

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

THAIS NALIATO CHEQUER

**Quantificação da Betacasomorfina-7 após processamento tecnológico de leite
oriundo de vacas com alelos contrastantes para β -caseína**

Pirassununga

2022

THAIS NALIATO CHEQUER

Título do trabalho: Quantificação da Betacasomorfina-7 após processamento tecnológico de leite oriundo de vacas com alelos contrastantes para β -caseína
(versão corrigida)

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências do programa de Pós-Graduação em Zootecnia.

Área de concentração: Qualidade e Produtividade Animal

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Maria Centola Vidal

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP, com os dados fornecidos pela autora

Chequer, Thaís Naliato

Quantificação da Betacasomorfina-7 após processamento tecnológico de leite de vacas com alelos contrastantes para β -caseína / Thaís Naliato Chequer; orientadora Ana Maria Centola Vidal. -- Pirassununga, 2022.

39f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

1. Beta caseína. 2. BCM-7. 3. Leite A2. 4. Derivados lácteos. I. Vidal, Ana Maria Centola, orient. II. Título.

Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte - o autor.



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Perfil proteico e proteoma de leite com genótipos contrastantes para o gene da beta-caseína e verificação da ação proteolítica do *Bacillus cereus* s.s. e *Pseudomonas fluorescens* e de tratamentos tecnológicos aplicados ao leite sobre a produção da beta-casomorfina-7.", protocolada sob o CEUA nº 9431111019 (ID 001407), sob a responsabilidade de **Ana Maria Centola Vidal e equipe; Danielle de Cássia Martins da Fonseca; Elizangela Domenis Marino; Alenia Naliato Vasconcellos** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo - FZEA/USP (CEUA/FZEA) na reunião de 28/01/2020.

We certify that the proposal "Protein and protein profile of milk with contrasting genotypes for the beta-casein gene and verification of the proteolytic action of *Bacillus cereus* s.s. and *Pseudomonas fluorescent* and technological controls applied to milk on the production of beta-casomorphine-7.", utilizing 15 Bovines (15 females), protocol number CEUA 9431111019 (ID 001407), under the responsibility of **Ana Maria Centola Vidal and team; Danielle de Cássia Martins da Fonseca; Elizangela Domenis Marino; Alenia Naliato Vasconcellos** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Animal Science and Food Engineering - (São Paulo University) (CEUA/FZEA) in the meeting of 01/28/2020.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [01/2020](#) a [07/2022](#) Área: [Medicina Veterinária](#)

Origem: [Animais de proprietários](#)

Espécie: [Bovinos](#)

sexo: [Fêmeas](#)

idade: [2 a 5 anos](#)

N: [15](#)

Linhagem: [Holandesa P.O](#)

Peso: [450 a 500 kg](#)

Local do experimento: Ainda não há informações

Pirassununga, 28 de janeiro de 2020

Profa. Dra. Daniele dos Santos Martins
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo - FZEA/USP

Profa. Dra. Cristiane Gonçalves Titto
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo - FZEA/USP

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: Thaís Naliato Chequer

Título: Quantificação da Betacasomorfina-7 após processamento tecnológico de leite oriundo de vacas com alelos contrastantes para β -caseína

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências do programa de Pós-Graduação em Zootecnia.

Data: 16 de dezembro de 2022.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Ana Maria Centola Vidal – Presidente da Banca Examinadora

Instituição: FZEA/USP

Julgamento: _____

Prof. Dr. Evelise Oliveira Telles

Instituição: FMVZ/USP

Julgamento: _____

Prof^a. Bruna Maria Salotti de Souza

Instituição: UFMG

Julgamento: _____

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

RESUMO

CHEQUER, T.N. **Quantificação da Betacasomorfina-7 após processamento tecnológico de leite oriundo de vacas com alelos contrastantes para β -caseína.** 2022. 39f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2022.

A comunidade científica ainda não está totalmente de acordo quanto aos benefícios do consumo de leite oriundo de vacas com genótipo A2A2, em relação ao A1A1. Considerando que as novas demandas do mercado consumidor estão cada vez mais relacionadas à qualidade dos nutrientes e aos benefícios aportados à saúde e o bem-estar, a identificação e quantificação da BCM-7 em leite e derivados abre caminhos para a popularização do leite A2 e serve de base para outros estudos na área. Esses peptídeos são derivados a partir da β -caseína do leite e demonstram diversas atividades opióides e farmacológicas. As BCM-7 se ligam a receptores, que estão localizados no sistema nervoso central, trato gastrointestinal e algumas células imunes; podendo desencadear algumas doenças. Este estudo teve a finalidade de quantificar a BCM-7 no leite cru e pasteurizado, bem como em seus derivados (iogurte e queijo minas frescal) produzidos com leite oriundo de vacas com genótipos A1A1 e A2A2 para β -CN, ao longo da vida de prateleira de modo a averiguar se os tratamentos industriais têm influência na liberação desse peptídeo bioativo, bem como comparar a disponibilidade de BCM-7 em diferentes genótipos. As amostras foram lidas através do HPLC e foi possível verificar maior abundância desse peptídeo no genótipo A1A1, porém não observou ausência de BCM-7 no genótipo A2A2.

Palavras-chave: Beta-CN, BCM-7, leite A2, derivados lácteos, peptídeos opióides, HPLC.

ABSTRACT

CHEQUER, T.N. **Quantification of Beta casomorphin-7 after technological milk processing of cows with contrasting alleles for β -casein.** 2022. 39p. Dissertation (Master of Animal Science) – Faculty of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo, Pirassununga, 2022.

The scientific community still does not fully agree on the benefits of consuming milk from cows with A2A2 genotype, as compared to A1A1. Considering that the new demands of the consumer market are increasingly related to the quality of the nutrients and the benefits provided to health and well-being, the identification and quantification of BCM-7 in milk and dairy products open the way to popularize A2 milk and serve as a basis for further studies in the area. These peptides are derived from the β -casein of milk and demonstrate diverse opioid and pharmacological activities. BCM-7 bind to receptors, which are located in the central nervous system, gastrointestinal tract and some immune cells; they can trigger some diseases. In order to quantify BCM-7 in raw and pasteurized milk, as well as in its derivatives (yogurt and minas frescal cheese) produced with milk from cows with A1A1 and A2A2 genotypes for β -CN, throughout the shelf life in order to investigate whether industrial treatments have an influence on the release of this bioactive peptide, as well as to compare the availability of BCM-7 in different genotypes. For the quantification of Betacasomorphin-7, the samples were read by HPLC and, it was possible to verify a higher abundance of this peptide in the A1A1 genotype, however, no absence of BCM-7 was observed in the A2A2.

Key-words: Beta-casein, BCM-7, A2 milk, dairy products, opioid peptides, HPLC.

LISTA DE FIGURAS

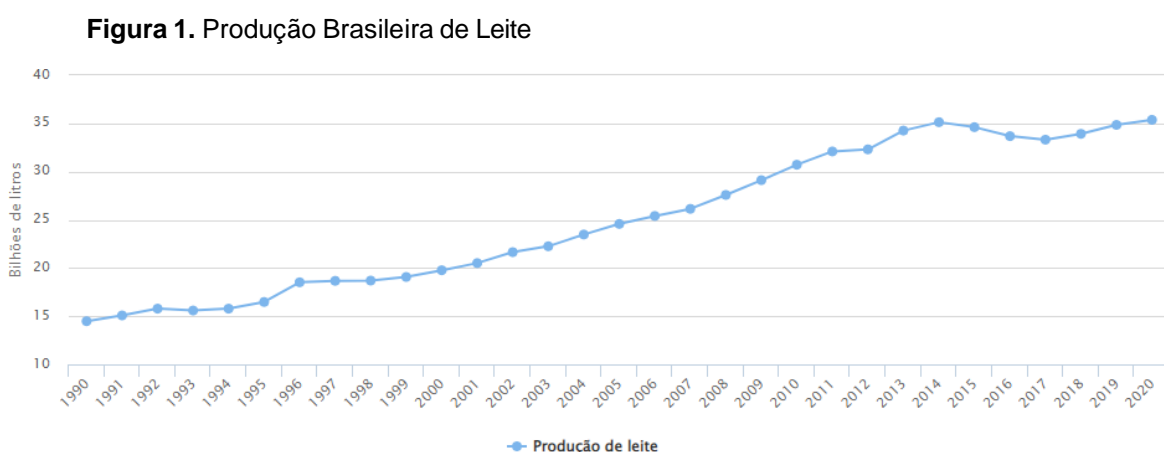
FIGURA 1. Produção Brasileira de Leite.....	11
FIGURA 2. Representação gráfica das variantes A1 e A2 da β -caseína	14
FIGURA 3. Representação esquemática de uma β -CN A1 e A2	14
FIGURA 4. Sequência primária de BCM em diversas fontes de leite.....	15
FIGURA 5. Digestão das β -CN A1 e A2.....	16
FIGURA 6. Presença de BCMs em diferentes tipos de queijos reportadas na literatura.....	22
FIGURA 7. Apresentação visual de uma β -CN A2 (amostra de leite cru)	27
FIGURA 8. Apresentação visual de uma β -CN A1 (amostra de leite cru)	28
FIGURA 9. Abundância de BCM-7 através da HPLC para as amostras de leite cru, leite pasteurizado no dia da produção (LPT1) e leite pasteurizado no final do período de validade (LPT2).....	28
FIGURA 10. Abundância de BCM-7 através da HPLC para as amostras de leite pasteurizado no dia da produção (LPT1) (matéria-prima para o iogurte) e iogurte no dia da produção (IT1) e iogurte no final do período de validade (IT2)	29
FIGURA 11. Abundância de BCM-7 através da HPLC para as amostras de leite pasteurizado no dia da produção (LPT1) (matéria-prima para o queijo) e queijo minas frescal no dia da produção (QMFT1) e queijo minas frescal no final do período de validade (QMFT2).....	29
FIGURA 12. Abundância de BCM7 em leite cru, pasteurizado, iogurte e queijo minas frescal	29

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1. Efeitos associados à BCM-7	17
2.2. Presença da BCM-7 no Leite cru e no Leite tratado beneficiado ou pasteurizado	19
2.3. Presença da BCM-7 em iogurte	20
2.4. Presença da BCM-7 em Queijos.....	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1. Preparo dos extratos de peptídeos solúveis em água.....	24
3.2. Identificação e quantificação da β -caseomorfina7 (BCM-7)	25
3.3. Preparo das amostras para análise de HPLC-MS/MS	25
3.4. Análise de espectrometria de massas	26
3.5. Parâmetros de processamento e busca em banco de dados públicos.....	26
4. RESULTADOS.....	27
5. DISCUSSÕES	29
6. CONCLUSÃO.....	33
REFERÊNCIAS.....	34

1. INTRODUÇÃO

O Brasil produziu, no ano de 2019, um total de 34,8 bilhões de litros de leite inspecionados, sendo que, 11,9 bilhões desses litros foram produzidos apenas pela região Sudeste (IBGE, 2020). A produção de leite em 2020 foi 2,1% superior a 2019, totalizando 35,5 bilhões de litros (CONAB, 2021). Esse número de produção atingiu a marca histórica desde o ano de 1974, ultrapassando a marca do ano de 2014 (com 35,1 bilhões de litros produzidos) (IBGE, 2021).



Fonte: IBGE

Desses litros, estima-se 13% sejam relacionados à produção de A2 (KARSBURG, 2022). No entanto, esse número ainda é subestimado já que a maior parte dos produtores brasileiros não investem em genotipagem dos animais. Por outro lado, os benefícios que podem ser atribuídos ao consumo de leite A2 juntamente com a possibilidade de venda do litro três vezes maior do que o A1, tem atraído investimento nesse setor (KARSBURG, 2022).

Desde 2019, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), através do Ofício 679, autorizou os produtores de leite A2 a usar a expressão ‘leite de vacas A2A2’ garantindo a origem do leite (BRASIL, 2019). Em complemento, em 2021, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) publicou a Resolução nº4.769, de 22 de dezembro de 2021 autorizou a inclusão no rótulo das embalagens de leite A2 as seguintes frases: “Leite produzido a partir de vacas com genótipo A2A2” e “O leite A2 não promove a formação de BCM-7 (betacasomorfina-7), que pode causar desconforto digestivo” (BRASIL, 2021).

Todo esse apoio legal e de rotulagem alavancou o desenvolvimento do leite A2A2 no Brasil. Retratado pela inserção de leite de vacas A2A2 no portfólio das duas maiores fazendas produtoras de leite do estado de São Paulo.

Aproximadamente um terço da proteína do leite de vaca é beta-caseína (β -CN), que é composta por β -CN A1 e A2. Essa diferença estrutural é foco de recentes pesquisas (THIRUVENGADAMA et al., 2021; ASLEDOTTIR et al., 2018; NGUYEN et al., 2018; BROOKE-TAULOR et al., 2017), pois a diferença conformacional na estrutura secundária da proteína expressa, pode exercer influência sobre as propriedades físico-químicas e microestruturais do leite (ELLIOTT et al., 1999).

Elas têm resultados distintos na digestão quando comparadas entre si, devido a uma ligeira diferença na sequência de aminoácidos da cadeia peptídica, podendo proporcionar a formação de peptídeos bioativos (KAMINSKI et al., 2007). Peptídeos bioativos são compostos que possuem entre 2 a 50 resíduos de aminoácidos e que possuem numerosas funções fisiológicas no corpo. Alguns desses peptídeos mostram atividade opioide que tem ação em receptores específicos distribuídos por todo sistema nervoso central e tem a capacidade de modulador e resposta ao estresse, dentre outras funções de importância fisiológica (BARBOSA et al., 2019).

A diferença entre os dois genótipos em específico, é a mudança do aminoácido prolina no A2 para histidina em A1 devido à um polimorfismo (KAMINSKI et al., 2007). Durante a digestão da β -CN A1 libera preferencialmente o peptídeo bioativo BCM-7. Em contraste, a estrutura de A2 limita a liberação de BCM-7 na digestão. Este peptídeo opioide tem sido incriminado em doenças cardiovasculares, diabetes, síndrome da morte súbita infantil, falha no desenvolvimento psicomotor, autismo, dentre outras (GIRIBALDI et al., 2022; UL HAQ et al., 2014).

Sendo assim, o propósito do presente estudo foi quantificar a BCM-7 no leite cru e pasteurizado, bem como em seus derivados (iogurte e queijo minas frescal) produzidos com leite oriundo de vacas com genótipos A1A1 e A2A2 para β -CN, ao longo da vida de prateleira de modo a averiguar se os tratamentos industriais têm influência na liberação desse peptídeo bioativo, bem como comparar a disponibilidade de BCM-7 em diferentes genótipos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

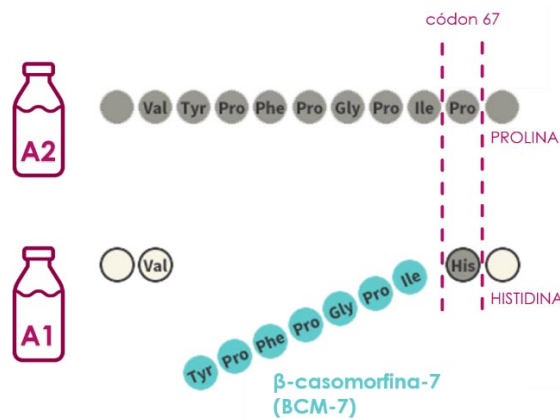
As proteínas lácteas são representadas por quatro caseínas (α_{s1} , α_{s2} , β e κ -caseína) e duas proteínas principais do soro (β -lactoglobulina e α -lactoalbumina) (KAMINSKI et al., 2007). As caseínas, em especial, exibem efeito imunomodulatório (VAN DER DOES et al., 2019; GAUTHIER et al., 2006; BENNETT et al., 2005), anti-hipertensivo (LÓPEZ-FANDIÑO et al., 2006), antimicrobiano (ESPÓSITO et al., 2006), antioxidante (PHILANTO et al., 2006) e de peptídeos semelhantes a opioides (RICHARD et al., 2013; MEISEL et al., 2000).

Dentre as proteínas lácteas, as caseínas são as proteínas mais abundantes no leite, sendo a β -CN a maior constituinte. A β -CN do leite possui 209 aminoácidos com 13 variantes, A1, A2, A3, A4, B, C, D, E, F, H1, H2, I e G (GALLINAT et al., 2013; CAROLI et al., 2009; KAMINSKI et al., 2007), as quais A1 e A2 são as variantes mais comuns. O alelo A1 é uma mutação do alelo A2 e é encontrado com maior frequência em animais de raças taurinas, como a Holandesa.

Os alelos da caseína também estão associados às características produtivas em gado de leite, principalmente ao aumento na produção de proteína. No Brasil, a grande maioria do rebanho produtor de leite é mestiço, resultante do cruzamento de uma raça zebuína (predominantemente a Gir) com uma taurina (predominantemente a Holandesa), que responde por cerca de 70% da produção de leite nacional (ÇALDAK, 2005). O leite é fonte de proteína, gordura, minerais e vitaminas de alta qualidade (NAGPAL et al., 2011; KAMINSKI et al., 2007; SGARBIERI, 2005).

Há um debate em andamento sobre os efeitos prejudiciais à saúde do alelo A1 da β -CN no leite em comparação com o alelo progenitor A2 (ASLAM et al., 2020; WONG et al., 2020; HEDGE et al., 2019; TULIPANO et al., 2020). A diferença entre a variante A1 e A2 é o resultado de um polimorfismo de nucleotídeo único no códon 67 do gene da β -CN; sendo a histidina na A1 e a prolina em A2 (KAMINSKI et al., 2007; TRUSWELL et al., 2005). Enquanto a variante A2 apresenta uma ligação peptídica entre prolina e isoleucina (Pro-Ile), a variante A1 apresenta a ligação peptídica entre histidina e isoleucina (His-Ile).

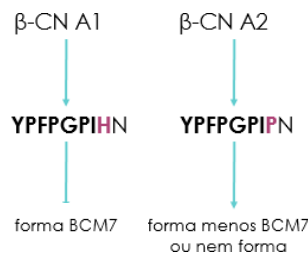
Figura 2. Representação gráfica das variantes A1 e A2 da β -caseína.



FONTE: Adaptado de A2milk.

Devido a este polimorfismo, a digestão enzimática da variante A1 produz o peptídeo opioide BCM-7 (DAMIANI et al., 2009). No caso da β -CN A2, a hidrólise enzimática da ligação entre “Pro-Ile” não ocorre ou ocorre a uma taxa muito baixa (CIEŚLIŃSKA et al., 2007) porque as proteases intestinais atuam mais fortemente na ligação “His-Ile”, resultando no aparecimento da BCM-7 (ALSLEDOTTIR et al., 2018; DE NONI et al., 2010; JINSMAA et al., 1999).

Figura 3. Representação esquemática de uma β -CN A1 e A2.



FONTE: traduzido de PARASHAR et al., 2015.

As β -casomorfina (BCMs) são um grupo de peptídeos bioativos com propriedades opioides (DE NONI; CATTANEO, 2010) que apresentam estruturas semelhantes, uma sequência de 4 a 11 aminoácidos (KAMINSKI et al., 2007) e a mesma sequência para os três primeiros aminoácidos: tirosina, prolina e fenilalanina (MUEHLENKAMP; WARTHESEN, 1996). A sequência de aminoácidos da BCM-7 corresponde às posições 60 a 66 da cadeia da β -CN (TIR-PRO-FEN-PRO-GLI-PRO-ILE) (DE NONI et al., 2009).

Várias fontes de leite, como leite bovino, bubalino, ovino e humano podem ser precursores de BCM-7, mas leite de cabras e camelos não são (XU, 2009). Os peptídeos BCMs também estão presentes no leite humano e são expressos no colostro, bem como no leite materno. A quantidade de peptídeos seria maior na semana inicial de lactação e menor no decorrer da lactação. A sequência primária das BCMs de várias fontes de leite foi descrita por De Noni et al. (2009) (figura 4).

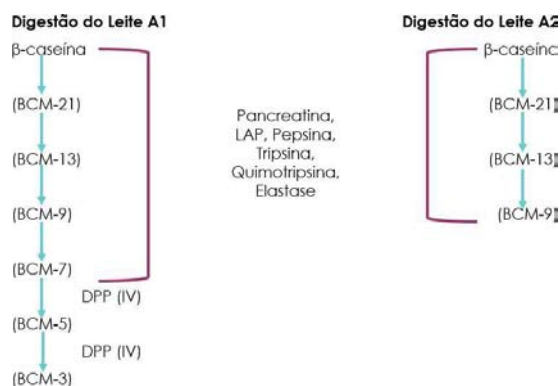
Figura 4. Sequência primária de BCM em diversas fontes de leite.

Fonte do Leite	BCMs	Posição dos Aminoácidos na Beta Caseína	Sequência Primária do Peptídeo
Bovino	β -casomorfina 4	(60-63)	Tyr-Pro-Phe-Pro (YPPF)
	β -casomorfina 5	(60-64)	Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly (YPPFG)
	β -casomorfina 7	(60-66)	Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile (YPPFGPI)
	β -casomorfina 8	(60-67)	Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-Pro/His (YPPFGPIP/H)
Ovino	β -casomorfina 8	(60-67)	Tyr-Pro-Phe-Thr-Gly-Pro-Ile-Pro (YPPFGPIP)
Bubalino	β -casomorfina 7	(60-66)	Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile (YPPFGPI)
Humano	β -casomorfina (1-4)	(51-54)	Tyr-Pro-Phe-Val (YPFV)
	β -casomorfina (1-5)	(51-55)	Tyr-Pro-Phe-Val-Glu (YPFVE)
	β -casomorfina (1-7)	(51-57)	Tyr-Pro-Phe-Val-Glu-Pro-Ile (YPFVEPI)
	β -casomorfina (1-8)	(51-58)	Tyr-Pro-Phe-Val-Glu-Pro-Ile-Pro (YPFVEPIP)

FONTE: DE NONI et al., 2009.

Dentre as BCMs, há também a BCM-5, como a sequência desse peptídeo tende a ser mais hidrofóbica, tem sabor amargo e está presente no interior da β -CN. Ele permanece ativo até que a molécula original seja digerida pela atividade combinada de enzimas proteolíticas do trato digestivo. A digestão adicional do heptapeptídeo é difícil devido à grande porcentagem de prolina nesta sequência de 7 aminoácidos e pode ser alcançada apenas com pepsina. A digestão com carboxipeptidase Y deste heptapeptídeo liberaria um pentapeptídeo, Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly, que tem uma atividade opioide mais alta do que a anterior (HENSCHEN et al., 1979).

Figura 5. Digestão das β -CN A1 e A2.



FONTE: Traduzido de PARSHAR et al., 2015.

A hidrólise da β -CN, além de acontecer durante a digestão por proteases intestinais envolvidas na digestão do leite, também pode acontecer pela ação de proteases endógenas do leite, proteases microbianas e durante os processamentos térmicos e enzimáticos utilizados na produção de leite e derivados (NGUYEN et al., 2015).

Outra hipótese de digestão é através da atividade proteolítica endógena no leite decorrente da ação da plasmina que está associada à fração de caseína (RICHARDSON, 1983). O plasminogênio presente no leite é convertido em plasmina e pode ser prontamente ativado por células somáticas. Uma vez convertido, resulta na ação proteolítica das frações de caseína α_{s1} , α_{s2} e β (CORASSIM et al., 2013; BASTIAN et al., 1996; VERDI et al., 1991; RICHARDSON et al., 1983).

Tais peptídeos também são liberados durante o processamento de alimentos que acontece na indústria de laticínios durante produção de leite pasteurizado, queijo, iogurte e outros produtos lácteos (NGUYEN et al., 2015). BCM-7 são geradas como resultado da digestão enzimática da β -CN A1 no intestino. Essa liberação ocorre quatro vezes mais do que no leite A2 (NGUYEN et al., 2015). O processamento do leite para a produção de derivados libera peptídeos bioativos da caseína, não apenas pela hidrólise enzimática, mas também pela hidrólise ácida (NGUYEN et al., 2015; BITRI, 2004; LOTFI, 2004; EL-ZAHAR et al., 2003) e tratamentos térmicos (ASLEDOTTIR et al., 2017; CIESLINSKA et al., 2012; MELTRETTER et al., 2008).

Tendências analíticas na análise de BCMs indicam a cromatografia líquida de alta eficiência de fase (RP-HPLC) como a escolha preferida para a separação destes

peptídeos em uma variedade de produtos lácteos. Para detecção, a absorvância (UV-Vis) tem sido amplamente utilizada em laboratórios todo o mundo (NGUYEN et al., 2015). Atualmente, na vanguarda das técnicas de detecção, está espectrometria de massa acoplada à ionização por eletropulverização (ESI) que é de longe a técnica de detecção mais confiável para pequenos peptídeos (DE NONI et al., 2010). Alternativamente, o ensaio imunoenzimático (ELISA) tem sido aplicado para detectar e quantificar BCMs em produtos lácteos (CIESLINSKA et al., 2012). Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a UV-Vis e detecção de espectrometria de massa, bem como ensaio imunoenzimático (ELISA) são usados para analisar BCMs em produtos lácteos (NGUYEN et al., 2015).

BCMs foram detectadas em leite cru de vaca, leite humano e em uma variedade de queijos comerciais, mas sua presença ainda não foi confirmada em iogurtes comerciais (NGUYEN et al., 2015).

A presença de BCMs no queijo depende de vários fatores que estão envolvidos na produção de diferentes variedades de queijo. Esses fatores incluem o processo de tratamento do leite, coagulante, pH na manipulação da coalhada, salga, tipo de cultura iniciadora e a temperatura e umidade durante a maturação (THIRUVENGADAMA et al., 2021).

A descoberta de que as BCMs estão presentes no queijo sugere que elas também possam se formar no iogurte, mas serem degradadas durante o seu processamento. A formação das BCMs no iogurte e a quantidade de BCM formada em diferentes etapas de processamento dependerá do tratamento térmico e do processo de fermentação (NGUYEN et al., 2015).

2.1. Efeitos associados à BCM-7

Evidências epidemiológicas sugerem que ela pode aumentar o risco de doenças crônicas (CIESLINSKA et al., 2007; CIESLINSKA et al., 2012), doença cardíaca isquêmica humana, arteriosclerose, diabetes tipo 1 e síndrome da morte súbita do lactente (LAUGESEN et al., 2003; BIRGISDÓTTIR et al., 2002; SUN et al., 1999, 2003; THORSÓTTIR et al., 2000; McLACHLAN, 2001; ELLIOTT et al., 1999).

BCM-7 foi identificada como um fator de risco nessas doenças causadas por sua associação com os receptores opioides nos sistemas nervoso, endócrino e imunológico (ASLEDÓTTIR et al., 2019). Eles são absorvidos no trato

gastrointestinal imaturo de bebês e nos segmentos da borda em escova do intestino em adultos (THIRUVENGADAN et al., 2021). Este peptídeo bioativo também pode ser absorvido por regiões cerebrais relevantes para a esquizofrenia e o autismo (SUN, 1999). Essas regiões também são promotoras e/ou integrantes de vias dopaminérgicas, serotoninérgicas e gabaérgicas, além de interagir com receptores de serotonina 5-HT₂, podendo afetar todos esses sistemas (SOKOLOV et al., 2005). Sobre a atividade opioide no sistema nervoso central após a ingestão oral, é necessária a passagem de BCM-7 derivado do leite A1 através da mucosa intestinal e ainda através da barreira hematoencefálica (EFSA, 2009). No entanto, os mecanismos de transferência de peptídeos intactos através da barreira intestinal não são claros. A presença de material imunorreativo de BCM-7 foi relatada no sangue em dois estudos com bezerros e cães neonatos (UMBACH et al., 1985; SINGH et al., 1989). Umbach et al. (1985), não encontraram BCM-7 em amostras coletadas antes da primeira ingestão de leite. Em contraste, em amostras coletadas após a ingestão de leite, foi detectado BCM-7.

Singh et al. (1989) descobriram que a BCM-7 aumentou significativamente em filhotes de 2 e 4 semanas de idade após a alimentação com leite bovino, enquanto os níveis de BCM-7 foram indetectáveis em cães adultos antes ou após a alimentação com leite bovino. Ambos os estudos indicaram que a BCM detectada consiste em 12-13 resíduos de aminoácidos e pode representar um precursor do heptapeptídeo BCM-7 (UMBACH et al., 1985; SINGH et al., 1989). No entanto, a presença de moléculas de BCM-7 intactas no sangue após a ingestão de leite não foi comprovada em estudos *in vivo*. Em certos casos, como em recém-nascidos, a mucosa intestinal é mais permeável a peptídeos relativamente grandes durante a formação pós-natal, tornando-os candidatos mais prováveis do que os adultos a experimentar os efeitos opioides da BCM-7 (KOST et al., 2009).

Outra condição associada aos efeitos da BCM-7 é a intolerância à lactose a qual costuma ser erroneamente diagnosticada: ela é caracterizada por sintomas atribuíveis em decorrência da má absorção de lactose que pode ser causado pela baixa atividade ou mesmo a ausência da enzima lactase ou por uma síntese reduzida ou ausente da mesma enzima. A gravidade dos sintomas é subjetiva e dependente de inúmeros fatores, os quais incluem a concentração de lactase presente na mucosa intestinal, a microbiota intestinal, a quantidade de lactose

ingerida, a motilidade gastrointestinal e a sensibilidade individual na percepção dos sintomas (CATANZARO et al., 2021). Pessoas nessa condição não podem ingerir leite proveniente de vacas com alelos A1, nem A2 para β -CN.

Entretanto, estudos realizados pela *National Institutes of Health* de 2010 sobre intolerância à lactose, afirmam que pessoas que relatam intolerância à lactose não mostram nenhuma evidência de má absorção de lactose. Com isso, o mais provável é que os sintomas gastrointestinais sejam causados por outro componente lácteo, sugere-se, então que, parte desses sintomas sejam provenientes do mecanismo de digestão da BCM-7 (SUCHY et al., 2010).

Já o quadro de Alergia à Proteína do Leite de Vaca (APLV) consiste em uma reação orgânica generalizada, ou seja, atinge o sistema imunológico, de “combate” e tentativa de expulsar o agente alergênico (antígeno) neste caso, as proteínas do leite de vaca (caseína, lactoglobulina, lactoalbumina, soroalbumina e imunoglobulinas) e elas geram sintomas como dor e distensão abdominal, flatulência, diarreia (em alguns casos, constipação), borborismo, náusea e vômito (LUIZ et al., 2005). APLV não está associada aos efeitos da BCM-7 e sob essa condição, também não se pode ingerir leite bovino.

2.2. Presença da BCM-7 no Leite cru e no Leite beneficiado ou pasteurizado

A formação de novos peptídeos durante o tratamento térmico de leite depende da força térmica das ligações peptídicas β -CN (NGUYEN et al., 2015). O autor relatou a formação de peptídeos de baixo peso molecular em leite cru desnatado aquecido a 120°C por 30 minutos. Dez peptídeos, não presentes no leite cru, foram identificados; dois dos quais foram liberados da β -CN, mas nem BCMs nem precursores de BCMs foram encontrados. BCM-7 foi detectado no leite cru, mas não no leite pasteurizado (NYUGEN et al., 2015).

Ainda segundo o Nguyen et al. (2015), peptídeos liberados após o tratamento térmico são principalmente resultado da hidrólise de ligações peptídicas envolvendo ácido aspártico, asparagina ou ácido glutâmico ligado a qualquer outro aminoácido, conhecidos por serem mais suscetíveis a hidrólise durante o tratamento térmico. Portanto, suspeita-se que as ligações peptídicas contendo asparagina são mais

suscetíveis à hidrólise do que aqueles que não contêm estes resíduos de aminoácidos durante o tratamento térmico do leite.

BCM-7 foi relatado como detectável em vários produtos lácteos como leite, queijo, iogurte e outros produtos lácteos antes e depois dos tratamentos térmicos e processamentos (THIRUVENGADAM et al., 2021; SUMMER et al., 2020; NYUGEN et al., 2015; PAL et al., 2015; RAIKOS et al., 2014).

2.3. Presença da BCM-7 em iogurte

A ocorrência de BCM-7 em iogurte tem sido bastante controversa e relatada principalmente para fabricação de iogurte não comercial em escala laboratorial provavelmente devido à hidrólise por bactérias específicas do iogurte (NGUYEN et al., 2015).

O leite fermentado é um produto lácteo popular, geralmente fermentado por duas bactérias lácticas, *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* e *S. thermophilus* (NGUYEN et al., 2015). Os principais passos no processamento de leite fermentado incluem tratamento térmico, fermentação e armazenamento refrigerado. Além de induzir mudanças no pH e na viscosidade, a cultura microbiológica do leite fermentado pode hidrolisar as proteínas do leite em peptídeos com bioatividade (NGUYEN et al., 2015).

A formação de BCMs a partir de produtos lácteos fermentados é improvável, pois as bactérias do ácido lático contêm x-prolil-diaminopeptidil peptidase: essas enzimas têm especificidade para resíduos de prolina, enquanto as BCMs também são peptídeos ricos em prolina e podem ser facilmente degradadas. No entanto, muitos desses estudos foram realizados em bactérias deficientes em x-prolil-diaminopeptidil peptidase (UL HAQ et al., 2014).

Vários peptídeos bioativos foram isolados de iogurte, como peptídeos ACE-I (DONKOR et al., 2007; KUNDA et al., 2012) e peptídeos anti-hipertensivos (SCHIEBER et al., 2000; KUNDA et al., 2012; MUGUERZA et al., 2006). No entanto, nenhum estudo relatou a formação ou degradação de BCMs em específico em leite fermentado. A falta de informações sobre BCMs em iogurte pode ser em parte devido à dificuldade na identificação e quantificação dos baixos níveis destes peptídeos dentro da matriz complexa de leite fermentado (EFSA, 2009).

Conforme relatado por Donkor et al. (2007), peptídeos derivados de β -CN foram isolados de iogurte inoculado com fermento próprio (cultura e organismos probióticos: *L. casei* L26, *L. acidophilus* L10 e *B. lactis* B94). Esses peptídeos incluíam diferentes fragmentos de β -CN, mas não foram identificados nem BCMs, nem precursores de BCM. De forma similar, Schieber e Bruckner (2000) identificaram 30 peptídeos em iogurte fermentado com *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* e *S. salivarius* ssp. *thermophilus*, produzido principalmente a partir de β -CN A1. Esses autores observaram dois precursores de BCM, β -CN f57-68, e β -CN f57-72, contendo histidina na posição 67.

2.4. Presença da BCM-7 em Queijos

O queijo é um produto lácteo mais comumente consumido e é majoritariamente produzido de leite bovino. As principais etapas na fabricação do queijo incluem o tratamento térmico do leite, coagulação com coalho e cultura inicial, separação da coalhada do soro e maturação da coalhada para produzir o queijo final. O tratamento térmico do leite é feito por pasteurização a 72° C por 15 segundos (HAYALOGLU, 2010). Estudos de queijo que usaram leite aquecido acima 72°C envolvendo perfis peptídicos mostraram desnaturação da proteína do soro do leite, levando à interação entre proteína do soro e caseína (HOUGAARD et al., 2010). O tratamento de alta temperatura pode afetar significativamente a proteólise do queijo durante sua maturação, bem como seu sabor e textura finais (BENFELDT et al., 2001). A proteólise durante o amadurecimento pode envolver a formação de grandes peptídeos, alguns dos quais são posteriormente degradados em peptídeos menores, como as BCMs (NGUYEN et al., 2015; BENFELDT et al., 2001).

Apenas alguns estudos investigaram a formação de BCMs em variedades de queijo (figura 6).

Figura 6. Presença de BCMs em diferentes tipos de queijos reportadas na literatura.

Queijo	BCMs	Conteúdo ($\mu\text{g/g}$)	Referências
Brie	β -casomorfina 7	5-15	Jarmolowska et al. (1999)
		0.15	De Noni e Cattaneo (2010)
		6.48	Sienkiewicz-Szlapka et al. (2009)
Cheddar	β -casomorfina 5	3.14	Sienkiewicz-Szlapka et al. (2009)
	β -casomorfina 7	0.11	De Noni e Cattaneo (2010)
	β -casomorfina 5	Não relatado	De Noni e Cattaneo (2010)
Gorgonzola	β -casomorfina 9	Identificado	Singh et al. (1997)
	β -casomorfina 7	0.01	De Noni e Cattaneo (2010)
	β -casomorfina 5	Não relatado	De Noni e Cattaneo (2010)
Fontina	β -casomorfina 7	0.04	De Noni e Cattaneo (2010)
	β -casomorfina 5	Não relatado	De Noni e Cattaneo (2010)
Gouda	β -casomorfina 7	0.06	Sienkiewicz-Szlapka et al. (2009)
		0.1	De Noni e Cattaneo (2010)
	β -casomorfina 5	0.05	Sienkiewicz-Szlapka et al. (2009)
	β -casomorfina 9	Identificado	Saito et al. (2000); Toelstede e Hofmann (2008)
Rokpol	β -casomorfina 10	Identificado	Toelstede e Hofmann (2008)
	β -casomorfina 7	1.66	Sienkiewicz-Szlapka et al. (2009)
	β -casomorfina 5	2.57	Sienkiewicz-Szlapka et al. (2009)
Edamski	β -casomorfina 7	1	Sienkiewicz-Szlapka et al. (2009)
	β -casomorfina 5	0.46	Sienkiewicz-Szlapka et al. (2009)
Kasztelan	β -casomorfina 7	0.04	Sienkiewicz-Szlapka et al. (2009)
	β -casomorfina 5	0.14	Sienkiewicz-Szlapka et al. (2009)
Teleggio, Caprino e Grana Padano	β -casomorfina 7	Não detectado	De Noni e Cattaneo (2010)
	β -casomorfina 5	Não relatado	De Noni e Cattaneo (2010)
	β -casomorfina 5	Não relatado	De Noni e Cattaneo (2010)

FONTES: traduzido de NGUYEN et al., 2015.

Além de BCM-7, BCM-5 foi encontrado em Brie, Rokpol, Edamski, Gouda e Kasztelan (SIENKIEWICZ-SZLAPKA et al., 2009), BCM-9 (SAITO et al., 2000; TOELSTEDE et al., 2008; HOFMANN et al., 2008) e BCM-10 em Gouda (TOELSTEDE; HOFMANN, 2008) e BCM 11 em *Caprino del Piemonte*, um queijo de cabra italiano (RIZZELLO et al., 2005). Em contraste, Muehlenkamp e Warthesen (1996) relataram que BCM7 não foram detectadas em Brie e Cheddar. De acordo com esses autores, a ausência de BCM-7 nestes produtos pode ser devido a não formação de BCMs de β -CN, degradação de BCM-7 durante o amadurecimento, ou quantidades menores de BCM-7 do que o nível mínimo detectável por HPLC (<2 mg/mL de extrato de queijo).

Por outro lado, BCM-7 em queijo foi relatada como não proveniente da originalmente presente no leite, uma vez que peptídeos seriam removidos do coalho durante a drenagem de soro de leite (GIRIBALDI et al., 2022). Além disso, acredita-se que a fabricação, a maturação de queijos, proteólise por bactérias lácticas e probióticos, exerçam um papel fundamental na modulação da liberação BCM-7 antes e depois da produção (SUMMER et al., 2020). Por exemplo, a BCM-7 foi

relatada ser maior em queijos com culturas (Brie e Rokpol) do que em queijos semiduros, embora enzimas proteolíticas de culturas iniciais de queijo foram relatadas como redutoras de BCM7 durante o amadurecimento (GIRIBALDI et al., 2022).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização do experimento, foram produzidos 10 litros de leite pasteurizado, 10 frascos de 500mL de iogurte e 10 queijos minas frescal de 200g, com 50 litros de leite do *pool* de 5 vacas de cada grupo com os diferentes genótipos (A1A1 e A2A2). O leite foi obtido das vacas da prefeitura do Campus USP Fernando Costa, já que as vacas já são genotipadas para a β -CN. A etapa de produção foi realizada no Laticínio da Prefeitura do Campus USP Fernando Costa e no Laboratório Quali-POA da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, de acordo com o descrito por Vidal e Saran Netto (2018). As amostras foram obtidas e preparadas para análise de quantificação de BCM-7 no início e final da vida de prateleira do leite pasteurizado e de cada derivado. A quantificação de BCM-7 foi realizada no Laboratório Multiusuário de Proteômica, Metabolômica e Lipidômica da ESALQ/USP.

- **Leite Pasteurizado**

Após a coleta da matéria-prima, o leite foi pré-aquecido (para evitar instabilidade) a uma faixa de temperatura entre 40 a 45°C, na sequência, pasteurizado entre 73 a 75°C por 15 a 20 segundos para redução da microbiota contaminante. Na refrigeração subsequente, a temperatura de saída do leite foi de 4°C (VIDAL; SARAN NETTO, 2018). Assim, parte desse leite foi direcionado ao acondicionamento das amostras de leite pasteurizado e o restante foi utilizado para produção dos derivados no laboratório Quali-POA.

- **Iogurte**

Após a pasteurização, o leite foi acondicionado em recipiente estéril e encaminhado ao laboratório Quali-POA, onde foi aquecido a uma temperatura de 41°C, ao atingir a temperatura, foi inoculado o fermento (fermento lácteo Bio Rich contendo *L. acidophilus* LA-5, *Bifidobacterium* BB-12 e *S. thermophilus* em

quantidades recomendadas pelo fabricante) e ficou fermentando por 4 horas para que ocorresse a fermentação da lactose em ácido láctico e se estabelecesse a coagulação ácida e o desenvolvimento das características sensoriais do produto, por meio da formação de um gel de aspecto liso, brilhoso, sem presença de gases ou liberação de soro (VIDAL; SARAN NETTO, 2018). A acidez titulável foi em torno de 70 a 72°D, e o pH, em torno de 4,4 a 4,7). Por fim, foi resfriado com agitação a 4°C, envasado em embalagens estéreis e armazenado sob refrigeração.

- **Queijo minas frescal**

Após a pasteurização, o leite foi acondicionado em recipiente estéril e encaminhado ao laboratório Quali-POA, onde 13 litros de leite foram aquecidos a 40°C, momento no qual foi adicionado o coalho (Coalho líquido Estrella – enzima quimosina – em quantidades recomendadas pelo fabricante) e o cloreto de cálcio (a 40% – usado na proporção de 0,5mL para cada 10L de leite) e foi incubado por aproximadamente uma hora até a formação do coágulo desejado. Após a coagulação, foi realizado o corte e a mexedura do coágulo, a fim de gerar fragmentos menores para ocorrer a separação do soro. Depois do corte, a massa foi colocada em formas. Após 24 horas de armazenamento a 4°C, o queijo foi desenformado, embalado em sacos plásticos tipo *ziploc* e armazenado sob refrigeração.

3.1. Preparo dos extratos de peptídeos solúveis em água

O preparo dos extratos de peptídeos solúveis em água (PSA) das amostras de leite cru, leite pasteurizado, iogurte e queijo minas frescal, seguiu a metodologia proposta por De Noni et al. (2010), na qual:

Leite cru (LC) e pasteurizado (LP): 50 mL de leite foi acidificado para o pH 4,60 e centrifugado a 5000x g por 20 minutos à 4°C. Na sequência foram separados o *pellet* do sobrenadante e ambos foram armazenados à -80°C. A preparação do PSA para cada amostra foi realizada em dois momentos (LPT1 e LPT2). Sendo LPT1 o dia da produção e o LPT2 final da vida de prateleira do leite pasteurizado (LPT2 = 7 dias).

Iogurte (I): 50 mL de iogurte foi centrifugado à 10000x g por 20 minutos, a 4°C. O PSA recuperado foi ajustado para o pH 4,60 e centrifugado à 5000x g por 20 minutos, à 4°C. Foram separados o *pellet* do sobrenadante e ambos foram

armazenados à -80°C. Os PSA foram preparados no dia da produção (IT1) e o IT2 no final da vida de prateleira do iogurte (T2 = 10 dias).

Queijo Minas frescal (QMF): 20 gramas de queijo foram homogeneizados com 40 mL de água, utilizando um aparelho Ultraturrax. A mistura foi aquecida à 40°C por 1 hora, com agitação lenta, filtrada e, em seguida, centrifugada a 10000 x g por 30 minutos, à 10°C. Foram separados o *pellet* do sobrenadante e ambos foram armazenados à -80°C. A preparação dos PSA ocorreu no dia da produção (QMFT1) e o QMFT2 no final da vida de prateleira do queijo (QMFT2 = 21 dias).

Ao final da extração, 1 mL de cada PSA obtido, foi submetido à ultrafiltração e ficaram estocados à -40°C até que a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) tenha sido realizada.

3.2. Identificação e quantificação da β -casomorfina7 (BCM-7)

A separação e identificação de BCM-7 das amostras de leite e derivados foram pesquisadas nos extratos de PSA obtidos e realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massa (HPLC-MS/MS), segundo a metodologia proposta por De Noni (2008). Para este teste, 1-50 pmoles de BCM-7 sintético foram dissolvidos em água e submetidos ao HPLC-MS/MS como padrão externo para a quantificação. As análises de HPLC-MS/MS foram realizadas, no Laboratório Multiusuário de Proteômica, Metabolômica e Lipidômica da ESALQ/USP.

3.3. Preparo das amostras para análise de HPLC-MS/MS

Após a obtenção dos peptídeos solúveis em água das amostras conforme descrito acima, as amostras foram submetidas à ultra filtração, com auxílio dos filtros seletivos (3KDa *cut-off*, da Millipore), com o objetivo de remover peptídeos de alta massa molecular. Dessa forma, o percolado foi coletado e liofilizado a -50°C. Depois da secagem, o pellet foi ressuscitado em 300uL de 0.1% TFA em H₂O grau LC-MS, seguido de dessalinização com auxílio das colunas (*Pierce Peptide Desalting Spin Columns*, da *Thermoscientific*). Os peptídeos dessalinizados foram secados com auxílio de *SpeedVac* e ressuscitados em 10uL de 0.1% ácido fórmico em H₂O grau LC-MS, para serem analisados por HPLC-MS/MS.

3.4. Análise de espectrometria de massas

As análises de espectrometria de massas foram realizadas com o auxílio do sistema cromatográfico *nanoElute nanoflow*, da *Bruker Daltonics, Bremen, Germany*, acoplado online a um espectrômetro de massas *hybrid trapped ion mobility spectrometry-quadrupole time-of-flight mass spectrometer-timsTof Pro*, da *Bruker Daltonics*.

Uma alíquota (1 μ L) das amostras, equivalente a 200ng de peptídeos digeridos foi injetada em uma coluna *Aurora 2 C18 trap column* (1,6 μ m, 250mm x 75 μ m), da *ionOpticks, Austrália*. Um gradiente típico RP (Solvente A: 0.1% AF, 99.9% H₂O MilliQ; Solvente B: 0.1% AF, 99.9% CH₃CN) foi estabelecido em um sistema de nanofluxo de cromatografia líquida e separado a uma taxa de fluxo de 250nL.min⁻¹. A temperatura da coluna foi mantida a 50°C. A corrida cromatográfica foi de 60 min (2% a 13% do Solvente B durante 30 min; elevada a 20% aos 45 min; elevada a 30% aos 50 min; elevada a 85% aos 55 min e finalmente 85% por 5 min para lavagem da coluna). A coluna foi acoplada, online, a um *timsTOF-Pro* com uma fonte de íons *CaptiveSpray*, ambos da *Bruker Daltonics GmbH*. A temperatura da linha de transferência capilar de íons foi ajustada para 180°C. O acúmulo de íons, por 123ms e a separação por mobilidade foram obtidos com uma rampa de potencial de entrada de -160V a -20V dentro dos 123s. Durante a aquisição, para habilitar o método PASEF, i.e. o acúmulo paralelamente à fragmentação dos íons, as informações de precursor de m/z e mobilidade foram derivadas primeiramente de um experimento de *full scan Tims-MS*, com uma faixa de m/z de 100-1700. O modo operacional do TIMS-ToF, MS e PASEF foi controlado e sincronizado com o auxílio do software *OtofControl 5.1* de controle instrumental da *Bruker Daltonics* (Macron et al., 2020).

3.5. Parâmetros de processamento e busca em banco de dados públicos

O processamento dos dados, a identificação de proteínas e as análises de Identificação da BMC-7 foram realizadas utilizando-se o *Software PEAKS studio, Version 10.6, Bioinformatics Solutions Inc., Waterloo, ON*.

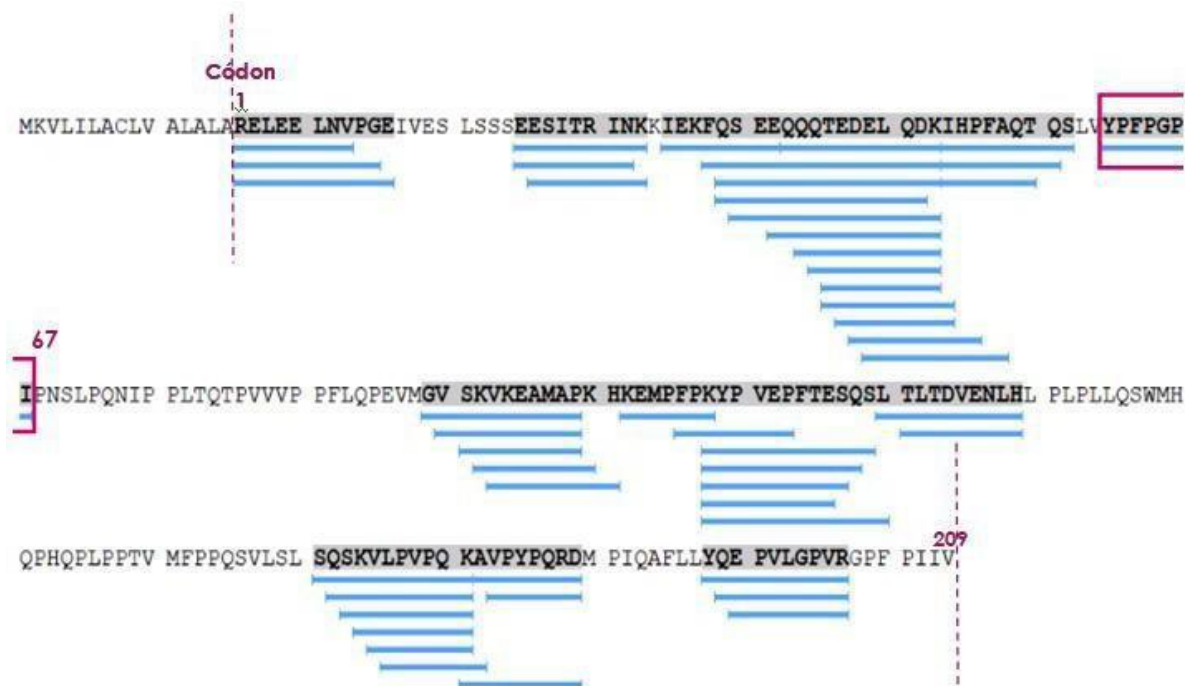
A tolerância de desvio de massa de íons para peptídeos e fragmentos foi ajustada para 20 ppm e 0,05 Da, respectivamente.

Uma máxima taxa de falso positivos (FDR) de 1% será utilizada para identificação dos peptídeos e proteínas, considerando-se como critério, ao menos um peptídeo único para identificação de proteínas. Todas as proteínas serão identificadas com um grau de confiança $\geq 95\%$, utilizando-se o algoritmo do PEAKS Software e busca dentro da base de dados de proteínas de *Bos taurus*, disponível no Uniprot.

RESULTADOS

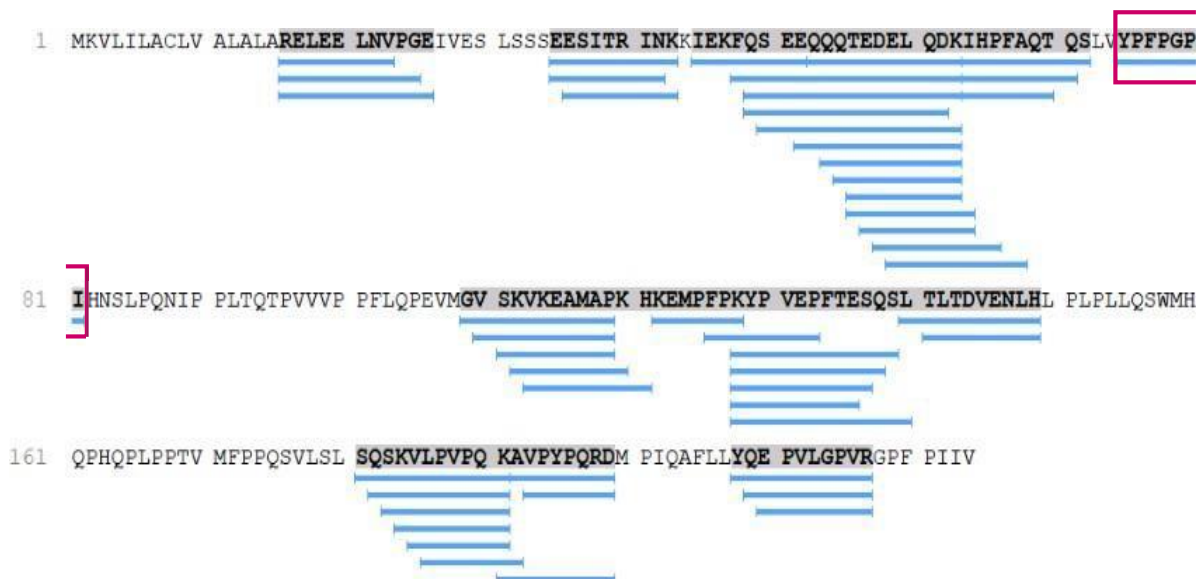
As figura 7 e 8 representam a sequência dos 209 aminoácidos da β -CN A1 e A2 da amostra de leite cru obtida através das corridas do HPLC, na qual é possível verificar a identificação de BCM-7, que ocorreu pelo rastreamento e quantificação da sequência YPFPGPI (Tirosina, Prolina, Fenilalanina, Prolina, Glicina e Isoleucina), ainda na cadeia da β -CN.

Figura 7. Apresentação visual de uma β -CN A2 (amostra de leite cru).



FONTE: acervo pessoal, 2022.

Figura 8 . Apresentação visual de uma β -CN A1 (amostra de leite cru).



FONTE: acervo pessoal, 2022.

Há uma predominância de BCM-7 no genótipo A1A1, cerca de 3,5 vezes mais no leite cru (controle) como apresentado na figura 9.

Com o processo de pasteurização, que serviu de base para a produção dos derivados, a BCM-7 foi extinta; já no tempo final de vida de prateleira do leite pasteurizado, o índice de BCM-7 atingiu 2001300 para o genótipo A1A1 e 1947100 para o A2A2 (figura 9).

Figura 9 – Abundância de BCM-7 através da HPLC para as amostras de leite cru, leite pasteurizado no dia da produção (LPT1) e leite pasteurizado no final do período de validade (LPT2).

Amostra		Genótipo	
		A1A1	A2A2
Leite cru		1,87E+06	5,29E+05
Leite pasteurizado	LPT1	0	0
	LPT2	2,00E+06	1,95E+06

Após a fermentação do leite, o genótipo A1A1 atingiu a marca de 8217300 e no A2A2, não foi registrado presença de BCM-7. No entanto, no final da vida de prateleira, foram registradas 2113400 unidades relativas de BCM-7 para A2A2 e 1475400 para A1A1, como apresentado na figura 10.

Figura 10. Abundância de BCM-7 através da HPLC para as amostras de leite pasteurizado no dia da produção (LPT1) (matéria-prima para o iogurte) e iogurte no dia da produção (IT1) e iogurte no final do período de validade (IT2).

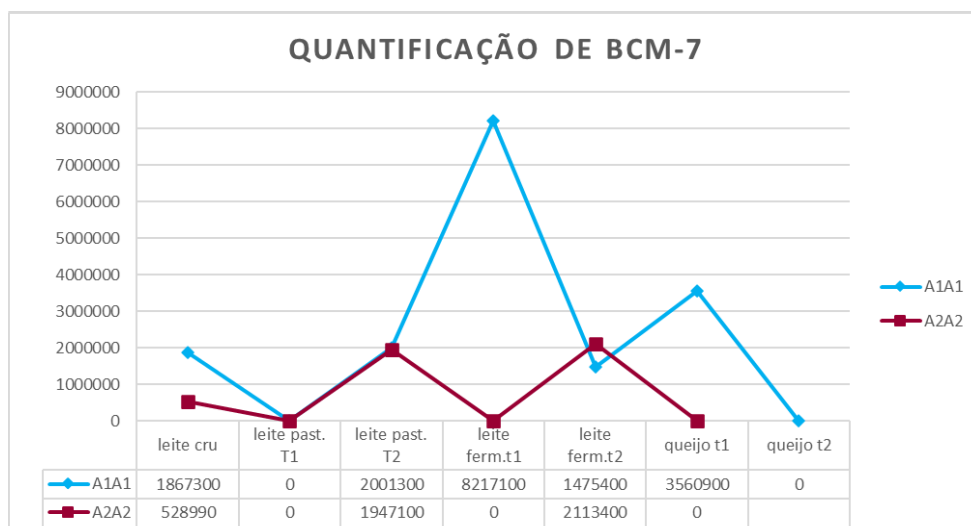
Amostra		Genótipo	
		A1A1	A2A2
Leite pasteurizado LPT1		0	0
iogurte	IT1	8,22E+06	0
	IT2	1,48E+06	2,11E+06

No presente estudo, após o processamento do leite para produção de queijo, apenas no genótipo A1A1 foram encontradas 3560900 unidades relativas de BCM-7, sem registro para esse momento do genótipo A2A2, como apresentado na figura 11. Após o final da vida de prateleira dos queijos de ambos os genótipos, não foram encontradas nenhuma BCM-7

Figura 11 – Abundância de BCM-7 através da HPLC para as amostras de leite pasteurizado no dia da produção (LPT1) (matéria-prima para o queijo) e queijo minas frescal no dia da produção (QMFT1) e queijo minas frescal no final do período de validade (QMFT2).

Amostra		Genótipo	
		A1A1	A2A2
Leite pasteurizado LPT1		0	0
Queijo minas frescal	QMFT1	3,56E+06	0
	QMFT2	0	-

Figura 12. Abundância de BCM7 em leite cru, pasteurizado, iogurte e queijo minas frescal.



Fonte: Autoria própria, 2022.

DISCUSSÕES

O processamento do leite para a produção de derivados libera peptídeos bioativos da caseína, não apenas pela hidrólise enzimática, mas também pela

hidrólise ácida (BITRI, 2004; EL-ZAHAR et al., 2003; LOTFI, 2004; NGUYEN et al., 2015) e tratamentos térmicos (ASLEDOTTIR et al., 2017; CIESLINSKA et al., 2012; MELTRETTER et al., 2008). Por isso, foi quantificado BCM-7 em diferentes momentos e tratamentos produtivos para comparação.

A quantificação de BCM-7 encontrada no leite cru do genótipo A1A1 foi 3,53 vezes maior do que no A2A2 em concordância com o reportado por Jinsmaa et al. (2007), Hartwig et al. (1997); e Yoshikawa (1999) que encontraram aproximadamente 4 vezes mais BCM-7 no genótipo A1A1. No entanto, ainda assim há formação de BCM-7 no leite A2A2, diferentemente do afirmado por Parashar (2015) e Thiruvengadama (2021) que dizem que o heptapeptídeo não é formado pelo processo de digestão do leite.

Quanto ao leite pasteurizado, verificou-se que a pasteurização desnatura as BCM-7 e assim, não foi detectável sua presença. Nguyen et al. (2021) afirmou da mesma maneira que após o tratamento térmico (73 °C/20 s, 85 °C/5 min e 121 °C/12 min), BCM-7 não foi liberada em todos os genótipos. Por outro lado, Meltretter et al. (2008) acredita que haja fragmentação do esqueleto proteico durante o tratamento térmico de leite, pois identificou cinco novos peptídeos não presentes no leite cru, após aquecimento a 120° C por 30 minutos. Por outro lado, Meltretter et al. (2008) exclui a formação de peptídeos por hidrólise enzimática e ácida. Já que durante o tratamento por calor do leite a 120°C por 30 minutos, as enzimas são inativadas e é improvável que o pH do leite mude muito. Durante o tratamento térmico do leite também ocorre a reação de Maillard, que é uma reação entre um açúcar redutor (lactose) com aminoácidos. Esse processo forma radicais que podem atacar as ligações peptídicas dentro da proteína para clivar as ligações e produzir novos peptídeos (MELTRETTER et al., 2008).

Já no final da vida de prateleira os leites provenientes dos genótipos A1 e A2, tiveram o mesmo comportamento atingindo os mesmos índices de BCM-7 que o leite cru do genótipo A1. No entanto, os artigos referenciados não estudam a formação da BCM-7 no final da vida de prateleira.

O mesmo não ocorre quando se realiza a fermentação do leite para a fabricação de iogurte. A fermentação comporta-se diferentemente nos dois genótipos. Para o A1A1, elevou cerca de 8 vezes o nível de BCM-7 encontrado no leite cru, mesmo após passado a pasteurização. Já na fermentação do leite A2, os

índices de BCM-7 se mantiveram indetectáveis pela metodologia utilizada. Porém, no final da vida de prateleira, o nível de BCM-7 encontrado foi 5,56 vezes menor que após a fermentação, se equiparando ao nível encontrado no genótipo A2A2. Schieber e Brückner (2000) também encontraram BCMs por HPLC-MS/MS no armazenamento de iogurte a 4°C por 3 semanas que foi preparado a partir de leite desnatado (44°C por 3 h) usando *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* Lb1466. De Noni et al. (2010) e Kahala et al. (1993) não encontraram a liberação da BCM de vários produtos lácteos fermentados finlandeses, iogurtes, produzidos com uma cultura inicial mista de *L. bulgaricus* e *S. thermophilus*. O motivo pode ser devido à utilização apenas de leite A2, que não é uma forte fonte formadora de BCMs.

Durante a fermentação, as proteases associadas à parede celular da cultura iniciadora ou bactérias contaminantes podem hidrolisar caseínas em grandes peptídeos e possivelmente até BCM7 (NIELSEN et al., 2009). Consequentemente, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* e *S. thermophilus* usados para produzir iogurte podem digerir β -CN em BCM-7 e outros BCMs relacionados; no entanto, estes podem ser subsequentemente degradados em peptídeos menores (NGUYEN et al., 2015).

Finalmente, na produção do queijo minas frescal, o comportamento do A2 se manteve indetectável pela metodologia utilizada no momento da industrialização e não quantificado no final de vida de prateleira. Quanto ao A1, a industrialização incentivou a formação de BCM-7, porém não foi detectável no final de vida de prateleira.

De acordo com Giribaldi et al. (2022) e Jarmolowska et al. (1999), a presença de BCM-7 em queijo não se origina daquela inicialmente presente no leite, porque peptídeos derivados do leite seriam removidos da coalhada durante a drenagem do soro. A formação de BCM-7 em alguns queijos deve-se à digestão de β -CN com enzimas derivadas de cultura iniciadora.

Além disso, acredita-se que a fabricação, a maturação de queijos, proteólise por bactérias lácticas e probióticos, exerçam um papel fundamental na modulação da liberação BCM-7 antes e depois da produção (SUMMER et al., 2020). Os queijos maturados possuem menos lactose do que os queijos frescos, pois as bactérias utilizadas no processo fermentativo consomem a lactose. Já os queijos processados (tipo cheddar), contém mais lactose do que os tradicionais. Por exemplo, o BCM-7 foi relatado ser maior em queijos com culturas (Brie e Rokpol) do que em queijos

semiduros, embora enzimas proteolíticas de culturas iniciais de queijo foram relatadas como redutoras de BCM-7 durante o amadurecimento (GIRIBALDI et al., 2022).

De Noni e Cattaneo (2010) encontraram 0,11 mg/g de BCM-7 em queijo Cheddar fazendo uso comum culturas iniciadoras que são uma mistura de *Lactococcus ssp. lactico cremoris* e *L. lactic ssp. lactico* (ROBINSON, 1995). Muehlenkamp e Warthesen (1996) mostraram que enzimas derivadas de *L. lactic ssp. cremoris* são capazes de reduzir a quantidade de BCM-7 encontrada por 50% em pH 5,0 e 1,5% NaCl após 6–15 semanas, condições semelhantes às de fabricação de queijo Cheddar. Assim, a concentração de BCM-7 no início da maturação no queijo pode ser superior ao do queijo curado (DE NONI et al., 2010), uma vez que BCM-7 pode ter sido formado a partir de β -CN na adição da cultura inicial, mas degradada em peptídeos menores durante a maturação.

Assim como por meio de culturas iniciadoras, há potencial para peptídeos bioativos (incluindo BCMS) serem formados por hidrólise de β -CN por proteases endógenas e cultura bacteriana por equipamentos contaminados (EFSA, 2009). No entanto, a protease endógena da plasmina não demonstrou liberar BCMS (GAUCHER et al., 2008) e da mesma forma as enzimas do coalho usadas para coagular o leite também não libera peptídeos bioativos excluindo as atividades de enzimas como fontes de BCMS (MCSWEENEY, 2004). Hayaloglu et al. (2010) investigaram o perfil peptídico de queijo Malatya feito de leite cru sem adição de cultura iniciadora. Os autores demonstraram consideravelmente maior concentração de peptídeos, mas não mediu BCMS, embora elas possam ter estado presentes neste queijo.

Nguyen et al. (2015) afirma que queijos tem diferenças entre si perante a formação de BCM-7, considerando que o Queijo Minas Frescal é um macio, fresco, realizado através de leite pasteurizado e sem maturação (PERRY, 2004), poderia compará-lo com o Fontina e o Caprino, ambos macios e sem maturação. No caprino, De Noni e Cattaneo (2010) não detectaram BCM-7 e no Fontina, 0,04 μ g/g, nível baixo comparado com outras categorias de queijo, mostrando padronização do comportamento de formação de BCM-7 para queijos macios e sem maturação. No entanto, não há comparação entre os genótipos.

Com os resultados obtidos e na condição em que o experimento foi realizado foi possível verificar que a BCM-7 mostrou-se sensível ao tratamento térmico de pasteurização, utilizado pela indústria preliminarmente para a produção da maioria dos derivados. No entanto, ao longo da vida de prateleira do leite pasteurizado, do iogurte e do queijo minas frescal foi possível detectar a presença do BCM-7, possivelmente em decorrência de ações endógenas de hidrólise da β -CN, reforçando a hipótese apontada por Corassim et al. (2013); a qual afirma que o plasminogênio presente no leite é convertido em plasmina e pode ser prontamente ativado por células somáticas e uma vez convertido, resulta na ação proteolítica das frações de caseína α_{s1} , α_{s2} e β -CN.

E, por fim, a frequência de formação de BCM-7 mais abundantemente no genótipo A1A1 comprova a ideia de que as ligações “His-Ile” sofre maior hidrólise como descrito por Alsledottir et al. (2018), De Noni et al. (2010) e Jinsmaa e Yoshikawa (1999).

De acordo com a literatura consultada, o método analítico escolhido para a quantificação de BCM-7, o HPLC-MS/MS, é apresentado como melhor opção de identificação e quantificação de BCM-7 (HAQ, 2014). Além disso, nenhum teste bioquímico rápido e confiável foi desenvolvido até o presente momento.

CONCLUSÃO

O presente estudo constatou que os diferentes genótipos exercem efeito na formação de BCM-7, cujo genótipo A1A1, propicia a liberação desse peptídeo bioativo. A industrialização dos derivados favorece a hidrólise da caseína. BCMs podem ser formadas em nos processos de produção do iogurte e queijo minas frescal, bem como pode ser degradado durante o processamento e não ser detectável no produto. Fatores de processamento que pode afetar a formação e/ou degradação de BCMs incluem tratamento térmico, fermentação, maturação e armazenamento a frio.

Faz-se necessário maiores investigações sobre os efeitos das combinações de fatores de processamento na formação e/ou degradação de BCM em derivados. Para a quantificação, a aplicação de métodos analíticos empregando espectrometria de massa ou espectrometria de massa de alta resolução é fortemente recomendado

para identificar com confiança e com precisão quantificar BCMs em matrizes de produtos lácteos complexos. E, finalmente, há a necessidade de um desenvolvimento de um teste rápido para a pesquisa de BCM.

REFERÊNCIAS

- ASLAM H, RUUSUNEN A, BERK M, LOUGHMAN A, RIVERA L, PASCO JA, ET AL. Unravelling facets of milk derived opioid peptides: a focus on gut physiology, fractures and obesity. **Int J Food Sci Nutr**. 71:36– 49. 2020.
- HEGDE NG. Research on A1 and A2 milk: A1 milk is not a matter of health concern. **Indian J Anim Sci**.89:707–11. 19. 2019
- WONG CB, ODAMAKI T, XIAO JZ. Insights into the reason of Human-Residential Bifidobacteria (HRB) being the natural inhabitants of the human gut and their potential health-promoting benefits. **FEMS Microbiol Rev**.44:369– 85. 2020.
- TULIPANO G. Role of bioactive peptide sequences in the potential impact of dairy protein intake on metabolic health. **Int J Mol Sci**. 21:1– 27. 2020.
- ALVES, M. P. et al. Characterization of a heat-resistant extracellular protease from *Pseudomonas fluorescens* 07A shows that low temperature treatments are more effective in deactivating its proteolytic activity. **Journal of dairy science**, v. 99, n. 10, p. 7842-7851, 2016.
- ASLEDOTTIR, T. et al. Identification of bioactive peptides and quantification of β -casomorphin-7 from bovine β -casein A1, A2 and I after ex vivo gastrointestinal digestion. **International dairy journal**, v. 71, p. 98-106, 2017.
- ASLEDOTTIR, T. et al. Release of β -casomorphin-7 from bovine milk of different β -casein variants after ex vivo gastrointestinal digestion. **International Dairy Journal**, v. 81, p. 8-11, 2018.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). 2000. Official Methods of Analysis. **17th ed. Arlington, VA**.
- BAGLINIÈRE, F. et al. Quantitative and qualitative variability of the caseinolytic potential of different strains of *Pseudomonas fluorescens*: Implications for the stability of casein micelles of UHT milks during their storage. **Food chemistry**, v. 135, n. 4, p. 2593-2603, 2012.
- BARBOSA, M. G; SOUZA, A. B.; TAVARES, G. M; ANTUNES, A. E. C. Leites A1 e A2: revisão sobre seus potenciais efeitos no trato digestório. **Segurança Alimentar Nutricional**, v. 26, p. 1 - 11, 2019.
- BASTIAN, E. D; BROWN, R. J. Plasmin in milk and dairy products: an update. **International Dairy Journal**, v.6, p.435-457, 1996.
- BARNETT M.P.G., MCNABB W.C., ROY N.C., WOODFORD K.B., CLARKE A.J. Dietary A1 β -casein affects gastrointestinal transit time, dipeptidyl peptidase-4 activity, and inflammatory status relative to A2 β -casein in Wistar rats. **Int. J. Food Science Nutrition**.;65:720–727 2014.
- BENNETT L.E., Crittenden R., Khoo E., Forsyth S. Evaluation of immune-modulatory properties of selected dairy peptide fractions. **Journal of Dairy Technology**, v.60, p.106–109, 2005.
- BIRGISDOTTIR, B. E. Influence of nutrition on prevention of diabetes mellitus. **Scandinavian Journal of Nutrition**, v. 46, n. 3, p. 143 - 146, 2002.

BITRI, L. Optimization study for the production of an opioid-like preparation from bovine casein by mild acidic hydrolysis. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 6, p. 535 - 539, 2004.

BRANDSCH M., BRUST P., NEUBERT K., ERMISCH A. SYSTEMS. IN: BRANTL V., TESCHEMACHER H., editors. *β -Casomorphins and Related Peptides: Recent Developments*. 1st ed. VCH; **Weinheim**, Germany: 1994. pp. 207–219.

BRASIL, 2006. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos. In: **Diário Oficial da União**, Brasília, p.8, 14 dez. 2006.

BROOKE-TAYLOR, S; DWYER, K; WOODFORD, K; KOST, N. Systematic Review of the Gastrointestinal Effects of A1 Compared with A2 β -Casein. **Advances in Nutrition**, v. 8, p. 739 - 748, 2017.

BRUZAROSKI, S. R. et al. Psicotróficos e *Pseudomonas* spp. em Leite Cru Refrigerado. **UNICIÊNCIAS**, v. 21, n. 1, p. 12-16, 2017.

CALDERA, L. et al. Identification, enzymatic spoilage characterization and proteolytic activity quantification of *Pseudomonas* spp. isolated from different foods. **Food microbiology**, v. 54, p. 142-153, 2016.

CATANZARO, R.; SCUITO, M.; MAROTA, F. Lactose intolerance: an update on its pathogenesis, diagnoses, and treatment. **Nutrition research**, 2021.

CAROLI, A. M.; CHESSA, S.; ERHARDT, G. J. Invited review: Milk protein polymorphisms in cattle: Effect on animal breeding and human nutrition. **Journal of dairy science**, v. 92, n. 11, p. 5335-5352, 2009.

CHOI, J. et al. Bioactive peptides in dairy products. **International Journal of Dairy Technology**, v. 65, n. 1, p. 1-12, 2012.

CIESLINSKA, A; KAMINSKI, S; KOSTYYRA, E; SIENKIEWICZ-SZLAPKA, E. Beta-casomorphin 7 in raw and hydrolyzed milk derived from cows of alternative b-casein genotypes. **Milchwissenschaft**, v. 62, n. 2, p. 125 - 127, 2007.

CIESLINSKA, A; KOSTYRA, E; KOSTYRA, H; OLENSKI, K; FIEDOROWICZ, E; KAMINSKI, S. Milk from cows of different b-casein genotypes as a source of b-casomorphin-7. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 63, n. 4, p. 426 - 430, 2012.

CONAB – **COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO**. Análise Mensal Leite e Derivados. 2021.

CORASSIN, C. H.; ROSIM, R. E.; KOBASHIGAWA, E.; FERNANDES, A. M.; DE OLIVEIRA, C. A. Relationship between plasmin activity and casein fractions during storage of UHT milk. **Brazilian Journal of Food Technology**. v. 16, n. 1, p. 29-33, 2013.

ÇARDAK, A. D. Effects of genetic variants in milk protein on yield and composition of milk from Holstein-Friesian and Simmentaler cows. **South African Journal of Animal Science**, v. 35, n. 1, p. 41-47, 2005.

DANIEL H., VOHWINKEL M., REHNER G. Effect of Casein and β -Casomorphins on Gastrointestinal Motility in Rats. **J. Nutr.** ;120:252–257. 1990.

Daniel H., Wessendorf A., Vohwinkel M., Brantl V. Effect of D-Ala^{2,4}, Tyr⁵- β -casomorphin-5-amide on gastrointestinal functions. In: Brantl V., Teschemacher H., editors. *β -Casomorphins and Related Peptides: Recent Developments*. 1st ed. VCH; Weinheim, Germany: pp. 95–104. 1994.

DAMIANI G., PILLA F., LEONE P., CACCIÒ S. Direct sequencing and bidirectional allele specific polymerase chain reaction of the bovine β -casein B variant. **Anim. Genet.** 2009;23:561–566.

DE NONI, I. Release of β -casomorphins 5 and 7 during simulated gastro-intestinal digestion of bovine β -casein variants and milk-based infant formulas. **Food chemistry**, v. 110, n. 4, p. 897-903, 2008.

DE NONI, I; CATTANEO, S. Occurrence of β -casomorphins 5 and 7 in commercial dairy products and in their digests following in vitro simulated gastro-intestinal digestion. **Food chemistry**, v. 119, n. 2, p. 560-566, 2010.

DETMANN, E.; SOUZA, M. A; VALADARES FILHO, S. C; QUEIROZ, A. C; BERCHIELLI, T. T; SALIBA, E. O. S; CABRAL, L. S; PINA, D. S; LADEIRA, M. M; AZEVEDO, J. A. Métodos para análises de alimentos. **Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia da Ciência Animal - INCT**. Visconde de Rio Branco, MG. Ed.: Suprema, p. 214, 2012.

DONKOR, O. N., HENRIKSSON, A., SINGH, T. K., VASILJEVIC, T. AND SHAH, N. P. ACE-inhibitory activity of probiotic yoghurt. **Int. Dairy J.** 17. 2007.

ELLIOTT, R. B. et al. Type I (insulin-dependent) diabetes mellitus and cow milk: casein variant consumption. **Diabetologia**, v. 42, n. 3, p. 292-296, 1999.

EL-ZAHAR, K; CHOBERT, J. M; SITOHY, M; DALGALARRONDO, M; HAERTLE, T. Proteolytic degradation of ewe milk proteins during fermentation of yoghurts and storage. **Food / Nahrung**, v. 47, n. 3, p. 199 - 206, 2003.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) Review of the potential health impact of β -casomorphins and related peptides. **EFSA J.** p.7, v.1–107, 2009.

EXPÓSITO I.L., RECIO I. Antibacterial activity of peptides and folding variants from milk proteins. *Int. Dairy J.* ;16:1294–1305. 2006.

FUKUDA, S. P.; ROIG, S.M.; PRATA, L. F. Correlation between acidic ninhydrin and HPLC methods to evaluate fraudulent addition of whey in milk. **Le Lait**, v. 84, n. 5, p. 501-512, 2004.

GALLINAT, J. L. et al. DNA-based identification of novel bovine casein gene variants. **Journal of dairy science**, v. 96, n. 1, p. 699-709, 2013.

GAUTHIER S.F., POULIOT Y., SAINT-SAUVEUR D. Immunomodulatory peptides obtained by the enzymatic hydrolysis of whey proteins. **Int. Dairy J.** 2006.

GIRIBALDI M, LAMBERTI C, CIRRINCIONE S, GIUFFRIDA MG AND CAVALLARIN L A2 Milk and BCM-7 Peptide as Emerging Parameters of Milk Quality. **Front. Nutr.** 2022

HARTWIG, A; GAULY, M; ERHARDT, G; TESCHEMACHER, H; LEHMANN; W. Influence of genetic polymorphisms in bovine milk on the occurrence of bioactiand peptides [beta-caso-morphins], Milk protein polymorphism, Palmerston North (New Zealand), 1997.

HEDNER J., HEDNER T. β -casomorphins induce apnea and irregular breathing in adult rats and newborn rabbits. **Life Sci.** 1987;41:2303–2312.

Ho S., Woodford K., Kukuljan S., Pal S. Comparative effects of A1 versus A2 beta-casein on gastrointestinal measures: A blinded randomised cross-over pilot study. **Eur. J. Clin. Nutr.** ;68:994–1000. 2014.

HOHMANN, L. G. et al. Comparative Effects of Milk Containing A1 versus A2 β -Casein on Health, Growth and β -Casomorphin-7 Level in Plasma of Neonatal Dairy Calves. **Animals (Basel)** Jan; 11(1): 55. 2021.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa Trimestral de leite. Rio de Janeiro. 2019.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa Trimestral de leite. Rio de Janeiro. 2020.

IDF-International Dairy Federation Milk. Determination of nitrogen contents (Kjeldahl method) and calculation of crude protein content. Standard 20A, 1986.

JARMOLOWSKA, B., KOSTYRA, E., KRAWCZUK, S. AND KOSTYRA, H. Betacasomorphin-7 isolated from Brie cheese. **J. Sci. Food Agr.** 79(13):1788.1999.

JINSMAA, Y; YOSHIKAWA, M. Enzymatic release of neocasomorphin and bcasomorphin from bovine b-casein. **Peptides**, v. 20, n. 8, p. 957 - 962, 1999.

KAHALA, M., PAHKALA, E. AND PIHLATO, A. Peptides in fermented Finnish milk products. **Agr. Food Sci.** Finland 2:379–386.1993.

KAMINSKI, S; CIESLINSKA, A; KOSTYRA, E. Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health. **Journal of applied genetics**, v. 48, n. 3, p. 189-198, 2007.

KARSBURG, H.F. Certificação ligada às demandas do mercado. **Integral Certificações**. 2022.

KONONOFF, P. J; HEINRICHS, A. J. The effect of reducing alfalfa haylage particle size on cows in early lactation. *Journal of Dairy Science*, v. 86, p. 1445 – 1457, 2003.

KOST N.V., *et al.* β -Casomorphins-7 in infants on different type of feeding and different levels of psychomotor development. *Peptides*.30:1854–1860,2009.

KUMARI, S; SARKAR, P.K. Prabir K. Bacillus cereus hazard and control in industrial dairy processing environment. **Food Control**, v. 69, p. 20-29, 2016.

LAMMERS, B. P; BUCKMASTER, D. R; HEINRICHS, A. J. A Simple method for the analysis of particle sizes of forage and total mixed rations. *Journal of Dairy Science*, v.79, n.5, p.922-928, 1996.

LAUGESEN, M; ELLIOTT, R. Ischaemic heart disease, type 1 diabetes, and cow milk A1 β -casein. **The New Zealand Medical Journal**, v. 24, n. 116, p. 1 - 19, 2003.

LEONARDI, C; ARMENTANO, L. E. Effect of quantity, quality and length of alfalfa hay on selective consumption by dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 86, p. 557 – 564, 2003.

LOFFI, B. Optimization study for the production of an opioid-like preparation from bovine casein by mild acidic hydrolysis. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 6, p. 535 - 539, 2004.

LÓPEZ-FANDIÑO R. Functional Improvement of Milk Whey Proteins Induced by High Hydrostatic Pressure. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** 46:351–363.2006.

LUIZ, V. F. C.; *et al.* Terapia nutricional nas intolerâncias e alergias alimentares. *Electronic Journal of Pediatric Gastroenterology, Nutrition and*

MCLACHLAN, C. N. S. β -casein A1, ischaemic heart disease mortality, and other illnesses. **Medical Hypotheses**, v. 56, n. 2, p. 262-272, 2001.

MELTRETTER, J; SCHMIDT, A; HUMENY, A; BECKER, C; PISCHETSRIEDER, M. Analysis of the peptide profile of milk and its changes during thermal treatment and storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 9, p. 2899 - 2906, 2008.

MEISEL H., FITZGERALD R.J. Opioid peptides encrypted in intact milk protein sequences. *Br. J. Nutr*;84:27–31. 2000.

MOSSEL, D. A.A.; KOOPMAN, M. J.; JONGERIUS, E. Enumeration of Bacillus cereus in foods. **Applied Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 650-653, 1967.

MUEHLENKAMP, M. R; WARTHESEN, J. J. [beta]-Casomorphins: Analysis in cheese and susceptibility to proteolytic enzymes from Lactococcus lactis ssp. cremoris. **Journal of Dairy Science**, v. 79, n. 1, p. 20 - 26, 1996.

NAGPAL, R. *et al.* Milk, Milk Products, and Disease Free Health: An Updated Overview. **Critical Reviews In Food Science And Nutrition**, [s.l.], v. 52, n. 4, p.321-333, abr.2012. Informa UK Limited.

NGUYEN, D. D.; JOHNSON, S. K; BUSETTI, F; SOLAH, V. A. Formation and degradation of beta-casomorphins in dairy processing. **Food Science and Nutrition**, v. 55, p. 1955 - 1967, 2015.

NGUYEN, Hanh TH et al. Differences in the yoghurt gel microstructure and physicochemical properties of bovine milk containing A1A1 and A2A2 β -casein phenotypes. **Food Research International**, v. 112, p. 217-224, 2018.

PAL S, WOODFORD K, KUKULJAN S, HO S. Milk intolerance, betacasein and lactose. *Nutrients*. 7:7285–97. 2015.

PARASHAR, A., RAJPUT, Y. S., & SHARMA, R. Aptamer-based sensing of β -casomorphin-7. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 63(10), 2647–2653. 2015.

PIHLANTO A. Antioxidative peptides derived from milk proteins. *Int. Dairy J.*;16:1306–1314.2006.

RAIKOS V, DASSIOS T. Health-promoting properties of bioactive peptides derived from milk proteins in infant food: a review. **Dairy Sci Technol**. 94:91–101. 2014.

Review of the potential health impact of β -casomorphins and related peptides. **EFSA Scientific Report**, 231, 1-107. 2009.

RICHARD, D., KEN, E., THOMAS, A. W., & DAVIS, P. Opioid peptides. **Handbook of biologically active peptides** (Second Edition), 1696-1701, 2013.

RICHARDSON, B.C. The proteinases of bovine milk and the effect of pasteurization on their activity. **New Zealand Journal of Dairy Science and Technology**, v.18, p.233- 245, 1983.

SANTOS, E. C.; VILELA, P. A. M. Pesquisa de células somáticas no leite cru como critério de avaliação de qualidade. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 35, n. 6, p. 907 - 919, 1983.

SCHIEBER, A. AND BRUCKNER, H. Characterization of oligo- and polypeptides isolated from yoghurt. **Eur. Food Res. Technol**. 210(5):310–313.2000.

SGARBIERI, V. C. Revisão: Propriedades estruturais e físico-químicas das proteínas do leite. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 8, n. 1, p. 43-56, 2005.

SILVA, H. O. et al. Efficiency of Different Disinfectants on *Bacillus cereus* sensu stricto Biofilms on Stainless-steel Surfaces in Contact with Milk. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 2018.

SIMÕES, M; et al. A review of current and emergent biofilm control strategies. **LWT-Food Science and Technology**, v. 43, n. 4, p. 573-583, 2010.

SINGH M. *et al.* Casomorphin-7 Immunoreactive Peptide Increases after Milk Intake in Newborn but not in Adult Dogs. *Pediatr. Res.*v.26, p.34–38,2014.

SKLAN, D.; KAIM, M.; MOALLEM, U. et al. Effect of dietary calcium soaps on milk yield, bodyweight, reproductive hormones and fertility in first parity and older cows. *Journal of Dairy Science*, v.77, p.1652-1660, 1994.

SOKOLOV, O. Y; PRYANIKOVA, N. A; KOST, N. V; ZOLOTAREV, Y. A; RYUKERT, E. N; ZOZULYA, A. A. Reactions between β -Casomorphins-7 and 5-HT₂ -Serotonin Receptors. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 10, n. 5, 2005

SUCHY, F. J. et al. NIH consensus development conference statement: lactose intolerance and health. **NIH consensus and state-of-the-science statements**, v. 27, n. 2, p. 1-27, 2010.

Summer A, Di Frangia F, Marsan PA, De Noni I, Malacarne M. Occurrence, biological properties and potential effects on human health of beta-casomorphin 7: current knowledge and concerns. **Crit Rev Food Sci Nutr**. 60:3705–23, 2020.

SUN, Z; CADE, J. R; FREGLY, M. J; PRIVETTE, R. M. β -Casomorphin induces Fos-like immunoreactivity in discrete brain regions relevant to schizophrenia and autism. **Autism**, v. 3, n. 1, p. 67 - 83, 1999.

SUN, Z; ZHANG, Z; WANG, X; CADE, R; ELMIR, Z; FREGLY, M. Relation of β -casomorphin to apnea in sudden infant death syndrome. **Peptides**, v. 24, n. 6, p. 937 - 943, 2003.

SUN J., LEIMING X., LU X., YELLAND G.W., NI J., CLARKE A. Effects of milk containing only A2 beta casein versus milk containing both A1 and A2 beta casein proteins on gastrointestinal physiology, symptoms of discomfort, and cognitive behavior of people with self-reported intolerance to traditional cows' milk. **Nutr. J.** 2015;15:1–16

TAILFORD, K. A; BERRY, C. L; THOMAS, A. C; CAMPBELL, J. H. A casein variant in cow's milk is atherogenic. **Atherosclerosis**, v. 170, n. 1, p. 13 - 19, 2003.

TESCHEMACHER, H. Opioid receptor ligands derived from food proteins. **Current Pharmaceutical Design**, 9, 1331–1344. 2003.

THE A2 MILK COMPANY. Cows' milk A1/A2 beta-casein protein digestion. **Australia**, 2021.

THIRUVENGADAM M, VENKIDASAMY B, THIRUPATHI P, CHUNG IM, SUBRAMANIAN U. Beta-casomorphin: a complete health perspective. **Food Chem.** 2021.

THORSDOTTIR, I; BIRGISDOTTIR, B. E; JOHANNSDOTTIR, I. M; HARRIS, D. P; HILL, J; STEINGRIMSDOTTIR, L; THORSSON, A. V. Different beta-casein fractions in Icelandic milk versus Scandinavian cow's milk may influence diabetogenicity of cow's milk in infancy and explain low incidence of insulin-dependent diabetes mellitus in Iceland. **Pediatrics**, v. 106, n. 4, p. 719 - 724, 2000.

TRUSWELL, A. S. The A2 milk case: A critical review. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 59, n. 5, p. 623 - 631, 2005.

UMBACH M., TESCHEMACHER H., PRAETORIUS K., HIRSCHHÄUSER R., BOSTEDT H. Demonstration of a β -casomorphin immunoreactive material in the plasma of newborn calves after milk intake. **Regul. Pept.** v.12,p.223–230,1985.

UNIPROT **CONSORTIUM UNIPROT: the universal protein knowledgebase in 2021** Nucleic Acids Res. 49:D1.2021

VAN DER DOES, A. M., HIEMSTRA, P. S., & MOOKHERJEE, N. Antimicrobial host defence peptides: Immunomodulatory functions and translational prospects. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, 1117, 149–171, 2019.

VAN SOEST, P. J, ROBERTSON, J. B, LEWIS, B. A. Symposium: carbohydrate methodology, metabolism, and nutritional implications in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.3583-3597, 1991.

VERDI, R. J; BARBANO, D. M. Effect of coagulants, somatic cell enzymes, and extracellular bacterial enzymes on plasminogen activation. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.772-782, 1991.

VIDAL-MARTINS, Ana Maria C. et al. Evolução do índice proteolítico e do comportamento reológico durante a vida de prateleira de leite UAT/UHT. **Food Science and Technology** (Campinas), p. 698-704, 2005.

XU, R. J. Bioactive peptides in milk and their biological and health implications. **Food Reviews International**, 14(1), 1-16.2009.

WATANUKI, M. M; GALLO, C. R. Detection of *Bacillus cereus* in milk samples and assessment of the spores germination after milk thermal treatment. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v. 67, n. 3, p. 202-207, 2008.

ZOGHBI S., TROMPETTE A., CLAUSTRE J., EL HOMSI M., GARZÓN J., JOURDAN G., SCOAZEC J.-Y., PLAISANCIÉ P. β -Casomorphin-7 regulates the secretion and expression of gastrointestinal mucins through a μ -opioid pathway. **Am. J. Physiol. Liver Physiol.** ;290:G1105–G1113, 2006.