



Avaliação Metabolômica do Processo de Maturação de Queijo Minas

Geovana Manzan Sales, Jeany Delafiori, Flávia Luísa Dias-Audibert e Dr. Rodrigo Ramos Catharino

1. INTRODUÇÃO

O queijo minas é caracterizado, segundo Lei nº 14185 de 2002, como um queijo produzido com leite cru, culturas lácteas naturais como pingo, soro fermentado ou soro-fermento, coalho e sal, e maturado à temperatura ambiente. Contudo, o período mínimo de maturação varia conforme a microrregião onde foi produzido, podendo este ser de 14 dias a 22 dias [1,2].

O processo de maturação do queijo envolve uma série de reações bioquímicas, catalisadas por microrganismos vivos ou por enzimas provenientes de várias fontes, resultando no desenvolvimento do sabor, textura e aparência da variedade de queijo. Dentre as reações bioquímicas que ocorrem, podem ser citados o metabolismo de lactose, lactato e citrato, lipólise, metabolismo de ácidos graxos, proteólise e catabolismo de aminoácidos [3,4].

Visto a importância dessa etapa no processo de produção de queijos, uma elucidação de quando esse processo atinge o esperado nos quesitos de sabor, textura e aparência para a variedade de queijo auxiliaria no melhor controle de qualidade da produção, uma vez que haveria a possibilidade de padronização analítica do processo de maturação. Assim, uma análise das reações bioquímicas que ocorrem durante esse processo, de forma rápida e efetiva através da busca por possíveis biomarcadores se faz necessária.

2. OBJETIVO

Determinar as diferenças e identificar os marcadores de Queijo Minas utilizando espectrometria de massas e correlacioná-los com o processo de maturação.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Ambiente de experimentação

Os experimentos foram realizados integralmente no Laboratório *INNOVARE* de Biomarcadores, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Campinas.

Materiais e preparo de amostra

Foi acompanhado o processo de maturação de três lotes do Queijo Minas Artesanal a partir de leite cru produzido pelo Sítio Real localizado em Araxá/MG. Durante o processo de maturação foram coletadas amostras da casca do queijo em triplicata nos tempos 0, 3, 6, 12 e 30 dias. Foi retirada uma fatia de cada amostra (0,5 cm x 0,5 cm) e cada uma foi posta em 1 mL de solução de metanol:água (1:1) e homogeneizado em vórtex por 30 segundos, para extração dos lipídios presente, em seguida, foi retirado uma alíquota de 10 µL do sobrenadante e a mesma foi diluída em 490 µL de metanol e homogeneizada em vórtex por 30 segundos e analisada no modo positivo após a adição de 1 µL de ácido fórmico.

Análise por espectrometria de massas e identificação de biomarcadores

Um ESI-LTQ-XL Discovery (Thermo Scientific, Bremen, Germany) foi usado para a aquisição dos espectros de massas. As condições experimentais foram definidas como: fluxo de 10 µL/min, temperatura do capilar de 280 °C, corrente de pulverização de 5 kV e gás carreador a 5 unidades arbitrárias. Foram realizadas 10 replicadas para cada amostra. A aquisição de dados foi realizada em modo *fullscan* na faixa de m/z entre 150 a 1700 unidades de massa atômica. Os dados foram tabulados em relação massa-carga e intensidade.

As diferenças no processo de maturação foram observadas através de tratamento por software estatístico online MetaboAnalyst 4.0 [5] utilizando-se análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA). Essa abordagem permite agrupar ou diferenciar grupos de amostras baseado nas semelhanças existentes entre si. Esses compostos tiveram sua identidade proposta através de busca em bancos de dados em metabolômica, como LIPIDMAPS e METLIN, de reações de fragmentação (MS/MS) e cálculos estruturais por meio de software Mass Frontier (v. 6.0, Thermo Scientific, Califórnia, EUA).



Condições experimentais gerais para MS/MS foram: dissociação induzida por colisão (CID) utilizando Hélio como gás de colisão, com energia variável de 20 a 50 eV.

4. RESULTADOS

Os resultados dos espectros de massa adquiridos foram submetidos à análise estatística multivariada (PLS-DA) para comparação dos tempos em análise. Os resultados obtidos por essa análise, observados na Figura 1, mostram a separação do queijo fresco (tempo 0) e do processo de maturação (nos tempos 3, 6, 12 e 30) o que nos permite afirmar que há metabólitos que estatisticamente diferenciam o queijo fresco do queijo maturado. O modelo utilizado foi estatisticamente significativo ($p < 0,001$) através da validação realizada (Figura 2) através de testes de permutação (Fig.2a Distância de separação; Fig.2b Exatidão predita durante treinamento). Através da lista de VIP score gerado pelo software online MetaboAnalyst 4.0 foi possível selecionar os marcadores distintos entre queijo fresco e queijo nos diferentes estágios de maturação; além disso, através dessa lista é possível observar quais marcadores são comuns dentre os diferentes estágios de maturação e que podem descrever esse processo.

Através de análise por *heat map* (figura 3) dos marcadores é possível observar quais estão presentes em maior concentração no queijo fresco (tempo 0) e quais estão em maior concentração no queijo maturado (tempos 3, 6, 12 e 30). Essa diferenciação corrobora para a definição de quais marcadores melhor representam o queijo fresco e quais melhor representam o processo de maturação. Por fim, os marcadores identificados foram descritos na tabela 1,

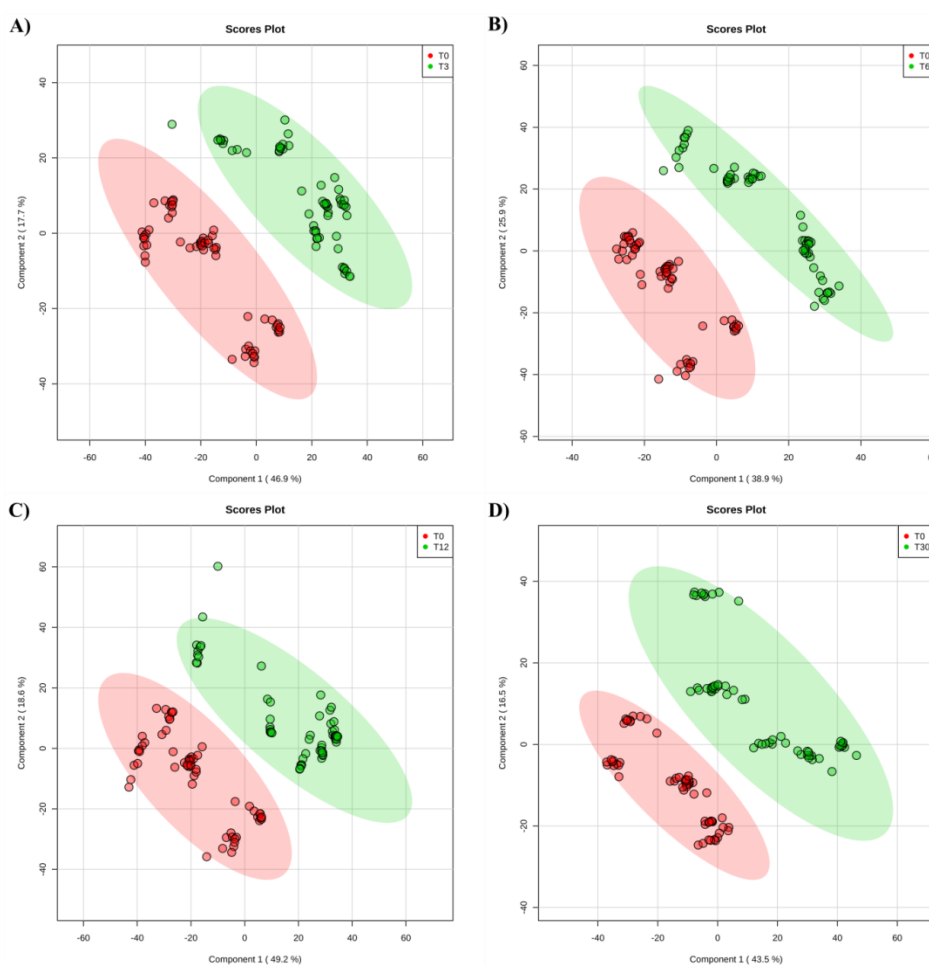


Figura 1. Imagem contendo os resultados do PLS-DA para as comparações entre os tempos de análise T0xT3 (A), T0xT6 (B), T0xT12 (C) e T0xT30 (D).

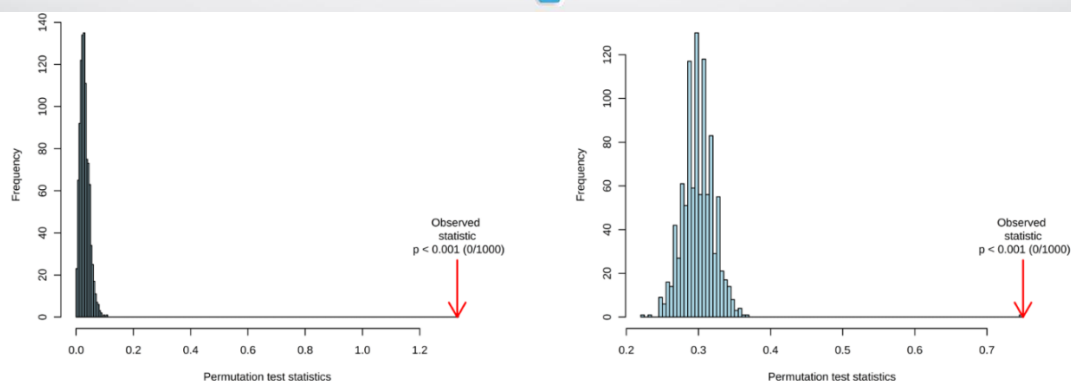


Figura 2. Teste de permutação para validação da análise estatística por PLS-DA. (a) Distância de Separação (p -valor $< 0,001$); (b) Exatidão predita durante treinamento (p -valor $< 0,001$).

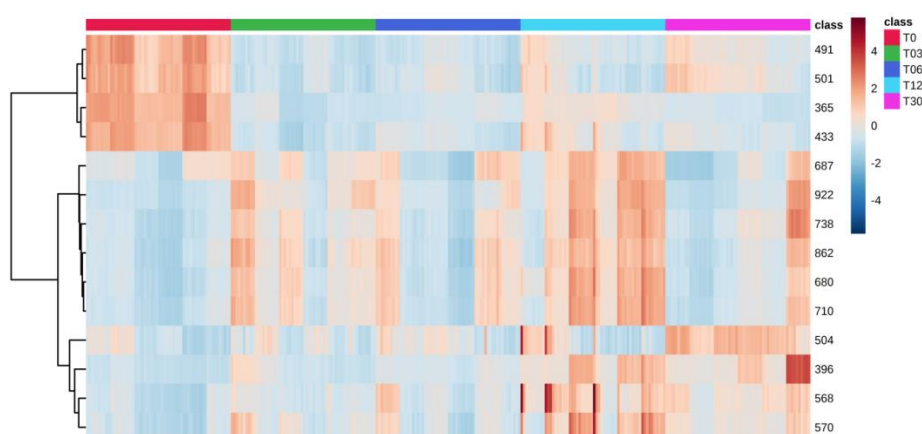


Figura 3. Heat map dos marcadores nos tempos 0, 3, 6, 12 e 30.

Tabela 1. Tabela contendo os marcadores encontrados para o queijo fresco (T0) e para o maturado (T3, T6, T12 e T30).

<i>m/z</i>	Molécula	Aduto	MSMS	ID
Queijo Fresco (T0)				
365	Dissacarídeo (lactose, manobiose)	[M+Na] ⁺	305-347-203-245-185	267
491	N-oleil-Ala-His	[M+H] ⁺	459-365-210-371-403-447-373-491	LMFA08020220
687	DG(42:11) ^c	[M+H] ⁺	599-405-431-577-571-383	LMGL02010286 4660
Queijo Maturado (T3, T6, T12 e T30)				
504	PE(20:3) ^c	[M+H] ⁺	486-458-446-415-389-436	LMGP02050022 ^a 77688 ^b
568	PE(22:4) ^c	[M+K] ⁺	525-520-522-453-439-551-510	LMGP02050014 ^a 77680 ^b
570	PS(22:6) ^c	[M+H] ⁺	538-524-552-553-497-371-436	LMGP03050013 ^a 78840 ^b
680	DG(40:1) ^c	[M+H] ⁺	592-622-648-636-662	LMGL02010128 ^a 4437 ^b
710	PE(34:5) ^c	[M+H] ⁺	622-454-430-600-678-406-664	LMGP02010444 ^a 60315 ^b
738	DG(44:0) ^c	[M+H] ⁺	622-650-570-692-706	LMGL02010258 ^a 4601 ^b
862	TG(52:1) ^c	[M+H] ⁺	830-606-804-816-844-475-776	LMGL03010085 ^a 4784 ^b
922	TG(58:13) ^c	[M+H] ⁺	640-639-894-585-754-569	LMGL03012870 98729

DG: diacilglicerol; PE: fosfatidiletanolamina; PS: fosfatidilserina; e TG: triacilglicerol.

^a: LIPIDMAPS; ^b: METLIN; ^c: número de carbonos: número de insaturações.



5. DISCUSSÃO

O leite pode ser considerado uma emulsão óleo em água, na qual as micelas lipídicas estão dispersas na fase contínua (fase aquosa). Conforme descrito em literatura as micelas lipídicas presentes no leite são revestidas por uma fina membrana que desempenha um grande papel para melhorar a estabilidade dessa emulsão, sendo essa membrana constituída por uma complexa mistura de proteínas, glicoproteínas, fosfolipídios, triacilglicerídeos, colesterol, enzimas e outros componentes, em menores quantidades [6,7].

Dentre os componentes da membrana, podemos destacar os fosfolipídios, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina e fosfatidilinositol pela sua maior importância para a melhor estabilização dessa emulsão devido ao seu caráter anfifílico [6]. Sabendo que o processo de transformação do leite em queijo envolve uma série de etapas, é importante ressaltar a adição do coalho. Nesse processo de adição, torna-se possível o rompimento da membrana que reveste os glóbulos lipídicos, provocando a liberação além dos lipídios em seu interior, os componentes da própria membrana, dentre os quais foram identificados fosfatidiletanolamina [m/z 504 PE(20:3); m/z 568 PE(22:4); e m/z 710 PE(34:5)] e fosfatidilserina [m/z 570 PS(22:6)].

Foi identificada no queijo fresco a molécula N-oleil-Ala-His [m/z 491 N-oleil-Ala-His], a qual pode ser formada pela reação entre carnosina e ácido oleico [8], ambos presentes no leite [9,10]. Propõe-se que a formação dessa substância pode ser desencadeada após adição do coalho, responsável pela sua catálise, e se limite ao início do processo devido à carnosina possuir potencial antioxidante e capacidade de inibir lipoxigenases [11] o que provocaria seu consumo durante o período de maturação do queijo. Além desse biomarcador também foi identificado, para o queijo fresco, um dissacarídeo, podendo este ser lactose ou manobiose, [m/z 365 Dissacarídeo (lactose, manobiose)] o qual está presente no leite e que sua concentração no queijo maturado reduziria devida sua metabolização para lactato, o qual seguiria por rotas de metabolização [4,12,13].

Durante o processo de maturação uma das principais classes de reação é a lipólise que, devido ao baixo potencial de oxidação do queijo [14], ocorre por meio da ação de enzimas hidrolíticas, também chamadas hidrolases, presentes, formando seus principais produtos, os quais podem ser ácidos graxos livres, mono- e diacilgliceróis [14,15]. Dentre esses, foi possível identificar, para o queijo fresco, possivelmente por causa da quebra das micelas e exposição de triacilgliceróis durante o processo de produção do queijo, um diacilglicerol na m/z 687 DG(42:11). Já no processo de maturação observa-se a presença de triacilgliceróis nas m/z 862 TG(52:1) e m/z 922 TG(58:13), que, possivelmente, ainda não sofreram reação, e diacilgliceróis nas m/z 680 DG(40:1) e m/z 738 DG(44:0). O aumento dessas espécies de diacilgliceróis observado no queijo maturado pode ser justificado pelo maior tempo de exposição desses às enzimas presentes no queijo durante seu armazenamento para maturação.

6. CONCLUSÃO

É possível concluir que o queijo fresco e o queijo maturado, ou em processo de maturação, possuem características moleculares que os discriminam estatisticamente, conforme o observado através da análise por PLS-DA. Os biomarcadores relacionados a essas diferenças podem ser determinados a partir da análise da lista de VIP score e na análise por *heat map*, os quais melhor representam o queijo no estado fresco, representado pelo tempo 0, e quais melhor representam o queijo em estado de maturação, representado nos tempos 3, 6, 12 e 30.

Assim, foram identificados para o queijo fresco os marcadores [m/z 491 N-oleil-Ala-His; e m/z 687 DG(42:11)] que estão relacionados com a ação do coalho no leite, e um dissacarídeo [m/z 365 Dissacarídeo (lactose, manobiose)] que está presente no leite antes de sua transformação em queijo. E, para o queijo maturado, foram identificados os marcadores que estão relacionados com a reação de lipólise [m/z 862 TG(52:1); m/z 922 TG(58:13); m/z 680 DG(40:1); e m/z 738 DG(44:0)] e com a degradação das micelas lipídicas e liberação de componentes da membrana durante o processo de produção e maturação do queijo [m/z 504 PE(20:3); m/z 568 PE(22:4); m/z 710 PE(34:5); e m/z 570 PS(22:6)].

Agradecimentos ao CNPq pelo apoio financeiro, e ao pessoal do laboratório *INNOVARE* por todo o apoio durante a realização desse projeto.



7. REFERÊNCIAS

1. Minas Gerais, *Lei nº 14.185 de 31 de janeiro de 2002. Dispõe sobre o processo de produção do Queijo Minas Artesanal*. 2002: Belo Horizonte, Minas Gerais.
2. IMA, *Portaria nº 1736 de 27 de julho de 2017. Altera a Portaria nº 1305/2013, de 30 de abril de 2013, que dispõe sobre o período de maturação do Queijo Minas Artesanal*. 2017: Belo Horizonte, Minas Gerais.
3. Fox, P.F., et al., *Fundamentals of cheese science*. 2017: Springer.
4. McSweeney, P.L., *Biochemistry of cheese ripening*. International journal of dairy technology, 2004. **57**(2-3): p. 127-144.
5. Chong, J., et al., *MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis*. Nucleic acids research, 2018. **46**(W1): p. W486-W494.
6. Contarini, Giovanna, and Milena Povolo. *Phospholipids in milk fat: composition, biological and technological significance, and analytical strategies*. International Journal of Molecular Sciences, 2013. **14**(2): p. 2808-2831.
7. Tamime, Adnan Y., ed. *Dairy fats and related products*. John Wiley & Sons, 2009.
8. Pitzer, Julia, and Kerstin Steiner. *Amides in nature and biocatalysis*. Journal of biotechnology, 2016. **235**: p. 32-46.
9. Vistoli, Giulio *CHAPTER 1: Carnosine in the Context of Histidine-Containing Dipeptides*, in *Imidazole Dipeptides: Chemistry, Analysis, Function and Effects*, 2015. p. 3-22.
10. Jenkins, T. C., and M. A. McGuire. *Major advances in nutrition: impact on milk composition*. Journal of Dairy Science, 2006. **89**(4): p. 1302-1310.
11. Pihlanto, Anne. *Antioxidative peptides derived from milk proteins*. International dairy journal, 2006. **16**(11): p. 1306-1314.
12. Portnoi, P. A., and A. MacDonald. *Determination of the lactose and galactose content of cheese for use in the galactosaemia diet*. Journal of human nutrition and dietetics, 2009. **22**(5): p. 400-408.
13. McSweeney, Paul LH, and Maria José Sousa. *Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review*. Le Lait, 2000. **80**(3): p. 293-324.
14. Collins, Yvonne F., Paul LH McSweeney, and Martin G. Wilkinson. *Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge*. International Dairy Journal, 2003. **13**(11): p. 841-866.
15. Lopez, Christelle, et al. *Lipolysis during ripening of Emmental cheese considering organization of fat and preferential localization of bacteria*. Journal of agricultural and food chemistry, 2006. **54**(16): p. 5855-5867.