

# **DETECÇÃO DE SORO BOVINO EM RICOTA DE BÚFALA POR MEIO DE AVALIAÇÃO PROTEÔMICA, ESPECTROSCOPIA NI INFRAVERMELHO E MEDIDAS ANALÍTICAS ASSOCIADAS À QUIMIOMETRIA.**

Gabriel Ramos Carvalho<sup>1</sup>, Leduan Rosa Alcantara<sup>2</sup>, Sabrina Masceno Sousa<sup>3</sup>, Josane Cardim de Jesus<sup>4</sup>, Sibelli Passini Barbosa Ferrão<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Bacharelado em Engenharia de alimentos, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Laboratório de Leite e Derivados, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Laboratório de Leite e Derivados, <sup>2</sup>Programa de pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos.

## **RESUMO**

A ricota é um queijo produzido a partir da coagulação do soro de leite, e seu reaproveitamento está se expandindo. A adulteração por soro de leite bovino (SLV) em ricota de búfala (SLB) é comum devido à diferença de preço entre os leites. Este trabalho teve como objetivo detectar SLV em ricota de búfala usando peptídeos solúveis em água (PSA), por meio de espectroscopia no infravermelho médio (MIR) e eletroforese em gel (SDS-PAGE). Foram produzidas ricotas com diferentes proporções de SLV e SLB, de 0% a 100% de SLV. Os extratos de PSA foram analisados por MIR, e a separação das amostras foi feita por Análise de Componentes Principais (ACP), que mostrou que dois componentes principais (CP1 e CP2) explicam 97,46% da variabilidade dos dados. A eletroforese SDS-PAGE indicou mudanças no perfil proteico das ricotas, com redução das bandas de caseínas ao longo do tempo. As diferenças entre ricotas puras e adulteradas diminuíram após 15 dias de armazenamento, dificultando a detecção de fraudes. As análises da MIR e da eletroforese mostraram diferenças claras entre as ricotas no início, mas essas diferenças foram reduzidas após 15 dias de armazenamento. Esses resultados destacam a importância de combinar métodos para.

**PALAVRAS-CHAVE:** Fraude, espectroscopia, ricota.

## **DETECTION OF BOVINE SERUM IN BUFFALO RICOTTA THROUGH PROTEOMIC EVALUATION, NEAR-INFRARED SPECTROSCOPY, AND ANALYTICAL MEASUREMENTS ASSOCIATED WITH CHEMOMETRICS.**

### **ABSTRACT**

Ricotta is a cheese produced from whey coagulation, and its reuse is expanding. Adulteration with bovine whey (BWS) in buffalo ricotta (BWB) is common due to the price difference between the milks. This study aimed to detect BWS in buffalo ricotta using water-soluble peptides (WSP), through mid-infrared (MIR) spectroscopy and gel electrophoresis (SDS-PAGE). Ricottas were produced with different proportions of BWS and BWB, from 0% to 100% BWS. The WSP extracts were analyzed by MIR, and sample separation was performed by Principal Component Analysis (PCA), which showed that two principal components (PC1 and PC2) explained 97.46% of the data variability. SDS-PAGE electrophoresis indicated changes in the ricottas' protein profiles, with a reduction in casein bands over time. The differences between pure and

adulterated ricottas decreased after 15 days of storage, making fraud detection more difficult. MIR and electrophoresis analyses showed clear differences between ricottas at the beginning, but these differences were reduced after 15 days of storage. These results highlight the importance of combining methods for detection.

**KEYWORDS:** Fraud, spectroscopy, ricotta.

## 1. INTRODUÇÃO

O queijo é o produto resultante da coagulação do leite por adição de enzimas coagulantes e/ou ácido láctico, gerando o soro de queijo (ORDÓNEZ, 2005). Com os avanços tecnológicos, o soro de queijo pode ser transformado em produtos como a ricota, uma alternativa para as indústrias de laticínios reaproveitarem esse subproduto (BALD et al., 2014). A ricota é um queijo branco, considerado magro e com alto valor nutricional, devido às proteínas como  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactalbumina e albumina sérica bovina. Para produzi-la, o soro é aquecido com adição de ácidos orgânicos. Embora a ricota possa ser feita com soro de diferentes espécies, a de leite de vaca é a mais comum, seguida pela de búfala (PINTADO et al., 2001). O leite de búfala tem vantagens nutricionais, como maiores teores de gordura, proteína e minerais. Contudo, devido à sazonalidade da produção, fraudes podem ocorrer, com a substituição do soro de búfala pelo de vaca, que é mais barato e abundante. Isso torna a detecção de fraudes um desafio. Métodos como eletroforese e espectroscopia no infravermelho médio têm sido pesquisados para identificar essas adulterações. O objetivo deste estudo foi detectar a presença de soro bovino em ricota de búfala usando análise de peptídeos com essas técnicas

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

As ricotas foram produzidas com diferentes proporções de Soro de Leite de Vaca (SLV) e Soro de Leite de Búfala (SLB) nas seguintes proporções: T2: 10%, T3: 20%, T4: 30%, T5: 40%, T6: 50%, T7: 60%, T8: 70%, T9: 80% e T10: 90%, além de formulações feitas com 100% SLB (T1) e 100% SLV (T11). Para a extração dos Peptídeos Solúveis em Água (PSA), foi utilizada uma metodologia adaptada de Gonçalves et al. (2017). Cinco gramas de cada amostra de queijo foram homogeneizados em 25 mL de água ultrapura em mesa agitadora a 200 rpm por 1 hora. Em seguida, os extratos foram filtrados em papel filtro quantitativo e submetidos a centrifugação repetida a 4°C e 4000 rpm, por três vezes, durante 20 minutos cada. Após esse processo, os extratos contendo os PSA foram congelados a -80°C por 24 horas e liofilizados a -48°C e 0,040 mBar por 72 horas, utilizando um liofilizador de bancada. Os peptídeos liofilizados foram armazenados a -20°C até o momento das análises por eletroforese e espectroscopia.

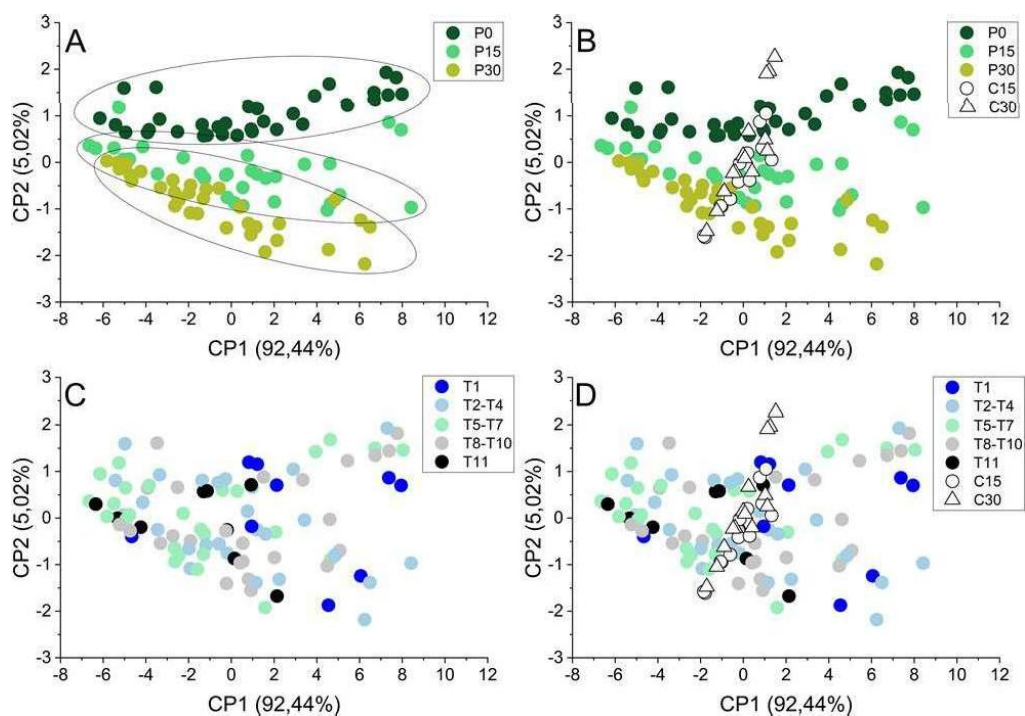
A análise espectroscópica por Infravermelho Médio (MIR) foi realizada nos peptídeos extraídos das amostras de ricota de búfala. Foram obtidos espectros na faixa de 4000 a 600  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  e 64 scans. Cerca de 0,1 g de amostra foi utilizada para a leitura por absorção no cristal de diamante, e o espectro de fundo foi verificado antes de cada coleta. Durante as análises, a temperatura foi mantida em torno de 18°C.

A eletroforese foi conduzida conforme metodologia descrita por Egito et al. (2006), com a técnica de gel de poliacrilamida em condições desnaturantes e adição de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS). Foram aplicados 20  $\mu$ L de cada amostra no gel, e a separação foi realizada a 4°C durante 120 minutos, com tensão de 250 V. Após a corrida, o gel foi corado com azul de Coomassie e descolorido com solução de etanol e ácido tricloroacético.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 ANÁLISES DOS LEITES DE VACA E OVELHA

Os valores —Os dados das técnicas de CLAE e MIR foram submetidos à Análise de Componentes Principais (ACP) para identificar as variáveis mais relevantes que distinguem os queijos pelos tratamentos e períodos de armazenamento. A separação dos dados MIR utilizou a matriz B, composta por 18 picos. Dois componentes principais (CP1 e CP2) explicaram 97,46% da variabilidade dos queijos com diferentes níveis de SLV e SLB ao longo do armazenamento (Figura 1).

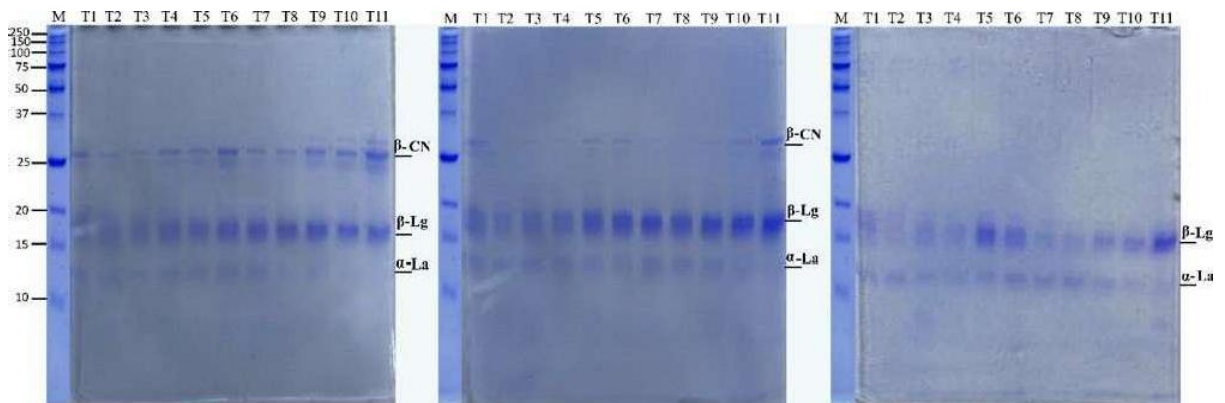


T1, 100% SLB e 0% SLV; T2, 90% SLB e 10% SLV; T3, 80% SLB e 20% SLV; T4, 70% SLB e 30% SLV; T5, 60% SLB e 40% SLV; T6, 50% SLB e 50% SLV; T7, 40% SLB e 60% SLV; T8, 30% SLB e 70% SLV; T9, 20% SLB e 80% SLV; T10, 10% SLB e 90% SLV; T11, 0% SLB e 100% SLV.

A redução para esses dois componentes, com perda mínima de informação, permitiu a visualização das amostras de ricota (puras e adulteradas) em um gráfico bidimensional, facilitando a análise exploratória.

A eletroforese em gel SDS-PAGE foi realizada para analisar os extratos PSA das ricotas ao longo do tempo de armazenamento (Figura 2).

Figura 2. Perfil eletroforético (SDS-PAGE) dos extratos PSA das ricotas produzidas. (a) armazenada após o processamento (T0); (b) armazenada no tempo de 15 dias (T15); (c) armazenada no tempo de 30 dias (T30). As siglas T1-T11 correspondem aos queijos com diferentes teores de SLV (0; 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90 e 100%). M: padrão do peso molecular (kDa).



O perfil eletroforético mostrou a presença de proteínas como  $\alpha$ -caseína,  $\beta$ -caseína,  $\kappa$ -caseína,  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -Lg) e  $\alpha$ -lactalbumina ( $\alpha$ -La), esperadas devido ao uso do leite integral de búfala para a produção das ricotas. As amostras com 100% SLB (T1) exibiram diferenças em relação ao tratamento com 100% SLV (T11) no início do armazenamento (T0), com destaque para a presença clara das bandas de caseínas.

Após 15 dias de armazenamento (Figura 7b), apenas a banda da  $\beta$ -caseína permaneceu visível, sendo mais intensa em T11. Aos 30 dias (Figura 7c), as bandas de caseínas desapareceram, indicando mudanças no perfil proteico das ricotas. Esses resultados sugerem que, a partir de 15 dias, a diferenciação entre ricotas com SLB e SLV se torna difícil, pois as bandas de caseínas se atenuam, dificultando a detecção de fraudes. aaaaaa a. No entanto, de acordo com Revers et al. (2016)

#### 4. CONCLUSÃO

Através das análises realizadas com espectroscopia no infravermelho médio (MIR) e eletroforese, foi possível identificar alterações significativas no perfil proteico das ricotas adulteradas com soro de leite bovino. Nos primeiros dias de armazenamento, as diferenças entre as ricotas de búfala e bovino eram evidentes, especialmente nas bandas de proteínas como a caseína. Contudo, após 15 dias de armazenamento, essas diferenças se tornaram menos perceptíveis, dificultando a identificação de adulterações. Esses resultados destacam a eficácia dessas técnicas para a detecção de fraudes, mas também indicam que o tempo de armazenamento pode influenciar a capacidade de identificação, o que enfatiza a necessidade de uma combinação de métodos para garantir a autenticidade dos produtos lácteos.

#### 5. AGRADECIMENTOS

Agradeço a Fapesb pela concessão da bolsa de iniciação científica e a Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia pela estrutura e apoio docente para a realização da pesquisa.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALD, Júlio André et al. Características físico-químicas de soros de queijo e ricota produzidos no Vale do Taquari, RS. *Revista Jovens Pesquisadores*, v. 4, n. 3, p. 90-99, 2014.

FUSELLI, Fabio et al. Detection of fraudulent addition of bovine whey in water buffalo ricotta cheese by isoelectric focusing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 95, n. 13, p. 2757-2762, 2015.

PINTADO, M. E.; MACEDO, A. C.; MALCATA, F. X. Review: Technology, Chemistry and Microbiology of Whey Cheeses. *Food Science and Technology International*, London, v. 7, p. 105-116, 2001.

OLIVEIRA, Evelyn et al. Eletroforese: conceitos e aplicações. *Enciclopédia Biosfera*, v. 11, n. 22, 2015.

ORDÓÑEZ, J. A. *Tecnologia de alimentos*. Porto Alegre: Artmed, 2005.

SILVA, Cleyzer Lopes et al. Detecção de fraude em amostras comerciais de queijo bubalino por adição de leite bovino por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) multiplex. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 74, n. 1, p. 21-29, 2015.