

Capítulo XI

Espectroscopia Ótica e de Massa na Caracterização de Leite e Derivados

Raquel Perobelli¹

Carla Aparecida da Silva¹

Déborah Demarque¹

Mariana Maselli¹

Jéssica Schaeffer Nogueira^{1,3}

Maria José Valenzuela Bell²

Paulo Henrique Fonseca da Silva³

Carla Christine Lange⁴

Nívea Maria Vicentini⁴

Virgílio Anjos^{2}*

¹ Alunas do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais – Brasil.

² Departamento de Física, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brasil;

³ Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brasil;

⁴ Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, Brasil.

*Autor para correspondência: virgilio.anjos@ufjf.br

Resumo

Leite e seus derivados são alimentos essenciais na dieta humana. Um controle rigoroso da qualidade e da autenticidade dos mesmos são primordiais de forma a garantir a saúde e satisfação dos consumidores. Dentre as várias técnicas analíticas possíveis a espectroscopia de absorção no infravermelho e a espectrometria de massa MALDI-TOF se destacam por sua praticidade e acurácia. Esta revisão apresenta algumas aplicações recentes em espectroscopia do infravermelho médio e infravermelho próximo em sistemas lácteos. Sob o ponto de vista da utilização de MALDI-TOF, a espectrometria será focada na identificação de constituintes do leite e seus derivados assim como na identificação e caracterização de microrganismos presentes nestes alimentos. No caso do leite, os analitos-alvo são em sua maioria as proteínas e peptídeos, e com menor frequência os lipídeos e fosfolipídeos. Para os microrganismos, a técnica de espectrometria de massa é utilizada com sucesso na identificação de microrganismos isolados e na diferenciação entre espécies. As aplicações apresentadas demonstram a relevância das espectroscopias, ótica e de massa, como ferramentas poderosas e modernas no monitoramento e análise dos vários segmentos que compõem a cadeia produtiva do leite.

Palavras-chave: absorção infravermelho; espectrometria de massa; leite; segurança alimentar; qualidade alimentar.

Introdução

Berzelius (1814) descreveu o leite como sendo composto por três frações: “gordurosa”, “caseosa” e “aquosa”. O leite foi destacado por Fox *et al.* (2015) como objeto de estudo há mais de 150 anos, manifestando a sua complexidade química e a diversidade de produtos que podem ter o leite como matéria-prima. Os autores evidenciaram que a química é uma vertente de maior expressão no contexto do estudo da ciência do leite. Todos os esforços primordiais foram de grande relevância e seguiram-se pesquisas cada vez mais acuradas, visando desvendar a composição e as propriedades do leite.

O ponto de partida para o conhecimento da química e da bioquímica do leite é a biossíntese dos seus constituintes nas células secretoras do tecido alveolar mamário. Há constituintes sintetizados típicos do leite, como a lactose e as caseínas e outros constituintes secretados, como os sais e as vitaminas. Jenness (1974) apontou para a necessidade de se atender a um balanço entre a disponibilidade de precursores sanguíneos e a secreção dos compostos que formarão o leite. A composição do leite é limitada por propriedades físicas, como a condição isosmótica com o sangue (por volta de 0,3 molal). Também influencia a solubilidade do fosfato de cálcio, que atinge a saturação e forma complexos coloidais com a caseína.

Em uma visão ampla, conforme Foroutan *et al.* (2019), o leite é um biofluido, nutricionalmente rico, quimicamente complexo, consistindo de uma grande diversidade de compo-

mentos. Os autores, usando técnicas espectroscópicas e cromatográficas, identificaram e quantificaram 1.447 estruturas químicas distintas no leite. Somadas a outras identificações mencionadas na literatura, chegou-se a 2.355 compostos químicos contidos no leite bovino.

O leite bovino contém, aproximadamente, 3,5% a 5,0% de gordura, apresentando-se como glóbulos (0,1 μ m a 15 μ m), contendo uma porção interna primariamente composta por triacilgliceróis (na ordem de 98% m/m dos lipídeos totais), envolvidos por uma membrana (10nm a 50nm) formada por lipídeos polares, proteínas específicas, glicoproteínas e colesterol (Singh, 2019; Thum *et al.*, 2021). As propriedades físicas da gordura do leite, particularmente as propriedades de cristalização e fusão, têm um efeito marcante nas propriedades funcionais dos produtos lácteos integrais (MacGibbon, 2022).

A lactose é o principal carboidrato do leite bovino, com concentração aproximada de 4,9%, formada a partir de uma ligação glicosídica β 1-4 entre glicose e galactose. Trata-se de um carboidrato redutor e pode ocorrer nas formas anoméricas α e β , que manifestam mutarrotação e apresentam distintas solubilidades (Fox *et al.*, 2015).

A determinação do teor de lactose no leite pode ser conduzida por cromatografia, espectroscopia no infravermelho, polarimetria, gravimetria ou biossensores. A espectroscopia ultrassônica de alta resolução (HR-US) pode ser aplicada para a análise quantitativa de lactose em leite e bebidas lácteas, conforme Lynch e Buckin (2023).

A lactulose é um dissacarídeo composto de frutose e galactose, que não ocorre naturalmente no leite cru, no entanto, é encontrado em produtos lácteos tratados termicamente,

devido à isomerização da lactose induzida pelo calor. Vários métodos analíticos estão disponíveis para detectar a lactulose, incluindo métodos espectrofotométricos, cromatografia e eletroforese capilar de zona (CZE) (Neves *et al.*, 2018).

As caseínas são fosfoproteínas que representam, aproximadamente, 80% do conteúdo total de proteínas do leite. Estão associadas a nanoagregados de fosfato de cálcio coloidal, na complexa estrutura supramolecular, usualmente denominada como micelas de caseína, com diâmetro variando de 50nm a 500nm (média aproximada de 150nm). Vários modelos têm sido propostos para tentar elucidar o arranjo e a estrutura das micelas de caseína e suas forças de estabilização, como as interações hidrofóbicas (McMahon; Oommen, 2008; Horne, 2020). Estudos por espectroscopia têm contribuído para o entendimento das interações hidrofóbicas e suas relações com o grau de mineralização das micelas (Nogueira *et al.*, 2021).

Aproximadamente, 20% das proteínas do leite consistem em soroproteínas que, ao contrário das caseínas, não são precipitáveis em pH 4,6. As principais soroproteínas são α -lactoalbumina, β -lactoglobulina, albumina do soro bovino, imunoglobulinas e proteose-peptonas (Fox *et al.*, 2015). Neves, Silva e Oliveira (2016) avaliaram o índice de soroproteínas não-desnaturadas como indicador de severidade do tratamento térmico aplicado a leite UHT. A espectroscopia no infravermelho permitiu mostrar as características conformacionais e a interação das caseínas e soroproteínas desnaturadas pelo calor (Liyanaarachchi; Vasiljevic, 2018).

Dentre os sais do leite, destacam-se aqueles compostos a partir do cálcio, em diferentes formas de fosfato de cálcio, podendo ainda estar solúvel, como sais ou ionizado ou es-

tar associado às micelas de caseína. O cálcio micelar ocorre como fosfato de cálcio coloidal inorgânico e fosfato de cálcio covalentemente ligado às caseínas, cujas partições influenciam propriedades importantes, como a coagulabilidade do leite para fabricação de queijos (Mlalacarne *et al.*, 2014).

Martin, Evanowski e Wiedmann (2023) propuseram uma redefinição da qualidade do leite, destacando indicadores microbiológicos que favorecem a elaboração de produtos lácteos processados de alta qualidade. Destacaram que testes de qualidade do leite tendem a medir indicadores relacionados às condições na produção primária, com vários níveis de capacidade que geram implicações para a qualidade dos produtos acabados. Esta análise indica a relevância na escolha das metodologias analíticas, na monitorização e na implementação de ferramentas integradas de suporte à decisão.

O leite e os produtos lácteos são reconhecidos pelo papel preponderante para a nutrição no âmbito global. O leite é o alimento principal que contribui para disponibilidade global de nutrientes: cálcio (49%), vitamina B2 (24%), lisina (18%) e gordura (15%), também fornecendo mais de 10% da disponibilidade global de cinco aminoácidos indispensáveis, proteínas, vitaminas A, B5 e B12, fósforo e potássio (Smith *et al.*, 2022).

As questões relacionadas à composição, às propriedades e à qualidade do leite, em um senso mais abrangente, requerem soluções analíticas confiáveis, exatas, reproduzíveis e rastreáveis. As metodologias espectroscópicas (Bastettin *et al.*, 2022) contribuem para o alcance destes desafios, expandindo suas aplicações e revelando a intrincada e complexa natureza do leite.

Desenvolvimento

Técnicas espectroscópicas ótica e de massa

Espectroscopia no infravermelho

A espectroscopia no infravermelho tem se apresentado como o método mais utilizado para o monitoramento da qualidade de alimentos e uma das tecnologias mais relevantes sob o ponto de vista da segurança dos alimentos (Brandão *et al.*, 2010). Técnicas como infravermelho próximo (NIR) e infravermelho médio (MIR) têm sido aplicadas com sucesso desde a avaliação da qualidade do leite e de lácteos (Andrade *et al.*, 2019; Leite *et al.*, 2019) até a determinação de antimicrobianos e determinação precoce de doenças do gado leiteiro (Pereira *et al.*, 2020; Luiz *et al.*, 2021a; Luiz *et al.*, 2021b). De maneira geral, nessas técnicas, quanta (plural de quantum) de energia de uma fonte de radiação eletromagnética são absorvidos excitando modos normais de vibração das estruturas moleculares que compõem a amostra a ser analisada. Essa absorção pode ocorrer na configuração de transmissão ou por reflexão total atenuada (ATR). As faixas de energia que compreendem as vibrações moleculares do NIR e MIR são dadas em unidades de número de onda, 14.290 a 4000 cm^{-1} e 4000 a 400 cm^{-1} , respectivamente. Essa unidade de energia se dá em termos do recíproco do comprimento de onda (cm^{-1}) e tem o seguinte significado: ela corresponde à energia de uma onda que possui x comprimentos de onda por cm. Ex.: 400 cm^{-1} significa a energia

de uma onda que tem 400 comprimentos de onda em 1cm. Aparelhos mais modernos utilizam o conceito de Transformada de Fourier (FT), o que lhes confere grande rapidez nas medidas quando comparado com os antigos aparelhos dispersivos. São referidos, portanto, como FT-NIR e FT-MIR.

Como exemplo de aplicação da espectroscopia de FT-NIR (*Fourier Transform- Near infrared*), Luiz *et al.* (2021a), através dos espectros de amostras de sangue de bezerros inoculados com *Anaplasma marginale*, foram capazes de monitorar o desenvolvimento da doença no animal, bem como sua recuperação. Constatou-se que os picos, que representam a intensidade de absorção de energia, posicionados nos números de ondas 8.000cm^{-1} , 6.500cm^{-1} , 5.000cm^{-1} e 4.500cm^{-1} contribuíram para prever e identificar com precisão o dia da infecção bacteriana antes de sua manifestação clínica.

Pesquisa recente focou na detecção de resíduos de medicamentos antiparasitários em leite cru através da Espectroscopia no Infravermelho Médio e Próximo com Transformada de Fourier (FT-MIR e FT-NIR) (Luiz *et al.*, 2021b). Amostras de leite cru e medicamento antiparasitário puro simularam a contaminação. As amostras simuladas foram elaboradas adicionando os medicamentos antiparasitários em leite cru nas seguintes concentrações: abamectina $10\mu\text{g/L}$, doramectina $15\mu\text{g/L}$, ivermectina $10\mu\text{g/L}$ e eprinomectina $20\mu\text{g/L}$. Para analisar a sensibilidade das técnicas foram utilizadas concentrações acima e abaixo dos limites máximos de resíduos (LMR) (Brasil, 2022). A ferramenta estatística multivariada utilizada foi a Análise de Componentes Principais (PCA). Os resultados mostraram que é possível discriminar diferentes concentrações de antiparasitários diluídos

em leite cru. A metodologia provou ser rápida, sensível e precisa dentro do que é preconizado pela legislação vigente (Brasil, 2022; Luiz *et al.*, 2021b).

A espectroscopia no infravermelho médio é amplamente utilizada em leite cru para fins de padronização pela indústria de laticínios para atribuir valor à remuneração do leite ao produtor. Bassbasi *et al.* (2014) empregaram a técnica para a determinação quantitativa rápida e não destrutiva do teor de sólidos desengordurados em leite cru. Este dado é um importante parâmetro nutricional do leite cru, pois compreende todo o resíduo deixado após a completa evaporação da água do leite.

Pereira *et al.* (2020) realizaram uma revisão sobre algumas das pesquisas mais recentes utilizando técnicas de espectroscopia infravermelha para avaliar a qualidade intrínseca de produtos lácteos. As informações relacionadas às principais regiões do espectro infravermelho próximo e médio, associadas aos componentes majoritários do leite, são apresentadas nas Tabela 1 e Tabela 2, respectivamente.

Tabela 1: Regiões do espectro infravermelho próximo (NIR), em números de onda (cm^{-1}), composto de origem e vibrações moleculares características do leite.

Número de onda (cm^{-1})	Composto	Vibrações características
4775	Lactose	Combinações de O-H
4273		
5494		
6897		
5255	Polissacarídeos	Estiramento de OH e HOH

Continua

*Gestão, Qualidade e Inovações Tecnológicas:
Produções Acadêmicas em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados*

Continuação

Número de onda (cm⁻¹)	Composto	Vibrações características	
8278	Proteína	2° sobreton de estiramento de C-H	
5767		1° sobreton de estiramento de C-H	
4000 a 4600		CH ₂	
4878		Combinação de N-H/amida 2 ^a ou N-H/amida 3 ^a	
4273	Caseína		
4329			
4762			
5050			
5495			
5618			
5780			
5814			
5952			
6897			
5628		Gordura	CH and CH ₂
5800			1° sobreton de estiramento de C-H
5708			1° sobreton de estiramento de C-H
4333	2° sobreton de dobramento de C-H		
4266	2° sobreton de dobramento de C-H ₂		
8400	Concentrado proteico do soro do leite (Whey Protein)		
6634			
5555 a 6060		1° sobreton de estiramento C-H	
4545 a 5000		Combinação de estiramento de N-H e estiramento O-H	
4000 a 4545		Estiramento C-H	
8000 a 9000	Lipídeos	C-H	
6900 a 7300		C-H	
5600 a 6150		C-H	
4167 a 4545		C-H	
6000 a 7500	Água		
6876		1° sobreton de estiramento de O-H	
5176		Combinações de O-H	
11905 a 13158	Melatonina		

Fonte: Pereira *et al.* (2020).

Tabela 2: Regiões do espectro do infravermelho médio (MIR), em números de onda (cm⁻¹), compostos de origem e vibrações moleculares características do leite.

Número de onda (cm⁻¹)	Compostos	Vibrações características
900 a 1200	Lactose	Estiramento C-O-C
1045		Estiramento C-O
2800 a 3000	Carboidratos	Estiramento C-H
800 a 1400		Estiramento esquelético e dobramento
1550	Proteína	Picos C-N e N-N
1600 a 1695	Caseína	Amida I (Estiramento C=O)
1520 a 1560		Amida II (dobramento N-H e estiramento C-N)
1230 a 1300		Amida III
1060 a 1100		Estiramento O=P-O
1725 a 1745	Gordura de leite	Estiramento C=O
970		Dobramento C=C-H
2800 a 3000		Estiramento C-H
1520 a 1650	Concentrado proteico do soro do leite (Whey Protein)	Amida I e Amida II
1632		Amida I (estiramento C=O)
1531		Amida II (dobramento N-H e estiramento C-N)
1200 a 1400		Grupos de hidrocarbonetos alifáticos C-H
1390		Estiramento C=O no COO-
1250		Amida III (C-N)
1750		Lipídeos C=O
1450		Ligações C-H em grupos CH ₂
1392		C=O em ácido carboxílico
1100 a 1130		Estiramento C-OH, C-C e C-O-C
900 a 1200		Vibrações C-O-C e C-O em carboidratos
1730 a 1765	Triglicerídeos	Estiramento C=O
2925		Estiramento assimétrico de metileno
2850		Estiramento assimétrico de metileno
1475		Modo tesoura do metileno
1385		Deformação simétrica do metileno
1400 a 1477	Lipídeos	Estiramento C-H

Continua

Continuação			
Número de onda (cm ⁻¹)	Compostos	Vibrações características	
3680	Água	Estiramento simétrico e assimétrico O-H	
3200 a 3600		Estiramento O-H	
1650		Estiramento H-OH	
1020 a 1282	Fosfolipídeos		
1055 a 1070		P-O-C	
970		Estiramento assimétrico C-N de (CH ₃)N ⁺	
970 a 1200		P-O-C + PO ₂ ⁻	
1025		Estiramento simétrico em éster C-O-P	
1243		Assimétrico fosfato diester PO ₂ ⁻	
1090		Estiramento simétrico de fosfato diester de PO ₂ ⁻	
1173		Estiramento assimétrico C-O do C=O-O-C	
400 a 1000		Melatonina	
3200 a 3400			
1680			
1400 a 1500			
800			
900			
980			

Fonte: Pereira *et al.* (2020).

Um trabalho interessante foi conduzido por Andrade *et al.* (2019) onde se avaliou temporalmente as mudanças no processo de maturação de queijos especiais (Pecorino, Feta e “Gouda”) feitos com leite de ovelha usando espectroscopia FTIR/ATR durante aproximadamente um ano. O estudo foi capaz de detectar os vários estágios de proteólise e lipólise, que são reações primárias que definem a maturação de queijos.

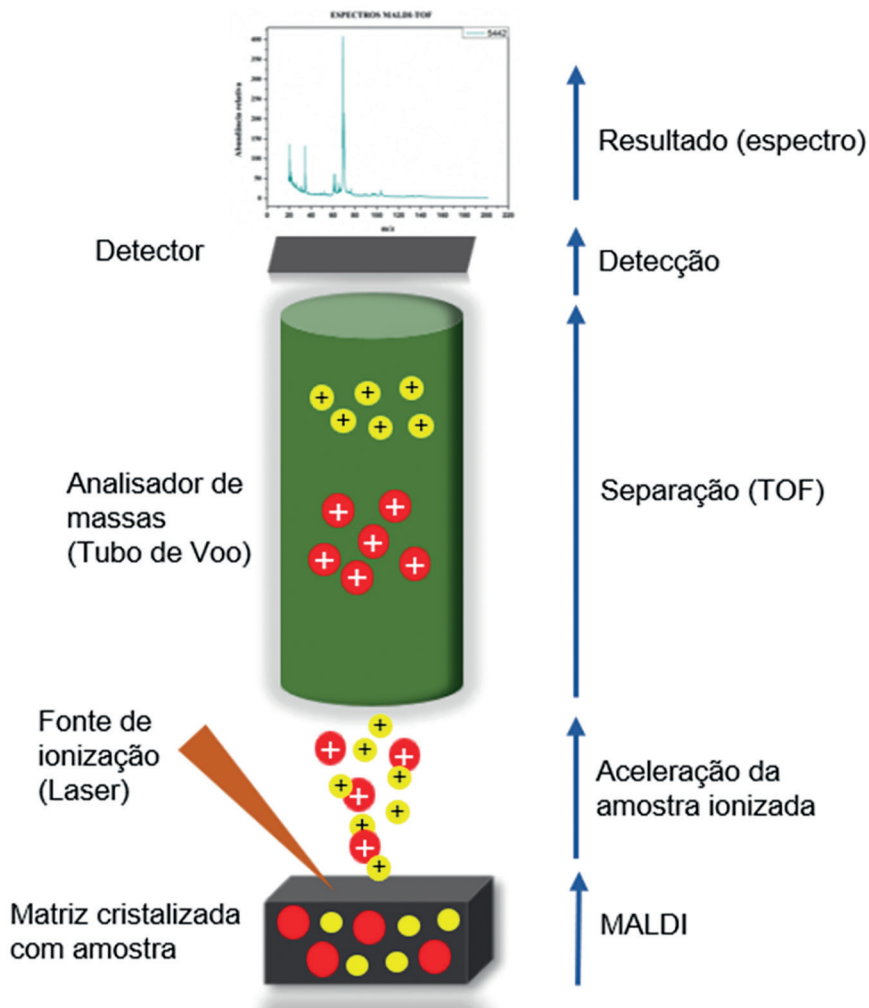
Espectrometria de Massa Maldi-TOF

A espectrometria de massa pelo método de ionização por dessorção a laser assistido por matriz (MALDI,

Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization) consiste em um método usado para determinar, com precisão, as massas moleculares de biopolímeros polares. A substância a ser analisada é misturada com uma matriz sobre uma placa metálica, após a cristalização da matriz e da amostra, a placa é inserida em uma câmara a vácuo e sobre ela incidem os fótons provenientes de um laser pulsado, devidamente focalizado. Sob a ação do laser, ocorre o que se chama de dessorção tanto da matriz quanto da amostra, que são então vaporizados e ionizados. O analisador de massa usado, conjuntamente, com o MALDI é o analisador por tempo de voo (TOF- *time of flight*). As massas moleculares obtidas são dadas em Daltons (Holler; Skoog; Crouch, 2009).

Três partes principais compõem o espectrômetro de massa: a fonte de ionização, o analisador de massa e o detector. A fonte de ionização transforma as moléculas da amostra em íons em fase gasosa, que são separados pelo analisador de massa de acordo com a relação massa-carga (m/z). Por fim, o detector capta os íons amplificando-os e gerando uma corrente elétrica que é registrada e processada pelo software do equipamento, que transforma essa informação em um espectro de massa. O espectro tem como eixo das abcissas a relação massa-carga (m/z) e o das ordenadas corresponde à intensidade do sinal (Croxatto; Prod´Hom; Greub, 2012). A Figura 1 ilustra, esquematicamente, a técnica como representada por Croxatto, Prod´hom e Greub (2012).

Figura 1. Esquema das partes principais do espectrômetro de massa MALDI-TOF.



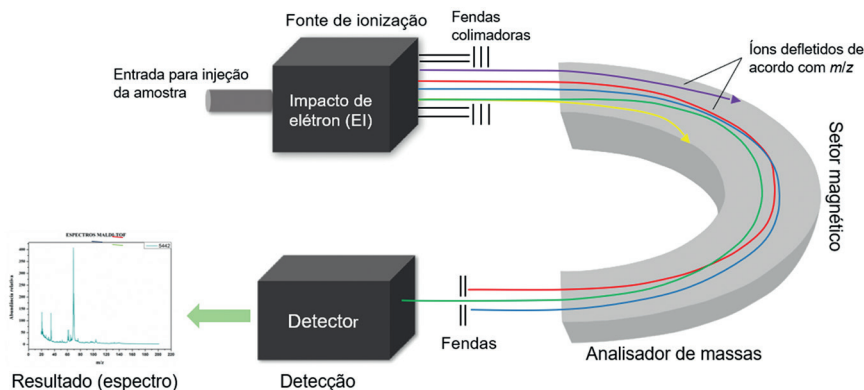
Fonte: Adaptado de Croxatto; Prod'Hom; Greub (2012).

Outro método da espectrometria de massa é a ionização por impacto de elétrons, que consiste em introduzir uma amostra gasosa no compartimento em que ela será bombar-

deada por um feixe de elétrons de alta energia, promovendo a ionização dos átomos e moléculas do gás. Os íons são acelerados em direção a algumas grades, passando por fendas estreitas, seguindo trajetória curva sob ação de um magneto, conforme ilustra a Figura 2.

O grau de desvio depende da massa para íons de carga idêntica e quanto maior a massa do íon, menor o desvio. Os íons de menor massa, e, portanto, com o maior desvio, atingem primeiro o detector. Assim é possível determinar a massa desses fragmentos desintegrados, produzindo a 'impressão digital química da molécula', revelando a forma da sua ligação original (Brown; Lemay; Bursten, 2005). Dado que os fragmentos dos compostos orgânicos são únicos, é possível identificar um composto desconhecido por comparação do seu espectro de massas com um banco de dados do equipamento, denominado registro de dados espectrais de massas (McMurry, 2011).

Figura 2. Esquema de um espectrômetro de massa de setor magnético com ionização por feixe de elétrons de alta energia.



Fonte: Adaptado de Silverstein; Webster; Kiemle (2005) e McMurry (2011).

Piraino *et al.* (2007) utilizaram a espectrometria MALDI-TOF para caracterizar a proteólise que ocorre durante o processo de maturação de queijos, concluindo que a técnica foi rápida e efetiva para monitorar pequenos peptídeos dos queijos como resultado da proteólise. Comparativamente com análises realizadas por HPLC de fase reversa, em que o tempo aproximado de análise foi em torno de 100 minutos, a análise por MALDI-TOF MS demorou cerca de três minutos. Estudos desta natureza são de grande importância para a compreensão do complexo processo de maturação de queijos.

Baptista *et al.* (2017) caracterizaram o perfil de peptídeos do queijo Prato por espectrometria de massa MALDI e por eletroforese capilar. Pela técnica de MALDI foram identificados 44 peptídeos que já tinham sido reportados anteriormente na literatura. Os autores concluíram que, embora os queijos tenham sido produzidos com diferentes matérias-primas e condições de processamento, os perfis de peptídeos foram muito semelhantes, e somente nove peptídeos foram responsáveis pela discriminação dos queijos analisados.

Outra área de grande aplicabilidade do MALDI é na detecção de fraudes em alimentos em geral, e também em leite e derivados. O aumento na procura e produção de lácteos reflete em um aumento no número de adulterações desses produtos, transformando a segurança e a autenticidade do leite e dos produtos lácteos numa área de crescente atenção e preocupação. As práticas ilegais variam desde a diluição do leite com água ou a venda de leite desnatado ou semidesnatado como leite integral até fraudes mais sofisticadas, como a adição de produtos lácteos anidros como caseínas, caseinatos e proteínas do soro do leite ao leite fluido, a mistura de

leites de alta qualidade como de búfala, ovelha e cabra com produtos mais baratos, como o leite de vaca, a adição de leites vegetais ao leite de vaca, adulteração de queijos, entre outras (Zambonin, 2021).

De acordo com Zambonin (2021), a espectrometria de massa MALDI-TOF está provando ser um excelente sistema para a determinação de fraudes em alimentos, permitindo em vários casos o desenvolvimento de métodos analíticos confiáveis, rápidos e com um bom custo-benefício, frequentemente requerendo protocolos de tratamento de amostras muito simples, e às vezes requerendo o uso de quimiometria. No caso do leite, os analitos-alvo são em sua maioria as proteínas e peptídeos, e com menor frequência os lipídeos e fosfolipídeos. Pelo grande número de artigos recentes sobre o assunto é esperado o aumento do uso da técnica no futuro próximo.

Vários estudos utilizaram a técnica para a identificação de microrganismos isolados a partir do leite e derivados. Angelakis *et al.* (2011) investigaram a acurácia e viabilidade do MALDI-TOF na identificação de bactérias lácticas dos gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium* e *Streptococcus* presentes em alimentos probióticos e iogurtes, concluindo que a técnica apresentou uma especificidade de 92% quando comparada com o sequenciamento dos genes *tuf* e 16S rRNA. Nacef *et al.* (2017) identificaram a população de bactérias ácido lácticas mesofílicas do queijo francês “Meroilles”. Identificou-se espécies dos gêneros *Lactobacillus*, *Enterococcus* e *Leuconostoc*. Os autores concluíram que a técnica é uma boa alternativa para as metodologias comumente utilizadas na indústria de alimentos.

Nogueira (2022) identificou 109 microrganismos isolados de leite cru, soro-fermento, salmoura e queijos artesanais da região da Serra da Mantiqueira de Minas Gerais por MALDI-TOF MS. Destes foram identificadas espécies dos gêneros *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Corynebacterium*, *Kocuria* e *Macrococcus*. A identificação dos últimos dois gêneros e sua diferenciação de estirpes de *Staphylococcus* coagulase negativos se tornou mais frequente com a utilização da espectrometria de massa MALDI-TOF.

Também na identificação de microrganismos causadores de mastite a técnica vem sendo amplamente empregada. Tomazi *et al.* (2014) e Cameron *et al.* (2017) utilizaram a técnica para identificar espécies de *Staphylococcus* coagulase negativos, um grupo de microrganismos de difícil identificação por técnicas microbiológicas clássicas, sendo necessário o uso de técnicas moleculares, como o sequenciamento, ou da espectrometria de massa MALDI-TOF. Nonnemann *et al.* (2019) identificaram, em nível de espécie, 93,5% de um total de 500 patógenos isolados de leite bovino. Os espectros de massa de algumas espécies foram inseridos no banco de dados do equipamento para melhorar a capacidade de identificação da técnica. Segundo os autores, o banco de dados deve ser continuamente expandido com espectros de massas de espécies microbianas envolvidas em mastite bovina.

Oliveira *et al.* (2021) identificaram 380 bactérias isoladas de leite bovino com mastite por espectrometria de massa MALDI-TOF. Deste total, 363 bactérias (95,5%) foram identificadas pela técnica em 12 gêneros e 37 espécies causadoras de mastite bovina, incluindo os gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* e gêneros relacionados e bactérias Gram-negativas. A acurácia de identificação da técnica em espécies

do gênero *Staphylococcus* foi de 93,2%, quando comparada com o sequenciamento do gene 16S rRNA. Os resultados do estudo corroboraram com informações da literatura de que a espectrometria de massa MALDI-TOF é uma técnica precisa, rápida e simples para identificar patógenos de mastite bovina.

Conclusão

A detecção da qualidade e autenticidade do leite e seus derivados exige um monitoramento constante por meio de metodologias analíticas eficientes. Nesta revisão alguns avanços recentes na área da segurança de alimentos lácteos foram abordados por meios das técnicas de espectroscopia no infravermelho e espectrometria de massa MALDI-TOF. Dos resultados apresentados pôde-se depreender o potencial dos métodos para detectar adulterantes, microrganismos, antimicrobianos, bem como realizar a caracterização e classificação de produtos lácteos. Essa potencialidade é amplificada por meio da estatística multivariada. Embora uma quantidade impressionante de trabalhos seja realizada nos últimos anos, o grau de exigência das análises de alimentos também tem crescido proporcionalmente, indicando uma perspectiva positiva para o desenvolvimento da espectroscopia ótica e de massa como ferramentas analíticas.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pelas agências brasileiras, CAPES, FAPEMIG e CNPq.

Referências

ANDRADE, J.; PEREIRA, C. G.; ALMEIDA JUNIOR, J. C.; VIANA, C. C. R.; NEVES, L. N. O.; SILVA, P. H. F.; BELL, M. J. V.; ANJOS, V. C. FTIR-ATR determination of protein content to evaluate whey protein concentrate adulteration. *LWT - Food Science and Technology*, v. 99, p. 166-172, Jan. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.09.079>.

ANGELAKIS, E.; MILLION, M.; HENRY, M.; RAOULT, D. Rapid and accurate bacterial identification in probiotics and yoghurts by MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of Food Science*, v. 76, n. 8, p. M568-M572, Oct. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02369.x>.

BAPTISTA, D. P.; ARAÚJO, F. D. S.; EBERLIN, M. N.; GIGANTE, M. L. A survey of the peptide profile in Prato cheese as measured by MALDI-MS and capillary electrophoresis. *Journal of Food Science*, v. 82, n. 2, p. 386-393, Feb. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13618>.

BASSBASI, M.; PLATIKANOV, S.; TAULER, R.; OUSSAMA, A. FTIR-ATR determination of solid non fat (SNF) in raw milk using PLS and SVM chemometric methods. *Food Chemistry*, v. 146, p. 250-254, Mar. 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.044>.

BATESTTIN, C.; ÂNGELO, F. F.; ROCHA, R. A.; ANJOS, V.; BELL, M. J. V. High resolution raman spectroscopy of raw and UHT bovine and goat milk. *Measurement: Food*, v. 6, p. 100029, June 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meafoo.2022.100029>.

BERZELIUS, J. J. *Über Theoretische Chemie*. *Journal für Chemie und Physik*, v. 11, p. 261-280, 1814.

BRANDÃO, M. C. M. P.; CARMO, A. P.; BELL, M. J. V.; ANJOS, V. C. Characterization of milk by infrared spectroscopy. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 65, n. 373, p. 30-33, 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº 162, de 06 de julho de 2022. Estabelece a ingestão diária aceitável (IDA), a dose de referência aguda (DRfA) e os limites máximos de resíduos (LMR) para insumos farmacêuticos ativos (IFA) de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, ano 160, n. 126, p. 238-262, 6 jul. 2022. Seção 1.

BROWN, T. L.; LeMAY, H. E.; BURSTEN, B. E. *Química: A ciência central*. 9. ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2005. 972 p.

CAMERON, M.; BARKEMA, H. W.; DE BUCK, J.; DE VLIEGHER, S.; CHAFFER, M.; LEWIS, J.; KEEFE, G. P. Identification of bovine-associated coagulase-negative staphylococci by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using a direct transfer protocol. *Journal of Dairy Science*, v. 100, n. 3, p. 2137-2147, Mar. 2017. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12020>.

CROXATTO, A.; PROD`HOM, G.; GREUB, G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 36, n. 2, p. 380-407, Mar. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x>.

FOROUTAN, A.; GUO, A. C.; VAZQUEZ-FRESNO, R.; LIPFERT, M.; ZHANG, L.; ZHENG, J.; BADRAN, H.; BUDINSKI, Z.; MANDAL, R.; AMETAJ, B. N.; WISHART, D. S. Chemical composition of commercial cow's milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 67, n. 17, p. 4897- 4914, Apr. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b00204>.

FOX, P.F.; UNIACKE-LOWE, T.; MCSWEENEY, P. L. H.; O'MAHONY, J. A. *Dairy chemistry and biochemistry*. 2nd ed. New York: Springer, 2015. 606 p. ISBN: 978-3-319-14891-5.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. Princípios de análise instrumental. 6 ed. Porto Alegre: Bookman, 2009, 1056p.

HORNE, D. S. Casein micelle structure and stability. *In*: BOLAND, M.; SINGH, H. (ed.). Milk proteins: From expression to food. 3rd ed. [S. l.]: Academic Press 2020. cap. 6, p. 213-250. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-815251-5.00006-2>.

JENNESS, R. Biosynthesis and composition of milk. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 63, n. 1, p. 109-118, July 1974. DOI: <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12678111>.

LEITE, A. I. N.; PEREIRA, C. G.; ANDRADE, J.; VICENTINI, N. M.; BELL, M. J. V.; ANJOS, V. FTIR-ATR spectroscopy as a tool for the rapid detection of adulterations in butter cheeses. *LWT - Food Science and Technology*, v. 109, p. 63-69, July 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.04.017>.

LIYANAARACHCHI, W. S.; VASILJEVIC, T. Caseins and their interactions that modify heat aggregation of whey proteins in commercial dairy mixtures. *International Dairy Journal*, v. 83, p. 43-51, Aug. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.03.006>.

LUIZ, L. C.; TEIXEIRA, V. A.; CAMPOS, M. M.; PEREIRA, L. G. R.; TOMICH, T. R.; LEITE, J. L. B.; BELL, M. J. V.; ANJOS, V. C. Uso da espectroscopia de infravermelho próximo com Transformada de Fourier (FT-NIR) para acompanhar o processo de Tristeza Parasitária Bovina. *Brazilian Journal of Animal and Environmental Research*, v. 4, n. 2, p. 1594-1605, 2021a. DOI: <https://doi.org/10.34188/bjaerv4n2-003>.

LUIZ, L. C.; SILVA, D. D. M.; BELL, M. J. V.; ANJOS, V. C. Uso da espectroscopia no infravermelho para detecção de medicamentos veterinários em leites: um review das aplicações recentes. *In*: PEREIRA, A. M; BANDEIRA, D. M.; SÁ, C. G. (org.). *Patologia Clínica Veterinária*. Ponta Grossa: Atena Editora 2021b. p. 169-183. DOI: [10.22533/at.ed.54121100520](https://doi.org/10.22533/at.ed.54121100520).

LYNCH, R.; BUCKIN, V. Determination of lactose in milk by high resolution ultrasonic spectroscopy. *International Dairy Journal*, v. 139, p. 105566, Apr. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2022.105566>.

MACGIBBON, A. K. H. General characteristics of milk lipids. *In: MCSWEENEY, P. L. H.; McNAMARA, J. P. (ed.). Encyclopedia of Dairy Sciences*. 3th ed. [S. l.]: Academic Press, 2022. v. 3, p. 814-820. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818766-1.00295-6>.

MALACARNE, M.; FRANCESCHI, P.; FORMAGGIONI, P.; SANDRI, S.; MARIANI, P.; SUMMER, A. Influence of micellar calcium and phosphorus on rennet coagulation properties of cows milk. *Journal of Dairy Research*, v. 81, n. 2, p. 129-136, May 2014. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0022029913000630>.

MARTIN, N. H.; EVANOWSKI, R. L.; WIEDMANN, M. Invited review: Redefining raw milk quality - Evaluation of raw milk microbiological parameters to ensure high-quality processed dairy products. *Journal of Dairy Science*, v. 106, n. 3, p. 1502-1517, Mar. 2023. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22416>.

McMAHON, D. J.; OOMMEN, B. S. Supramolecular structure of the casein micelle. *Journal of Dairy Science*, v. 91, n. 5, p. 1709-1721, May 2008. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0819>.

McMURRY, J. *Química Orgânica*. 7. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2011. 1141 p.2.

NACEF, M.; CHEVALIER, M.; CHOLLET, S.; DRIDER, D.; FLAHAUT, C. MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of lactic acid bacteria isolated from a French cheese: The Maroilles. *International Journal of Food Microbiology*, v. 247, p. 2-8, Apr. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.005>.

NEVES, L. N. O.; MARQUES, R.; SILVA, P. H. F.; OLIVEIRA, M. A. L. Lactulose determination in UHT milk by CZE-UV with indirect detection. *Food Chemistry*, v. 258, p. 337-342, Aug. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.069>.

NEVES, L. N. O.; SILVA, P. H. F.; OLIVEIRA, M. A. L. de. Spectrophotometric determination of WPNI and HMF in UHT milk through the principal components analysis. *Química Nova*, v. 39, n. 6, p. 741-747, jul. 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20160082>.

NOGUEIRA, M. H.; HUMBLLOT, L.; SINGH, R. P.; DIEUDE-FAUVEL, E.; DOUMERT, B.; NASSER, S.; LESUR, C.; KAROUI, R.; DELAPLACE, G.; PEIXOTO, P. P. S.. The heterogeneous substructure of casein micelles evidenced by SAXS and NMR in demineralized samples. *Food Hydrocolloids*, v. 117, p. 106653, Aug. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106653>.

NOGUEIRA, J. S. Perfil de resistência aos antimicrobianos e presença do gene *mecA* em cocos Gram-positivos catalase positivos isolados de queijos artesanais e ingredientes utilizados na sua produção. 2022. 64 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2022.

NONNEMANN, B.; LYHS, U.; SVENNESEN, L.; KRISTENSEN, K. A.; KLAAS, I. C.; PEDERSEN, K. Bovine mastitis bacteria resolved by MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of Dairy Science*, v. 102, n. 3, p. 2515–2524, Mar. 2019. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15424>.

OLIVEIRA, T. C. A.; BRITO, M. A. V. P.; GIAMBIAGI-de MARVAL, M.; VICENTINI, N. M.; LANGE, C. C. Identification of bovine mastitis pathogens using MALDI-TOF mass spectrometry in Brazil. *Journal of Dairy Research*, v. 88, n. 3, p. 302-306, Aug. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0022029921000595>.

PEREIRA, C. G.; LUIZ, L. C.; BELL, M. J. V.; ANJOS, V. Near and Mid Infrared Spectroscopy to assess milk products quality: A review of recent applications, *Journal of Dairy Research & Technology*, v. 3, n. 1, p. 1-10, May 2020. DOI: <https://doi.org/10.24966/DRT-9315/100014>.

PIRAINO, P.; UPADHYAY, V. K.; ROSSANO, R.; RICCIO, P.; PARENTE, E.; KELLY, A. L.; MCSWEENEY, P. L. H. Use of mass spectrometry to characterize proteolysis in cheese. *Food Chemistry*, v. 101, n. 3, p. 964-972, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.02.048>.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. *Spectrometric identification of organic compounds*. 7th ed. [S. l.]: John Wiley & Sons, 2005. 502p. ISBN: 0-471-39362-2.

SINGH, H. Symposium review: Fat globules in milk and their structural modifications during gastrointestinal digestion. *Journal of Dairy Science*, v. 102, n. 3, p. 2749-2759, Mar. 2019. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15507>.

SMITH, N. W.; FLETCHER, A. J.; HILL, J. P.; McNABB, W. C. Modeling the contribution of milk to global nutrition. *Frontiers in Nutrition*, v. 8, 716100, Jan. 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.716100>.

THUM, C.; ROY, N. C.; EVERETT, D. W.; McNABB, W. C. Variation in milk fat globule size and composition: A source of bioactives for human health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 63, n. 1, p. 87-113, June 2021. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1944049>.

TOMAZI, T.; GONÇALVES, J. L.; BARREIRO, J. R.; BRAGA, P. A. C.; SILVA, L. F. P.; EBERLIN, M. N.; SANTOS, M. V. Identification of coagulase-negative staphylococci from bovine intramammary infection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 52, n. 5, p. 1658-1663, May 2014. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.03032-13>.

ZAMBONIN, C. MALDI-TOF mass spectrometry applications for food fraud detection. *Applied Sciences*, v. 11; n. 8, 3374, p. 1-18, Apr. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/app11083374>.