

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ALENIA NALIATO VASCONCELLOS

Quantificação de glicomacropéptido em leite proveniente de vacas com alelos A1 e A2 para β -caseína, experimentalmente contaminado com *Bacillus cereus* s.s. e *Pseudomonas fluorescens*

Pirassununga

2022

ALENIA NALIATO VASCONCELLOS

Quantificação de glicomacropéptido em leite proveniente de vacas com alelos A1 e A2 para β -caseína, experimentalmente contaminado com *Bacillus cereus* s.s. e *Pseudomonas fluorescens*

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 na área de Qualidade e Produtividade Animal, do programa de Pós-Graduação em Zootecnia.

Área de Concentração: Produção e Tecnologia de Alimentos

Orientador: Profa. Dra. Ana Maria Centola Vidal

Pirassununga

2022

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

N331q Naliato Vasconcellos, Alenia
Quantificação de GMP em leite proveniente de vacas com alelos A1 e A2 para B-CN, experimentalmente contaminado com *B. cereus* e *P. fluorescens* / Alenia Naliato Vasconcellos ; orientadora Ana Maria Centola Vidal. -- Pirassununga, 2022.
57 f.

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

1. Leite A2. 2. Hidrólise enzimática. 3. Protease microbiana. I. Centola Vidal, Ana Maria, orient.
II. Título.



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, 06 de janeiro de 2021

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

Prof. Dra. Daniele dos Santos Martins
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: VASCONCELLOS, Alenia Naliato

Título: Quantificação de glicomacropéptido em leite proveniente de vacas com alelos A1 e A2 para β -caseína, experimentalmente contaminado com *Bacillus cereus s.s.* e *Pseudomonas fluorescens*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: 21/02/2022

Banca Examinadora

Profa. Dra.: Ana Maria Centola Vidal
Instituição: FZEA/USP

Julgamento: Aprovada

Dra. Andréia Cristina Nakashima Vaz
Instituição: FZEA/USP

Julgamento: Aprovada

Profa. Dra.: Bruna Maria Salotti de Souza
Instituição: UFMG

Julgamento: Aprovada

DEDICATÓRIA

Não poderia dedicar tudo que sou e alcancei a outro alguém que não fosse minha mãe,
meu girassol.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus pelo privilégio de poder estudar e chegar aonde cheguei, com saúde e vontade de sempre alcançar mais.

Agradeço a minha mãe, Sonia, que sempre me deu o primeiro empurrão para voar longe e nunca me segurou embaixo de suas asas, me incentivando a buscar tudo que sonho em conquistar.

Agradeço ao meu pai, Alexandre, que mesmo não esteja presente nessa vida, é minha inspiração e sei que é meu fã número um.

Agradeço à toda minha família: meus avós que me educaram, meus tios e tias que formaram meu caráter, meus primos que são meus irmãos e que me ensinaram que alegria compartilhada é alegria redobrada.

Agradeço às minhas amigas, colegas, companheiras de vida: Isabela, Kaiana, Monique e Patricia. Não sentiria metade da felicidade que sinto se não tivesse o apoio de vocês, o abraço, o conselho, o incentivo, o amor, o lar. Vocês são minha história e minha zona de conforto.

Agradeço à minha orientadora, Ana Maria Centola Vidal, que nunca me deixou desistir.

Nos meus dias de desespero foi minha calma, nos meus dias de conquistas foi a primeira a mostrar seu orgulho. Sou sua cria muito bem direcionada.

Agradeço à Andréia Vaz, técnica e amiga, conselheira, sempre disposta a ajudar. Eu não teria alcançado esse título sem metade da sua dedicação por mim.

Agradeço aos meus colegas de laboratório, Elizangela, Thaís e Luísa; em especial à Danielle Fonseca, que segurou minha mão do primeiro ao último dia dessa caminhada e ao Arthur Macedo, sem sua dedicação e parceria nas noites viradas não teríamos resultados para discutir aqui.

Agradeço à Universidade de São Paulo por me formar a profissional que sou, com todo seu corpo docente de peso e suas oportunidades de crescimento, e à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos com suas lindas paisagens, flora e fauna que me permitiu viver e fazer o estudo ser lazer por tantos anos.

Agradeço à FAPESP pelo auxílio ao projeto de número 2019/09583-5.

Agradeço à CAPES pela bolsa de mestrado que me foi concedida. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“As investigações científicas revelam novas maneiras com quais Deus trabalha e nos trazem revelações mais profundas do totalmente desconhecido.”

- Maria Mitchell

RESUMO

VASCONCELLOS, A. N. **Quantificação de glicomacropéptido em leite proveniente de vacas com alelos A1 e A2 para β -caseína, experimentalmente contaminado com *Bacillus cereus* s.s. e *Pseudomonas fluorescens*.** 2022. 57f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2022.

Pouco se sabe sobre a ação de proteases microbianas no leite proveniente de vacas com genótipos contrastantes para β -caseína e, visto que a demanda do consumidor vem crescendo por produtos inovadores e de qualidade, e os benefícios que o leite A2 pode trazer para a saúde e bem-estar seguem em discussão na literatura. Destaca-se também que a quantificação de GMP em relação à ação de proteases microbianas também pode trazer discussões relevantes para a cadeia produtiva leiteira atual. O objetivo do estudo foi contaminar experimentalmente o leite proveniente de vacas com os genótipos A1A1, A1A2 e A2A2 para β -caseína com *Bacillus cereus* s.s. e *Pseudomonas fluorescens* e posteriormente quantificar o glicomacropéptido (GMP) a fim de verificar se existe influência dos três genótipos na degradação microbiana ou não da Kappa caseína (κ -CN) em diferentes tempos de incubação. Ao longo do tempo, houve aumento da concentração de GMP independentemente do genótipo ou contaminação. Comparando genótipos, foi possível perceber menores taxas de degradação da κ -CN para o leite proveniente de genótipo A1A1 para β -CN, seguido do A2A2 e por fim, A1A2. Desse modo, é importante manter a qualidade de um produto de valor agregado como o leite proveniente de vacas com genótipo A2A2 para β -CN que apresenta maior sensibilidade na degradação da κ -CN.

Palavras-chave: leite A2, hidrólise enzimática, protease microbiana.

ABSTRACT

VASCONCELLOS, A. N. Quantification of glycomacropeptide in milk from cows with A1 and A2 alleles for β -CN, experimentally contaminated with *Bacillus cereus* s.s. and *Pseudomonas fluorescens*. 2022. 57p. Master's dissertation (Animal Science) – Faculty of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo, Pirassununga, 2022.

Little is known about the action of microbial proteases in milk from cows with contrasting genotypes for β -casein and, given that consumer demand has been growing for innovative and quality products, and the benefits that A2 milk can bring to health and well-being are still under discussion in the literature. It is also noteworthy that the quantification of GMP in relation to the action of microbial proteases can also bring relevant discussions to the current dairy production chain. The aim of the study was to experimental contamination of milk from cows with genotypes A1A1, A1A2 and A2A2 for β -casein with *Bacillus cereus* s.s. and *Pseudomonas fluorescens* and later to quantify the glycomacropeptide (GMP) in order to verify if there is an influence of the three genotypes on the microbial degradation of Kappa casein (κ -CN), at different incubation times. Over time, there was an increase in GMP concentration regardless of genotype or contamination. Comparing genotypes, it was possible to notice lower degradation rates of κ -CN for milk from genotype A1A1 to β -CN, followed by A2A2 and finally, A1A2. Thus, it is important to maintain the quality of a value-added product such as milk from cows with the A2A2 genotype for β -CN, which is more sensitive to κ -CN degradation.

Key-words: A2 milk, enzymatic hydrolysis, microbial protease.

SUMÁRIO

1.	Revisão de literatura	12
1.1	Leite proveniente de vacas com alelos A1 e A2 para β -CN	12
1.2	Glicomacropéptido (GMP)	15
1.3	Microrganismos de relevância na cadeia leiteira	19
2.	Objetivo	23
3.	Material e métodos	23
3.1	Delineamento experimental	23
3.2	Obtenção do leite	24
3.3	Microrganismos utilizados para os inóculos	25
3.4	Contaminação experimental	25
3.5	Determinação do teor de GMP livre	25
3.6	Análise estatística	26
4.	Resultados	27
4.2	Quantificação de GMP	27
4.2.1	<i>Bacillus cereus s.s.</i>	27
4.2.2	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	33
5.	Discussão	39
6.	Conclusão	46
	REFERÊNCIAS	47

1. Revisão de literatura

1.1 Leite proveniente de vacas com alelos A1 e A2 para β -CN

O consumo de leite e derivados é cada vez mais protagonista na vida do brasileiro, uma vez que são considerados essenciais para o desenvolvimento e o bem-estar dos seres humanos, como também um alimento com grande contribuição ao fornecimento de cálcio, fósforo, vitamina A, D, E e B12, proteína, potássio, zinco, colina, magnésio e selênio, sendo incluídos nos índices de alimentação saudável (BASIoTIS et al., 2004; BRASIL, 2014; USDA, 2020).

Segundo o IBGE, a quantidade de leite cru adquirido e industrializado em 2020 foi de aproximadamente 18 bilhões de litros (IBGE, 2020). Desde 2017, a produção de leite, sob inspeção, voltou a crescer depois de dois anos consecutivos em queda (EMBRAPA, 2019). Estes dados revelam análises do cenário atual do Brasil, levando em consideração as novas tendências de mercado, onde pode-se destacar o leite proveniente de vacas com genótipo A2A2.

Além do mercado leiteiro ter grande impacto na economia, trata-se da compra e venda, produção e industrialização de um alimento altamente nutritivo. O leite é fonte de proteína, gordura, minerais e vitaminas de alta qualidade, sendo considerado um alimento completo devido sua composição rica em nutrientes (CALLEFE et al., 2015; NAGPAL et al., 2011; SGARBIERI, 2005). Dentre as proteínas lácteas, pode-se destacar a caseína do leite, que possuem excelente valor nutricional, com 9 aminoácidos essenciais que ajudam no crescimento e desenvolvimento e são encontradas em maior abundância dentre as proteínas, sendo classificadas em α_{S1} -caseína (α_{S1} -CN), α_{S2} -caseína (α_{S2} -CN), β -caseína (β -CN) e kappa-caseína (κ -CN), sendo a β -caseína a maior constituinte dessa classe (BRAUN et al., 2016; MADRIGAL et al., 2021).

As caseínas α_{S1} -CN, α_{S2} -CN e β -CN se combinam por interações hidrofóbicas e eletrostáticas entre si, e interagem com minerais de fosfato de cálcio (CCP), e em menor quantidade magnésio, citrato e fósforo; na superfície da estrutura da micela também encontra-se a κ -CN, com característica hidrofílica que contribui para a estabilidade micelar. Em cada micela formam-se sub-micelas e a junção dessas sub-micelas formam o grupo caseína (BIJL et al., 2021).

Além da caseína, o leite contém as proteínas séricas que fazem parte das principais proteínas, destacando-se a β -lactoglobulina e α -lactoalbumina, encontradas no soro (KAMINSKI et al., 2007). As demais proteínas séricas são: imunoglobulinas, enzimas, glicomacropéptídeos, lactoferrina, albumina sérica e fatores de crescimento,

que atuam na função imunológica e desenvolvimento do trato digestório (DEMIREL; ÇAK, 2018; VARGAS-BELLO-PÉREZ et al., 2019).

Os genes da caseína, região localizada no cromossomo 6 (BTA6q31), são estudados extensivamente em bovinos. Para que ocorram as variações genéticas das subunidades, α_{s1} , α_{s2} , β e κ -CN pelos genes CSN1S1, CSN1S2, CSN2 e CSN3, respectivamente, é necessário ocorrer a codificação no cromossomo 6. No mais, tais características genéticas apresentam altas taxas de mutação, principalmente na codificação da β -CN (CHEN et al., 2021; JANN et al., 2004).

A β -caseína do leite é uma proteína constituída de 209 aminoácidos que apresentam 13 variantes genéticas, sendo elas A1, A2, A3, A4, B, C, D, E, F, H1, H2, I e G (CAROLI; CHESSA; ERHARDT, 2009; GALLINAT et al., 2013; KAMINSKI et al., 2007), que diferem pela posição dos aminoácidos. Essas variações genéticas apresentam características de codominância, ou seja, os alelos podem estar presentes em heterozigoto entre as variações, sendo que um animal pode carregar no seu genótipo uma cópia de cada um dos alelos (DANILOSKI et al., 2021).

Os genótipos A1A1, A1A2 e A2A2 são mais frequentes no rebanho leiteiro, enquanto as outras variantes estão distribuídas dentro da variação alélica A1 (B, C, D, F e G) e A2 (A3, E, H1, H2 e I), por possuírem características genéticas semelhantes, sendo que alelos A1 e A2 são as variantes mais comuns (DANILOSKI et al., 2021).

O alelo A1 é uma mutação do alelo A2 e é encontrado com maior frequência em animais de raças taurinas, como a Holandesa. Acredita-se que, historicamente, o homozigoto A2A2 era predominante em todo o rebanho bovino, porém ao longo do tempo, ocorreu uma mutação no gene da β -CN originando outras variantes além do fenótipo alélico A2 (DANILOSKI et al., 2021).

É importante que seja feita a genotipagem do rebanho e a identificação do gene em questão. Para identificação das variações gênicas de β -CN a informação é extraída do DNA genômico em amostras de espermatozóide, leite, em pêlos ou sangue (DANILOSKI et al., 2021). Pode ser realizada por diferentes métodos analíticos, como PCR para amplificação de DNA, HPLC (cromatografia líquida de alto desempenho acoplada a espectrofotometria de massa), gel de eletroforese para focalização isoeétrica e espectroscopia de infravermelho (DANILOSKI et al., 2021; MAYER et al., 2021; NGUYEN et al., 2018).

Para a identificação do gene CSN2, o mais comum é que seja realizada a genotipagem animal. No entanto, com o aprofundamento de estudos e altos investimentos da indústria, novos métodos de identificação em relação às variantes da

β -CN e detecção dos alelos A1 e A2 da β -CN vêm sendo descritos, por exemplo, no leite. Um estudo recente de Giglioti et al. (2020), foi realizado o método de rhAmp para genotipagem utilizando leite, proporcionando uma opção de análise com otimização de tempo, praticidade e facilidade na coleta, além de ser um método não invasivo que não causa estresse aos animais.

O maior diferencial entre as variantes A1 e A2 para β -CN é o polimorfismo do nucleotídeo de citosina (CCT) convertido em adenina (CAT) no gene CSN2, na sua cadeia de 209 aminoácidos. Dessa forma, ocorre a troca do aminoácido prolina na posição do códon 67 (Pro⁶⁷) de β -CN A2 pelo aminoácido histidina (His⁶⁷) na β -CN A1 (KAILASH et al., 2014; LIMA, 2015; MAYER et al., 2021; NGUYEN et al., 2018).

A presença da His⁶⁷ facilita a clivagem nessa posição após atuação de proteases digestivas. Desse modo, libera um peptídeo bioativo de 7 aminoácidos (Tyr⁶⁰-Pro⁶¹-Phe⁶²-Pro⁶³-Gly⁶⁴-Pro⁶⁵-Ile⁶⁶) denominado de β -Casomorfina-7 (BCM-7) com características opióides (KAMINSKI et al., 2007).

As β -casomorfina (BCMs) são produto da hidrólise da β -caseína, classificadas como um grupo de peptídeos bioativos com propriedades opióides que apresentam uma estrutura que envolve de 4 a 11 aminoácidos sendo a mesma sequência para os três primeiros aminoácidos: tirosina, prolina e fenilalanina (DE NONI; CATTANEO, 2010; KAMINSKI et al., 2007; MUEHLENKAMP; WARTHESEN, 1996). Essa reação de hidrólise ocorre durante a digestão por proteases intestinais como a tripsina, envolvidas na digestão do leite, também podem acontecer pela ação de proteases endógenas do leite, proteases microbianas e durante os processamentos térmicos e enzimáticos na produção de leite e derivados (NGUYEN et al., 2015).

A BCM-7 pode ser produzida em até quatro vezes mais no leite com a variante A1 da β -caseína em relação à variante A2 (HARTWIG et al., 1997; KAMINSKI et al., 2007; YOSHIKAWA, 1999). Este peptídeo bioativo pode causar desconforto e inflamação gastrointestinal (HE et al., 2017; XIAOYANG et al., 2019) e é absorvido por regiões cerebrais relevantes para a esquizofrenia e o autismo (SUN; CADE, 1999), que também são promotoras 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). A BCM-7 também pode levar ao aumento do 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 (BIRGISDÓTTIR et al., 2002; ELLIOTT et al., 1999;

TAILFORD et al., 2003; McLACHLAN, 2001; SUN et al., 1999; THORSÐÓTTIR et al., 2000).

O motivo do crescimento da popularidade do leite proveniente de vacas com genótipo A2A2 para β -CN está relacionado ao seu potencial de fácil digestibilidade e diminuição dos problemas intestinais em comparação ao leite que contém o alelo A1 para β -CN. Conhecido até mesmo como alimento com propriedades funcionais, o “leite A2” vem sendo escolha prioritária entre os consumidores com sensibilidade digestiva (OLIVEIRA MENDES et al., 2019). Recentemente no Brasil, foi publicada a Resolução 3.980 (20.10.2021), onde os rótulos poderão conter a frase “Leite produzido a partir de vacas com genótipo A2A2”. A Anvisa também autorizou, a alegação de funcionalidade com a frase: “O leite A2 não promove a formação de BCM-7 (beta-casomorfina-7), que pode causar desconforto digestivo” (BRASIL, 2021).

Desse modo, o consumo do leite proveniente de vacas com genótipo A2A2 para β -CN é uma alternativa para indivíduos específicos com sensibilidade digestiva ou ainda para outros indivíduos com outras condições que se encaixam nas descritas acima.

Estudos levantam a possibilidade do leite proveniente de vacas com genótipo A2A2 para β -CN possuir uma composição diferente, com porcentagens diferentes de proteína, gordura e outros compostos (MCLEAN et al., 2009). Dessa maneira, a ação de enzimas que degradam o leite, como proteases microbianas, podem agir diferentemente nos leites provenientes de genótipos contrastantes para a β -CN. Segundo Çadark (2005), é possível notar que para os genes da β -CN, o homocigoto A1A1 possui maior teor de proteína e gordura em relação aos genótipos A1A2 e A2A2. Em uma pesquisa mais recente, Cendron et al. (2021) apresenta dados significativos de maior percentual de proteína e gordura para o genótipo A2A2.

Em termos de rendimento industrial, Nguyen et al. (2018) demonstraram que na produção de derivados, como no iogurte, o genótipo A2A2 apresentou um maior tempo de geleificação, com uma estrutura mais porosa, devido à maior quantidade de cálcio livre na micela de caseína, levantando a discussão de que a estrutura micelar desse genótipo pode ser mais frágil (DANILOSKI et al. 2021).

1.2 Glicomacropeptídeo (GMP)

Outro peptídeo derivado da caseína é o glicomacropeptídeo (GMP). A micela de caseína é uma partícula coloidal, que é a responsável pela estabilidade térmica do leite (FOX; BRODKORB, 2008). A estrutura interna da micela de caseína é constituída

predominantemente por α_{S1} , α_{S2} β -CN e de fosfato de cálcio, enquanto a κ -CN está localizada na superfície da micela (DALGLEISH, 2011).

Existem vários estudos divergentes em relação à estrutura da micela de caseína, mas ainda sim há um consenso quanto à estabilidade, que se deve pela presença de ligações iônicas e interações hidrofóbicas (HOLT et al., 2003). A κ -CN é uma glicoproteína, estável na presença de íons de cálcio e assumindo importante papel na estabilidade da micela. Já a β -CN, por ser mais fosforilada que a κ -CN, é mais sensível a altas concentrações de sais de cálcio, mesmo que seja menos sensível a precipitação com cálcio do que as caseínas α (WALSTRA, 1999).

Apesar das caseínas apresentarem alta estabilidade, alguns fatores como ação de proteases, hidrólise enzimática, extremas temperaturas e outros fatores podem alterar a estrutura micelar. A hidrólise enzimática ocorre pela ação de endopeptidases, assim também como de proteases, que agem semelhante à renina: hidrolisam a cadeia peptídica da κ -CN (169 aminoácidos) na ligação entre a fenilalanina (posição 105 na cadeia) e a metionina (posição 106 na cadeia), acarretando na falta de estabilidade e liberando produtos, em uma porção hidrofóbica (para-kappa-caseína, cadeia de 1 a 105 aminoácidos) e uma hidrofílica (glicomacropéptido - GMP, cadeia de 106 a 169 aminoácidos), causando a precipitação da caseína e expondo as α_{S1} , α_{S2} e as β -CN (BRASIL et al., 2015; ORDOÑÉZ, 2005).

Tal reação é utilizada na indústria de laticínios na produção de queijo e outros derivados lácteos. Por isso, quando há degradação da micela de caseína por ação de enzimas externas por conta da qualidade do leite e mal armazenamento, ocorre diminuição do rendimento industrial, tornando esse fator agravante para a lucratividade das indústrias (SILVA, 2015).

Enzimas degradantes atuam nas frações kappa, α e β das micelas de caseína, sem degradar as proteínas do soro (BÜRGER, 2015). Essa reação é preocupante pois afeta a vida de prateleira do leite e derivados, visto que a ação degradante das metalloproteinas não é interrompida após tratamento térmico, fazendo com que ocorra mudanças no sabor e textura do produto, por conta de derivados de peptídeos que possuem características de amargor, causando rejeição no paladar do consumidor (MARCHAND et al., 2017). Apesar de tais defeitos tecnológicos não oferecerem risco à saúde do consumidor, promovem grandes perdas econômicas para a indústria, limitando o prazo de validade dos lácteos no comércio por conta de alterações sensoriais (MONTANHINI, 2018).

Importante ressaltar que as metalloproteínas, enzimas produzidas por microrganismos importantes na cadeia produtiva leiteira, possuem resistência térmica, mantendo-se ativas mesmo após o tratamento térmico, perdurando o período de validade do produto (IZIDORO et al., 2003). Alguns estudos demonstram que existe aumento da proteólise no decorrer da vida de prateleira, relacionada com a quebra da caseína pela ação dessas enzimas, provenientes principalmente de bactérias psicrotróficas que contaminam o leite cru (SANTOS, 2006)

No mais, não é toda proteólise do leite que ocorre por conta apenas de contaminação microbiológica. Existe ação de proteases naturais que degradam o leite, como a ação de plasmina, assim como de proteinase alcalina nativa (WALSTRA, 1990). Essa degradação natural pode desestabilizar a caseína, resultando no aumento de viscosidade do produto e geleificação do leite, principalmente em derivados com maior vida de prateleira (VIDAL-MARTINS et al., 2005).

A ação das proteases em geral ocorre entre os aminoácidos fenilalanina e metionina da sequência da κ -CN, sendo o local semelhante ao utilizado pela renina, como mencionado anteriormente, na coagulação do leite para fabricação de queijo e derivados (GARCÍA-ROMERO; MAYORGA-LLERENA, 2015) e resultando em glicomacropéptido (GMP) e na para-kappa-caseína (HARAGUCHI et al., 2006).

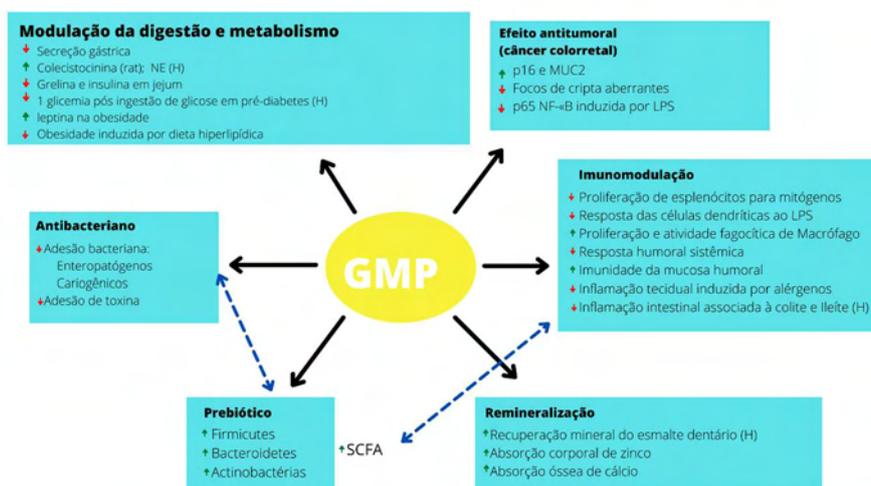
Portanto, a quantificação de GMP está relacionada com a ocorrência do processo de degradação do leite, assim como também pode ser utilizada para verificar a adição fraudulenta do soro no leite (PRATA; PRATA, 2012). Para mensurar o teor de GMP existem algumas metodologias validadas que foram desenvolvidas para detectar fraudes e a atividade proteolítica no produto, como por exemplo a polarografia, a determinação do teor de fosfatídeos e de aminoácidos sulfurados, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e a metodologia de ninidrina ácida, com utilização da curva de ácido siálico como base (OANCEA, 2009; PRATA; PRATA, 2012).

O método da ninidrina ácida (determinação quantitativa de ácido siálico por espectrofotometria na região visível) quantifica, indiretamente, a liberação de glicomacropéptido (GMP). Na fabricação de queijos, a fração GMP, liberada com o soro do queijo, é resultante da hidrólise da κ -CN pela ação do coalho (quimosina) e processo idêntico ocorre em caso de proteólise do leite cru, pasteurizado ou esterilizado promovido pelas proteases (FUKUDA et al., 2003). De acordo com Hogenboom et al. (2019), a presença de GMP é um indicador útil de suscetibilidade do leite à gelificação, independentemente da espécie responsável pela produção da enzima.

Além das características relacionadas ao rendimento e degradação do leite, é interessante ressaltar que o GMP é também objeto de estudo há algum tempo, por ser responsável por várias funções como a estimulação de bifidobactérias, ou seja, bactérias com potencial probiótico, ser fonte de ácido siálico que atua no desenvolvimento cerebral, e atua como modulador da secreção gástrica. Ainda quando novamente digerido, pode agir com atividade antitrombótica (SANTIN, 2005).

Além disso, o GMP tem grande potencial alimentício. Há evidências de que esse peptídeo possui propriedades como elemento nutricional, aditivo alimentar e alimento com propriedade funcional. Muitas pesquisas evidenciam as propriedades antibacterianas, prebióticas, remineralizantes, modulares dos processos digestivo, metabólico e imunológico (SALINAS et al., 2019).

Figura 1. Propriedades biológicas do GMP.



Fonte: SALINAS et al., 2019 - adaptado.

Devido a tais bioatividades descritas na figura 1 e sua abundância em derivados lácteos, a indústria de alimentos têm grande interesse na pesquisa e desenvolvimento de produtos funcionais baseados em GMP. No entanto, é importante ressaltar que é um produto de uma degradação de outro componente e por conta disso, pode variar por não ser uma estrutura única (DALLAS et al., 2021). De tal forma, a ação das proteases sobre a molécula de sua origem pode estar relacionada com a quantificação desse peptídeo no leite, uma vez que sofre ação de degradação, inclusive de microrganismos de grande importância na cadeia produtiva leiteira.

1.3 Microrganismos de relevância na cadeia leiteira

Por se tratar de um produto de rica composição nutricional, perecível e com significativo percentual de proteína, as Instruções Normativas que se referem à qualidade de leite vêm preconizando há anos a importância da obtenção, transporte e armazenamento de forma que a matéria-prima se mantenha íntegra. Ou seja, é imprescindível que a obtenção do leite seja feita de maneira higiênica, seu transporte seja feito em condições adequadas e seu armazenamento seja prioritariamente sob refrigeração, respeitando o tempo e temperatura estabelecidos em legislação (BRASIL, 2018).

A recomendação, segundo a IN 76 (BRASIL, 2018), atualizada pela IN 55 de 2020 (BRASIL, 2020), é que o leite seja armazenado a 5°C na indústria de beneficiamento antes de sua pasteurização. Desse modo, fica limitada a multiplicação de microrganismos mesófilos que consomem os componentes do leite como substrato. No entanto, ainda é possível que microrganismos psicotróficos que contaminam a matéria-prima possam se multiplicar a essa temperatura, uma vez que sua temperatura ótima de multiplicação é a temperatura de refrigeração, além de durante o resfriamento, ocorrer o fenômeno de resfriamento marginal do leite, com oscilação de temperatura, que também colabora para a multiplicação de microrganismos psicotróficos (FONSECA; SANTOS, 2019).

Ou seja, a refrigeração do leite proporciona uma redução no processo de deterioração pelos microrganismos mesófilos, entretanto, esse procedimento pode proporcionar alguns problemas tecnológicos associados à seleção de microrganismos psicotróficos. Desse modo, é importante que seja feito o dimensionamento do tanque de expansão de forma correta, correspondendo às necessidades do local de acordo com dados referentes ao número de ordenhas, volume a ser armazenado, temperatura ideal de armazenamento, com o intuito de alcançar o melhor método de conservação do leite (ARCURI et al., 2006).

Os microrganismos psicotróficos de impacto na cadeia leiteira englobam as espécies Gram-negativas dos gêneros *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Alcaligenes*, *Chromobacterium* e *Flavobacterium*; e espécies Gram-positivas dos gêneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* e *Microbacterium* spp. (PINTO et al., 2013).

As principais fontes de contaminação do leite cru com bactérias psicotróficas podem ser água residual de ordenhadeiras, tubulações e/ou tanques de resfriamento, na ordenha com tetos mal higienizados, de superfícies de utensílios e equipamentos ou

ainda durante o transporte e armazenamento do leite, também é importante ressaltar a possibilidade de existir a formação de biofilme nessa cadeia (SIMÕES et al., 2010).

Os microrganismos psicrotróficos são uma classe de microrganismos capazes de manter sua atividade mesmo em baixas temperaturas. Além de manter sua taxa de multiplicação crescente, eles possuem a capacidade de produzir enzimas que degradam proteínas e lipídios, que são termorresistentes. No entanto, não é só pelo fato de ter a presença destes microrganismos no leite, mas ocorrer a produção de enzimas que diminuem a qualidade e a vida de prateleira do leite termicamente tratado e de derivados fabricados com esta matéria-prima contaminada (SØRHAUG et al., 1997). Dentre os principais microrganismos contaminantes do leite, destacam-se o *Bacillus cereus sensu strictu* (s.s.) e *Pseudomonas fluorescens*.

O gênero *Bacillus* é um grupo de bactérias gram-positivas em forma de bastonete, variam no tamanho de 1.0-1.2µm a 3.0-5.0µm, móveis, mesófilas com comportamento psicrotrófico, aeróbias ou anaeróbias facultativas, formadoras de esporos, capazes de resistir ao processamento térmico mantendo sua a capacidade de germinação (WATANUKI; GALLO, 2008) e produção de enzimas toxinas e biofilmes (VIDAL-MARTINS et al., 2005).

Existem espécies de *Bacillus* que não são patogênicas e que são, por exemplo, utilizadas pela indústria como probióticos e na fermentação de alimentos (ELSHAGHABEE et al., 2017; TAMANG; WATANABE; HOLZAPFEL, 2016). Mas existem também cepas altamente patogênicas, conhecidas como arma biológica, como o *Bacillus anthracis*, que produz a toxina antraz (HELGASON et al., 2004).

Dentre as espécies de *Bacillus* com importância alimentícia, destaca-se o *Bacillus cereus* s. s.. Trata-se de uma espécie relevante na cadeia produtiva leiteira não só por conta de seu potencial proteolítico que causa problemas nos laticínios, mas também por estar relacionada a doenças transmitidas por alimentos, causando síndrome gastrointestinal por conta da produção de toxinas com perfil enterotoxigênico, podendo causar duas vias de síndrome: diarreica e emética, ou até mesmo, as duas síndromes juntas (MAZIERO; BERSOT, 2011; OH et al., 2012).

A síndrome diarreica ocorre pela produção e liberação de enterotoxinas (Hbl, Nhe e CytK) pelo *B. cereus* s.s. no intestino delgado, sendo que é preciso ingerir quantidade o suficiente de esporos ou células viáveis para que ocorra a enfermidade (EHLING-SCHULZ et al., 2004; FOSSI et al., 2016; WANG et al., 2014). Já quanto à síndrome emética, uma única toxina é responsável (cereulide) pela enfermidade, sendo

que ela é pré-formada no alimento durante a esporulação do microrganismo (LUCKING et al., 2015).

Dentro dos parâmetros de qualidade do leite, o *B. cereus s.s.* tem grande importância. Pois trata-se de um microrganismo que tem uma temperatura ótima de multiplicação entre 28 a 35°C, porém pode ter atividade mesmo entre temperaturas de 4 a 48°C, fazendo com que seja fácil contaminar e sobreviver em condições mais adversas, inclusive dentro da faixa de pH de 4,9 a 9,3 (NOTERMANS; BATT, 1998). Por ser um microrganismo esporulado e resistente à tratamentos térmicos, a ação de proteases pode perdurar durante toda a vida de prateleira, fazendo com que o teor de proteína e gordura do leite seja consumido como substrato para essa bactéria, além de sofrer degradação enzimática por suas enzimas.

Dessa forma, ressalta-se a importância de priorizar a obtenção higiênico-sanitária do leite, uma vez que ao ocorrer a contaminação da matéria-prima com *B. cereus s.s.*, fica difícil reverter a situação. Tal microrganismo, ainda possui a capacidade de formar biofilme (CHMIELEWSKI; FRANK, 2003), ou seja, seus esporos, que são de natureza hidrofóbica, se aderem ao material comumente utilizado nas indústrias de laticínios, como o aço inoxidável e podem contaminar a matéria-prima que passa pela tubulação. É importante ressaltar que a presença de biofilme na indústria é uma condição extremamente difícil de reverter, pois há grande resistência de limpeza e desinfecção por produtos de limpeza (ROSSI et al., 2018).

Quanto à produção de enzimas, tais microrganismos sintetizam lipases, metalloproteínases, lecitínases e fosfolipases (KUMARI; SARKAR, 2016; SIMÕES et al., 2010). O metabolismo da ação das metalloproteínases ocorre por meio da hidrólise da caseína, podendo causar a coagulação do leite. Enquanto para as lecitínases, fosfolipases e lipases, ocorre a hidrólise dos triglicerídeos resultando em uma maior concentração de ácidos graxos livres e degradação de lipídios (JONGHE et al., 2010).

Portanto, para evitar perdas econômicas para a indústria, é importante evitar a contaminação por *Bacillus cereus s.s.*. O prejuízo ocasionado pela deterioração de produtos através de enzimas proteolíticas e lipolíticas é um dos principais desafios da indústria de laticínios, principalmente em produtos cuja vida de prateleira é maior (SAMARZIJA et al., 2012).

Outro microrganismo de grande importância é a *Pseudomonas fluorescens*, que são bactérias psicrotróficas e gram-negativas, termolábeis, aeróbias, com alta atividade metabólica e que produzem pigmentos fluorescentes como a pioverdina (MIRANDA et

al., 2016). Produzem enzimas proteolíticas capazes de resistir inclusive ao tratamento por ultra alta temperatura (UAT) (MATÉOS et al., 2015).

As proteases destas bactérias resistem à temperaturas utilizadas em tratamentos térmicos aplicados na produção de leite pasteurizado e de derivados (ALVES et al., 2016; CALDERA et al., 2016), causando instabilidade e coagulação indesejada no leite, ao longo da vida de prateleira do produto (ALVES et al., 2016; KUMARI; SARKAR, 2016; SIMÕES et al., 2010).

Existem algumas cepas de *Pseudomonas* spp. que produzem diferentes enzimas hidrolíticas, como proteases, lipases e fosfolipases (ERCOLINI et al., 2009). As proteases provenientes desse microrganismo são estáveis a altas temperaturas, podendo ser inativadas em tratamento térmico a 72°C, por quatro a cinco horas ou, a 120°C, por sete minutos. No entanto, é inviável que seja realizado qualquer um destes processos, uma vez que, são de enorme prejuízo para as propriedades sensoriais e físico-químicas do leite (SØRHAUG; STEPANIAK, 1997).

Desse modo, as enzimas produzidas pelas *Pseudomonas* spp., durante o armazenamento do leite cru sob refrigeração, mantém sua atividade hidrolítica máxima. E ainda assim, várias destas enzimas possuem a capacidade de manter atividade hidrolítica entre 60 a 70% após a pasteurização, e 30 a 40% após o processo de esterilização comercial do leite (SAMARŽIJA et al., 2012.).

Por conta de seu papel relevante na deterioração do leite, a *Pseudomonas fluorescens* é uma excelente classe de microrganismos que serve para relacionar a taxa de multiplicação, atividade proteolítica e ocorrência de instabilidade em diferentes substratos lácteos (PINHO et al., 2015). Ainda é importante ressaltar que a *P. fluorescens* pode produzir uma metalloprotease alcalina termoestável denominada AprX, que desempenha um papel predominante na deterioração de derivados lácteos (COLANTUONO et al., 2020).

Por conta da atividade de proteases bacterianas sobre o leite, ocorre um processo de geleificação/coagulação, afetando as propriedades físico-químicas do produto. Além disso, ocorre a formação de compostos que conferem sabor e odor desagradáveis ao consumidor, além da perda de rendimento na produção de derivados, isto devido à ação sobre a β -CN e a κ -CN, que produzem peptídeos hidrófobos e a desestabilização da micela de caseína (COLANTUONO et al., 2020; FAIRBAIRN; LAW, 1986; RECIO et al., 2000).

A especificidade das proteases produzidas por bactérias tanto gram-positivas quanto gram-negativas diferem em relação às caseínas, atuando preferencialmente sobre

a κ -CN por conta de sua localização na superfície da micela (GLÜCK et al., 2016; MATÊOS et al., 2015). Ainda assim, supõe-se que não há preferência de sítio de clivagem, o que traz a oportunidade de levantar diferenças entre a ação das proteases e os genótipos para a β -CN, uma vez que não há conhecimento específico sobre a ação da degradação microbiana no leite proveniente de vacas com genótipo A2A2 (COLANTUONO et al., 2020).

2. Objetivo

O objetivo do estudo foi contaminar experimentalmente o leite proveniente de vacas com os genótipos A1A1, A1A2 e A2A2 para β -caseína com *Bacillus cereus s.s.* e *Pseudomonas fluorescens* e posteriormente quantificar o GMP (glicomacropéptido) em diferentes tempos de incubação, afim de verificar se existe influência dos três genótipos na degradação microbiana ou não da κ -CN.

3. Material e métodos

3.1 Delineamento experimental

Para a realização do projeto, foram aplicados 4 tratamentos diferentes em leite proveniente de vacas com alelos contrastantes para β -caseína, totalizando 12 tratamentos, com análise de 6 tempos crescentes de incubação. Os 3 genótipos foram A1A1, A1A2 e A2A2 para a β -caseína, com contaminação experimental e sem contaminação experimental (grupos controle), sendo que para a contaminação experimental foram utilizados microrganismos de relevância na cadeia produtiva leiteira: *Bacillus cereus s.s.* e *Pseudomonas fluorescens*. As análises aconteceram nos tempos, em horas: 0h (1), 1h30 (2), 3h (3), 4h30 (4), 6h (5) e 12h (6), todo experimento foi realizado em triplicata, conforme descrito na tabela 1.

Tabela 1. Delineamento experimental do estudo realizado.

Genótipo das vacas	Tratamentos do leite	Análises realizadas	Tempo/hs de incubação do leite
A1A1	Leite contaminado com <i>B cereus s.s.</i> (CBC)	Determinação do teor de GMP livre	
	Leite controle – sem contaminação com <i>B cereus s.s.</i> (SBC)		0 (1)
	Leite contaminado com <i>P. fluorescens</i> (CPF)		1:30 (2)
	Leite controle – sem contaminação com <i>P. fluorescens</i> (SPF)		3 (3)
			4:30 (4)
A1A2	Leite contaminado com <i>B cereus s.s.</i> (CBC)	Determinação do teor de GMP livre	
	Leite controle – sem contaminação com <i>B cereus s.s.</i> (SBC)		0 (1)
	Leite contaminado com <i>P. fluorescens</i> (CPF)		1:30 (2)
	Leite controle – sem contaminação com <i>P. fluorescens</i> (SPF)		3 (3)
			4:30 (4)
A2A2	Leite contaminado com <i>B cereus s.s.</i> (CBC)	Determinação do teor de GMP livre	
	Leite controle – sem contaminação com <i>B cereus s.s.</i> (SBC)		0 (1)
	Leite contaminado com <i>P. fluorescens</i> (CPF)		1:30 (2)
	Leite controle – sem contaminação com <i>P. fluorescens</i> (SPF)		3 (3)
			4:30 (4)

3.2 Obtenção do leite

Foram utilizados 5 litros de leite, do *pool* do leite de vacas genotipadas para a β -caseína, sendo 10 animais de cada grupo com os diferentes genótipos (A1A1, A1A2 e A2A2). Foi realizada a coleta de leite do setor de Bovinocultura de Leite do campus USP Fernando Costa e em uma fazenda comercial, que também tem os animais genotipados para β -caseína. Em seguida, o leite foi autoclavado a 121°C por 15 minutos

para garantir que não houvesse a presença de microrganismos que pudessem interferir na contaminação experimental.

3.3 Microrganismos utilizados para os inóculos

Para a contaminação experimental do leite, foram utilizados microrganismos isolados com conhecido potencial proteolítico, sendo eles: *Bacillus cereus s.s.* SAMN07414939 (Bio Project PRJNA390851) (SILVA et al., 2018) e *Pseudomonas fluorescens*: ATCC 13525.

3.4 Contaminação experimental

No leite obtido e previamente autoclavado, foi adicionado 1 mL do inóculo em concentração de 10^6 UFC de cada microrganismo (*Bacillus cereus s.s.* e *Pseudomonas fluorescens*) (BRUZAROSKI et al., 2017). Para chegar na concentração desejada de 10^6 UFC/mL, foi feita a diluição até 10^{-3} do inóculo e adicionado 0,1 mL do conteúdo da diluição em 100 mL de leite, que foi incubado a 35°C e 25°C, respectivamente, por 12 horas. Foi realizado um controle negativo para equiparação dos resultados a partir da quantificação de GMP em amostra de leite autoclavado sem contaminação.

3.5 Determinação do teor de GMP livre

A determinação do teor de GMP livre foi realizada pela metodologia da Ninidrina ácida (FUKUDA; ROIG; PRATA, 2004). Para o preparo da amostra, foram pipetados 20 mL de leite, previamente homogeneizado, em um becker e adicionados 20 mL de ácido tricloroacético 24% (p/v). A mistura permaneceu em repouso por 30 minutos, filtrada em filtro qualitativo (papel filtro Whatman nº 40) e, 10 mL do filtrado foi recolhido em um tubo cônico de 15 mL, e adicionado de 1 mL de ácido fosfotúngstico. Após a centrifugação a 3500 rpm, por 11 minutos, o sobrenadante foi descartado e 6 mL de álcool etílico absoluto foram adicionados ao precipitado. A amostra foi homogeneizada e novamente centrifugada. O precipitado foi adicionado de 2 mL de ácido acético glacial e 1 mL de ninidrina. Os tubos foram colocados em banho-maria (100°C) por 10 minutos, seguido de choque térmico em banho de gelo. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro, 470 nm. Para a determinação da concentração (mg de ácido siálico/mL), foi utilizada uma curva padrão de ácido siálico puro.

3.6 Análise estatística

Após a verificação da normalidade dos resíduos e a homogeneidade das variâncias, os resultados foram analisados pelo programa estatístico Statistical Analysis System®, versão 9.4 (SAS, 2018). Com a distribuição normal dos dados, o procedimento estatístico adotado foi de acordo com os efeitos principais dos tratamentos, pelo comando Proc-GLIMMIX adotando-se nível de significância de 5%.

Os dados de tratamentos (sem contaminação e com contaminação) e os diferentes genótipos (A1A1, A1A2, A2A2) foram analisados como variáveis classificatórias e os teores de Glicomacropéptido (GMP em mg de ácido siálico/mL de leite) como variáveis resposta. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial 2×3 (dois tratamentos e três genótipos) totalizando 6 tratamentos, de acordo com o modelo estatístico abaixo:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + D_j + E_i \times D_j + e_{ij},$$

onde Y_{ij} = é o valor observado para o teor de GMP; μ = média geral; T_i = efeito fixo do tratamento i ; G_j = efeito fixo de genótipo j ; $T_i \times G_j$ = efeito fixo da interação entre o tratamento e o genótipo; e e_{ijk} = erro aleatório associado a cada observação. Os teores de GMP foram medidos em seis diferentes tempos de incubação (0 horas, 1:30 horas, 3 horas, 4:30 horas, 6 horas e 12 horas), analisados como medidas repetidas no tempo, segundo o modelo estatístico abaixo:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + G_j + T_i \times G_j + T_k + T_k \times T_i + T_k \times G_j + T_k \times G_j \times T_i + e_{ijk},$$

onde Y_{ijk} = é o valor observado para o teor de GMP; μ = média geral; T_i = efeito fixo do tratamento i ; G_j = efeito fixo de genótipo j ; $T_i \times G_j$ = efeito fixo da interação entre o tratamento e o genótipo; H_k = efeito fixo de hora k ; $H_k \times T_i$ = efeito fixo da interação entre hora e tratamento; $H_k \times G_j$ = efeito fixo da interação entre hora e genótipo; $H_k \times G_j \times T_i$ = efeito fixo da interação hora, genótipo e tratamento; e_{ijk} = erro aleatório associado a cada observação.

4. Resultados

4.2 Quantificação de GMP

4.2.1 *Bacillus cereus s.s.*

Na tabela 2, estão apresentados os resultados do efeito dos tratamentos, sem contaminação com *Bacillus cereus s.s.* e com contaminação com *Bacillus cereus s.s.*, nas amostras de leite proveniente de vacas com genótipo A1A1 da β -CN, e nos diferentes tempos de incubação (1, 2, 3, 4, 5 e 6) sobre o teor de Glicomacropéptido (GMP em mg de ácido siálico/mL de leite), em que é possível observar efeito estatisticamente significativo para tratamento (p_valor 0,0011) e tempo de incubação (p_valor 0,0007) e não significativo para interação dos fatores (p_valor 0,2282), sendo as maiores médias observadas no leite contaminado e nos tempos finais de incubação. Para o leite, sem contaminação com *Bacillus cereus s.s.* e proveniente de vacas com genótipo A1A1, a menor média do teor de ácido siálico foi de 4,75 mg/mL, e no tempo de incubação 1, e a maior média do teor de ácido siálico foi de 5,86 mg/mL no tempo de incubação 6. Para o leite com contaminação com *Bacillus cereus s.s.* a menor média do teor de ácido siálico foi de 5,18 mg/mL no tempo de incubação 1 e a maior média do teor de ácido siálico foi de 7,73 mg/mL no tempo de incubação 6, como pode ser observado na tabela 2.

Tabela 2. Efeito dos tratamentos, sem contaminação com *Bacillus cereus s.s.* e com contaminação com *Bacillus cereus s.s.*, nas amostras de leite proveniente de vacas com genótipo A1A1 da β -CN, e nos diferentes tempos de incubação (1, 2, 3, 4, 5 e 6) sobre o teor de Glicomacropéptido (GMP em mg de ácido siálico/mL de leite).

Tratamento	Tempo	mg de Ác. Siálico / mL	EPM	P_valor		
				Trat. ⁹	Tempo ¹⁰	Trat*Tempo ¹¹
SBC ¹	1 ³	4,75bF	0,3080	0,0011	0,0007	0,2282
	2 ⁴	5,01bD				
	3 ⁵	5,52bC				
	4 ⁶	4,87bE				
	5 ⁷	5,71bB				
	6 ⁸	5,86bA				
CBC ²	1 ³	5,18aF	0,3080	0,0011	0,0007	0,2282
	2 ⁴	5,61aD				
	3 ⁵	5,92aC				
	4 ⁶	5,45aE				
	5 ⁷	6,38aB				
	6 ⁸	7,73aA				

¹ Leite controle – sem contaminação com *B cereus s.s.*; ² Leite contaminado com *B cereus s.s.*; ³ 0 horas de incubação; ⁴ 1:30 horas de incubação; ⁵ 3 horas de incubação; ⁶ 4:30 horas de incubação; ⁷ 6 horas de incubação; ⁸ 12 horas de incubação; ⁹ Diferentes tratamentos (sem contaminação e contaminado); ¹⁰ Diferentes tempos de incubação (1, 2, 3, 4, 5 e 6); ¹¹ Interação entre os diferentes tratamentos e os diferentes tempos. Letras iguais correspondem às médias que não diferem estatisticamente entre si, ao nível de significância de 5% ($p > 0,05$). Letras diferentes correspondem às médias que diferem estatisticamente entre si, ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Letras minúsculas correspondem a comparação das médias para variável tratamento. Letras maiúsculas correspondem a comparação das médias para variável tempo. EPM – erro padrão da média.

Na tabela 3, estão apresentados os resultados do efeito dos tratamentos, sem contaminação com *Bacillus cereus s.s.* e com contaminação com *Bacillus cereus s.s.*, nas amostras de leite proveniente de vacas com genótipo A1A2 da β -CN, e nos diferentes tempos de incubação (1, 2, 3, 4, 5 e 6) sobre o teor de Glicomacropéptido (GMP em mg de ácido siálico/mL de leite), em que é possível observar efeito estatisticamente significativo para tratamento ($p_valor < 0,0001$), tempo de incubação ($p_valor < 0,0001$) e para interação entre os fatores ($p_valor < 0,0001$), sendo a maior média observada no leite contaminado no tempo final de incubação. Para o leite, sem contaminação *Bacillus cereus s.s.* e proveniente de vacas com genótipo A1A2, a menor média do teor de ácido siálico foi de 7,48 mg/mL no tempo 3 e a maior média do teor de ácido siálico foi de 9,58 no tempo 5. Para o leite com contaminação *Bacillus cereus s.s.* a menor média do teor de ácido siálico foi de 7,94 mg/mL no tempo de incubação 1 e a maior média do teor de ácido siálico foi de 28,03 mg/mL no tempo de incubação 6, como pode ser observado na tabela 3.

Tabela 3. Efeito dos tratamentos, sem contaminação com *Bacillus cereus s.s.* e com contaminação com *Bacillus cereus s.s.*, nas amostras de leite proveniente de vacas com genótipo A1A2 da β -CN, e nos diferentes tempos de incubação (1, 2, 3, 4, 5 e 6) sobre o teor de Glicomacropéptido (GMP em mg de ácido siálico/mL de leite).

Tratamento	Tempo	mg de Ác. Siálico / mL	EPM	P_valor		
				Trat.	Tempo	Trat*Tempo
SBC ¹	1	7,65a	0,4669	<0,0001	<0,0001	<0,0001
	2	8,26a				
	3	7,48b				
	4	9,14a				
	5	9,58a				
	6	8,78b				
CBC ²	1	7,94a	0,4669	<0,0001	<0,0001	<0,0001
	2	9,08a				
	3	9,41a				
	4	9,61a				
	5	9,84a				
	6	28,03a				

¹ Leite controle – sem contaminação com *B cereus s.s.*; ² Leite contaminado com *B cereus s.s.*; ³ 0 horas de incubação; ⁴ 1:30 horas de incubação; ⁵ 3 horas de incubação; ⁶ 4:30 horas de incubação; ⁷ 6 horas de incubação; ⁸ 12 horas de incubação; ⁹ Diferentes tratamentos (sem contaminação e contaminado); ¹⁰ Diferentes tempos de incubação (1, 2, 3, 4, 5 e 6); ¹¹ Interação entre os diferentes tratamentos e os diferentes tempos. Letras iguais correspondem às médias que não diferem estatisticamente entre si, ao nível de significância de 5% ($p > 0,05$). Letras diferentes correspondem às médias que diferem estatisticamente entre si, ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Letras minúsculas correspondem à comparação das médias para variável tratamento. Letras maiúsculas correspondem a comparação das médias para variável tempo. EPM – erro padrão da média.

Na tabela 4, estão apresentados os resultados do efeito dos tratamentos, sem contaminação com *Bacillus cereus s.s.* e com contaminação com *Bacillus cereus s.s.*, nas amostras de leite proveniente de vacas com genótipo A2A2 da β -CN, e nos diferentes tempos de incubação (1, 2, 3, 4, 5 e 6) sobre o teor de Glicomacropéptido (GMP em mg de ácido siálico/mL de leite), em que é possível observar efeito estatisticamente significativo para tratamento ($p_valor < 0,0001$), tempo de incubação ($p_valor < 0,0001$) e para interação entre os fatores ($p_valor < 0,0001$), sendo a maior média observada no leite contaminado no tempo final de incubação. Para o leite, sem contaminação *Bacillus cereus s.s.* e proveniente de vacas com genótipo A2A2, a menor média do teor de ácido siálico foi de 5,78 mg/mL no tempo 6 e a maior média do teor de ácido siálico foi de 7,55 no tempo 5. Para o leite com contaminação *Bacillus cereus s.s.* a menor média do teor de ácido siálico foi de 6,03 mg/mL no tempo de incubação 1 e a maior média do teor de ácido siálico foi de 29,79 mg/mL no tempo de incubação 6, como pode ser observado na tabela 4.

Tabela 4. Efeito dos tratamentos, sem contaminação com *Bacillus cereus s.s.* e com contaminação com *Bacillus cereus s.s.*, nas amostras de leite proveniente de vacas com genótipo A2A2 da β -CN, e nos diferentes tempos de incubação (1, 2, 3, 4, 5 e 6) sobre o teor de Glicomacropéptido (GMP em mg de ácido siálico/mL de leite).

Tratamento	Tempo	mg de Ác. Siálico / mL	EPM	P_valor		
				Trat.	Tempo	Trat*Tempo
SBC ¹	1	5,79a	0,3741	<0,0001	<0,0001	<0,0001
	2	6,27b				
	3	6,20b				
	4	6,60b				
	5	7,55a				
	6	5,78b				
CBC ²	1	6,03a	0,3741	<0,0001	<0,0001	<0,0001
	2	7,64a				
	3	7,62a				
	4	9,56a				
	5	7,77a				
	6	29,79a				

¹ Leite controle – sem contaminação com *B cereus s.s.*; ² Leite contaminado com *B cereus s.s.*; ³ 0 horas de incubação; ⁴ 1:30 horas de incubação; ⁵ 3 horas de incubação; ⁶ 4:30 horas de incubação; ⁷ 6 horas de incubação; ⁸ 12 horas de incubação; ⁹ Diferentes tratamentos (sem contaminação e contaminado); ¹⁰ Diferentes tempos de incubação (1, 2, 3, 4, 5 e 6); ¹¹ Interação entre os diferentes tratamentos e os diferentes tempos. Letras iguais correspondem às médias que não diferem estatisticamente entre si, ao nível de significância de 5% ($p > 0,05$). Letras diferentes correspondem às médias que diferem estatisticamente entre si, ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Letras minúsculas correspondem à comparação das médias dentro da mesma variável tratamento. Letras maiúsculas correspondem a comparação das médias dentro da mesma variável tempo. EPM – erro padrão da média.

Na tabela 5, estão apresentados os resultados do efeito dos três diferentes genótipos (A1A1, A1A2, A2A2) e dos tratamentos, sem contaminação com *Bacillus cereus s.s.* e com contaminação com *Bacillus cereus s.s.*, sobre o teor de Glicomacropéptideo (GMP em mg de ácido siálico/mL de leite) nas amostras de leite. Para o tempo 1 (0 horas) de incubação, foi observado apenas efeito de genótipo ($p_{\text{valor}} 0,0001$), porém não foi observado efeito de tratamento ($p_{\text{valor}} 0,2103$) e nem a interação entre os fatores ($p_{\text{valor}} 0,9359$), em que as maiores médias estatisticamente significativas para o teor de GMP foram nas amostras de leite proveniente de vacas com genótipo A1A2, seguida do genótipo A2A2 e do genótipo A1A1.

Para o tempo 2 (1:30 horas) de incubação, foi observado efeito de genótipo ($p_{\text{valor}} 0,0004$) e efeito de tratamento ($p_{\text{valor}} 0,025$), porém não foi observado a interação entre os fatores ($p_{\text{valor}} 0,6124$), em que as maiores médias estatisticamente significativas para o efeito genótipo sobre o teor de GMP foram nas amostras de leite proveniente de vacas com genótipo A1A2, seguida do genótipo A2A2 e do genótipo A1A1 e para o efeito tratamento foram observadas maiores médias significativas para as amostras dos tratamentos CBC e menores para os tratamentos SBC nos três diferentes genótipos.

Para o tempo 3 (3 horas) de incubação, foi observado efeito de genótipo ($p_{\text{valor}} 0,0002$) e efeito de tratamento ($p_{\text{valor}} 0,0014$), porém não foi observado a interação entre os fatores ($p_{\text{valor}} 0,077$), em que as maiores médias significativas para o efeito genótipo sobre o teor de GMP foram nas amostras de leite proveniente de vacas com genótipo A1A2, seguida do genótipo A2A2 e do genótipo A1A1 e para o efeito tratamento foram observadas maiores médias significativas para as amostras dos tratamentos CBC e menores para os tratamentos SBC nos três diferentes genótipos.

Para o tempo 4 (4:30 horas) de incubação, foi observado efeito de genótipo ($p_{\text{valor}} < 0,0001$), efeito de tratamento ($p_{\text{valor}} 0,0042$) e para interação entre os fatores ($p 0,0241$), em que as maiores médias significativas do teor de GMP foram nas amostras de leite proveniente de vacas com genótipo A1A2, 9,14 mg/mL (SBC) e 9,61

mg/mL (CBC), com genótipo A2A2 com média de 9,56 mg/mL (CBC) e as menores médias significativas do genótipo A1A1 com médias de 4,87 mg/mL (SBC) e 5,45 mg/mL (CBC) e para genótipo A2A2 6,60 mg/mL (SBC).

Para o tempo 5 (6 horas) de incubação, foi observado efeito de genótipo ($p_{\text{valor}} < 0,0001$) e efeito de tratamento ($p_{\text{valor}} 0,0047$), porém não foi observado a interação entre os fatores ($p_{\text{valor}} 0,1515$), em que as maiores médias significativas para o efeito genótipo sobre o teor de GMP foram nas amostras de leite proveniente de vacas com genótipo A1A2, seguida do genótipo A2A2 e do genótipo A1A1 e para o efeito tratamento foram observadas maiores médias significativas para as amostras dos tratamentos CBC e menores para os tratamentos SBC nos três diferentes genótipos.

Para o tempo 6 (12 horas) de incubação, foi observado efeito de genótipo ($p_{\text{valor}} < 0,0001$), efeito de tratamento ($p_{\text{valor}} < 0,0001$) e para interação entre os fatores ($p_{\text{valor}} < 0,0001$), em que as maiores médias significativas do teor de GMP foram nas amostras de leite proveniente de vacas com genótipo A1A2, 8,80 mg/mL (SBC) e 28,03 mg/mL (CBC), com genótipo A2A2 com média de 29,79 mg/mL (CBC) e as menores médias significativas do genótipo A1A1 com médias de 5,86 mg/mL (SBC) e 7,73 mg/mL (CBC) e para genótipo A2A2 5,78 mg/mL (SBC).

Tabela 5. Efeito dos três diferentes genótipos (A1A1, A1A2, A2A2) e dos tratamentos, sem contaminação com *Bacillus cereus s.s.* e com contaminação com *Bacillus cereus s.s.*, sobre o teor de Glicomacropéptido (GMP em mg de ácido siálico/mL de leite) nas amostras de leite.

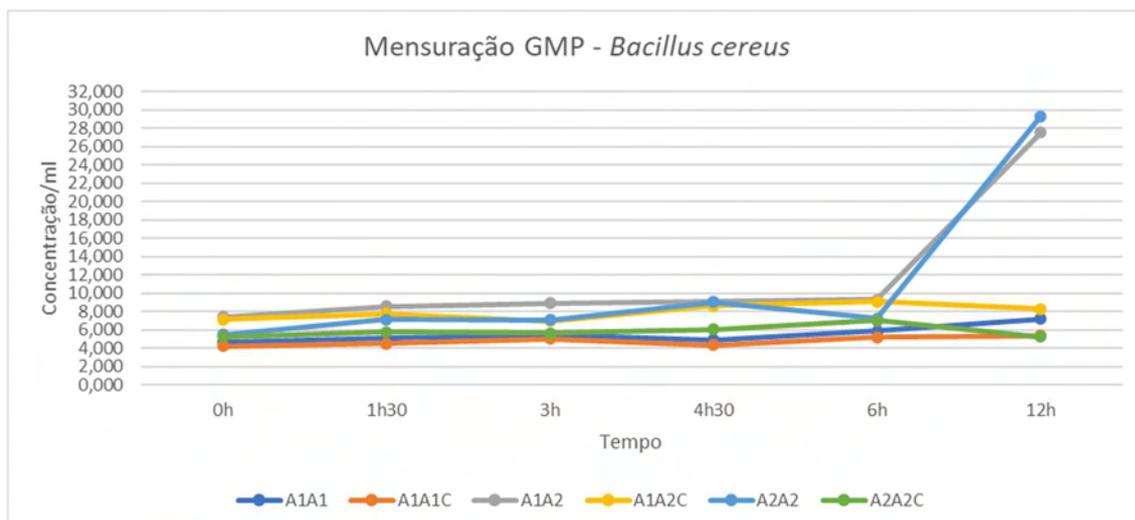
Tempo	Genótipo	Tratamento	mg de Ác. Siálico / mL	EPM	P_valor		
					Genot. ⁹	Trat. ¹⁰	Genot*Trat ¹¹
1 ¹	A1A1	SBC ⁷	4,75c	0,2761	0,0001	0,2103	0,9359
		CBC ⁸	5,18c				
	A1A2	SBC ⁷	7,65a				
		CBC ⁸	7,94 ^a				
	A2A2	SBC ⁷	5,79b				
		CBC ⁸	6,03b				
2 ²	A1A1	SBC ⁷	5,01cB	0,3822	0,0004	0,025	0,6124
		CBC ⁸	5,61cA				
	A1A2	SBC ⁷	8,26aB				
		CBC ⁸	9,08aA				
	A2A2	SBC ⁷	6,27bB				
		CBC ⁸	7,64bA				

3 ³	A1A1	SBC ⁷	5,52cB	0,2742	0,0002	0,0014	0,077
		CBC ⁸	5,92cA				
	A1A2	SBC ⁷	7,48aB				
		CBC ⁸	9,42aA				
	A2A2	SBC ⁷	6,20bB				
		CBC ⁸	7,62bA				
4 ⁴	A1A1	SBC ⁷	4,87b	0,366	<0,0001	0,0042	0,0241
		CBC ⁸	5,45b				
	A1A2	SBC ⁷	9,14a				
		CBC ⁸	9,61a				
	A2A2	SBC ⁷	6,60b				
		CBC ⁸	9,56a				
5 ⁵	A1A1	SBC ⁷	5,71cB	0,1067	<0,0001	0,0047	0,1515
		CBC ⁸	6,38cA				
	A1A2	SBC ⁷	9,58aB				
		CBC ⁸	9,84aA				
	A2A2	SBC ⁷	7,55bB				
		CBC ⁸	7,77bA				
6 ⁶	A1A1	SBC ⁷	5,86a	0,6802	<0,0001	<0,0001	<0,0001
		CBC ⁸	7,73a				
	A1A2	SBC ⁷	8,8b				
		CBC ⁸	28,03a				
	A2A2	SBC ⁷	5,78b				
		CBC ⁸	29,79a				

¹ 0 horas de incubação; ² 1:30 horas de incubação; ³ 3 horas de incubação; ⁴ 4:30 horas de incubação; ⁵ 6 horas de incubação; ⁶ 12 horas de incubação; ⁷ Leite controle – sem contaminação com *B cereus s.s.*; ⁸ Leite contaminado com *B cereus s.s.*; ⁹ Diferentes genótipos (A1A1, A1A2, A2A2); ¹⁰ Diferentes tratamentos (Leite controle – sem contaminação com *B cereus s.s.*; Leite contaminado com *B cereus s.s.*); ¹¹ Interação entre os diferentes genótipos e os diferentes tratamentos. Letras iguais correspondem às médias que não diferem estatisticamente entre si, ao nível de significância de 5% ($p > 0,05$). Letras diferentes correspondem às médias que diferem estatisticamente entre si, ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Letras minúsculas correspondem à comparação das médias para variável genótipo. Letras maiúsculas correspondem à comparação das médias para variável tratamento. EPM – erro padrão da média.

Na figura 2, pode-se observar um gráfico de comparação entre a concentração de GMP/mL para cada amostra de leite proveniente de vacas com genótipos A1A1, A1A2 e A2A2 para β -caseína em relação ao tempo de incubação, seja com contaminação experimental com *Bacillus cereus s.s.* ou não contaminado.

Figura 2. Comparação entre a concentração de GMP/mL para cada genótipo e tratamento em relação ao tempo para contaminação experimental de *Bacillus cereus* s.s. e seu controle.



Onde: O eixo X representa os tempos de incubação, sendo o tempo 1 (0h), tempo 2 (1h30), tempo 3 (3h), tempo 4 (4h30), tempo 5 (6h), tempo 6 (12h) e o eixo Y representa o nível de concentração de GMP/mL. As amostras contaminadas experimentalmente com *Bacillus cereus* s.s. são A1A1, A1A2 e A2A2 e as amostras sem contaminação são A1A1C, A1A2 C e A2A2C, sendo que “C” representa “controle”.

É possível observar que houve um aumento da concentração nos tempos finais de incubação, com um grande aumento dos níveis para os genótipos A1A2 e A2A2 com contaminação experimental.

4.2.2 *Pseudomonas fluorescens*

Na tabela 6, estão apresentados os resultados do efeito dos tratamentos, sem contaminação com *Pseudomonas fluorescens* e com contaminação com *Pseudomonas fluorescens*, nas amostras de leite proveniente de vacas com genótipo A1A1 da β -CN, e nos diferentes tempos de incubação (1, 2, 3, 4, 5 e 6) sobre o teor de Glicomacropéptido (GMP em mg de ácido siálico/mL de leite), em que é possível observar efeito estatisticamente significativo para tratamento (p_valor 0,0178), tempo de incubação (p_valor 0,0017) e para interação entre os fatores (p_valor 0,0309), sendo as maiores médias observadas no leite contaminado. Para o leite, sem contaminação com *Pseudomonas fluorescens* e proveniente de vacas com genótipo A1A1, a menor média do teor de ácido siálico foi de 4,51 mg/mL no tempo de incubação 5 e, a maior média do teor de ácido siálico foi de 8,13 mg/mL no tempo de incubação 1. Para o leite com contaminação com *Pseudomonas fluorescens* a menor média do teor de ácido

siálico foi de 5,44 mg/mL no tempo de incubação 2 e a maior média do teor de ácido siálico foi de 6,85 mg/mL no tempo de incubação 6, como pode ser observado na tabela 6.

Tabela 6. Efeito dos tratamentos, sem contaminação com *Pseudomonas fluorescens* e com contaminação com *Pseudomonas fluorescens*, nas amostras de leite proveniente de vacas com genótipo A1A1 da β -CN, e nos diferentes tempos de incubação (1, 2, 3, 4, 5 e 6) sobre o teor de Glicomacropéptido (GMP em mg de ácido siálico/mL de leite).

Tratamento	Tempo	mg de Ác. Siálico / mL	EPM	P valor		
				Trat. ⁹	Tempo ¹⁰	Trat*Tempo ¹¹
SPF ¹	1 ³	8,13 a	0,4359	0,0178	0,0017	0,0309
	2 ⁴	5,29a				
	3 ⁵	4,63b				
	4 ⁶	6,02a				
	5 ⁷	4,51b				
	6 ⁸	4,85b				
CPF ²	1 ³	6,67a	0,4359	0,0178	0,0017	0,0309
	2 ⁴	5,44a				
	3 ⁵	5,98a				
	4 ⁶	6,23a				
	5 ⁷	6,11a				
	6 ⁸	6,85a				

¹ Leite controle – sem contaminação com *Pseudomonas fluorescens*; ² Leite contaminado com *Pseudomonas fluorescens*; ³ 0 horas de incubação; ⁴ 1:30 horas de incubação; ⁵ 3 horas de incubação; ⁶ 4:30 horas de incubação; ⁷ 6 horas de incubação; ⁸ 12 horas de incubação; ⁹ Diferentes tratamentos (sem contaminação e contaminado); ¹⁰ Diferentes tempos de incubação (1, 2, 3, 4, 5 e 6); ¹¹ Interação entre os diferentes tratamentos e os diferentes tempos. Letras diferentes correspondem às médias que diferem estatisticamente entre si, ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Letras minúsculas correspondem às médias do efeito de interação entre os fatores.

EPM – erro padrão da média.

Na tabela 7, estão apresentados os resultados do efeito dos tratamentos, sem contaminação com *Pseudomonas fluorescens* e com contaminação com *Pseudomonas fluorescens*, nas amostras de leite proveniente de vacas com genótipo A1A2 da β -CN, e nos diferentes tempos de incubação (1, 2, 3, 4, 5 e 6) sobre o teor de Glicomacropéptido (GMP em mg de ácido siálico/mL de leite), em que é possível observar efeito estatisticamente significativo para tratamento ($p_valor < 0,0001$), tempo de incubação ($p_valor < 0,0001$) e para interação entre os fatores ($p_valor 0,0209$), sendo a maior média observada no leite contaminado no tempo 3 de incubação. Para o leite, sem contaminação *Pseudomonas fluorescens* e proveniente de vacas com genótipo A1A2, a menor média do teor de ácido siálico foi de 7,67 mg/mL no tempo 1 e a maior média do teor de ácido siálico foi de 9,74 no tempo 4. Para o leite com contaminação *Pseudomonas fluorescens* a menor média do teor de ácido siálico foi de 7,89 mg/mL no

tempo de incubação 1 e a maior média do teor de ácido siálico foi de 10,46 mg/mL no tempo de incubação 3, como pode ser observado na tabela 7.

Tabela 7. Efeito dos tratamentos, sem contaminação com *Pseudomonas fluorescens* e com contaminação com *Pseudomonas fluorescens*, nas amostras de leite proveniente de vacas com genótipo A1A2 da β -CN, e nos diferentes tempos de incubação (1, 2, 3, 4, 5 e 6) sobre o teor de Glicomacropéptido (GMP em mg de ácido siálico/mL de leite).

Tratamento	Tempo	mg de Ác. Siálico / mL	EPM	P valor		
				Trat. ⁹	Tempo ¹⁰	Trat*Tempo ¹¹
SPF ¹	1 ³	7,67a	0,2174	<0,0001	<0,0001	0,0209
	2 ⁴	7,87b				
	3 ⁵	9,10b				
	4 ⁶	9,74a				
	5 ⁷	8,51a				
	6 ⁸	9,70a				
CPF ²	1 ³	7,89a	0,2174	<0,0001	<0,0001	0,0209
	2 ⁴	9,42a				
	3 ⁵	10,46a				
	4 ⁶	9,76a				
	5 ⁷	9,18a				
	6 ⁸	10,29a				

¹ Leite controle – sem contaminação com *Pseudomonas fluorescens*; ² Leite contaminado com *Pseudomonas fluorescens*; ³ 0 horas de incubação; ⁴ 1:30 horas de incubação; ⁵ 3 horas de incubação; ⁶ 4:30 horas de incubação; ⁷ 6 horas de incubação; ⁸ 12 horas de incubação; ⁹ Diferentes tratamentos (sem contaminação e contaminado); ¹⁰ Diferentes tempos de incubação (1, 2, 3, 4, 5 e 6); ¹¹ Interação entre os diferentes tratamentos e os diferentes tempos. Letras iguais correspondem às médias que não diferem estatisticamente entre si, ao nível de significância de 5% ($p > 0,05$). Letras minúsculas correspondem às médias do efeito de interação entre os fatores.

EPM – erro padrão da média.

Na tabela 8, estão apresentados os resultados do efeito dos tratamentos, sem contaminação com *Pseudomonas fluorescens* e com contaminação com *Pseudomonas fluorescens*, nas amostras de leite proveniente de vacas com genótipo A2A2 da β -CN, e nos diferentes tempos de incubação (1, 2, 3, 4, 5 e 6) sobre o teor de Glicomacropéptido (GMP em mg de ácido siálico/mL de leite), em que é possível observar efeito estatisticamente significativo para tratamento ($p_valor < 0,0001$), tempo de incubação ($p_valor < 0,0001$) e para interação entre os fatores ($p_valor < 0,0001$), sendo a maior média observada no leite contaminado no tempo 4 de incubação. Para o leite, sem contaminação *Pseudomonas fluorescens* e proveniente de vacas com genótipo A2A2, a menor média do teor de ácido siálico foi de 2,44 mg/mL no tempo 1 e a maior média do teor de ácido siálico foi de 7,50 no tempo 4. Para o leite com contaminação *Pseudomonas fluorescens* a menor média do teor de ácido siálico foi de 6,46 mg/mL no tempo de incubação 1 e a maior média do teor de ácido siálico foi de 8,33 mg/mL no tempo de incubação 4, como pode ser observado na tabela 8.

Tabela 8. Efeito dos tratamentos, sem contaminação com *Pseudomonas fluorescens* e com contaminação com *Pseudomonas fluorescens*, nas amostras de leite proveniente de vacas com genótipo A2A2 da β -CN, e nos diferentes tempos de incubação (1, 2, 3, 4, 5 e 6) sobre o teor de Glicomacropéptido (GMP em mg de ácido siálico/mL de leite).

Tratamento	Tempo	mg de Ác. Siálico / mL	EPM	P_valor		
				Trat. ⁹	Tempo ¹⁰	Trat*Tempo ¹¹
SPF ¹	1 ³	2,44b	0,1710	<0,0001	<0,0001	<0,0001
	2 ⁴	6,51a				
	3 ⁵	7,11a				
	4 ⁶	7,50b				
	5 ⁷	6,57a				
	6 ⁸	6,98a				
CPF ²	1 ³	6,46a	0,1710	<0,0001	<0,0001	<0,0001
	2 ⁴	6,61a				
	3 ⁵	7,48a				
	4 ⁶	8,33a				
	5 ⁷	6,70a				
	6 ⁸	7,19a				

¹ Leite controle – sem contaminação com *Pseudomonas fluorescens*; ² Leite contaminado com *Pseudomonas fluorescens*; ³ 0 horas de incubação; ⁴ 1:30 horas de incubação; ⁵ 3 horas de incubação; ⁶ 4:30 horas de incubação; ⁷ 6 horas de incubação; ⁸ 12 horas de incubação; ⁹ Diferentes tratamentos (sem contaminação e contaminado); ¹⁰ Diferentes tempos de incubação (1, 2, 3, 4, 5 e 6); ¹¹ Interação entre os diferentes tratamentos e os diferentes tempos. Letras iguais correspondem às médias que não diferem estatisticamente entre si, ao nível de significância de 5% ($p > 0,05$). Letras minúsculas correspondem às médias do efeito de interação entre os fatores.

EPM – erro padrão da média.

Na tabela 9, estão apresentados os resultados do efeito dos três diferentes genótipos (A1A1, A1A2, A2A2) e dos tratamentos, sem contaminação com *Pseudomonas fluorescens* e com contaminação com *Pseudomonas fluorescens*, sobre o teor de Glicomacropéptido (GMP em mg de ácido siálico/mL de leite) nas amostras de leite. Para o tempo 1 (0 horas) de incubação, foi observado efeito de genótipo (p _valor 0,0004), efeito de tratamento (p _valor 0,0273) e na interação entre os fatores (p _valor 0,00025), em que na amostra de leite proveniente de vacas com genótipo A2A2 ocorreu o único efeito estatisticamente significativo, com diferença entre os tratamentos, onde observa-se maior média para CPF e menor média SPF.

Para o tempo 2 (1:30 horas) de incubação, foi observado efeito de genótipo (p _valor < 0,0001), efeito de tratamento (p _valor 0,0387) e efeito de interação entre os fatores (p _valor 0,0640), em que as maiores médias significativas do teor de GMP foram nas amostras de leite proveniente de vacas com genótipo A1A2, seguido pelo genótipo A2A2, e enfim as menores médias significativas do genótipo A1A1 e, para o efeito tratamento foram observadas maiores médias significativas para as amostras dos tratamentos CPF e menores para os tratamentos SPF nos três diferentes genótipos.

Para o tempo 3 (3 horas) de incubação, foi observado efeito de genótipo ($p_{\text{valor}} < 0,0001$) e efeito de tratamento ($p_{\text{valor}} 0,0387$), porém não foi observado a interação entre os fatores ($p_{\text{valor}} 0,4349$), em que as maiores médias estatisticamente significativas para o efeito genótipo sobre o teor de GMP foram nas amostras de leite proveniente de vacas com genótipo A1A2, seguida do genótipo A2A2 e do genótipo A1A1 e para o efeito tratamento foram observadas maiores médias significativas para as amostras dos tratamentos CPF e menores para os tratamentos SPF nos três diferentes genótipos.

Para o tempo 4 (4:30 horas) de incubação, foi observado efeito de genótipo ($p_{\text{valor}} < 0,0001$) e efeito de tratamento ($p_{\text{valor}} 0,0345$), porém não foi observado a interação entre os fatores ($p_{\text{valor}} 0,0706$), em que as maiores médias estatisticamente significativas para o efeito genótipo sobre o teor de GMP foram nas amostras de leite proveniente de vacas com genótipo A1A2, seguida do genótipo A2A2 e do genótipo A1A1 e para o efeito tratamento foram observadas maiores médias significativas para as amostras dos tratamentos CPF e menores para os tratamentos SPF nos três diferentes genótipos.

Para o tempo 5 (6 horas) de incubação, foi observado efeito de genótipo ($p_{\text{valor}} < 0,0001$), efeito de tratamento ($p_{\text{valor}} 0,0020$), e para interação entre os fatores ($p_{\text{valor}} 0,0061$), em que as maiores médias significativas do teor de GMP foram nas amostras de leite proveniente de vacas com genótipo A1A2, 9,18 mg/mL (CPF), com genótipo A1A1 com média de 6,11 mg/mL (CPF) e com genótipo A2A2 com média de 6,70 mg/mL (SPF) e 6,57 mg/mL (CPF) e as menores médias significativas do genótipo A1A1 com média de 4,51 mg/mL (SPF) e para genótipo A1A2 com média de 8,51 mg/mL (SBC).

Para o tempo 6 (12 horas) de incubação, foi observado efeito de genótipo ($p_{\text{valor}} < 0,0001$), efeito de tratamento ($p_{\text{valor}} 0,0016$) e para interação entre os fatores ($p_{\text{valor}} 0,0122$), em que a maior média estatisticamente significativa do teor de GMP foi na amostra de leite proveniente de vacas com genótipo A1A1 para o tratamento CPF, com média de 6,85, enquanto para o genótipo A1A1 para amostra de SPF observou-se a menor média estatisticamente significativa, com média de 4,85.

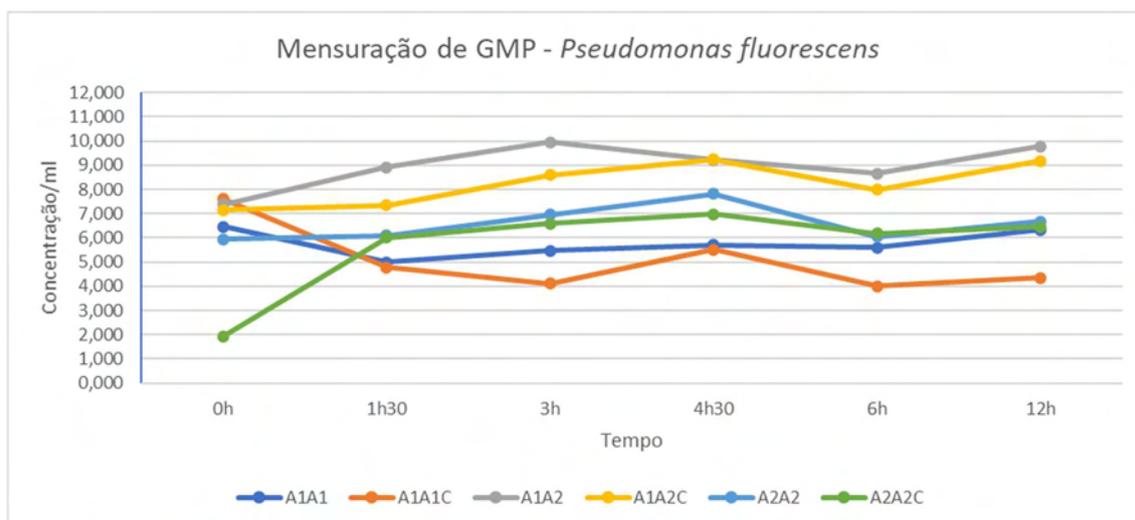
Tabela 9. Efeito dos três diferentes genótipos (A1A1, A1A2, A2A2) e dos tratamentos, sem contaminação com *Pseudomonas fluorescens* e com contaminação com *Pseudomonas fluorescens*, sobre o teor de Glicomacropeptídeo (GMP em mg de ácido siálico/mL de leite) nas amostras de leite.

Tempo	genótipos	Tratamento	mg de Ác. Siálico / mL	EPM	P_valor		
					Genot. ⁹	Trat. ¹⁰	Genot*Trat ¹¹
1 ¹	A1A1	SPF ⁷	8,13a	0,04349	0,0004	0,0273	0,0025
		CPF ⁸	6,97a				
	A1A2	SPF ⁷	7,67a				
		CPF ⁸	7,89a				
	A2A2	SPF ⁷	2,44b				
		CPF ⁸	6,46a				
2 ²	A1A1	SPF ⁷	5,29cB	0,0276	<0,0001	0,0387	0,0640
		CPF ⁸	5,44cA				
	A1A2	SPF ⁷	7,87aB				
		CPF ⁸	9,42aA				
	A2A2	SPF ⁷	6,51bB				
		CPF ⁸	6,61bA				
3 ³	A1A1	SPF ⁷	4,63cB	0,4141	<0,0001	0,0230	0,4349
		CPF ⁸	5,98cA				
	A1A2	SPF ⁷	9,10aB				
		CPF ⁸	10,46aA				
	A2A2	SPF ⁷	7,11bB				
		CPF ⁸	7,48bA				
4 ⁴	A1A1	SPF ⁷	6,02cB	0,1520	<0,0001	0,0345	0,0706
		CPF ⁸	6,23cA				
	A1A2	SPF ⁷	9,76aB				
		CPF ⁸	9,74aA				
	A2A2	SPF ⁷	7,50bB				
		CPF ⁸	8,33bA				
5 ⁵	A1A1	SPF ⁷	4,51b	0,1667	<0,0001	0,0020	0,0061
		CPF ⁸	6,11a				
	A1A2	SPF ⁷	8,51b				
		CPF ⁸	9,18 ^a				
	A2A2	SPF ⁷	6,70 ^a				
		CPF ⁸	6,57 ^a				
6 ⁶	A1A1	SPF ⁷	4,85b	0,2106	<0,0001	0,0016	0,0122
		CPF ⁸	6,85a				
	A1A2	SPF ⁷	9,70a				
		CPF ⁸	10,29a				
	A2A2	SPF ⁷	6,98a				
		CPF ⁸	7,19a				

¹ 0 horas de incubação; ² 1:30 horas de incubação; ³ 3 horas de incubação; ⁴ 4:30 horas de incubação; ⁵ 6 horas de incubação; ⁶ 12 horas de incubação; ⁷ Leite controle – sem contaminação com *Pseudomonas fluorescens*; ⁸ Leite contaminado com *Pseudomonas fluorescens*; ⁹ Diferentes genótipos (A1A1, A1A2, A2A2); ¹⁰ Diferentes tratamentos (Leite controle – sem contaminação com *B cereus s.s.*; Leite contaminado com *B cereus s.s.*); ¹¹ Interação entre os diferentes genótipos e os diferentes tratamentos. Letras iguais correspondem às médias que não diferem estatisticamente entre si, ao nível de significância de 5% ($p > 0,05$). Letras diferentes correspondem às médias que diferem estatisticamente entre si, ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Letras minúsculas correspondem a comparação das médias para variável genótipo. Letras maiúsculas correspondem a comparação das médias para variável tratamento. EPM – erro padrão da média.

Na figura 3, pode-se observar um gráfico de comparação entre a concentração de GMP/mL para cada amostra de leite proveniente de vacas com genótipos A1A1, A1A2 e A2A2 para β -caseína em relação ao tempo de incubação, seja com contaminação experimental com *Pseudomonas fluorescens* ou não contaminado.

Figura 3. Comparação entre a concentração de GMP/mL para cada genótipo e tratamento em relação ao tempo para contaminação experimental de *Pseudomonas fluorescens* e seu controle.



Onde: O eixo X representa os tempos de incubação, sendo o tempo 1 (0h), tempo 2 (1h30), tempo 3 (3h), tempo 4 (4h30), tempo 5 (6h), tempo 6 (12h) e o eixo Y representa o nível de concentração de GMP/mL. As amostras contaminadas experimentalmente com *Pseudomonas fluorescens* são A1A1, A1A2 e A2A2 e as amostras sem contaminação são A1A1C, A1A2 C e A2A2C, sendo que “C” representa “controle”.

É possível observar que houve um aumento da concentração nos tempos finais de incubação, com oscilações entre os genótipos e amostras com ou sem contaminação.

5. Discussão

De acordo com a análise estatística, foi possível observar que independente do genótipo ou microrganismo analisado durante o experimento, houve um aumento do teor de GMP nas amostras de leite ao longo do período de incubação para os três genótipos. Ou seja, ocorre a degradação da κ -CN, liberando glicomacropéptido, que pode ser mensurado através do método da Ninidrina ácida, possibilitando inferir qual é o nível de degradação do leite, seja por proteases microbianas ou não, em relação ao tempo de incubação. Essa constatação foi observada também por Bürger et al. (2015), ao analisar vida de prateleira leite e bebida láctea UAT.

Analisando a variável tempo, houve um aumento do teor de GMP desde o tempo de 0h até o tempo de 12h. Ou seja, a incubação, seja ela em temperatura de 25°C (*Pseudomonas fluorescens* / sem contaminação) ou 35°C (*Bacillus cereus s.s.* / sem contaminação) permitiu que ao longo do tempo, proteases agissem sobre as caseínas do leite, degradando a κ -CN. Tais proteases podem ser endógenas ou então podem ser

provenientes de microrganismos, que resistiram ao tratamento térmico aplicado ao leite cru e em um momento posterior, agiram sobre a caseína. Esse fenômeno foi verificado por Yang et al. (2021), que demonstraram que proteases microbianas foram capazes de manter a estabilidade após tratamento térmico e inclusive, foram capazes de hidrolisar a caseína em suas diferentes porções, com maior degradação da κ -CN.

Analisando as amostras de leite nos tratamentos com e sem contaminação experimental com *Bacillus cereus s.s.*, pode-se verificar que para o leite proveniente de vacas com genótipo A1A1, não houve interação entre tratamento e tempo, porém houve efeito entre os tratamentos e entre os tempos, ou seja, os teores de GMP foram maiores para as amostras de leite contaminadas experimentalmente, assim como foram maiores nos últimos tempos, demonstrando que houve maior degradação de caseína nas amostras de leite contaminado e nos maiores tempos. Isso foi descrito por Prata e Prata (2012), uma vez que trata-se de um microrganismo que utiliza como via metabólica a degradação da caseína por metalloproteínases e desse modo, é possível que, em temperatura ótima de multiplicação, essa degradação aumente com o tempo. Esse fenômeno também foi observado em Vidal-Martins et al. (2005), já que houve aumento da proteólise mesmo após tratamento térmico, mostrando que as proteases microbianas resistiram e atuaram em outras condições, assim como ocorreu em no trabalho realizado por Aguilar (2018), com níveis de degradação da κ -CN representados pela quantificação de GMP.

Para as amostras de leite proveniente de vacas com genótipo A1A2, houve efeito de interação entre tratamento e tempo. Nos tempos de 3h e 6h, há efeito significativo da interação, sendo que as amostras de leite contaminadas experimentalmente apresentaram taxas significativas de aumento de teor de GMP nos tempos de 3h e 12h. Ainda assim, nos demais tempos, independentemente da interação, foi possível observar aumento dos teores de GMP tanto para amostras de leite contaminadas quanto para amostras de leite sem contaminação. O aumento da concentração de GMP em relação ao tempo ocorreu também em um estudo feito por Vidal-Martins et al. (2005), demonstrando que a proteólise ocorre mesmo após tratamento térmico, ou seja, não necessariamente há presença de microrganismo, mas uma vez que o leite cru apresentou contaminação por microrganismos proteolíticos, as proteases resistem ao tratamento térmico e continuam agindo durante a vida de prateleira do produto, seja em temperatura ambiente após um maior tempo de ação ou após incubação em maiores temperaturas, em um menor tempo.

Foi possível observar que também houve efeito de interação entre tratamento e tempo para as amostras de leite proveniente de vacas com genótipo A2A2, sendo que nos tempos de 1h30, 3h, 4h30 e 12h, houve um aumento significativo dos teores de GMP em comparação entre as amostras de leite contaminadas experimentalmente e as amostras de leite sem contaminação.

Desse modo, quando observou-se a interação entre os genótipos e tratamento em relação ao tempo, é possível inferir que há um padrão em relação ao aumento do teor de GMP e o tempo. Analisando individualmente, no tempo de 0h, não houve efeito significativo de interação entre genótipo e tratamento, apenas efeito significativo de genótipo. O leite proveniente de vacas heterozigotas (A1A2) apresentou as maiores médias de GMP, seguido do A2A2 e por último, o A1A1 apresentou as menores médias, sugerindo então que houve menor degradação nesse genótipo, sendo as amostras de leite contaminadas experimentalmente ou não. Fato que pode ser explicado por Daniloski (2021), uma vez que a característica estrutural é baseada na variante genética de β -CN em diferentes formações estruturais na micela de caseína, sendo que em suas análises foi possível inferir que para amostras de leite, a variante A1A1 β -CN separa-se claramente da variante A2A2 β -CN, enquanto a variante A1A2 β -CN mostrou similaridade com a variante A2A2 β -CN indicando que o alelo A2 β -CN domina na organização estrutural da proteína.

No tempo de 1h30, houve efeito de genótipo e de tratamento, sendo que as amostras de leite proveniente de vacas heterozigotas também apresentaram os maiores teores de GMP, seguido do homozigoto A2A2 e, enfim, o A1A1. Para tratamento, as médias de GMP dos grupos contaminados experimentalmente foram maiores do que as amostras sem contaminação para todos os genótipos. Desse modo, é possível levantar a hipótese de que o leite proveniente de vacas com genótipo A2A2 sofreu uma maior degradação da κ -CN por conta da ação de proteases microbianas sintetizadas pelo *Bacillus cereus* s.s. em relação aos outros genótipos. Essa observação pode ser constatada também para o tempo de 3h.

Para o tempo de 4h30, houve efeito de interação entre genótipo e tratamento, onde foi possível observar que as amostras de leite proveniente de vacas heterozigotas apresentaram as maiores médias de GMP tanto com contaminação quanto sem contaminação, seguido do homozigoto A2A2 com uma maior média para o contaminado experimentalmente e por fim, o A1A1, que apresentou as menores médias tanto para contaminado quanto para o sem contaminação.

No tempo de 6h não houve efeito de interação, assim como nos tempos de 1h30 e 3h. Já no tempo de 12h, houve efeito de interação. Foram observadas menores médias nas amostras de leite proveniente de vacas com genótipo A1A2, sem contaminação, e no A2A2, com diferença entre os tratamentos. Já para as amostras de leite proveniente de vacas com genótipo A1A1 não houve diferença entre os tratamentos.

Analisando as amostras de leite para tratamento com e sem contaminação experimental por *Pseudomonas fluorescens*, pode-se verificar que, referente ao leite proveniente de vacas com genótipo A1A1, houve efeito de interação entre tratamento e tempo. É possível constatar que nos tempos finais, as médias dos teores de GMP foram maiores, reiterando que houve maior degradação de κ -CN, seja por ação de proteases naturais ou por proteases sintetizadas pelo microrganismo.

É esperado que a concentração de GMP seja mais perceptível nos tempos finais, uma vez que a *Pseudomonas fluorescens* é uma bactéria mais seletiva, que necessita de condições ideais (temperatura ideal, maior tempo de adaptação e velocidade de multiplicação mais lenta), assim como Gaspar et al. (2009) verificou que as proteases sintetizadas por *Pseudomonas* spp. têm ação mais lenta em relação às sintetizadas por *Bacillus cereus* s.s., o que pode ser preocupante também para a vida de prateleira do produto, uma vez que no final do período de incubação é que a degradação foi evidente.

Para o leite proveniente de vacas com genótipo A1A2, também houve interação entre tratamento e tempo, com maiores médias de concentração de GMP para as amostras com contaminação experimental nos tempos de 1h30 e de 3h, sendo que nos tempos finais, a diferença de média de GMP não foi significativa, demonstrando que para o leite desse genótipo, mesmo que tenha ação de proteases microbianas, as médias de degradação ficam próximas às médias de uma degradação natural por proteases endógenas, por se tratar de um microrganismo que tem via metabólica lenta, assim como verificado por Stanborough (2018), que levantou a caracterização genômica e metabólica de *Pseudomonas* spp. associadas à deterioração.

Desse mesmo modo, foi possível observar que para o leite proveniente de vacas com genótipo A2A2, também houve efeito de interação para tratamento e tempo, com maiores médias de concentração de GMP para as amostras de leite com contaminação experimental nos tempos de 0h e 4h.

Para a interação entre os genótipos e tratamento (com e sem contaminação por *Pseudomonas fluorescens*) em relação ao tempo, foi possível inferir que, também há um padrão em relação ao aumento do teor de GMP e o tempo, assim como ocorreu para o leite contaminado com *Bacillus cereus* s.s..

Analisando individualmente, para o tempo de 0h houve efeito de interação, apresentando maiores médias de GMP para o leite proveniente de vacas heterozigotas, seja com contaminação experimental ou sem contaminação, seguido pelo leite proveniente de vacas com genótipo A2A2 e por fim, A1A1. Para o tempo de 1h30, também não houve efeito de interação significativa, apenas efeito de genótipo e tratamento. O leite proveniente de vacas heterozigotas apresentou maiores médias de concentração de GMP, seguido pelo A2A2 e, por fim, A1A1 apresentou as menores médias. Isso ocorreu também para os tempos de 3h e 4h30. Para o tempo de 6h e de 12h, houve efeito de interação, com maiores médias no leite proveniente de vacas A1A2, seja com contaminação ou sem contaminação, seguido por A2A2 e A1A1, mostrando que houve menor degradação de caseína para esse último. Esse fato pode ser explicado por Montanhini e Bersot (2013) uma vez que quanto maior o tempo em temperatura de incubação do microrganismo, maior a degradação sofrida pela ação de suas proteases.

É possível verificar que para o leite proveniente de vacas heterozigotas A1A2, ocorreram as maiores médias de GMP, independentemente do tratamento ser com contaminação experimental ou sem contaminação. Em seguida, o leite proveniente de vacas com genótipo A2A2 apresentou as maiores médias, seguido do A1A1.

Portanto, é possível constatar que o leite proveniente de vacas com genótipo A1A1 sofre uma menor degradação da κ -CN em relação à ação das proteases, sejam elas microbianas ou naturais, uma vez que não houve diferença entre os tratamentos. Desse modo, é possível levantar a discussão de que o alelo A2 tem uma maior influência sobre o heterozigoto, pois de acordo com os resultados analisados, os leites provenientes de vacas com genótipos A1A2 e A2A2 apresentaram uma maior concentração de GMP, demonstrando uma maior fragilidade da κ -CN. Esse fato pode estar relacionado com uma menor interação entre os compostos da molécula de caseína, pois segundo Nguyen (2018), a estrutura micelar para o genótipo A2A2 tende a ser mais frágil, por conta de sua composição apresentar maior quantidade de fósforo e menor quantidade de cálcio (DANILOSKI, 2021) sofrendo assim uma maior degradação por proteases.

Ainda em relação à alelo, é possível inferir que o alelo A2 para o gene da β -CN tenha uma maior influência no heterozigoto, por isso os genótipos A1A2 e A2A2 apresentaram uma maior concentração de GMP. Desse modo, pode-se levantar hipóteses sobre genômica e proteômica, podendo haver uma diferença estrutural da

caseína, uma vez que o gene muda para β -CN, porém a ação das proteases normalmente é sobre a κ -CN.

Em relação à ação de proteases microbiana, a degradação por *Pseudomonas fluorescens* mostrou-se mais lenta do que por *Bacillus cereus s.s.*, que demonstrou ser mais intensa e mais rápida, com diferença em todos os tempos. Com essa informação, pode-se levantar hipóteses do porquê nem todo leite chega instável no laticínio, já que a contaminação do leite cru por *Pseudomonas fluorescens* apesar de ser comum, muitas vezes não é perceptível no início da degradação, mesmo que esteja em sua temperatura ideal. Quando o leite é mantido em refrigeração, há o controle da multiplicação desse microrganismo, dificultando inclusive a ação de suas proteases que vão degradar a κ -CN, assim como mostra Miguel (2019), em um estudo do controle de temperatura de refrigeração para *Pseudomonas fluorescens*, demonstrando que menores temperaturas diminuem o potencial proteolítico desse microrganismo. No entanto, existe a possibilidade desse microrganismo produzir enzimas deteriorantes mesmo em temperaturas mais baixas, mesmo que menos do que em maiores temperaturas, assim como afirma Meng et al. (2017).

Para o *Bacillus cereus s.s.*, é esperado que a percepção da degradação seja mais rápida e intensa em relação à *Pseudomonas fluorescens*, acarretando na redução de vida de prateleira e inclusive pode interferir nos processos térmicos e na produção de derivados. Além disso, é um microrganismo que é patogênico e os níveis de degradação de GMP indicam a presença deste microrganismo, alertando o perigo para a saúde pública, assim como indicou Rossi et al. (2018). De Jonghe et al. (2010) verificaram que as enzimas do *Bacillus cereus s.s.* são altamente proteolíticas, reiterando a importância de evitar a contaminação por esse microrganismo devido aos problemas tecnológicos, que suas enzimas termorresistentes podem causar.

É importante ressaltar que a legislação (BRASIL, 2006) preconiza que os níveis de GMP não devem ser maiores do que 75 mg/mL, uma vez que ultrapassando esse limite o leite é considerado impróprio para o consumo humano, devendo ser destinado para alimentação animal ou indústria química. Diante dos resultados obtidos, pode-se considerar que as amostras contaminadas com *Bacillus cereus s.s.* após 12 horas de incubação, para o leite proveniente de vacas com genótipo A1A2 e A2A2 para β -CN, mesmo que apresentem os maiores níveis de GMP/mL em relação às demais amostras, não alcança os níveis previstos em legislação que apontam que essa amostra esteja imprópria para consumo.

Do mesmo modo, partindo do princípio de que o leite que apresenta concentração de ácido siálico maior do que 20 µg/mL sofre alterações sensoriais e nutritivas (DATTA; DEETH, 2003), Vidal-Martins et al. (2005) quantificaram GMP para leite UAT/UHT no tempo de validade (120 dias), encontrando concentrações de 24,7 µg de ácido siálico/mL, valor ainda maior do que encontrado nas concentrações obtidas para tais amostras de leite proveniente de vacas com genótipo A1A2 e A2A2 para β-CN, experimentalmente contaminadas com *Bacillus cereus s.s.* e incubadas por 12 horas.

6. Conclusão

As médias de concentração de glicomacropéptido nas amostras de leite proveniente de vacas com alelos contrastantes para β -caseína foram maiores nos tempos finais de incubação, seja para amostra após contaminação experimental padronizada ou amostra controle, tanto para *Bacillus cereus s.s.* ou *Pseudomonas fluorescens*. Ou seja, foi possível observar que houve degradação da κ -CN ao decorrer do tempo, seja ela por proteases naturais ou microbianas, independentemente do genótipo da β -CN.

Além disso, as amostras de leite proveniente de vacas com genótipo A1A1 para β -CN apresentaram menores teores de GMP em relação aos genótipos A1A2 e A2A2, demonstrando que houve uma menor degradação da κ -CN. Desse modo, é importante ressaltar que o leite proveniente de vacas com genótipo A2A2 para β -CN, que já é um produto de valor agregado por conta de sua condição de digestibilidade facilitada, venha a ser um produto de alta sensibilidade por conta de sua maior probabilidade de degradação pela ação de proteases que podem prejudicar sua composição.

REFERÊNCIAS

- AGUILAR, C. E. G. *Bacillus cereus*: produção de metaloproteínas na cadeia produtiva de lácteos e avaliação da proteólise da kappa-caseína em leite pasteurizado. Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (Medicina Veterinária Preventiva). 2018.
- 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.
- ARCURI, E. F.; BRITO M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; PINTO, S. M.; ÂNGELO, F. F.; SOUZA, G. N. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 3, p. 440- 446, 2006.)
- 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.
- AGLINIÈRE, 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.
- BASIOTIS, P. P; CARLSON, A.; GERRIOR, S. A; JUAN, W. Y.; LINO, M. The healthy eating index, 1999-2000: charting dietary patterns of Americans. **Family Economics and Nutrition Review**, vol. 16, ed. 1, p. 39+, 2004.
- BERSOT, L. S.; BIJL, E.; HOLLAND, J.W.; BOLAND, M. Posttranslational Modifications of Caseins. In *Milk Proteins*; Elsevier, 2020. Daniloski, D.; McCarthy, N.A.; Markoska, T.; Auldist, M.J.; Vasiljevic, T. Conformational and Physicochemical Characteristics of Bovine Skim Milk Obtained from Cows with Different Genetic Variants of β -Casein. **Food Hydrocolloids**. 2021.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos, em conformidade com o anexo desta Instrução Normativa, determinando que sejam utilizados nos Laboratórios

Nacionais Agropecuários. Diário Oficial da União, Brasília DF, 14 dez. 2006a, Seção 1, p.8.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 55, de 30 de setembro de 2020. Altera os Regulamentos Técnicos que fixam a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A referente à IN 76. Diário Oficial da União, Brasília DF, 1 de out.2020, Seção 1, p.9.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 76, de 26 de novembro de 2018. Oficializa os Regulamentos Técnicos que fixam a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A. Diário Oficial da União, Brasília DF, 30 de nov.2018, Seção 1, p.9.

BRASIL, Ministério da Saúde. Guia alimentar para a população brasileira. 2 ed. ISBN 978-85-334-2176-9, Brasília-DF, 2014.

BRASIL, et al. Estrutura e estabilidade das micelas de caseína do leite bovino. **Ciência Animal** 25 (2): 71-80, 2015.

BRAUN, K. V. E.; ERLER, N. S.; JONG, J.C.K.; JADDOE, V. W. V.; HOOVEN, E. H. V. D.; FRANCO, O. H.; VOORTMAN, T. Dietary Intake of Protein in Early Childhood Is Associated with Growth Trajectories between 1 and 9 Years of Age. **The Journal of Nutrition**, v.146, n.11, 2361-2367, 2016.

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

BÜRGER, K. P; ROSSI, G. A. M.; VIDAL, A. M. C.; GRISOLIO, A. P. R.; GONÇALVES, A. C. S. κ -casein proteolysis during the shelf-life of UHT milk and milk beverage. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 22, n. 3-4, p. 220-223, jul./dez. 2015.

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**, 35(1), 41-47. 2005.

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.

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.

- CENDRON, F.; FRANZOI, M.; PENASA, M.; DE MARCHI, M.; CASSANDRO, M. Effects of β - and κ -casein, and β -lactoglobulin single and composite genotypes on milk composition and milk coagulation properties of Italian Holsteins assessed by FT-MIR, **Italian Journal of Animal Science**, 20:1, 2243-2253, 2021.
- COLANTUONO, A; D'INCECCO, P; FORTINA, M.G.; ROSI, V.; RICCI, G.; PELLEGRINO, L. Milk substrates influence proteolytic activity of *Pseudomonas fluorescens* strains, **Food Control**, Volume 111, 2020.
- CHEN, Y.; Qu, S.; HUANG, Z.; REN, Y.; WANG, L.; RANKIN, S.A. Analysis and Comparison of Key Proteins in Maiwa Yak and Bovine Milk Using High-Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry. **Journal of Dairy Science**. 2021.
- CHMIELEWSKI, R.A.N.; FRANK, J.F. Biofilm formation and control in food processing facilities. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. v. 2, p. 22-32, 2003.
- CIESLINSKA, A. et al. 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. et al. Milk from cows of different b-casein genotypes as a source of bcasomorphin-7. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 63, n. 4, p. 426 - 430, 2012.
- CÓRDOVA-DÁVALOS, L.E.; JIMÉNEZ, M.; SALINAS, E. Glycomacropeptide Bioactivity and Health: A Review Highlighting Action Mechanisms and Signaling Pathways. **Nutrients**. 11, 598. 2019.
- DALGLEISH, D. G.; On the structural models of bovine casein micelles—review and possible improvements. **Soft Matter**. Issue 6. 2011.
- DANILOSKI, D.; MCCARTHY, N.A.; MARKOSKA, T.; AULDIST, M.J.; VASILJEVIC, T. Conformational and Physicochemical Characteristics of Bovine Skim Milk Obtained from Cows with Different Genetic Variants of β -Casein. **Food Hydrocolloids**, 2021.
- DATTA, N. ;DEETH, H. C. Diagnosing the cause of proteolysis in UHT milk. **LWT-Food Science and Technology**, 36(2), 173-182. 2003.
- DE JONGHE V., COOREVITS A., DE BLOCK J., VAN COILLIE E., GRIJSPEERDT K., HERMAN L. Toxinogenic and spoilage potential of aerobic spore-formers isolated from raw milk. **Int. Journal of Food Microbiology**. 136 318–32, 2010.

- DE NONI I, CATTANEO S. Occurrence of b-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.
- 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.
- DEMIREL, A. F. e ÇAK, B. Discussions of Effect A1 and A2 Milk Beta-Casein Gene on Health. **Approaches in Poultry, Dairy & Veterinary Sciences**, ISSN: 2576-9162, 2018.
- EHLING-SCHULZ, M.; FRICKER, M.; SCHERER, S. Bacillus cereus, the causative agent of an emetic type of food-borne illness. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 48, p. 479-487, 2004.
- 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.
- ELSHAGHABEE, F. M. F.; ROKANA, N.; GULHANE, R. D.; SHARMA, C.; PANWAR, H. Bacillus as potential probiotics: status, concerns, and future Perspectives. **Frontiers in Microbiology**. v. 8, p. 1490, 2017.
- EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Anuário leite 2019. Sua Excelência: o consumidor. Novos produtos e novas estratégias da cadeia do leite para ganhar competitividade e conquistar os clientes finais. p. 3-15, 2019.
- ERCOLINI, D.; RUSSO, F.; FERROCINO, I.; VILLANI, F. Molecular identification of mesophilic and psychrotrophic bacteria from raw cow's milk. **Food microbiology**, v. 26, n. 2, p. 228-231, 2009.
- FAIRBAIRN, D.; LAW, B. Proteinases of psychrotrophic bacteria: Their production, properties, effects and control. **Journal of Dairy Research**, 53(1), 139-177. 1986.
- FOSSI, B.; TATAH KIHILA AKOACHERE, J. F.; NCHANJI, G. T.; WANJI, S. Occurrence, heat and antibiotic resistance profile of Bacillus cereus isolated from raw cow and processed milk in Mezam Division, Cameroon. **International Journal of Dairy Technology**, v. 70(1), p. 43-51, 2017.
- FOX, P.F. ; BRODKORB, A. The casein micelle: Historical aspects, current concepts and significance, **International Dairy Journal**, Volume 18, Issue 7, 2008, Pages 677-684, ISSN 0958-6946, 2008.
- 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.
- GARCÍA-ROMERO, A.; MAYORGA-LLERENA, E. Correlación de glicomacropéptido de lacto suero dulce con proteasas de bacterias psicrótrofas e identificación de leche adulterada. Anais X Congresso de ciencia y tecnología Espe, 2015.
- GASPAR P.D.; DOMINGUES, C.; GONÇALVES, L. C. C.; ANDRADE, L. P. Avaliação da qualidade e segurança alimentar pela previsão do crescimento microbiano em diferentes condições de conservação. V Congresso Ibérico y III Congreso Iberoamericano de Ciencias y Técnicas del Frío. 2009.
- GIGLIOTI, R.; GUTMANIS, G.; KATIKI, L.M.; OKINO, C.H.; DE SENA OLIVEIRA, M.C.; VERCESI FILHO, A.E. New High-Sensitive RhAmp Method for A1 Allele Detection in A2 Milk Samples. **Food Chemistry**, 2020.
- GLÜCK, C.; RENTSCHLER, E.; KREWINKEL, M.; MERZ, M.; NEUBECK, M. VON; WENNING, M.; SCHERER, S.; STOECKEL, M.; HINRICHS, J.; STRESSLER, T.; FISCHER, L. Thermostability of peptidases secreted by microorganisms associated with raw milk. **International Dairy Journal**, v. 56, p. 186-197, 2016.
- HARAGUCHI, F. K.; ABREU, W. C.; DE PAULA, H. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Revista de Nutrição**. Campinas, v. 19, p. 479-488, 2006.
- HE, M.; SUN, J.; JIANG, Z.Q.; YANG, Y. X. Effects of cow's milk beta-casein variants on symptoms of milk intolerance in Chinese adults: a multicentre, randomised controlled study. **Nutritional Journal**. v. 16, n 72, 2017.
- HELGASON, E.; TOURASSE, N. J.; MEISAL, R.; CAUGANT, D. A.; KOLSTØ, A. B. Multilocus sequence typing scheme for bacteria of the *Bacillus cereus* group. **Applied and environmental microbiology**, v. 70, p. 191-201, 2004.
- HOGENBOOM, J. A.; PELLEGRINO, L.; SANDRUCCI, A., ROSI, V.; D'INCECCO, P. Invited review: Hygienic quality, composition, and technological performance of raw milk obtained by robotic milking of cows. **Journal of dairy science**, 102(9), 7640-7654, 2019.
- IZIDORO, T. B., PEREIRA, J. G., SOARES, V. M., SPINA, T. L. B.; PINTO, J. P. D. A. N. Proteolytic activity of psychrotrophic bacteria in milk stored at different temperatures. **Revista Ceres**. v. 60, p. 452-457, 2013.

- JANN, O.C., IBEAGHA-AWEMU, E.M., ÖZBEYAZ, C.. Geographic distribution of haplotype diversity at the bovine casein locus. **Genetics Selection Evolution** 36, 243, 2004.
- JINSMAA, Y; YOSHIKAWA, M. Enzymatic release of neocasomorphin and bcasomorphin from bovine b-casein. **Peptides**, v. 20, n. 8, p. 957 - 962, 1999.
- KAILASH, J.; SARSAVAN, A. Detection of single nucleotide polymorphism by T-ARMS PCR of cross bred cattle Karan Fries for A1, A2 beta casein types. **International Journal of Scientific Research in Biological Sciences**, 1(1), 18-22. 2014.
- 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.
- 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.
- LANGONI, H.; CALLEFE, J. R. Qualidade do leite: uma meta a ser atingida. Disponível em: Acesso em: 17/05/2019.
- LAUGESSEN, 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.
- LIMA, A.C.J.; LARA, M.A.C. Polimorfismo do gene beta-caseína em bovinos. Disponível em: Acesso em: 21/05/2019.
- LUCKING, G.; STOECKEL, M.; ATAMER, Z.; HINRICHS, J.; EHLING-SCHULZ, M. Characterization of aerobic spore-forming bacteria associated with industrial dairy processing environments and product spoilage. **Int. Journal of Food Microbiology**. v. 166, p. 270-279, 2013.
- MADRIGAL, C.; SOTO-MÉNDEZ, M. J.; HERNÁNDEZ-RUIZ, A.; VALERO, T.; VILLOSLADA, F. L.; LEIS, R.; VICTORIA, E. M.; MORENO, J. M.; ORTEGA, R. M.; RUIZ-LÓPEZ, M. D.; VALERA-MOREIRAS, G.; GIL, A. Dietary Intake, Nutritional Adequacy, and Food Sources of Protein and Relationships with Personal and Family Factors in Spanish Children Age one to <10 Years: **Findings of the EsNuPI Study**. **Nutrients**, v.13, n.4, 2021.
- MATÉOS, A.; GUYARD-NICODÈME, M.; BAGLINIÈRE, F.; JARDIN, J.; GAUCHERON, F.; DARY, A.; HUMBERT, G.; GAILLARD, J. L. Proteolysis of milk proteins by AprX, an extracellular protease identified in Pseudomonas LBSA1 isolated from bulk raw milk, and implications for the stability of UHT milk. **International Dairy Journal**, v. 49, p. 78-88, 2015.

- MAZIERO, M. T.; BERSOT, L. S. Bacillus cereus em produtos lácteos – uma revisão. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.66, n.381, p.5-12, 2011.
- MARCHAND, S., DUQUENNE, B., HEYNDRIKX, M., COUDIJZER, K., & DE BLOCK, J. estabilization and off-flavors generated by Pseudomonas proteases during or after UHT-processing of milk. **International Journal of Food Contamination**, v. 4, p. 1-7, 2017.
- MAYER, H.K.; LENZ, K.; HALBAUER, E.-M. “A2 Milk” Authentication Using Isoelectric Focusing and Different PCR Techniques. **Food Research International**, 2021.
- MELTRETTER, J. et al. 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.
- MENG, L., ZHANG, Y., LIU, H., ZHAO, S., WANG, J., & ZHENG, N. Characterization of *Pseudomonas* spp. and Associated Proteolytic Properties in Raw Milk Stored at Low Temperatures. **Frontiers in microbiology**, 8, 2158. 2017.
- MCLACHLAN, C. N. S. β -casein A1, ischaemic heart disease mortality, and other illnesses. **Medical Hypotheses**, v. 56, n. 2, p. 262-272, 2001.
- MCLEAN, D., GRAHAM, E., PONZONI, R., & MCKENZIE, H. Effects of milk protein genetic variants on milk yield and composition. **Journal of Dairy Research**, 51(4), 531-546. 1984. Published online in 2009.
- MIGUEL, E. M.; SOBRAL, D.; MOREIRA, G. M. M.; COSTA, R. G. B.; TEODORO, V. A. M.; CARVALHO, A. F. Multiplicação de *Pseudomonas fluorescens* em temperaturas de refrigeração e seu potencial proteolítico. **Revista Inst. Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 74, n. 2, p. 96-107. 2019.
- MIRANDA, J.S.; MARTINS, M.L. Fenótipos de *Pseudomonas fluorescens* isolada de leite cru refrigerado granelizado. **XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, 2016.
- MONTANHINI, M. T. M. Influência da qualidade do leite cru em produtos lácteos processados. Disponível em: Acesso em: 01 de agosto de 2018.
- MONTANHINI, M. T. M.; BERSOT, L. S. Evaluation of psychrotrophic behavior and lipolytic and proteolytic activity of Bacillus cereus isolated from refrigerated dairy products. **Acta Scientiarum**. Technology Maringá, v. 35, n. 1, p. 163-167, Jan.-Mar., 2013.

- 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.
- NGUYEN, D. D. et al. 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.
- NOTERMANS; S.; BATT, C. A. A risk assessment approach for food-borne *Bacillus cereus* and its toxins. **Journal of Applied Microbiology**. 84. 1998.
- ROSSI, G.A.M et al. Comparative genomic survey of *Bacillus cereus* sensu stricto isolates from the dairy production chain in Brazil. **FEMS Microbiology Letters**. v. 365, n. 3, 2018.
- OANCEA, S. Identification of glycomacropeptide as indicator of milk and dairy drinks adulteration with whey by immunochromatographic assay. **Romanian Biotechnology Letters**, v. 14, n. 1, p. 4146-4151, 2009.
- OH, M. H.; HAM, J. S.; COX, J. M. Diversity and toxigenicity among members of the *Bacillus cereus* group. **International Journal of Food Microbiology**, v. 152, n. 1-2, p. 1-8, 2012.
- OLIVEIRA MENDES, M.; FERREIRA DE MORAIS, M.; FERREIRA RODRIGUES, J. A2A2 Milk: Brazilian Consumers' Opinions and Effect on Sensory Characteristics of Petit Suisse and Minas Cheeses. **LWT**, 2019.
- ORDÓÑEZ, J.A. *Tecnologia de Alimentos – Alimentos de Origem Animal*. v2. Porto Alegre: Artmed, 280 p. 2005.
- PINHO, C.; LEITE JÚNIOR, B.; OLIVEIRA, M.; TRIBST, A.; CRISTIANINI, M. Atividade proteolítica de protease produzida por *Pseudomonas fluorescens* ib 2312 em leite desnatado submetido ao processo de homogeneização à alta pressão. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, 69(4), 289-296. 2014.
- PINTO, C. L. de O.; PICCOLO, M. da P.; BRITO, M. A. V. P.; MARTINS, M. L.; MACÊDO, C. S.; FARIÑA, L. O. de. Qualidade microbiológica do leite cru. Viçosa: EPAMIG. Zona da Mata, 2013, p. 135- 156.
- PRATA, L. F.; PRATA, C. B. Determinação de GMP e CMP* no leite por métodos espectrofotométrico (ANSM) e cromatográfico (HPLC) – parâmetros metodológicos (*Glicomacropeptídeo e Caseinomacropeptídeo). **Archives of Veterinary Science**. v. 17, n. 2, p. 29-39, 2012.

- QU, Y.; KIM, B.-J.; KOH, J.; DALLAS, D.C. Analysis of Bovine Kappa-Casein Glycomacropeptide by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. **Foods** .10, 2028. 2021.
- RECIO, I.; GARCÍA-RISCO, M. R.; RAMOS, M.; LÓPEZ-FANDIÑO, R. O. S. I. N. A. Characterization of peptides produced by the action of psychrotrophic proteinases on κ -casein. **Journal of Dairy Research**, 67(4), 625-630. 2000.
- ROSSI, G. A. M.; AGUILAR, C. E. G.; SILVA, H. O.; VIDAL, A. M. C. Bacillus cereus group: genetic aspects related to food safety and dairy processing. **Arquivos do Instituto Biológico**. 2018.
- SAMARZIJA, D.; ZAMBERLIN, S.; POGAČIĆ, T. Psychrotrophic bacteria and milk and dairy products quality. **Mljekarstvo**, v. 62, p. 77-95, 2012.
- SANTIN, J. Peptídeos e proteínas do leite com propriedades funcionais. Disponível em: <https://www.milkpoint.com.br/noticias-e-mercado/giro-noticias/peptideos-e-proteinas-do-leite-com-propriedades-funcionais-24101n.aspx> Acesso em: 11/06/2019.
- SANTOS, M. G.; OKURA, M. H. ; RENSIS, C. M. V. B. Avaliação da qualidade do leite UHT durante o período de estocagem. In: 4º Congresso internacional de iniciação científica, 2006, Guarulhos. 4º Congresso internacional de iniciação científica, 2006.
- Santos, M. V.; Fonseca, L. F. L. da. Controle da mastite e qualidade do leite: desafios e soluções. São Paulo: Edição dos autores. 2019.
- SIDRA – Banco de Tabelas Estatísticas. Pesquisa Trimestral do Leite – 3o trimestre 2020. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/home/leite/brasil>. Acesso em: 28/01/2021.
- SILVA, F. G.; SILVA, C. R.; BRAGA, L. B.; SERRÃO NETO, A. Portuguese Children’s Sleep Habits Questionnaire – validation and cross-cultural comparison. **Jornal de Pediatria**, 90 (1), 78-84, 2014.
- SIMÕES, A. S.; MORI, R. Y.; FARIA, R.; CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.. Desempenho da matriz híbrida sio2-quitosana na imobilização da lipase microbiana de Candida rugosa. **Química Nova, Lorena**, v. 34, p. 33-38, 2010.
- 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.
- SOKOLOV, O. et al. Reactions between β -Casomorphins-7 and 5-HT₂ -Serotonin Receptors. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 10, n. 5, 2005.

- SMYTH, E., CLEGG, R.A. AND HOLT, C. A biological perspective on the structure and function of caseins and casein micelles. **International Journal of Dairy Technology**, 57: 121-126. 2004.
- SØRHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophics and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. **Trends in Food Science & Technology**, v. 8, n. 2, p. 35-41, 1997.
- STANBOROUGH, T.; FEGAN, N.; POWELL, S.N.; SINGH, T.; TAMPLIN, M.; CHANDRY, P.S. Genomic and metabolic characterization of spoilage-associated *Pseudomonas* species, **International Journal of Food Microbiology**, V. 268, p. 61-72, 2018.
- SUN, Z; CADE, J. R. A peptide found in schizophrenia and autism causes behavioural changes in rats. **Autism**, v. 3, n. 1, p. 85 - 95, 1999.
- SUN, Z. et al. 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. et al. Relation of β -casomorphin to apnea in sudden infant death syndrome. **Peptides**, v. 24, n. 6, p. 937 - 943, 2003.
- TAILFORD, K. A. et al. A casein variant in cow's milk is atherogenic. **Atherosclerosis**, v. 170, n. 1, p. 13 - 19, 2003.
- TAMANG, J. P.; WATANABE, K.; HOLZAPFEL, W. H. Review: Diversity of Microorganisms in Global Fermented Foods and Beverages. **Frontiers in Microbiology**. v. 7, p. 377, 2016.
- USDA United States Department of Agriculture. Dietary Guidelines for Americans. 8 ed. 2015-2020.
- VARGAS-BELLO-PÉREZ, E.; MÁRQUEZ-HERNÁNDEZ, R. I.; HERNÁNDEZ-CASTELLANO, L. E. Bioactive peptides from milk: animal determinants and their implications in human health. **Journal of Dairy Research**, v.86, n.2, 136-144, 2019.
- VIDAL-MARTINS, A. M. 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.
- WALSTRA. P. On the Stability of Casein Micelles. **Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 8, p. 1975-1979, 1990.
- WANG, J.; DING, T.; OH, D. H. Effect of temperatures on the growth, toxin production, and heat resistance of *Bacillus cereus* in cooked rice. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 11, n. 2, 2014.

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.

XIAOYANG, S.; ZAILING, Z.; JIAYI, N.; GREG, Y. Effects of Conventional Milk Versus Milk Containing Only A2 β -Casein on Digestion in Chinese Children: A Randomized Study. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**. v. 69, n. 3, p. 375-382, 2019.

Yang, X.; Wang, Z.; Zhang, C.; Wang, L.; Pang, L.; Zhang, D.; Man, C.; Jiang, Y. Assessment of the production of *Bacillus cereus* protease and its effect on the quality of ultra-high temperature-sterilized whole milk. **Journal of Dairy Science**, Volume 104, Issue 6. 2021.