



Figura 2. Modo de preparação de amostras, curva de calibração e amostras tipo *matrix matched*.

6.2.4. Purificação complementar

Esta etapa é opcional e só foi utilizada com finalidade de desenvolvimento e pesquisa, não sendo utilizada na validação dos métodos.

O filtrado final tem uma concentração aproximada de 8% de TCA, onde o CMP e outros pequenos peptídeos se encontram em solução. Nas análises em HPLC, a injeção das amostras neste solvente gera um pico muito intenso de TCA, pela leitura realizada em uma zona muito baixa do ultravioleta (205 nm), causando interferência na qualidade do cromatograma, embora elua após o CMP. Pode-se utilizar o seguinte protocolo de purificação:

Em 10 mL do filtrado final, obtido no item 6.2.1, adicionar 2 mL de solução de TCA 50% para precipitar as proteínas que não foram desnaturadas na primeira etapa, incluindo o CMP.

Manter as amostras entre 1-8°C (refrigerador) durante aproximadamente 24 horas.

Após, centrifugar por aproximadamente 10 minutos X 6000 g e descartar o sobrenadante.

Lavar o *pellet* com 5 mL de etanol:éter etílico (1:1)

Repetir a etapa de centrifugação.

Desprezar o sobrenadante deixando o tubo drenar para eliminação do solvente orgânico.

Retomar o *pellet* no solvente adequado à finalidade analítica.

6.2.5. Coleta de frações

A coleta de frações de interesse, a partir da triagem por SEC, correspondentes ao pico eluído de CMP (ou pseudo-CMP) é realizada para as amostras positivas e pode ser realizada manualmente ou através de coletor de frações. A quantidade de injeções e coletas depende da aplicação posterior. Para análise em EC, coletar de 5 a 10 injeções da amostra suspeita. Para análise em LC-MS/MS, uma coleta é suficiente. Por exemplo, a coleta de um pico de padrão de CMP em solvente de concentração igual à 50 µg.mL⁻¹ (injetados 100 µL) contém 5 µg de CMP em cerca de 1 mL coletado.

6.2.6. Digestão triptica das frações coletadas

Calcular uma quantidade de enzima (tripsina) para uma razão equivalente à 1:50 (enzima:substrato); estimar a quantidade de CMP na amostra usando a curva injetada em SEC.

Reconstituir a quantidade necessária de tripsina em solução de bicarbonato de amônio 25mM, imediatamente antes de adicionar às análises.

Adicionar a quantidade calculada de solução de tripsina para cada amostra resultante da coleta das frações (o valor deve ser registrado para correção posterior de resultados).

Agitar por 5-10 segundos cada tubo em vórtex.

Incubar à 37±2 °C por 4±0,5 hs, em microtubos selados, sob agitação (~400rpm).

Como controle da digestão, digerir amostra de solução padrão equivalente à 50 mg.L⁻¹.

Para quantificação, digerir amostras de padrão em solvente, de modo a produzir uma "curva de calibração" de produtos de digestão triptica, capaz de quantificar correlativamente CMP e/ou pseudo-CMP.

6.2.7. Derivatização das amostras para detecção por fluorescência induzida a laser

Realizar em microtubo a seguinte reação de derivatização:

Adicionar 20 µL de amostra purificada

Adicionar 25 µL de tampão borato 20mM pH 10,0

Adicionar 45 µL de água

Agitar suavemente com a mão e deixar repousar o líquido novamente

Adicionar 10 µL de solução de fluorescamina 20 mM (em acetona)

Agitar imediatamente e aguardar 3 minutos aproximadamente antes de aplicar a amostra no sistema de EC.

6.3. Detecção e quantificação

Método 1 (SEC): As amostras serão analisadas em sistema de cromatografia líquida de alta performance sob as condições de análise descritas na Tabela 3. A quantificação é realizada através do software Lcsolution (Shimadzu) ou similar.

Tabela 3. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE

Bomba	Bomba SHIMADZU, Fluxo de fase móvel (6.1.6) em 1,0 mL.min ⁻¹ (ou similar).
Amostrador automático	SHIMADZU com volume de 20-100µL injetado (ou similar).
Coluna	Coluna Zorbax GF 250, 9,4 mm de diâmetro e 250 mm de comprimento (ou similar)
Detector	Detector de arranjo de díodos (Shimadzu SPD-M20A ou equivalente).
Dados	Computador integrado (Software LC Solution SHIMADZU ou equivalente)

Método 2. (EC): As amostras serão analisadas em sistema de eletroforese capilar com detecção por fluorescência induzida a laser (Tabela 4) sob as condições de análise especificadas na tabela abaixo. A quantificação é realizada através da calibração com amostras padrão (para análise de CMP íntegro) e com digestão de soluções de padrão (para produtos de digestão triptica).

Tabela 4. ELETROFORESE CAPILAR

Sistema de EC	Sistema de eletroforese capilar modular.
BGE	Tetraborato de sódio 20mM, pH 10,0
Voltagem	10 KV
Injeção	Modo hidrodinâmica em 90 segundos
Capilar	Sílica fundida, 42cm (efetivo), 50 µm
Comprimento de onda	385 nm

Método 3. (LC-MS/MS): As amostras serão analisadas em sistema de cromatografia líquida de alta performance acoplada à espectrômetro de massas em modo *tandem* sob as condições de análise listadas na Tabela 5. A identificação e quantificação é realizada através do software Analyst (Applied Biosystems).

Tabela 5. HPLC - ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Sistema de HPLC	Agilent 1100 Series, fluxo de fase móvel em 0,5 mL.min ⁻¹ (ou similar).
Espectrômetro de massas	API 5000 - Applied Biosystems (ou similar).
Colunas	Coluna C8, 150 X 4,6 mm. Coluna fenil-hexil, 150 X 4,6 mm. Coluna PLRP-S 150 X 4,6 mm, 300 Å
Dados	Computador integrado (Software Analyst APPLIED BIOSYSTEMS ou equivalente)
Fonte de ionização	Electrospray em modo positivo (ESI+)

Tabela 6. Fragmentos ionizados de peptídeos resultantes da digestão triptica de CMP

Sequência de aminoácidos	Digestão completa [M + H] ⁺	Digestão completa [M + 2H] ²⁺	Digestão parcial [M + H] ⁺	Digestão parcial [M + 2H] ²⁺
*MAIPPK	656.3	328.7	784.4	392.7
**AIPPK	525.3	263.2	653.4	327.2

*fragmento de CMP (clivagem entre os AAs 105-106 da k-caseína)

**fragmento de Pseudo-CMP (clivagem entre os AAs 106 -107 da k caseína)

Tabela 7. Fragmentos ionizados de peptídeos resultantes da digestão triptica de CMP

Massa do fragmento	DP- CE- CXP	Ion precursor [M + H] ⁺	DP - CE - CXP otimizado	MRM fons produtos
655	80-35-10	656 [M + H] ⁺	80-39-24	656 - 341
655	80-35-10	656 [M + H] ⁺	80-53-16	656 - 244
524	80-35-10	525 [M + H] ⁺	80-13-16	525 - 307
524	80-35-10	525 [M + H] ⁺	80-13-42	525 - 165

DP, potencial de "declustering"; CXP, potencial de saída; CE, energia de colisão

7. Resultados

Os resultados serão considerados da seguinte forma:

Método 1. (SEC) - amostras com pico na janela de tempo de retenção do CMP com áreas equivalentes ou inferiores ao pico do ponto de menor concentração da curva de calibração (25 mg.L⁻¹) serão consideradas "negativas", ou seja, com teor de CMP dentro da quantidade aceitável para consumo direto. Amostras com picos com área equivalentes ou superiores ao ponto de menor concentração da curva serão consideradas "positivas" e serão analisadas nos métodos de EC e/ou LC-MS/MS para confirmação da identidade e para quantificação. Para tanto, a amostra positiva será reinjetada e os picos serão coletados para a digestão triptica.

Método 2. (EC) - a EC permite a "abertura" do pico único evidenciado em SEC em múltiplos picos, correspondentes às isoformas do CMP (variantes genéticas A e B e suas múltiplas formas glicosiladas e/ou fosforiladas, bem como pseudo-CMP). A análise destes eletroferogramas proporciona informação estrutural sobre a composição do CMP presente na amostra positiva, sendo a quantificação realizada pela comparação dos picos principais em relação ao padrão. A derivatização do CMP íntegro ou de seus produtos de digestão triptica amplia a capacidade de detecção do método, bem como a seletividade do mesmo. Se a análise dos eletroferogramas não for suficiente para determinar a natureza do peptídeo (CMP ou pseudo-CMP), é necessária a análise confirmatória por LC-MS/MS. Conforme descrito no item "Fundamentos", a análise por EC pode ser suprimida se estiver disponível o método de confirmação por LC-MS/MS.

Método 3. (LC-MS/MS) - A confirmação da identidade do peptídeo na amostra suspeita é realizada pela identificação dos fragmentos terminais da k-caseína original, de modo que é possível determinar a massa molecular exata de cada fragmento. Embora seja possível a formação de CMP por ação de enzimas proteolíticas bacterianas, a especificidade da ação enzimática de *Pseudomonas fluorescens* é pela clivagem em 106-107. A análise por LC-MS/MS também pode se dar de forma quantitativa, no caso de não poder ser realizada por EC, através de calibração com digestão triptica de amostras de padrão. A estrutura primária das variantes genéticas de CMP A e B, bem como o pseudo-CMP, está descrita abaixo (Figura 3), com o fragmento alvo da diferenciação em destaque (negrito).

CMP A

MAIPPKKNQDKTEIPTINTIASGEPTSTPTTEAVESTVA-TLEDSPEVIESPPEINTVQVTSTAV

CMP B

MAIPPKKNQDKTEIPTINTIASGEPTSTPTTEAVESTVA-TLEASPEVIESPPEINTVQVTSTAV

Pseudo-CMP

AIPPKKNQDKTEIPTINTIASGEPTSTPTTEAVESTVA-TLEDSPEVIESPPEINTVQVTSTAV

Figura 3. Estrutura primária de CMP A, CMP B e pseudo-CMP. Com a digestão triptica, os analitos se convertem em peptídeos de 6 ou 7 aminoácidos, eliminando o problema da diversificação de isoformas glicosiladas e fosforiladas. Do mesmo modo, a variação de aminoácidos existente entre a variante genética A e B não é levada em conta, já que ambas variantes apresentam a mesma estrutura terminal.

7.1. Critérios de aceitabilidade dos resultados

7.1.1. Coeficiente de correlação (r) da curva de calibração

O coeficiente de correlação (r) da curva de calibração em matriz deve ser ≥ 0,92 para SEC, caso contrário, a curva deve ser repetida. No caso de curvas de produtos de digestão, são considerados satisfatórios valores ≥ 0,85.

7.1.2. Parâmetros de recuperação

Os dados de recuperação devem ser monitorados através de carta controle e, embora controlados, não estão envolvidos nos cálculos de concentração, uma vez que a curva é realizada em amostras de recuperado, mas se a recuperação não se mostrar satisfatória em relação à carta controle, deve-se realizar a análise crítica do processo.

7.2. Cálculos e emissão dos resultados

7.2.1 Deve-se calcular a concentração dos analitos nas amostras utilizando a seguinte equação, obtida pela injeção dos padrões da curva:

$$y = ax + b$$

onde: y = concentração em µg.mL⁻¹;

x = área do pico;

a = inclinação da reta;

b = intercepto y.

8. Referências

CAMPOS, T. M. (2008). "Desenvolvimento de método analítico para determinação diferencial de caseinomacropéptido e pseudo-caseinomacropéptido em leite por LC-MS/MS". Projeto Tecnológico de Conclusão de Curso - Química Industrial. Instituto de Química, UFRGS.

DE NONI, I. and P. Resmini (2005). "Identification of rennet-why solids in "traditional butter" by means of HPLC/ESI-MS of non-glycosylated caseinomacropéptido A." Food Chemistry v93 , p65.

LORENZETTI, D. K. (2006) Dissertação "Influência do tempo e da temperatura no Desenvolvimento de microrganismos psicrófilos no leite cru de dois estados da região sul". Curitiba, PR.

Método de Ensaio - MET RPM/05 - Determinação de CMP em leite por HPLC, eletroforese capilar e espectrometria de massas. Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas e Medicamentos Veterinários (RPM) - Laboratório Nacional Agropecuário (LANA-GRO/RS) Emissão: 16/04/2009. Versão 1.

RECIO, I., L. AMIGO, et al. (1997). "Application of capillary electrophoresis to the study of proteolysis of caseins." Journal of Dairy Research v64 (2), p221.

RIEL, V. J. and OLIEMAN, C (1995). "Determination of caseinomacropéptido with capillary zone electrophoresis and its application to the detection and estimation of rennet whey solids in milk and buttermilk powder." Electrophoresis v16 (4), p529.

THOMA, C., I. Krause, et al. (2006). "Precipitation behaviour of caseinomacropéptidos and their simultaneous determination with whey proteins by RP-HPLC." International Dairy Journal v16, p285.

SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA

PORTARIA Nº 93, DE 2 DE MARÇO DE 2010

O SECRETÁRIO DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO no uso das atribuições que lhe confere o Artigo 9, Seção II, Capítulo III, aprovado pelo Decreto Presidencial n.º 5.351, de 21 de janeiro de 2005, publicado no Diário Oficial da União, em 24 de janeiro de 2005, e tendo em vista o disposto no Capítulo V, art. 27º ao 38º da Instrução Normativa Ministerial Nº 17, de 13 de julho de 2006 e o que consta do Processo MAPA 21028.007135/2007-42, resolve:

Art. 1º Credenciar a empresa TRACER - Certificação de Origem Animal LTDA, estabelecida à Avenida Dr. Jaime Ribeiro Da Luz nº 971, Sala 31, município de Uberlândia/MG, CNPJ 04.994.346/0001-03, como Entidade Certificadora junto ao Serviço de Rastreabilidade da Cadeia Produtiva de Bovinos e Bubalinos.

Art. 2º Esta Portaria entra em vigor na data de sua publicação.

INÁCIO AFONSO KROETZ