



NATÁLIA DAMARIO

**“ESTUDO DE ADULTERAÇÃO DE QUEIJOS: espectrometria de
massas por uma abordagem inovadora”**

**“STUDY OF CHEESE ADULTERATION: an innovative approach for
mass spectrometry”**

**CAMPINAS
2014**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

NATÁLIA DAMARIO

**“ESTUDO DE ADULTERAÇÃO DE QUEIJOS: espectrometria de
massas por uma abordagem inovadora”**

**“STUDY OF CHEESE ADULTERATION: an innovative approach for
mass spectrometry”**

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Ramos Catharino

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas para obtenção de título de Mestre em Ciências Médicas, área de concentração em Ciências Biomédicas.

Master's dissertation presented to the Medical Sciences Postgraduation Programme of the School of Medical Sciences of the University of Campinas to obtain the MSc grade in Sciences.

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA
DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA NATÁLIA
DAMARIO E ORIENTADO PELO PROF. DR. RODRIGO RAMOS
CATHARINO.**

Assinatura do Orientador

**CAMPINAS
2014**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

D18e Damario, Natália, 1988-
Estudo de adulteração de queijos : espectrometria de massas por uma abordagem inovadora / Natália Damario. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Rodrigo Ramos Catharino.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Adulteração de alimentos. 2. Queijo. 3. Espectrometria de massas. I. Catharino, Rodrigo Ramos, 1977-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Study of cheese adulteration : an innovative approach for mass spectrometry

Palavras-chave em inglês:

Food adulteration

Cheese

Mass spectrometry

Área de concentração: Ciências Biomédicas

Titulação: Mestra em Ciências Médicas

Banca examinadora:

Rodrigo Ramos Catharino [Orientador]

Marcelo Lancellotti

Célia Regina Garlipp

Data de defesa: 04-07-2014

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

NATÁLIA DAMARIO

Orientador (a) PROF(A). DR(A). RODRIGO RAMOS CATHARINO

MEMBROS:

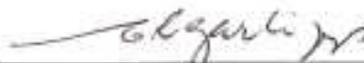
1. PROF(A). DR(A). RODRIGO RAMOS CATHARINO



2. PROF(A). DR(A). MARCELO LANCELLOTTI



3. PROF(A). DR(A). CÉLIA REGINA GARLIPP



Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas

Data: 04 de julho de 2014

RESUMO

O alto consumo global de queijos e a flutuação de disponibilidade e preço destes produtos lácteos os tornam alvos de fraudes. Uma das mais comuns é a adulteração de leites de alto valor agregado, como os de cabra e ovelha, com o então menos valioso leite de vaca, posteriormente vendido como matéria-prima para a indústria de queijo. Esta prática cria a necessidade de técnicas sensíveis para avaliar a autenticidade de queijos, incentivando o desenvolvimento e melhoria de métodos analíticos. Neste caminho, nós trazemos esta abordagem empregando a *Direct Imprinting in Glass Surface Mass Spectrometry* (DIGS-MS) para análise qualitativa de queijo em um instrumento MALDI. Esse método inclui uma preparação de amostra simples e eficaz além de rápida aquisição e interpretação de dados. A abordagem comprovou identificar prontamente lipídios de massas grandes em diferentes tipos de queijo, que podem ser associados a marcadores de qualidade. Também representa um potencial para controlar não só o produto final, mas também etapas produtivas, através da integração de dados estatísticos e analíticos, resultando em uma combinação poderosa para a discriminação de amostras com base no perfil lipídico. A ausência do efeito de matriz em toda cadeia analítica garante maior limpeza de sinal de espectros de massa e simplifica o processo.

ABSTRACT

High global consumption of cheeses and their availability and price fluctuations make these foodstuffs targets for frauds. One of the most common is the adulteration of highly priced milk (goat and sheep) with less valuable cow milk, which is sold as raw material for cheese industry. This creates the need for sensitive techniques to assess cheese authenticity by encouraging the development and improvement of analytical methods. In this path, we bring this approach employing Direct Imprinting in Glass Surface Mass Spectrometry (DIGS-MS) for qualitative cheese analysis in a MALDI instrument. This method includes simple and effective sample preparation and fast data acquisition and interpretation. It has proven to readily identify higher mass lipids in different types of cheese, which can be associated as quality markers. This can also represent potential to control not only the final product, but also productive stages, by integrating analytical and statistical data, resulting in a powerful combination for sample discrimination based on lipid profiles. The absence of matrix effect in the whole analytical chain ensures greater signal cleanliness of mass spectra and simplifies the process.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
DEDICATÓRIA.....	ix
AGRADECIMENTOS.....	x
EPÍGRAFE.....	xii
INTRODUÇÃO GERAL.....	16
REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO.....	27
OBJETIVOS.....	30
CAPÍTULO 1 – Perfil lipídico de queijos por <i>Direct Imprinting in Glass Surface Mass Spectrometry (DIGS-MS)</i>.....	31
Abstract.....	32
Introdução.....	33
Materiais e Métodos.....	35
Resultados e Discussão.....	36
Conclusão.....	41
Agradecimentos.....	42
Referências.....	42
CONCLUSÃO GERAL.....	47

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Vera e Ayrton, meus guias, como forma de reconhecimento por todo amor, carinho e apoio, principalmente nos momentos em que duvidei do meu potencial. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por estar sempre comigo em minha caminhada, fazendo com que os obstáculos não fossem intransponíveis.

Agradeço ao meu orientador Dr. Rodrigo Ramos Catharino pela confiança depositada, pela amizade oferecida e pelo exemplo de profissional. Sem tua ajuda nada disso seria possível! Obrigada pelo apoio desde a graduação, nas conversas e no aconselhamento psico-profissional, e por aceitar ser nosso professor do Projeto Rondon, que se unindo ao Mestrado, resultou em um conjunto de experiências incríveis das quais vou carregar para sempre. SEEEEEL-VA!

Agradeço aos meus pais, Vera e Ayrton, pela pessoa que sou hoje e por tudo que conquistei. Isso explica porque nos momentos em que pensei optar por um caminho diferente ao da opinião de vocês, preferi ouvi-los, simplesmente por confiar que seria o melhor. Hoje tenho certeza de que ouvi-los foi a melhor opção a se fazer. Obrigada pela confiança, amor, carinho, broncas (às vezes) e principalmente paciência! Obrigada por retribuir o orgulho que sentem de mim! Amo vocês incondicionalmente!

Ainda, aos queridos amigos do Laboratório Innovare. Este lugar é demais simplesmente porque as pessoas são demais! Lívia, Diogo (parça), Mônica, Gustavo, Tati, Cibele, obrigada por todo apoio e paciência, por me acompanharem até a noite nos experimentos, por me ensinarem a mexer em tudo que existe ali dentro, pelas risadas e pelos bons momentos vividos! Li, que venham mais congressos no Nordeste!

Ao meu namorado, Daniel, por sempre me incentivar a não desistir, pelo amor e companheirismo.

Aos amigos que sempre torceram para que tudo isso terminasse bem! Em especial, à Carol Valle (*in memoriam*) que sempre dizia ter orgulho da amiga que um dia chamaria de Mestra! Carol, “tamo junto, beijinho”, essa é pra você! E ainda, à minha atual chefe, Janette Cutrona, por me apoiar neste projeto e me ajudar a conciliar as atividades da Unilever e da Unicamp.

Obrigada a todos. De coração!

EPÍGRAFE

*“Cada sonho que você deixa para trás é um pedaço do seu futuro que
deixa de existir.”*

*“A única maneira de fazer um bom trabalho é amando o que você faz. Se
você ainda não encontrou, continue procurando. Não se desespere. Assim
como no amor, você saberá quando tiver encontrado”.*

Steve Jobs

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA	Albumina do soro bovino (<i>bovine serum albumine</i>)
CID	Dissociação induzida por colisão (<i>collision-induced dissociation</i>)
CN	Número de carbonos (<i>carbon number</i>)
DB	Ligações duplas (<i>double bounds</i>)
DIGS	Impressão direta em superfície de vidro (<i>direct imprinting in glass surface</i>)
DIOS	Ionização por dessorção direta de composto em silicone (<i>direct compound desorption/ionization on silicon</i>)
ESI	Ionização por elétron-spray (<i>electrospray ionization</i>)
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (<i>Food and Agriculture Organization of United Nations</i>)
IR	Infravermelho (<i>infrared</i>)
MALDI	Ionização por dessorção a laser assistida por matriz (<i>matrix-assisted laser desorption/ionization</i>)
MS	Espectrometria de massas (<i>mass spectrometry</i>)
MS/MS	Espectrometria de massas em <i>tandem</i>
PCA	Principal Component Analysis
TAG	Triacilglicerol
TOF	Tempo de voo (<i>time of light</i>)
USDA	Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (<i>United States Department of Agriculture</i>)
UV	Ultravioleta (<i>ultraviolet</i>)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ionização por MALDI.....	19
Figura 2	Espectro de Aflatoxinas B1 (m/z 335), B2 (m/z 337), G1 (m/z 351) e G2 (m/z 353) realizado pela técnica de MALDI.....	20
Figura 3	Esquema produtivo de queijos.....	24
Figura 4	Maiores exportadores mundiais de queijo em 2010 segundo a FAO..	26
Figura 5	Espectros de amostras de queijo de diferentes espécies. Dados foram adquiridos no modo de íon positivo na faixa de 600-950 de m/z.....	38
Figura 6	Gráfico de PCA para as amostras dos diferentes tipos de queijos.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Marcadores de lipídios específicos para cada queijo, conforme indicado pelo PCA e dados de MS/MS.....	40
-----------------	---	----

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Espectrometria de Massas e a Metabolômica em Alimentos

Avanços recentes em instrumentação e o desenvolvimento de novas e revolucionárias técnicas revitalizaram acentuadamente a Espectrometria de Massas (MS), que constitui hoje uma das mais abrangentes técnicas instrumentais em ciência, com amplas aplicações em diversas plataformas “ômicas”, tais como genômica, transcriptômica, proteômica, entre outras. Com seus novos horizontes, e amplas perspectivas de desenvolvimento, a MS vem se consolidando como uma ferramenta extremamente versátil e essencial em ciência. Desde pesquisas aplicadas até as mais fundamentais, a MS tem exercido papel de grande destaque, com crescente atuação na área da mais nova “ômica”: a metabolômica (1).

A metabolômica corresponde à análise das moléculas do metaboloma. Metaboloma é o conjunto dos produtos finais resultante da diversidade das atividades enzimáticas, integrando as respostas aos estímulos externos (mecânicos ou químicos) num tecido ou conjunto de células específicas (2), ou seja, é o conjunto das moléculas de baixo peso molecular geradas pelo metabolismo primário e intermediário dos seres vivos. Uma vez conhecida a composição dos metabólitos através de diferentes técnicas, poderemos prever, por exemplo, a ativação de determinados genes (nos casos de regulação conhecida), avaliar o risco imediato para determinadas substâncias tóxicas em alimentos ou identificar novos biomarcadores que serão utilizados no rastreamento da origem de novos constituintes nutricionais e no conhecimento dos mesmos (2, 3).

A metabolômica em alimentos ocupa um lugar de destaque na era moderna (4). A preocupação em relação aos alimentos deixou de ser apenas a prevenção de sua deterioração e extensão de sua vida de prateleira, mas se concentra hoje nos macronutrientes e micronutrientes que os compõem (água, carboidratos,

proteínas, lipídios, vitaminas e sais minerais). As evidências crescentes que demonstram uma estreita relação entre a dieta e as doenças humanas têm levado a grandes investimentos em países desenvolvidos e intensas atividades de pesquisa em metabolômica, tanto governamentais como particulares (4,5). As propriedades médico-preventivas, além do valor nutricional dos constituintes naturais dos alimentos, de um lado, e os efeitos tóxicos de constituintes e contaminantes do outro, tornaram prioritário o conhecimento da total composição química dos alimentos através do emprego das mais diversas técnicas instrumentais utilizando a ferramenta omica (5). Nos países cujo coeficiente de desenvolvimento é maior, hoje não é mais permitida a comercialização de alimentos sem que a sua composição seja do conhecimento do consumidor. Os benefícios decorrentes da diminuição do sofrimento humano e dos gastos com medicamentos e atendimento hospitalar, aliados à maior produtividade que resulta em uma população mais sadia, retribuem os investimentos nas pesquisas visando proporcionar uma dieta adequada e saudável para a população, esforços que requerem aplicação constante da ferramenta metabolômica em alimentos (4).

Um país que deseja entrar na modernidade e garantir seu lugar em um mercado internacional cada vez mais competitivo deve ter grupos de pesquisa e desenvolvimento capazes de realizar análises essenciais para garantir a qualidade e a segurança dos alimentos, avaliar e desenvolver métodos analíticos adequados para as necessidades do país e a natureza dos seus produtos, e ainda, de gerar um banco de dados sobre os diversos metabólitos existentes nos alimentos comercializados ou potencialmente comercializáveis. Esta infraestrutura garante à população alimentos nutritivos, seguros e de alta qualidade, além de evitar a rejeição dos produtos exportados. A análise metabolômica é também o primeiro passo para utilização eficiente das riquezas naturais (4).

Dados sobre os diversos metabólitos existentes nos alimentos têm como usuários indústrias, institutos governamentais, instituições de ensino e pesquisa, hospitais, serviços de informação à comunidade, sendo necessárias as atividades de milhares de profissionais como cientistas, engenheiros, tecnólogos,

nutricionistas, médicos, farmacêuticos, economistas, professores e profissionais de marketing (4,6).

No Brasil existe escassez de dados em pesquisa de metabolômica como ferramenta para o controle e rastreabilidade de alimentos (6). A população está, portanto, exposta ao consumo de alguns alimentos de qualidade não controlada, inclusive quanto ao valor nutricional, presença de contaminantes tóxicos e adulterações. Desta forma, o uso da análise metabolômica suportada por técnicas instrumentais rápidas com alta precisão, exatidão e versatilidade tornam-se indispensáveis na área de alimentos. As técnicas de MS ocuparam um papel de destaque na última década, por exatamente preencherem tais requisitos (6). Assim, aliar a metabolômica à técnica de MS torna-se uma tarefa de suma importância tecnológica e econômica para o Brasil.

1.2 Técnicas de Espectrometria de Massas para Determinação de Substâncias em Alimentos utilizando a Plataforma Metabolômica

Embora a espectrometria de massas tenha sido consolidada há vários anos pelas técnicas de ionização por elétrons e ionização química, estas eram limitadas quanto à aplicação em biomoléculas e em alimentos.

No início dos anos 90, duas técnicas de ionização foram desenvolvidas, o que ampliou a gama de aplicações de MS. Estas duas técnicas foram chamadas MALDI e ESI (7,8). Através de conceitos simples, mas revolucionários, moléculas termolábeis, íons em solução, complexos organometálicos, polímeros e moléculas de elevadas massas moleculares (até 1Mu ou mais), ou seja, espécies antes não adequadas às técnicas clássicas de ionização em MS, podem hoje ser analisadas com facilidade por MALDI-MS e/ou por ESI-MS (7). Massas moleculares de proteínas e outras macromoléculas têm sido determinadas com alta precisão, além de inúmeras novas aplicações para moléculas menores de diversas classes. Estas novas técnicas de ionização têm assim projetado a MS também na área de alimentos de forma nunca antes possível (7).

1.2.1 MALDI-MS

Essa técnica de ionização preconiza essencialmente a utilização de uma matriz, composta de moléculas orgânicas de caráter ácido e baixo peso molecular, para o recobrimento da amostra, porém para o trabalho em questão a matriz química é substituída por uma matriz “física”, como será descrito posteriormente. Um feixe de laser (infravermelho ou ultravioleta) incide e vaporiza a amostra recoberta com matriz (Figura 1) e esta, por suas características químicas, auxilia a ionização dos analitos presentes na amostra através da doação ou retirada de íons H^+ , podendo gerar íons positivos do tipo $[M + H]^+$ ou negativos do tipo $[M - H]^-$. As moléculas ionizadas e no estado gasoso são analisadas e, posteriormente, detectadas (9). Muitas análises de diferentes alimentos podem ser feitas através desta técnica, a exemplo da Figura 2.

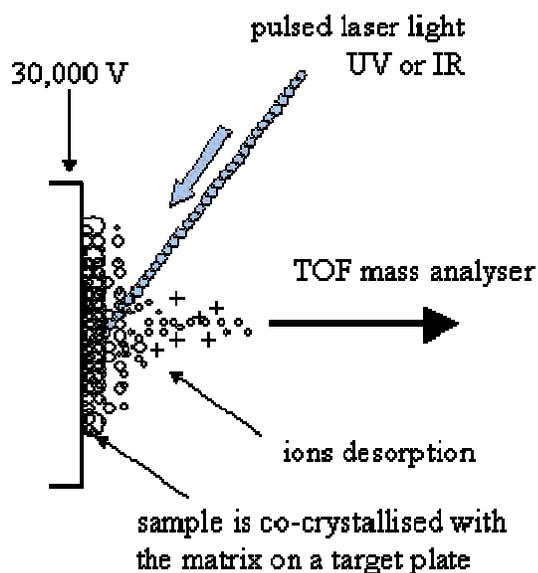


Figura 1 - Ionização por MALDI.

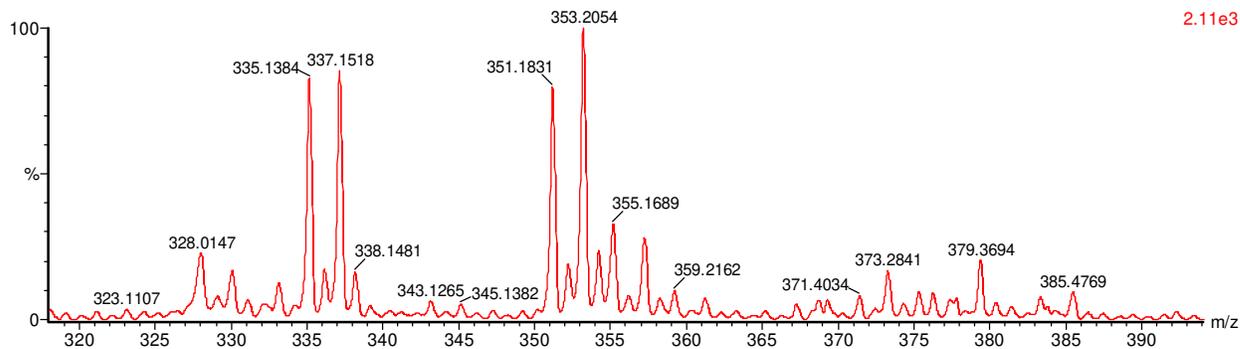


Figura 2 - Espectro de Aflatoxinas B1 (m/z 335), B2 (m/z 337), G1 (m/z 351) e G2 (m/z 353) realizado pela técnica de MALDI.

1.3 Leite

Segundo o USDA (*United States Department of Agriculture*), a produção brasileira de leite em 2010 foi de aproximadamente 29,4 mil toneladas, um dos maiores produtores mundiais, atrás apenas da União Européia, Índia e Estados Unidos (10).

O leite é um alimento extremamente complexo. Parte de seus componentes é produzida pelas células secretoras da glândula mamária dos animais mamíferos e outra porção é oriunda da corrente sanguínea dos mesmos. O fluido secretado pelas fêmeas dos mamíferos, cuja principal função é fornecer os requerimentos nutricionais de seus filhotes, deve suprir as suas necessidades energéticas (lipídios e carboidratos), protéicas (aminoácidos), vitamínicas e de minerais. A ordenha ininterrupta de bovinos saudáveis apresenta em média 3,7% de gordura, 3,4% de proteína, 4,8% de lactose, 0,7% de cinzas e 12,7% de sólidos totais (11).

Os lipídios do leite, comumente chamados de gordura, formam uma emulsão com a fração aquosa do leite. Tomando como exemplo o leite bovino, os triglicerídeos representam a maior fração dos lipídios presentes, aproximadamente 98%. Diglicerídeos, monoglicerídeos, ácidos graxos, fosfolípidos e colesterol também estão presentes em menor quantidade. A lactose, um dissacarídeo formado por uma molécula de galactose e uma de glicose, é o principal

carboidrato do leite. As proteínas do leite estão distribuídas em duas frações distintas: caseínas e proteínas do soro. A caseína corresponde a 80% do total protéico no leite bovino, e pode ser subdividida em quatro frações principais, α_{s1} , α_{s2} , β e κ -caseína, que se agrupam na forma de micelas. As proteínas do soro apresentam formato globular, sendo que as principais encontradas no leite bovino são: β -lactoglobulina, α -lactoalbumina, albumina do soro bovino (BSA) e imunoglobulinas. O leite bovino também possui uma quantidade significativa de minerais, dos quais se destacam o cálcio, o fosfato e o citrato, além de vitaminas dos complexos B e A (12).

O leite contém diversas enzimas naturais. Entre elas destacam-se a fosfatase alcalina e a lactoperoxidase por serem marcadores de um adequado processamento térmico. O ponto de inativação da fosfatase alcalina (binômio tempo-temperatura) é similar ao requerido para a destruição dos microorganismos patogênicos mais resistentes ao tratamento, sendo assim, sua inativação garante um produto inócuo para o consumidor. A lactoperoxidase é uma das enzimas mais termorresistentes encontradas no leite e sua inativação é usada como marcador de utilização de temperaturas mais elevadas em processos de pasteurização (11,13).

Designado para a completa nutrição de filhotes de mamíferos em fase de crescimento, o leite também é um meio adequado para o crescimento acelerado de ampla variedade de microorganismos. A abundância de carboidratos, proteínas e gorduras combinados com o pH próximo da neutralidade favorecem o desenvolvimento da flora microbiana (14).

Diversos fatores afetam a qualidade final do leite. Os fatores intrínsecos incluem a raça do animal, o período de lactação, o número de partições, e a dieta oferecida. Os fatores extrínsecos, por sua vez, são aqueles capazes de afetar a qualidade do produto após sua produção, como por exemplo, o manejo e a higiene da ordenha, a velocidade e a temperatura de resfriamento, transporte e armazenamento do leite antes de seu processamento (15).

A alimentação do animal também interfere na produção de leite. A baixa ingestão de matéria seca diminui a produção de leite, da mesma forma que a

baixa ingestão energética (15). A forma de apresentar a ração para os animais também altera a produção de leite (16). Isto se deve ao fato do animal necessitar ingerir uma dieta balanceada. Contudo, alimentos energéticos, ricos em gordura (silagem), são muito mais palatáveis que aqueles ricos em fibras (capim). Quando estes são apresentados separadamente, os animais aumentam a ingestão de silagem e diminuem a ingestão de fibras, tornando suas dietas desbalanceadas. Sistemas que misturam os ingredientes da dieta antes de apresentá-la no cocho, conhecidas como TMR (do inglês *Total Mixed Ration*), e que, conseqüentemente, dificultam a separação de seus componentes pelos animais são os mais adequados para animais de alta produção (17).

A lactação é um processo totalmente dependente da produção hormonal do animal. Sendo assim, os animais sexualmente mais maduros são os mais aptos à produção de leite. Khan e Shook (18) relatam que animais mais velhos tendem a apresentar uma maior produção em todas as lactações, contudo este efeito tende a diminuir com o avanço das lactações.

1.4 Queijo

Os primeiros relatos de fabricação do queijo datam de 8000 anos atrás, da região entre os rios Tigres e Eufrates, denominada Crescente Fértil. Este produto é um dos componentes clássicos da dieta humana. Durante este período, o volume e a diversidade de produtos aumentou ao ponto de, hoje, a produção anual ser de aproximadamente 15×10^6 toneladas, ou o equivalente a 35% do total de leite produzido no mundo (12).

Queijo é o termo genérico utilizado para denominar um grupo de produtos fabricados a partir da fermentação do leite, que possuem uma grande diversidade de sabores e aromas. Sandine e Elliker (19) sugerem que deve haver mais de 1000 variedades de queijos no mundo. Walter e Hargrove (20) descrevem por volta de 400 variedades de queijo e apresentam uma lista com mais de 400 nomes de produtos deste grupo. Burkhalter (21) por sua vez classifica 510 variedades de queijo.

O queijo é um dos alimentos mais complexos e dinâmicos produzidos pelo homem, com variações ao longo do tempo quanto à sua microbiota, reologia, atividades químicas e bioquímicas, bem como alterações em suas propriedades sensoriais (12).

Tecnologicamente, a fabricação do queijo tem início com a desestabilização das micelas de caseína obtida através da redução do pH pela ação de bactérias fermentadoras ou adição de ácido ao leite. A caseína desestabilizada precipita e forma uma rede a qual glóbulos de gordura ficam retidos em seu interior (12).

O desenvolvimento das diversas características de cada variedade de queijo ocorre, principalmente, no período de maturação no qual as variações nos processos de fabricação (culturas fermentativas diferentes, adição de bolores, lavagem da massa, tipo de salga, entre outros) levarão às atividades lipolíticas e proteolíticas diversas durante o período de maturação. Os três eventos enzimáticos responsáveis pela maturação são a proteólise, a lipólise e a glicólise (22). As reações primárias dizem respeito à hidrólise das macromoléculas tais como: proteínas, gordura e lactose em compostos menores que são peptídeos, ácidos graxos livres e ácido láctico, respectivamente (12,23). As reações secundárias permitem a degradação dos produtos gerados pelas reações primárias em moléculas mais simples. As enzimas envolvidas na maturação são numerosas: coalho residual, enzimas endógenas do leite como a plasmina e as enzimas liberadas pelo fermento láctico e pelos microorganismos contaminantes (22,24). Um resumo das etapas de produção de queijos está ilustrado na Figura 3.

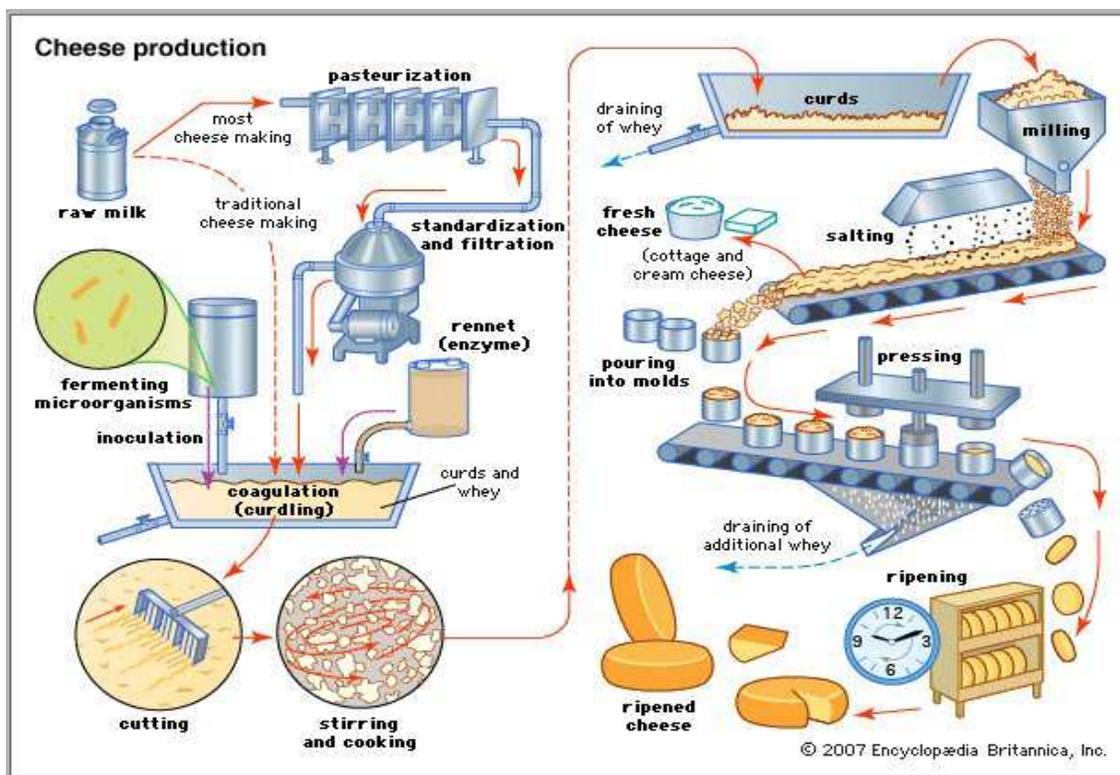


Figura 3 – Esquema produtivo de queijos.

Dentre os três eventos da maturação, a proteólise é o mais importante (24). Ela contribui para o desenvolvimento do aroma e sabor característicos e para a redução da firmeza do produto, que se traduz pelo seu amaciamento. Na verdade, o queijo recentemente fabricado apresenta uma textura borrachenta que é amaciada principalmente durante os quinze primeiros dias de maturação. Segundo Gerrard (25), as propriedades de textura dos alimentos dependem da matriz tridimensional conferida pelo estado das ligações proteína-proteína que sofrem proteólise. Gorostiza (26) observou que a hidrólise da α_{s1} - e β -caseína foram similares em vários queijos e que a α_{s1} -caseína foi hidrolisada mais extensivamente (65%) que a β -caseína (20%). Essa degradação é o resultado da ação do coalho residual e da plasmina. E como resultado da hidrólise da ligação Phe24 e Val25 da α_{s1} -caseína, tem-se a formação da α_{s1} -I-caseína. Essa quebra específica é responsável pela diminuição da firmeza que ocorre no estágio inicial da maturação dos queijos (27).

Durante a maturação, Schultz (28) e Spadoti (29) observaram a diminuição da firmeza do queijo Prato. Schultz (29) correlacionou esta redução de firmeza com a degradação progressiva da matriz protéica pela hidrólise da α_{s1} -caseína com a conseqüente formação da α_{s1} -I-caseína através do perfil eletroforético do queijo Prato durante 42 dias de maturação.

Para os queijos, a proteólise é amplamente usada para avaliar a evolução da maturação. Dois índices são calculados a partir da quantificação das frações nitrogenadas pelo método de Kjeldahl. O primeiro é o índice de extensão de maturação (IEM), que reflete a proporção de grandes peptídeos produzidos pela proteólise primária. A sua determinação analítica é feita após a precipitação isoelétrica da caseína em pH 4,6. O índice de extensão de maturação é calculado a partir da porcentagem do teor de nitrogênio solúvel em pH 4,6 em relação ao nitrogênio total. O segundo é o índice de profundidade de maturação (IPM), definido segundo a proporção de moléculas menores geradas pela proteólise secundária. Após a precipitação das proteínas em TCA 12%, o índice de profundidade de maturação é calculado a partir da porcentagem do teor de nitrogênio solúvel em TCA 12% em relação ao nitrogênio total (23).

1.4.1 Queijos no mundo

Segundo a FAO (*UN Food & Agriculture Organization*) 20 milhões de toneladas de queijos foram produzidas em todo o mundo em 2011. Estes dados de alta produtividade comprovam que os queijos são o alimento agrícola mais importante mundialmente, já que são responsáveis pela maior movimentação financeira na área (30). A Figura 4 mostra os maiores exportadores mundiais de 2010, em dólares.

Top 10 exportadores de queijo – 2010	
(valor em '000 US\$)	
Mundo	25,207,664
 União Européia	19,567,862
 Alemanha	3,995,010
 França	3,534,620
 Holanda	3,239,085
 Itália	2,201,038
 Dinamarca	1,350,514
 Nova Zelândia	1,041,534
 Bélgica	792,887
 Irlanda	743,818
 Estados Unidos	701,854
 Austrália	682,834

Figura 4 – Maiores exportadores mundiais de queijo em 2010 segundo a FAO.

Alimentos que possuem um alto volume de consumo globalmente, portanto movimentam grandes volumes em dólares, necessitam de atenção e cuidados no que diz respeito à penetração de mercados e consumidores, já que estes são grandes alvos para fraudes. Para tais alimentos, práticas de adulteração são extremamente rentáveis, portanto o foco em estudos e desenvolvimento de técnicas analíticas cada vez mais sensíveis contra estas adulterações faz-se cada vez mais necessário neste cenário mundial.

2. REFERÊNCIAS

- (1) Lv YH, Liu XR, Yan SK, Liang X, Yang Y, Dai WX, Zhang WD. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2010;52:129-35.
- (2) Kaddurah-Daouk R, Kristal BS, Weinshilboum RM. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2008;48:653-83.
- (3) Sabatine MS, Liu E, Morrow DA, Heller E, McCarroll R, Wiegand R et al. *Circulation*. 2005;112:3868-75.
- (4) Scalbert A, Brennan L, Fiehn O, Hankemeier T, Kristal BS, van Ommen B et al. *Metabolomics*. 2009;5:435-58.
- (5) Dragsted LO. *Meat Science*. 2010;84:301-7.
- (6) Cevallos-Cevallos JM, Reyes-De-Corcuera JI, Etxeberria E, Danyluk M D, Rodrick GE. *Trends in Food Science & Technology*. 2009;20:557-66.
- (7) Stewart II. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 1999;54:1649-95.
- (8) Loo JA. *Mass Spectrometry Reviews*. 1997;16:1-23.
- (9) Kussmann M, Nordhoff E, RahbekNielsen H, Haebel S, RossellLarsen M, Jakobsen L et al. *Journal of Mass Spectrometry* 1997;32:593-601.
- (10) United States Department of Agriculture. *Dairy: World Markets and Trade*. Washington DC: USDA; 2010.
- (11) Fox PF, McSweeney PLH. *Dairy Chemistry and Biochemistry*. London: Blackie Academic & Professional, an imprint of Chapman & Hall; 1998. 463p.
- (12) Fox PF, Guinee TP, Cogan TM, McSweeney PLH. *Fundamentals of cheese science*. Aspen: Gaithersburg; 2000. 587p.
- (13) Walstra P, Geurts TJ, Noomen A, Jellema A, van Boekel MAJS. *Dairy Technology, Principles of Milk Properties and Processes*. New York City: Marcel Dekker Inc.; 1999. 317p.
- (14) Hayes MC, Boor K. Raw milk and fluid milk products. In: Marth EH, Steele JL (eds.). *Applied dairy microbiology*, 2.ed. New York City: Marcel Dekker Inc.; 2001. p59-76.

- (15) Palmquist DL, Beaulieu AD, Barabano DM. Feed and animal factors influencing milk fat composition. *J Dairy Sci.* 1993;76:1753-71.
- (16) Beckman JL, Weiss WP. Nutrient Digestibility of Diets with Different Fiber to Starch Ratios when Fed to Lactating Dairy Cows. *Journal of Dairy Science.* 2005;88(3)1015-23.
- (17) Friggens NC, Emmans GC, Kyriazakis I, Oldham JD, Lewis M. Food intake relative to stage of lactation for dairy cows eating foods of high or low quality. *J Dairy Sci.* 1998;81:2228-39.
- (18) Khan MS; Shook GE. Effects of Age on Milk Yield: Time Trends and Method of Adjustment. *J Dairy Sci.* 1996;79:1057-64.
- (19) Sandin, WE, Elliker PR. Microbiologically induced flavours and fermented food flavours in fermented dairy products. *J Agric Food Chem.* 1970;18:557-62.
- (20) Walter HE, Hargrove RC. *Cheeses of the World.* New York: Dover Publications Inc.; 1972. 203p.
- (21) Burkhalter G. 1981. *Catalogue of cheese.* International Dairy Federation.
- (22) Fox PF. *Cheese: chemistry, physics and microbiology.* London: Chapman & Hall; 1993. v.2.
- (23) Walstra P. Fractal particle gels in foods, in *Supramolecular and colloidal structures in biomaterials and biosubstrates.* In: Lal M, Lillford PJ, Naik VM, Prakash V (eds.). London: Imperial College Press and The Royal Society; 2000. p157-73.
- (24) Fox PF. Proteolysis during cheese manufacturing and ripening. *Journal of Dairy Science.* 1989;72(6):1379–400.
- (25) Gerrard JA. Protein–protein crosslinking in food: methods, consequences, applications. *Trends in Food Science & Technology,* 2002;13:391-9.
- (26) Gorostiza A. Changes in soluble nitrogenous compounds, caseins and free amino acids during ripening of artisanal Prato cheese; a Brazilian semi-hard cows variety. *Food Chemistry,* 2004;85(3)407-14.

- (27) Creamer LK, Zoerb HF, Olson NF, Richardson T. Surface hydrophobicity of α_{s1} -I, α_{s1} -casein A and B and its implications in cheese structure. *J Dairy Sci.* 1982;65:902-6.
- (28) Schulz JG. Efeito da utilização de slurry sobre a maturação de queijo Prato [Dissertação]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2003.
- (29) Spatodi LM, Dornelas JRF, Roig SM. Evaluation of the melting of Prato cheese obtained by modifications of the traditional manufacturing process. *Le Lait.* 2003;83(5):397-408.
- (30) Food and Agriculture Organization of United Nations. Dairy production and products: dairy home. Rome: FAO; 2010.

3. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Análise de perfil lipídico diretamente nos queijos de diferentes espécies através da técnica de *Direct Imprinting in Glass Surface Mass Spectrometry* (DIOS-MS).

Objetivo Específico

Propor uma nova abordagem técnica com foco em identificar adulterações em queijos baseada em análise direta, rapidez, facilidade, prontidão de resultado, mínimo preparo de amostra e isenção do uso de matriz.

CAPÍTULO I

Perfil lipídico de queijos por *Direct Imprinting* *in Glass Surface Mass Spectrometry* (DIGS- MS)

Cheese Lipid Profile using Direct Imprinting in Glass Surface Mass Spectrometry

Natalia Damario; Diogo N. Oliveira; Mônica F. Siqueira; Rodrigo R. Catharino

ABSTRACT: High global consumption of cheeses and their availability and price fluctuations make these foodstuffs targets for frauds. One of the most common is the adulteration of highly priced milk (goat and sheep) with less valuable cow milk, which is sold as raw material for cheese industry. This creates the need for sensitive techniques to assess cheese authenticity by encouraging the development and improvement of analytical methods. In this path, we bring this approach employing Direct Imprinting in Glass Surface Mass Spectrometry (DIGS-MS) for qualitative cheese analysis in a MALDI instrument. This method includes simple and effective sample preparation and fast data acquisition and interpretation. It has proven to readily identify higher mass lipids in different types of cheese, which can be associated as quality markers. This can also represent potential to control not only the final product, but also productive stages, by integrating analytical and statistical data, resulting in a powerful combination for sample discrimination based on lipid profiles. The absence of matrix effect in the whole analytical chain ensures greater signal cleanliness of mass spectra and simplifies the process.

Keywords: cheese; laser desorption mass spectrometry; lipid markers

1. INTRODUCTION

Either for economic, ethical or public health reasons it is increasingly important to detect the placing on the market of lower quality and fraudulently labeled products. The adulteration of dairy products is relatively frequent and diverse.(Ana Cristina A. Veloso, Teixeira, Ferreira, & Ferreira, 2002) It is not unusual to find adulterations in the mixture of valuable – and highly priced – milk (goat or sheep) with lower value milk (cow).(Calvano, De Ceglie, Aresta, Facchini, & Zambonin, 2013; Calvano, De Ceglie, Monopoli, & Zambonin, 2012) This malpractice is usually performed in products destined for direct consumption or as cheese industry raw material. Fluctuations in the availability of goat and sheep milk and their higher price when compared to cow milk are the main causes for this adulteration, in a very profitable strategy.(Nicolaou, Xu, & Goodacre, 2011) In this way, determining *if* and *how* the raw material has been adulterated has great relevance, not only to ensure the genuineness of cheese with denomination of origin and of cheese manufactured with pure milk, but also to avoid the threat for consumers. Cow milk is known for its allergenic potential, especially due to the presence of proteins such as α_1 -casein and β -lactoglobulin.(Monaci, Tregogat, Hengel, & Anklam, 2006)

Numerous analytical techniques have been developed over the years to assess authenticity of dairy products made from different milk species. However, most of them show some difficulties, either in terms of sample preparation, price, time, or availability and matrices.(Chen, Chang, Chung, Lee, & Ling, 2004; Darwish, Allam, & Amin, 2009; Dias, Peres, Veloso, Reis, Vilas-Boas, & Machado, 2009; Enne,

Elez, Fondrini, Bonizzi, Feligini, & Aleandri, 2005; Fadzlillah, Rohman, Ismail, Mustafa, & Khatib, 2013; Hurley, Elyse Ireland, Coleman, & Williams, 2004; Rodriguez, Ortiz, Sarabia, & Gredilla, 2010; Ana C. A. Veloso, Teixeira, & Ferreira, 2002) Although the urgent need of sensitive techniques to assess authenticity of these products has encouraged the development and improvement of many analytical methods, it is still necessary to develop new techniques for faster analysis and improved result visualization. Based on this background, it is our understanding that developing improved methodologies must be based on the easiness of sample preparation and readiness for data acquisition/interpretation. The use of mass spectrometry in food science and adulteration findings has been described in some previous works.(Angeletti, Gioacchini, Seraglia, Piro, & Traldi, 1998; Careri, Bianchi, & Corradini, 2002; Cozzolino, Passalacqua, Salemi, & Garozzo, 2002; Muller, Bartak, Bednar, Frysova, Sevcik, & Lemr, 2008) Herein, we propose a new approach for this technique: direct imprinting in glass surface using laser desorption ionization coupled with mass spectrometry (DIGS-MS) in a MALDI instrument. This methodology uses no matrix in the process and requires minimal sample preparation, following a recent trend in our group in terms of direct analysis of complex samples. (de Oliveira, Siqueira, Sartor, & Catharino, 2013) Therefore, it ensures greater signal cleanliness in mass spectra, as well as assertive and effective data processing.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Sample Preparation

For this work, five different cheese samples were chosen to be analyzed: cow, sheep, goat, buffalo and mixed cheese (composed of cow, goat and sheep milk, in the proportions of 80, 10 and 10%, respectively), purchased from local grocery stores. The sample preparation was inspired on the method reported by Wei *et al.* (Wei, Buriak, & Siuzdak, 1999), in which a treated porous silicon plate is used as support for direct compound desorption/ionization on silicon (DIOS). Our approach has employed a glass plate with porous surface, which has been previously treated with sonication in a 50:50 solution of acetonitrile:methanol (J. T. Baker, Xalostoc, Mexico) so that no potential residues were adsorbed onto the surface. A piece of each cheese was pressed against the plate and then removed right away, just like a stamp, resulting in a very thin layer of lipids with the perfect width and distribution for direct analysis. The glass plate was then embedded on a MALDI plate and inserted in the equipment, without any further extraction steps or any matrix application either.

2.2 Mass Spectrometry

A MALDI-LTQ-XL (Thermo Fisher, California, USA) was used to acquire mass spectrometric data. The operation conditions were 20 μ J Nitrogen laser power, 100 μ m raster step size, sample size of 2000 \times 2000 μ m, three laser shots per step and normalized collision energy set at 50-70 for collision-induced dissociation (CID) in MS/MS experiments. Survey scan analyses (n = 5) were performed in m/z range of

600 to 950 (positive ion mode). The compound classes were proposed using the obtained MS/MS data and supported by software calculations with Mass Frontier (v. 6.0, Thermo Scientific, California, USA) as well as literature (Jandal, 1996; Park, 2009; Rodriguez-Alcala & Fontecha, 2010) and lipid database information.

2.3 Analytical and Statistical Data

Principal Component Analysis (PCA) was performed using Statistica v.7 (Statsoft Inc., Oklahoma, USA). Ions with relative intensities of less than ~10% were excluded. The data was preprocessed using auto scale and the PCA method was then run.

3. RESULTS AND DISCUSSION

Preliminary tests were conducted analyzing the plate with no sample added to assess background level and efficiency of the cleaning procedure. Since no spectra or signals were obtained in this phase, the plates were considered to be clear enough and hence suitable for experiments and data collection. Full scan in positive mode of each cheese was performed to identify larger mass compounds, such as triacylglycerols and phospholipids. Reinforcing previous concepts, some recent works have reported that the ionization of phospholipids happens at the expense of triacylglycerols, and can be substantially affected by the particular MALDI matrix used (Calvano, Ceglie, D'Accolti, & Zambonin, 2012). The present work was performed without matrix application, therefore, eliminating the

interference of matrix in the onset and resolution of signals. Figure 1 shows the sample spectra of (A) buffalo cheese; (B) mixed cheese; (C) goat cheese; (D) sheep cheese; (E) cow cheese.

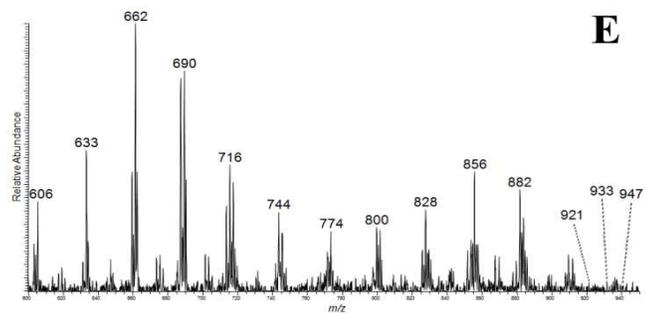
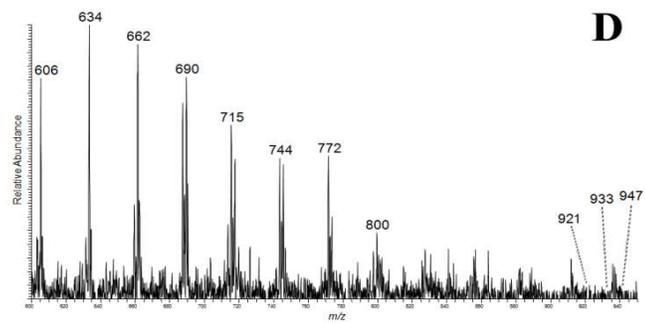
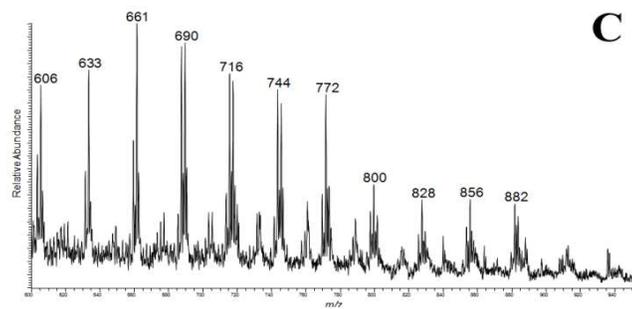
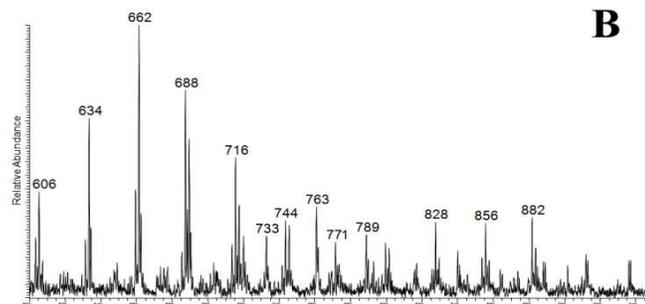
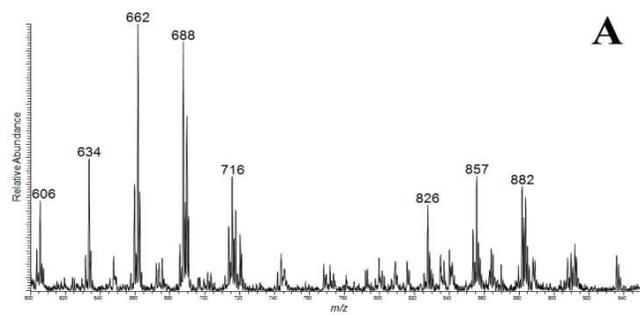


Fig. 5 – Sample spectra of (A) Buffalo’s cheese; (B) Mixed cheese; (C) Goat’s cheese; (D) Sheep’s cheese; (E) Cow’s cheese. Data were acquired in the positive ion mode at the m/z range of 600 – 950.

Multivariate data analysis (Principal Component Analysis – PCA) was performed using all cheese samples analyzed ($n = 5$), with results portrayed in Figure 2. Although these types of milk present a very similar lipid profile (Calvano, De Ceglie, Aresta, Facchini, & Zambonin, 2013), PCA has enabled the differentiation of four classes of cheese, which are clearly separated. Cow and sheep samples presented very close similarities, and thus were not separated with PCA.

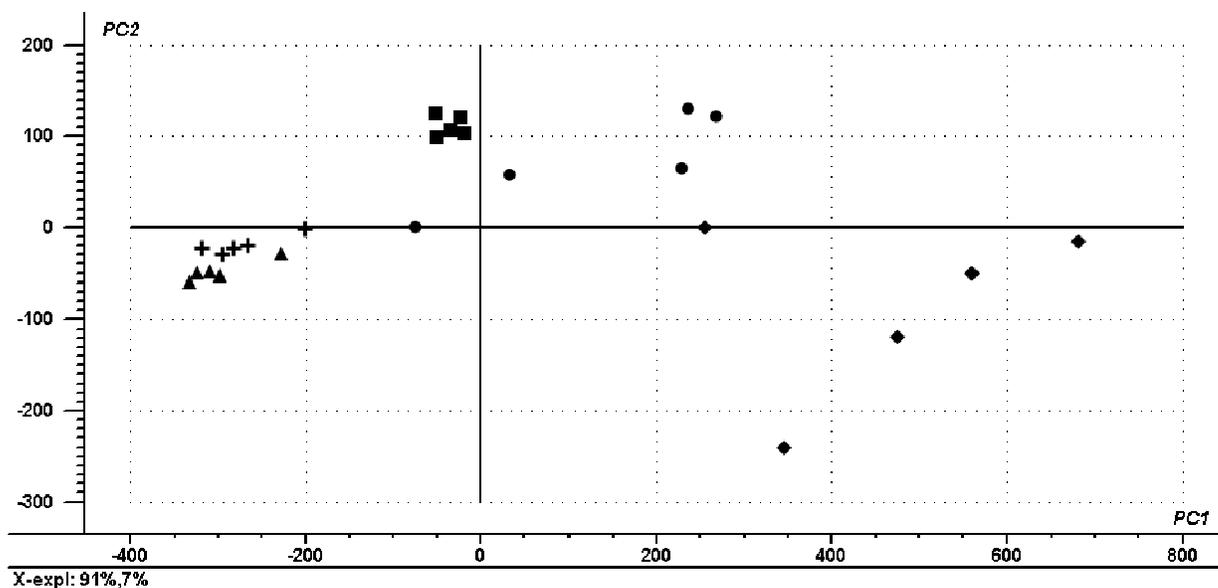


Fig. 6 – Score plots of PCA for cheese samples: (■) Buffalo’s cheese; (●) Mixed cheese; (◆) Goat’s cheese; (▲) Sheep’s cheese; (+) Cow’s cheese.

Table 1 reports the assignments for some of the characteristic ions of each sample class. These results are based on the MS/MS spectra obtained through CID reactions and their comparison to characteristic fragmentations predicted by calculations performed with Mass Frontier software.

Table 1 - Specific lipid markers for each cheese as indicated by PCA and MS/MS data.

Sample	[M+H ⁺] <i>m/z</i>	Lipid Class	Structural Formula	CN:DB ^a	CID Fragmentation
Cow /	921	Triacylglycerol	C ₆₀ H ₁₀₄ O ₆	57:6	897, 702, 657, 511
Sheep	933	Triacylglycerol	C ₆₁ H ₁₀₄ O ₆	58:7	913, 855, 782, 623
	947	Triacylglycerol	C ₆₁ H ₁₁₈ O ₆	58:0	901, 800, 372, 887
Goat	633	Diacylglycerophosphate	C ₃₅ H ₆₉ O ₇ P	32:1	437, 323
	661	Phosphatidylethanolamine	C ₃₅ H ₆₈ NO ₈ P	30:1	434, 388, 643, 275
	716	Phosphatidylethanolamine	C ₄₀ H ₈₁ N ₂ O ₆ P	38:1	434, 351, 320, 515
Mixed	733	Glycerophosphoglycerol	C ₃₉ H ₇₃ O ₁₀ P	33:2	599, 716, 508, 480
	763	Phosphatidylcholine	C ₄₂ H ₈₄ NO ₈ P	34:0	720, 537, 509, 381
	771	Glycerophosphoglycerol	C ₄₂ H ₇₅ O ₁₀ P	36:4	755, 555, 432, 386
Buffalo	826	Phosphatidylcholine	C ₄₈ H ₉₂ NO ₇ P	40:3	647, 543, 310
	857	Triacylglycerol	C ₅₅ H ₁₀₀ O ₆	52:3	790, 599, 549
	881	Triacylglycerol	C ₅₇ H ₁₀₀ O ₆	54:5	824, 792, 625

^a carbon number : double bound

The proposed structures, however, cannot be assigned to a specific molecule, since these *m/z* ratios cannot be assigned to a single structure, as most of these markers show position isomers within the same lipid class. It was possible to observe that goat and mixed cheeses have presented phospholipids as the characteristic lipid markers that helped differentiating from the other classes. On

the other hand, TAGs were the main observed markers for cow, sheep and buffalo samples.

The main feature of DIGS-MS is to use a treated porous glass plate as the main support for lipid trapping and extraction. By applying samples directly onto the surface of the glass plate with no matrix application, we were able to obtain high quality spectra, with clean signal and no interference from matrix effects. This work has demonstrated to readily identify compounds of interest by integrating both full scan (Figure 1) and MS/MS data, with no further actions regarding sample preparation neither matrix application. This approach can be used for fast fingerprint of complex lipids, such as triacylglycerols and phosphoglycerols, for rapid lipid evaluation in dairy products, characterization of their compounds and adulteration findings.

4. CONCLUSIONS

For the first time we were able not only to identify complex lipids in cheese with direct mass spectrometric analysis, but also to differentiate all samples based on their lipid profiles. Cheese samples, namely cow, goat, sheep, buffalo and mixed cheese presented characteristic molecules within their lipid profiles, proving that our approach can be an important tool for industry to launch products of higher quality and for laboratories and governmental agencies to meet the needs for safety of consumers.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

INNOVARE Biomarkers Lab would like to acknowledge CAPES, FAPESP and INCT for the financial support that allowed this work to be developed.

6. REFERENCES

- Angeletti, R., Gioacchini, A. M., Seraglia, R., Piro, R., & Traldi, P. (1998). The potential of matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry in the quality control of water buffalo mozzarella cheese. *J Mass Spectrom*, 33(6), 525-531.
- Calvano, C. D., Ceglie, C. D., D'Accolti, L., & Zambonin, C. G. (2012). MALDI-TOF mass spectrometry detection of extra-virgin olive oil adulteration with hazelnut oil by analysis of phospholipids using an ionic liquid as matrix and extraction solvent. *Food Chem*, 134(2), 1192-1198.
- Calvano, C. D., De Ceglie, C., Aresta, A., Facchini, L. A., & Zambonin, C. G. (2013). MALDI-TOF mass spectrometric determination of intact phospholipids as markers of illegal bovine milk adulteration of high-quality milk. *Anal Bioanal Chem*, 405(5), 1641-1649.
- Calvano, C. D., De Ceglie, C., Monopoli, A., & Zambonin, C. G. (2012). Detection of sheep and goat milk adulterations by direct MALDI-TOF MS analysis of milk tryptic digests. *J Mass Spectrom*, 47(9), 1141-1149.

- Careri, M., Bianchi, F., & Corradini, C. (2002). Recent advances in the application of mass spectrometry in food-related analysis. *Journal of Chromatography A*, 970(1–2), 3-64.
- Chen, R. K., Chang, L. W., Chung, Y. Y., Lee, M. H., & Ling, Y. C. (2004). Quantification of cow milk adulteration in goat milk using high-performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 18(10), 1167-1171.
- Cozzolino, R., Passalacqua, S., Salemi, S., & Garozzo, D. (2002). Identification of adulteration in water buffalo mozzarella and in ewe cheese by using whey proteins as biomarkers and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *J Mass Spectrom*, 37(9), 985-991.
- Darwish, S. F., Allam, H., & Amin, A. (2009). Evaluation of PCR assay for detection of cow's milk in water buffalo's milk. *World Applied Sciences Journal*, 7(4), 461-467.
- de Oliveira, D. N., Siqueira, M., Sartor, S., & Catharino, R. (2013). Direct analysis of lipsticks by Sorptive tape-like extraction laser desorption/ionization mass spectrometry imaging. *International Journal of Cosmetic Science*, 35(5), 467-471.
- Dias, L. A., Peres, A. M., Veloso, A. C. A., Reis, F. S., Vilas-Boas, M., & Machado, A. A. S. C. (2009). An electronic tongue taste evaluation: Identification of

goat milk adulteration with bovine milk. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 136(1), 209-217.

Enne, G., Elez, D., Fondrini, F., Bonizzi, I., Feligini, M., & Aleandri, R. (2005). High-performance liquid chromatography of governing liquid to detect illegal bovine milk's addition in water buffalo Mozzarella: comparison with results from raw milk and cheese matrix. *J Chromatogr A*, 11, 1-2.

Fadzillillah, N. A., Rohman, A., Ismail, A., Mustafa, S., & Khatib, A. (2013). Application of FTIR-ATR Spectroscopy Coupled with Multivariate Analysis for Rapid Estimation of Butter Adulteration. *J Oleo Sci*, 62(8), 555-562.

Hurley, I. P., Elyse Ireland, H., Coleman, R. C., & Williams, J. H. H. (2004). Application of immunological methods for the detection of species adulteration in dairy products. *International Journal of Food Science & Technology*, 39(8), 873-878.

Jandal, J. (1996). Comparative aspects of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, 22(2), 177-185.

Monaci, L., Tregoat, V., Hengel, A., & Anklam, E. (2006). Milk allergens, their characteristics and their detection in food: A review. *European Food Research and Technology*, 223(2), 149-179.

Muller, L., Bartak, P., Bednar, P., Frysova, I., Sevcik, J., & Lemr, K. (2008). Capillary electrophoresis-mass spectrometry - a fast and reliable tool for the monitoring of milk adulteration. *Electrophoresis*, 29(10), 2088-2093.

- Nicolaou, N., Xu, Y., & Goodacre, R. (2011). MALDI-MS and multivariate analysis for the detection and quantification of different milk species. *Anal Bioanal Chem*, 399(10), 3491-3502.
- Park, Y. W. (2009). Overview of bioactive components in milk and dairy products. *Bioactive Components in Milk and Dairy Products*, 3-12.
- Rodriguez-Alcala, L. M., & Fontecha, J. (2010). Major lipid classes separation of buttermilk, and cows, goats and ewes milk by high performance liquid chromatography with an evaporative light scattering detector focused on the phospholipid fraction. *J Chromatogr A*, 30(18), 3063-3066.
- Rodriguez, N., Ortiz, M. C., Sarabia, L., & Gredilla, E. (2010). Analysis of protein chromatographic profiles joint to partial least squares to detect adulterations in milk mixtures and cheeses. *Talanta*, 81(1-2), 255-264.
- Veloso, A. C. A., Teixeira, N., & Ferreira, I. M. P. L. V. O. (2002). Separation and quantification of the major casein fractions by reverse-phase high-performance liquid chromatography and urea–polyacrylamide gel electrophoresis: Detection of milk adulterations. *Journal of Chromatography A*, 967(2), 209-218.
- Veloso, A. C. A., Teixeira, N., Ferreira, I. M. P. L. V. O., & Ferreira, M. A. (2002). Detecção de adulterações em produtos alimentares contendo leite e/ou proteínas lácteas. *Química Nova*, 25, 609-615.

Wei, J., Buriak, J. M., & Siuzdak, G. (1999). Desorption-ionization mass spectrometry on porous silicon. *Nature*, 399(6733), 243-246.

CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados apresentados segundo a técnica proposta mostraram:

- Rápida identificação de lipídios complexos como marcadores – aquisição em 30s;
- Isenção de preparo de amostra e aplicação de matriz – simplificação da análise com alta qualidade de resultado;
- Rápida discriminação de amostra por plotar dados multivariados.

De forma inédita foi possível identificar lipídios complexos nos queijos com análise de espectrometria de massas direta e diferenciar todas as amostras com base em seus perfis de lipídios.

Nossa abordagem pode ser uma ferramenta importante para:

- Verificação de adulteração;
- Indústrias lançarem produtos de qualidade superior;
- Laboratórios e agências governamentais atenderem às necessidades de segurança dos consumidores.