

**UFRRJ**

**INSTITUTO DE TECNOLOGIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**DISSERTAÇÃO**

**Detecção da Adição Fraudulenta de Soro de  
Queijo em Leite:**

**Interferência da Atividade de Proteases Bacterianas.**

**Gislene Bremer de Oliveira**

**2009**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
DE ALIMENTOS**

**DETECÇÃO DA ADIÇÃO FRAUDULENTA DE SORO DE QUEIJO EM  
LEITE:**

**INTERFERÊNCIA DA ATIVIDADE DE PROTEASES BACTERIANAS.**

**GISLENE BREMER DE OLIVEIRA**

*Sob a Orientação da Professora*  
**Rosa Helena Luchese**

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Ciências** no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de Concentração em Ciência de Alimentos

Seropédica, RJ  
Março de 2009

637.127

O48d

T

Oliveira, Gislene Bremer de, 1979-  
Detecção da adição fraudulenta de soro  
de queijo em leite: interferência da  
atividade de proteases bacterianas /  
Gislene Bremer de Oliveira - 2009.  
47f. : il.

Orientador: Rosa Helena Luchese.  
Dissertação (mestrado) - Universidade  
Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa  
de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia  
de Alimentos.

Bibliografia: f. 34-43

1. Leite - Análise - Teses. 2. Leite -  
Microbiologia - Teses. 3. Leite -  
Contaminação - Teses. 4. Pseudomonas -  
Teses. I. Luchese, Rosa Helena, 1957-. II.  
Universidade Federal Rural do Rio de  
Janeiro. Programa de Pós-Graduação em  
Ciência e Tecnologia de Alimentos. III.  
Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE TECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE**  
**ALIMENTOS**

**GISLENE BREMER DE OLIVEIRA**

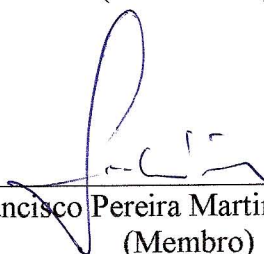
Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, área de Concentração em Ciência dos Alimentos.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 13/03/2009



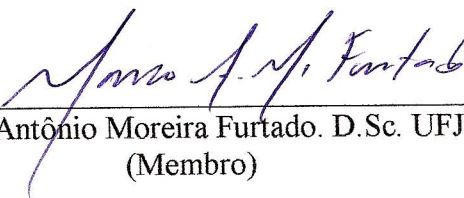
---

Rosa Helena Luchese. Ph.D. UFRRJ  
(Orientadora)



---

José Francisco Pereira Martins. Ph.D. UFRRJ  
(Membro)



---

Marco Antônio Moreira Furtado. D.Sc. UFJF  
(Membro)



---

Verônica Lobato. D.Sc. UFRRJ  
(Suplente)

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora **Profa. Rosa Helena Luchese**, por todo o apoio, dedicação, ensinamentos e paciência.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da UFRRJ, em especial, **Ediná e Rômulo** pela valiosa ajuda, amizade e pelos “socorros” prestados.

Aos graduandos **André Guerra, Aline Oliveira** e, em especial, **Maria Gatti** por toda ajuda prática, imprescindível para a realização deste trabalho.

Ao **Prof. José Francisco Pereira Martins**, pelas sugestões, dicas, paciência e inesgotável sabedoria.

À **Profa. Arlene Gaspar**, coordenadora deste programa, cujo apoio foi fundamental em cada etapa.

Ao **Eduardo Esteves e Moisa Lasmar** do LANAGRO-PL, pela essencial colaboração e por permitir o uso das instalações.

A **Dra. Edna Froeder Arcuri** da EMBRAPA Gado de Leite, pela doação dos microrganismos utilizados neste trabalho.

Aos **Profs. Marco Antonio Moreira Furtado e Verônica Lobato**, pela disponibilidade em participar da banca examinadora.

À **Lucimar Storck Teixeira**, secretária deste programa, pelos serviços prestados.

Ao **Prof. Celso Guimarães Barbosa**, pela ajuda nas análises estatísticas.

Ao meu noivo, **Frederico**, por todo o carinho e por me incentivar, sempre.

À minha **família** que, agora, felizmente, colhe mais um bom fruto da distância que nos separa.

A minha irmã, **Gerusa**, pela amizade, carinho e apoio.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**), pela concessão da bolsa de estudos.

*A você que sempre acreditou  
e que nos momentos mais difíceis  
não ousou desistir.  
Que fez mágicas diariamente  
para transformar meus sonhos em  
realidade e que, com amor, me apoia.  
A você, minha mãe querida,  
dedico este trabalho.*

*“Tantas vezes pensamos ter chegado  
Tantas vezes é preciso ir além.”*

*Fernando Pessoa*

## RESUMO

OLIVEIRA, Gislene Bremer. **Detecção da adição fraudulenta de soro de queijo em leite: interferência da atividade de proteases bacterianas.** 2009. 47p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

Uma das fraudes econômicas mais comumente aplicadas ao leite fluido é a adição do soro de queijo. No Brasil, a análise do índice de caseinomacropeptídeo (CMP), uma porção da molécula de  $\kappa$ -caseína solúvel no soro, é utilizada como indicador da ocorrência dessa fraude. No entanto, a ação de proteases produzidas por microrganismos psicrotróficos pode interferir neste teste levando a resultados falso-positivos, situação que passou a ter maior importância após a implementação da Instrução Normativa 51 (2002). Atualmente, grande parte do leite produzido é mantido refrigerado por dois dias ou mais antes do processamento, o que contribui para a seleção e proliferação destes microrganismos. Com o objetivo de avaliar esta interferência, foi inoculado no leite  $ca^1 10^3$  UFC/mL de *Pseudomonas* spp. seguido de incubação durante 2 e 5 d a 7 °C. O crescimento microbiano foi monitorado e, após estes períodos, o leite foi submetido a tratamento térmico (100 °C/5 min) para eliminação das células bacterianas e o extrato enzimático foi obtido para posterior análise da atividade de proteases. Em seguida, o leite foi encubado a 30 °C/30 d e o índice de CMP foi analisado nos tempos zero e 30 d. Adicionalmente, o mesmo leite foi fraudado com volumes crescentes de soro de queijo e analisado quanto ao índice de CMP. As linhagens de *P. fluorescens* apresentaram média de crescimento de 3 e 4 ciclos log, respectivamente, após 2 e 5 d de incubação a 7 °C. Os resultados dos testes de atividade de proteases após 2 d de incubação, utilizando como substrato a azocaseína, não diferiram significativamente ( $P > 0,05$ ) dos de 5 d. Diferentemente, os índices de CMP no tempo zero do tratamento 7 °C/5 d para o leite inoculado com *P. fluorescens* foram maiores do que o mesmo leite fraudado com 30% de soro de queijo, o que denota ainda mais a necessidade de controlar este importante deteriorante. Após 30 dias houve diminuição destes índices, possivelmente em decorrência da degradação do próprio CMP pelas proteases produzidas por *P. fluorescens*.

**Palavras-chave:** caseinomacropeptídeo, protease, fraude, psicrotróficos.

---

<sup>1</sup> Aproximadamente ou por volta de, do latim *circa*.



## ABSTRACT

OLIVEIRA, Gislene Bremer. **Detection of fraudulent addition of cheese whey in milk: Interference of bacterial proteases activity.** 2009. 47p. Dissertation (M.Sc. in Food Science and Technology). Institute of Technology, Department of Food Technology, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

One of the most common economic frauds applied to fluid milk is the addition of cheese whey. The analysis of the caseinomacropeptide (CMP) index, a portion of the  $\kappa$ -casein molecule soluble in the whey, is used as an indicator of the occurrence of this fraud in Brazil. However, the action of proteases produced by psychrotrophic microorganisms can interfere in this test, leading to false-positive results, situation that started to have greater importance after the implementation of Normative Instruction 51 (2002). Actually, great part of the milk produced is kept refrigerated for two days or more before being processed, fact that contributes to the selection and proliferation of these organisms. With the objective to evaluate this interference, *Pseudomonas* spp. was inoculated to a final concentration of *ca*  $10^3$  CFU/mL in milk, followed by incubation for 2 and 5 days at 7 °C. The microbial growth was monitored and, after these incubation periods, milk was submitted to thermal treatment (100 °C/5 min) for elimination of the bacterial cells and the enzymatic extract was obtained for posterior analysis of proteases activity. After that, the milk was incubated at 30 °C/30 d and the CMP index was analyzed at times zero and 30 days. Additionally, the same milk was frauded with increasing volumes of cheese whey and the CMP index was analyzed. *P. fluorescens* strains growth average was 3 and 4 cycles log, after 2 and 5 d of incubation at 7 °C, respectively. The results of the proteases activity tests at the 2<sup>nd</sup> day incubation, using azocasein as substratum, not differed significantly ( $P > 0,05$ ) from the 5<sup>th</sup> day. Differently, the CMP index at the zero time of the treatment 5d/7 °C for the milk inoculated with *P. fluorescens*, were higher than the same milk frauded with 30% of cheese whey, denoting the necessity to control even more, this important spoilage organism. After 30 days there was a reduction of these indexes, possibly as a result of the CMP degradation by the same proteases produced by *P. fluorescens*.

Key-words: caseinomacropeptide, protease, fraud, psychrotrophic.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Parte dos laudos de análise das amostras de leite recolhidas na “Operação Ouro Branco” da Polícia Federal. Fonte: ABLV (2007b). ..... 5
- Figura 2.** Modelo esquemático da submicela na micela de caseína. Fonte: HORNE (2006).... 9
- Figura 3.** Evolução integrada das áreas dos picos CMP1, CMP2 e CMP3, por eletroforese capilar, durante estocagem a 10 °C (a) e 20 °C (b) de leite cru incubado a 4 °C/24 h, submetido a tratamento UHT e adicionado de 6,4% (v/v) de soro de queijo em pó reconstituído em água para 8,87% (m/v). Fonte: RECIO et al. (2000b). ..... 15
- Figura 3.** Continuação. Evolução integrada das áreas dos picos CMP1, CMP2 e CMP3, por eletroforese capilar durante estocagem a 30 °C (c) de leite cru incubado a 4 °C/24 h, submetido a tratamento UHT e adicionado de 6,4% (v/v) de soro de queijo em pó reconstituído em água para 8,87% (m/v). Fonte: RECIO et al. (2000b). ..... 16
- Figura 4.** Amostras em banho-maria para a determinação da atividade enzimática. .... 19
- Figura 5.** Amostras sendo filtradas após adição de TCA e repouso durante 60 min. .... 20
- Figura 6.** Cromatógrafo utilizado para a determinação do índice de CMP (mg/L). .... 20
- Figura 7.** Curva de calibração construída com leite recém ordenhado adicionado de concentrações crescentes de padrão de CMP. .... 21
- Figura 8.** Ação proteolítica após 24 h de incubação a 36 °C (*P. aeruginosa*) e a 30 °C (*P. fluorescens*): (a) *P. aeruginosa*; (b) *P. fluorescens* P88; (c) *P. fluorescens* P250. .... 23
- Figura 9.** Ação proteolítica após 48 h de incubação a 21 °C: (a) *P. aeruginosa*; (b) *P. fluorescens* P88; (c) *P. fluorescens* P250 ..... 23
- Figura 10.** Ação proteolítica a 7°C: (a) *P. aeruginosa* após 16 d; (b) *P. fluorescens* P88 após 6 d; (c) *P. fluorescens* P250 após 4 d ..... 24
- Figura 11.** Crescimento da população de *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* P88 e *P. fluorescens* P250 no decorrer de 2 e 5 d a 7°C. .... 24

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Perfil físico-químico de soro de queijos tipo mussarela e minas padrão .....	7
---	---

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Valores médios\* de Log de UFC/mL de *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* P88 e *P. fluorescens* P250 inoculadas no leite e no decorrer de 2 e 5 d a 7 °C. .... 25
- Tabela 2.** Valores médios\* de atividade de proteases produzidas por *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* P88 e *P. fluorescens* P250 no decorrer de 2 e 5 d a 7 °C, após tratamento térmico (100 °C/5 min). .... 26
- Tabela 3.** Valores médios\* de concentração de CMP (mg/L) nos leites inoculados com *Pseudomonas* spp. e mantidos durante 2 e 5 d a 7 °C, tratados termicamente após este período (tempo zero d) e incubados a 30 °C durante 30 d (tempo 30 d). .... 28
- Tabela 4.** Coeficiente de correlação linear de Pearson entre de Log de UFC/mL e CMP (mg/L) para *P. aeruginosa* (PA), *P. fluorescens* P88 e P250 (P88 e P250) após 2 e 5 d/7°C.. 30
- Tabela 5.** Concentração de CMP (mg/L) nas diferentes porcentagens de soro de queijo adicionado ao leite. .... 31

## LISTA DE ABREVIACOES, SIGLAS OU SÍMBOLOS

®	marca registrada
µl	microlitro
µm	micrometro
ABLV	Associação Brasileira da Indústria de Leite Longa Vida
d	dia (s)
D	valor. Tempo de redução decimal ou tempo necessário para destruir 90% da população inicial de microrganismos.
DBO	Demanda Bioquímica de Oxignio
DIPOA	Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal
g	aceleração da gravidade
g	grama
h	hora
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
IN	Instrução Normativa
jan.	janeiro
jul.	julho
kDa	quilo Dalton
kg	quilograma
L ou l	litro
LANAGRO	Laboratório Nacional Agropecuário
log	logaritmo
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro
mol	mol
nm	nanmetro
°C	grau Celsius
°D	grau Dornic
°H	grau Hortvet
rpm	rotações por minuto
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida dodecilsulfato de sódio
t	tonelada (s)
UFC	Unidade (s) Formadora (s) de Colnia (s)
UHT	Ultra High Temperature

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	1
<b>2 OBJETIVOS</b>	2
2.1 Objetivo Geral	2
2.2 Objetivos Específicos	2
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b>	3
3.1 Fraudes em Leite no Brasil	3
3.2 O Índice de Caseinomacropéptido (CMP) no Leite	5
3.3 Instrução Normativa 51 de 18 de Setembro de 2002	6
3.4 Soro de Queijo	7
3.5 Proteólise no Leite	8
3.6 Bactérias Psicotróficas	10
3.7 <i>Pseudomonas</i> spp.	12
3.8 Enzimas Produzidas por Bactérias Psicotróficas	13
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>	17
4.1 Leite UHT e Soro de Queijo	17
4.2 Linhagens de <i>Pseudomonas</i> spp.	17
4.3 Manutenção das Culturas	17
4.4 Avaliação da Ação Proteolítica em Ágar Leite	17
4.5 Padronização do Inóculo - Desenvolvimento da Curva Padrão	17
4.6 Desenho Experimental	18
4.7 Determinação da Atividade de Proteases	18
4.8 Análise do Índice de Caseinomacropéptido (CMP)	19
4.9 Análise Estatística	21
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	23
5.1 Ação Proteolítica em Ágar Leite	23
5.2 Crescimento das Culturas no Leite	24
5.3 Atividade de Proteases	26
5.4 Índice de Caseinomacropéptido (CMP) no Leite Contaminado	27
5.5 Correlação entre log de UFC/mL e CMP (mg/L)	30
5.6 Índice de Caseinomacropéptido (CMP) no Leite Fraudado	31
<b>6 CONCLUSÕES</b>	32
<b>7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS</b>	33
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	34
<b>9 APÊNDICES</b>	44
A - Curva de concentração celular de <i>P. aeruginosa</i>	45
B - Curva de concentração celular de <i>P. fluorescens</i> P88	46
C - Curva de concentração celular de <i>P. fluorescens</i> P250	47

## 1 INTRODUÇÃO

Tendo em vista a importância do leite como alimento, a sua qualidade tem se tornado preocupação de pesquisadores de todo o mundo e uma das fraudes econômicas mais comumente aplicadas ao leite fluido é a adição de soro de queijo, por ser este um subproduto da indústria queijeira de baixo ou nenhum custo.

Esta adição, assim como qualquer outra, é proibida pela legislação brasileira por reduzir o valor nutritivo do alimento e diluir os teores de proteínas e gorduras. Caracteriza, ainda, prática abusiva que lesa os direitos do consumidor e que pode, em casos de consumo prolongado, gerar desnutrição, principalmente em lactentes. No entanto, para uma grande diversidade de outros produtos como leites fermentados, achocolatados, confeitos, panificações e as denominadas bebidas lácteas, o soro de queijo é um ingrediente de uso comum.

A determinação quantitativa do caseinomacropéptido (CMP), resultante da ação proteolítica de enzimas, é um método oficial utilizado para avaliação da qualidade do leite, incluindo a detecção da adição fraudulenta de soro de queijo (BRASIL, 2006a). Isto porque, em caso de fraude por adição de soro de queijo ao leite, o índice de CMP pode se apresentar aumentado por este ser resultante da hidrólise da  $\kappa$ -caseína na etapa de coagulação enzimática do processo de fabricação de queijo. No entanto, proteases de origem bacteriana, principalmente as proteases termoestáveis produzidas por microrganismos psicrotóxicos, podem também ser responsáveis por esse fenômeno, interferindo na detecção da fraude.

Em 22 de outubro de 2007 a Polícia Federal brasileira deflagrou a “Operação Ouro Branco”, que tornou público o denominado “escândalo da fraude do leite”. Através de denúncia, soube-se que duas cooperativas situadas no estado de Minas Gerais adicionavam ao leite, além de agentes químicos na tentativa de conservar ou mascarar a má qualidade do produto, o soro de queijo. Após recolhimento e análise de amostras de leite cru e UHT, com relação ao soro os laudos apresentaram como conclusão de que poderia se tratar da ação de bactérias ou a fraude propriamente dita. Os resultados inconclusivos deste laudo evidenciaram a importância deste tipo de interferência e as dificuldades experimentadas na detecção de um componente do próprio leite.

No Brasil esta situação passou a ter maior importância a partir de 2002, quando a refrigeração do leite na propriedade rural, assim como o seu transporte em caminhões isotérmicos foi regulamentada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) através de Instrução Normativa (IN 51). O objetivo era promover melhorias na qualidade do leite e reduzir custos operacionais, principalmente os relacionados ao transporte.

Atualmente, o uso corrente de tanques de refrigeração, assim como o aumento do intervalo de tempo entre a ordenha e o beneficiamento, propicia a predominância de bactérias psicrotóxicas na microbiota do leite, cujas proteases podem produzir resultados falso-positivos na pesquisa de adição fraudulenta de soro de queijo ao leite.

Considerando-se a grande importância do leite na dieta, a necessidade de assegurar a sua qualidade, combater fraudes e proteger o consumidor, torna-se necessário a realização de pesquisas capazes de esclarecer esta interferência e sustentar uma correta avaliação. Desta forma, espera-se que medidas penais cabíveis possam ser aplicadas ao fraudador.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Determinar a interferência da atividade de proteases produzidas por bactérias do gênero *Pseudomonas* no teste oficial que sugere a adição fraudulenta de soro de queijo em leite, assim como a sua ação após tratamento térmico e um período de tempo que simula parte da vida-de-prateleira do leite UHT, através do mesmo teste.

### 2.2 Objetivos Específicos

- a) Determinar o aumento da população após 2 e 5 d em temperatura de 7 °C de uma linhagem de *P. aeruginosa* e duas de *P. fluorescens* por inoculação no leite de  $ca 10^3$  UFC/mL;
- b) Determinar a atividade de proteases e a concentração de CMP (mg/L) após 2 e 5 d a 7 °C, após tratar o leite termicamente por vapor fluente ( $ca 100$  °C/5 min) para eliminação das células bacterianas;
- c) Determinar a concentração de CMP (mg/L) após incubar o leite tratado termicamente a 30 °C durante 30 d;
- d) Determinar as concentrações de CMP (mg/L) do mesmo leite fraudado com percentuais de 2, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 de soro de queijo.



### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Fraudes em Leite no Brasil

Fraudes são artifícios utilizados sobre os alimentos desmerecendo-os sob o ponto de vista nutritivo, comercial e biológico, tornando-os passíveis de restrições legais quanto ao consumo (ALMEIDA, 2007).

O termo “o crime perfeito” foi utilizado por Perks (2007) para a prática de fraudar alimentos, pois um dos maiores problemas enfrentados nas investigações é que os consumidores nem sempre conseguem dizer, com exatidão, quando estão sendo vítimas, pois os produtos podem ter sabor e aparência similares e custar quase o mesmo valor. Portanto, não, necessariamente, representam um dano, exceto o financeiro. Esta situação torna difícil prever o quão difundido é o problema.

Ressalta-se ainda que a decisão sobre a aquisição e consumo de um produto alimentício é, soberanamente, do consumidor, não devendo o fabricante fazer uso de um rótulo que não ostente o conteúdo real do produto (REYES et al., 2007).

O Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), em seu artigo 543, considera fraudado, adulterado ou falsificado, entre outros, o leite que for adicionado de substâncias conservadoras ou de quaisquer elementos estranhos à sua composição (BRASIL, 1952). Uma exceção a esta regra é verificada no Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite UHT, que aprova o uso do citrato de sódio neste produto por sua função estabilizadora. De acordo com este regulamento, além do citrato, outras substâncias já aprovadas tais como o mono, di e trifosfato de sódio, separadas ou combinadas, também poderiam continuar sendo utilizadas com a mesma finalidade (BRASIL, 1997).

O código penal brasileiro prevê pena de detenção de um a dois anos e multa para quem “corromper, adulterar, falsificar ou alterar substâncias ou produto alimentício destinado ao consumo, tornando-o nocivo à saúde ou reduzindo-lhe o valor nutritivo”. Estas punições podem ser aplicadas, após comprovada a culpa, em “quem fabrica, vende, expõe à venda, importa, tem em depósito para vender ou, de qualquer forma, distribui ou entrega a consumo a substância alimentícia adulterada ou o produto falsificado, corrompido ou adulterado” (BRASIL, 1998).

No entanto, apesar de ilegal e gerar prejuízos ao consumidor, a prática de fraudar o leite é comum em parte dos estabelecimentos industriais envolvidos com a produção, beneficiamento e/ou envase do leite, podendo as fraudes ser caracterizadas em dois tipos: a) sanitária: adição de substâncias estranhas ao leite com o intuito de mascarar deficiências do produto, podendo tais substâncias causar mal à saúde; b) econômica: adição de substâncias inócuas, que aumentam o volume de leite, mas não causam mal à saúde (ABLV, 2007a).

As fraudes econômicas mais comumente praticadas no leite fluido são as adições de água, soro de queijo e leitelho. A adição fraudulenta de soro de queijo ao leite fluido é financeiramente atrativa (RECIO et al., 2000b; VELLOSO, 2003). No entanto, desde que o produto final receba a denominação “bebida láctea”, a sua adição é permitida pela legislação brasileira e, para isso, é também necessário que contenha, no mínimo, 51% de base láctea (BRASIL, 2005).

Felício (2007) cita o professor Luiz F. Prata, da Universidade Estadual Paulista (UNESP), autor da seguinte afirmação: “uma das fraudes que mais preocupam na atualidade é a substituição de parte do leite por soro de queijo; ao utilizar um derivado do próprio leite, impõe dificuldades à sua detecção e coibição”. Ainda complementa que, a cada 10% de soro

adicionado ocorre diminuição de 8% no teor de proteínas e, conseqüentemente, prejuízos econômico e nutricional ao consumidor. Apesar disso, alguns fraudadores mascaram esta fraude através do emprego de outros ingredientes como sacarose e cloreto de sódio, capazes de restaurar os valores analíticos normais obtidos a partir da análise físico-química do leite (VELLOSO, 2003).

Este tipo de fraude não é um problema tipicamente brasileiro, pois, de acordo com Martín (1988), autoridades espanholas também suspeitaram de sua ocorrência nesta época, em virtude da queda dos preços de venda de algumas marcas de leite UHT, assim como o aumento da importação de soro de queijo em pó. No entanto, alguns fatos mais atuais traçam a sua ocorrência neste país.

Em trabalho desenvolvido pela Assembléia Legislativa de Minas Gerais entre agosto de 2001 e abril de 2002, tendo como objetivo a formação do preço do leite, foi detectado que um dos problemas enfrentados pelos consumidores era a prática da indústria em fraudar o seu produto através da adição do soro obtido do processamento de queijo (MATTA, 2003).

Em março de 2003, o Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA) do MAPA interditou uma empresa de laticínios com sede em Recife - PE por adulteração do leite em pó integral. A empresa adicionava maltodextrina e soro de queijo em pó ao leite. No momento da interdição foram apreendidas no entreposto da empresa, além de 9,6 t de leite em pó, 3,75 t de maltodextrina e 1,7 t de soro de queijo em pó. Nas amostras de leite analisadas previamente a data de interdição foram encontrados 21,8% e 20,7% de soro de queijo, já as amostras recolhidas no dia da interdição apresentavam 23,7%. Esta empresa era responsável pelo fornecimento de leite em pó integral para a merenda escolar de 15 prefeituras do mesmo estado (MAPA, 2003a).

Em abril de 2003, uma ação do programa de combate à fraude do leite do MAPA detectou a adição proibida de soro de queijo ao leite em 32 das 74 indústrias analisadas em 13 estados entre janeiro e abril. Quase 35% das 341 amostras testadas em laboratório tiveram resultado positivo. Esta fiscalização apreendeu 3,18 t de leite UHT e 1,9 t de leite em pó integral fraudados (MAPA, 2003b).

Em março de 2004, a assessoria de comunicação do MAPA publicou que esse vinha intensificando a fiscalização para coibir fraudes na produção e comércio de leite no país, agindo em conjunto com a Polícia Federal. Nesta ocasião, o então diretor do DIPOA, Nelmon Oliveira Costa, afirmou que as fraudes mais comuns aplicadas ao leite fluído eram por adição de água e soro de queijo (MAPA, 2004).

Em dezembro de 2006, o MAPA publicou no Diário Oficial da União (DOU) a IN 68, que oficializou métodos analíticos físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos utilizados nos Laboratórios Nacionais Agropecuários (LANAGROS). A medida tinha como objetivo combater a prática de fraudar o leite através da adição de soro de queijo. Essa legislação aperfeiçoou a análise de caseinomacropéptido (CMP), que indica a presença de soro no leite. O então fiscal agropecuário Paulo Humberto de Lima Araújo deixou claro que “excluindo o uso do soro de queijo como fraude econômica, quantidades pequenas de CMP servem como um indicador higiênico no processamento de leite” (MAPA, 2006).

De janeiro a agosto de 2007 foram analisadas 355 amostras de leite pela rede de laboratórios LANAGRO e 59 delas resultaram em abertura de processo de investigação para comprovar a fraude por adição de soro de queijo ao leite (MAPA, 2007).

A fraude por adição de soro de queijo ou água com açúcar ao leite foi também denunciada por representantes da Confederação Nacional da Agricultura (CNA) e da Federação da Agricultura do Estado de Minas Gerais (FAEMG), em maio de 2007. Os pecuaristas afirmaram que o problema existia há mais de cinco anos e se queixaram da morosidade da atuação do MAPA no combate à fraude (SÂNZIO, 2007).

Em outubro de 2007, frente à crise enfrentada pelo setor lácteo, a Polícia Federal, em nota oficial, confirmou a presença de resíduos alcalinos, água, sal, citrato, sacarose e soro de queijo no leite (AGÊNCIA BRASIL, 2007).

Em maio de 2008, mais uma vez, a Polícia Federal, em conjunto com fiscais do MAPA, desarticulou uma organização criminosa que adulterava leite em pó integral nos estados da Paraíba, Pernambuco, Ceará, Bahia e Santa Catarina. A ação da organização consistia em adicionar soro de queijo e outros ingredientes de origem láctea ao leite em pó. Esta operação ficou conhecida como “Operação Lactose” (MAPA, 2008).

### 3.2 O Índice de Caseinomacropeptídeo (CMP) no Leite

A legislação brasileira utiliza como um dos critérios de avaliação de qualidade do leite a determinação quantitativa do caseinomacropeptídeo (CMP), resultante da ação proteolítica de enzimas, e considera inadequado ao consumo humano o leite com concentração de CMP acima de 75 mg/L (BRASIL, 2006a, b).

Em caso de fraude por adição de soro de queijo ao leite, os índices de CMP podem se apresentar aumentados por ser este resultante da hidrólise da  $\kappa$ -caseína na etapa de coagulação enzimática do processo de fabricação de queijo. No entanto, proteases de origem bacteriana, principalmente as proteases termoestáveis produzidas por microrganismos psicrotóxicos, podem, também, ser responsáveis por esse fenômeno, mesmo após o tratamento térmico. O fato que os produtos da hidrólise de proteases bacterianas podem interferir na detecção da fraude tem sido relatado (LÓPEZ-FANDIÑO et al., 1993a, b; RECIO et al. 2000a, b, 1996).

Alguns laudos de análise de produtos recolhidos durante a “Operação Ouro Branco” foram disponibilizados pela ABLV (2007b) e, parte deste documento, encontra-se disposto na Figura 1.

Laudo nº 3406/07-INC

Ca:

Amostra	Origem	Tipo	Irregularidades	Conclusão
2427 2439 2415 2419	Silo 01	Leite cru	* Concentração de sódio acima daquela citada em literatura especializada * Elevado percentual de alcalinidade em cinzas * Índice elevado de CMP	Constatação da adição de substâncias químicas de natureza alcalina ao leite
2407 2413 2412 2411	Silo 02	Leite cru	* Acidez acima do normal * Índice elevado de CMP * Concentração de sódio acima daquela citada em literatura especializada	Indicação de ação de bactérias ou fraude pela adição de soro
2403 2434 2408 2430	Silo 03	Leite cru	* Concentração de sódio acima daquela citada em literatura especializada	Constatação de que a amostra atende ao regulamento

**Figura 1.** Parte dos laudos de análise das amostras de leite recolhidas durante a “Operação Ouro Branco” da Polícia Federal. Fonte: ABLV (2007b).

Apesar das limitações, a presença do CMP é considerada, por alguns autores, marcador da adulteração do leite por adição de soro de queijo (BREMER et al., 2008; GALINDO-AMAYA; VALBUENA-COLMENARES; ROJAS-VILLARROEL, 2006). Para a sua determinação, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) é o método internacionalmente reconhecido (FUKUDA; ROIG; PRATA, 2004), no entanto, Bremer (2008) cita alguns outros métodos desenvolvidos para esta detecção em produtos lácteos, sendo eles colorimétricos ou imunológicos e, mais recentemente, a eletroforese capilar, a espectrometria de massa e os biosensores.

### **3.3 Instrução Normativa 51 de 18 de Setembro de 2002**

A estocagem do leite cru refrigerado na fonte de produção iniciou-se em 1939 em grandes fazendas nas proximidades de Los Angeles, na Califórnia, expandindo-se posteriormente, de forma gradual, para outras regiões do Estado. Nos Estados Unidos, a grande mudança do sistema ocorreu no final da década de 50; na Inglaterra, no início da década de 70; e na Argentina, no final da década de 80 e início da década de 90 (PINTO, 2004).

No Brasil, este processo teve início em 1999 quando, através da Portaria 56, o MAPA submeteu à consulta pública a legislação proposta para a produção de leite no Brasil. Nela se estabelecia que a temperatura de estocagem do leite na propriedade rural não deveria ser superior a 4 °C e que, ao chegar à indústria esta não deveria ultrapassar 7 °C, limites estes tecnicamente recomendáveis. No entanto, parte do segmento produtivo nacional já vinha investindo, inclusive com financiamentos do governo federal, em tanques de refrigeração por imersão, com os quais a temperatura ideal de resfriamento é difícil de ser atingida. Em decorrência disso, a IN 51, em 2002, ampliou estes limites (TIMM; OLIVEIRA, 2007).

De acordo com a IN 51 são previstos a utilização de tanques de refrigeração por expansão direta, com capacidade para refrigerar o leite até temperatura igual ou inferior a 4 °C, ou tanques de refrigeração por imersão, que deverão refrigerar o leite até temperatura igual ou inferior a 7 °C. Ambos deverão atingir essas temperaturas no tempo máximo de 3 h após o término da ordenha. Como alternativa para a impossibilidade de obtenção de tanques individuais pelos produtores, a IN 51 prevê a possibilidade do uso de tanques coletivos de refrigeração, neste caso, sendo permitida somente a utilização de tanques baseados no princípio de operação por expansão direta (BRASIL, 2002).

Estabeleceu-se também que o tempo transcorrido entre a ordenha inicial e o recebimento do leite no estabelecimento processador deve ser de, no máximo, 48 h, recomendando-se como ideal um período de tempo não superior a 24 h. Após este período, o transporte do leite deve ser realizado em caminhões com tanques isotérmicos. Já no estabelecimento processador é permitido que o leite seja mantido refrigerado em temperatura máxima de 10 °C, porém não é especificado o período de tempo máximo nesta condição (BRASIL, 2002).

Quanto aos requisitos microbiológicos do leite refrigerado, a IN 51 prevê índices de Contagem Padrão em Placas (CPP) e prazos para que estes sejam alcançados. Atualmente, nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, com início em 01 jul. 2008 e término em 01 jul. 2011, é permitida a contagem máxima de  $7,5 \times 10^5$ ; nas regiões Norte e Nordeste, o prazo para que estes índices sejam alcançados tem início em 01 jul. 2010 e término em 01 jul. 2012. Após o término destes prazos, será permitida contagem máxima de  $1 \times 10^5$  para leite de tanque individual e  $3 \times 10^5$  para leite de tanque coletivo (BRASIL, 2002).

Sobre esta legislação, Pinto, Martins e Vanetti (2007) colocam que alguns aspectos são considerados críticos, como a utilização de tanques de refrigeração coletivos, o tempo de

refrigeração, a higienização dos equipamentos e utensílios e a temperatura máxima do leite na propriedade rural.

Neste contexto, também são importantes as colocações de Santos e Laranja da Fonseca (2001) que apontam que, no Brasil, alguns aspectos práticos limitam a obtenção dos benefícios integrais do resfriamento do leite na fazenda e o transporte a granel. Estes autores citam a má qualidade tanto da energia elétrica disponível em grande parte das propriedades rurais como de várias marcas de tanques resfriadores de leite comercializados no país, o que leva ao que se convencionou chamar de “resfriamento marginal do leite”, ou seja, o resfriamento e armazenamento do leite em temperaturas que variam entre 5 e 10 °C. Isto contribui de forma significativa para a proliferação de microrganismos psicrotróficos.

Timm e Oliveira (2007) ressaltam que, além da má qualidade, a energia elétrica no meio rural é inexistente em várias regiões do país. Além disso, apontam para a dificuldade na aquisição dos equipamentos.

### 3.4 Soro de Queijo

O soro de queijo é um líquido verde-amarelado que pode ser definido como a fração aquosa do leite que é separada da caseína durante a fabricação de queijos, correspondendo a cerca de 90% do volume de leite dependendo do tipo de queijo processado (CAMARGO et al. 2000 apud TEIXEIRA; FONSECA, 2008; FURTADO; LOURENÇO NETO, 1994).

No Brasil, a sua produção é constituída quase que exclusivamente de soro “doce”, obtido pelo processo de coagulação enzimática (quimosina) e proveniente da fabricação de queijos do tipo mussarela, prato, minas frescal e outros que são os mais comercializados no país. Já o soro ácido, originário da manufatura de queijos de coagulação ácida, de consumo mais reduzido (ricota e requeijão), e da fabricação da caseína, praticamente inexistente no Brasil, pouco contribui no cálculo geral (CARVALHO et al., 2007).

É constituído basicamente de água (93%) e somente 7% de matéria seca, da qual, 71% são lactose, 10% são proteína bruta, 12% são gordura e 11% são sais minerais (LIZIEIRE; CAMPOS, 2006).

Teixeira e Fonseca (2008) analisaram o perfil físico-químico de soro de queijos tipo mussarela e minas padrão produzidos no estado de Minas Gerais (Quadro 1).

**Quadro 1.** Perfil físico-químico de soro de queijos tipo mussarela e minas padrão. Fonte: TEIXEIRA; FONSECA (2008).

Parâmetro	Unidade	Queijo mussarela	Queijo minas padrão
		Média	Média
Crioscopia	°H	-0,565	-0,555
pH	-	6,19	6,3
Acidez	°D	13,17	12,49
Sólidos totais	g/100 g	6,33	6,28
Umidade	g/100 g	93,67	93,72
Gordura	g/100 g	0,77	0,68
Proteínas	g/100 g	0,84	0,80
Cinzas	g/100 g	0,47	0,49
Cloretos	g/100 g	0,18	0,19
Lactose	g/100 g	4,42	4,12
Densidade	-	1,0253	1,0249

Em média, são necessários 10 L de leite para se produzir 1 kg de queijo. A produção de queijo brasileira anual oficial de 500.000 t (HEGG, 2005) resulta na grande disponibilidade do soro “*in natura*”, que é oferecido de forma gratuita ou a baixo preço (LIZIEIRE; CAMPOS, 2006; MARTÍN-HERNÁNDEZ et al., 2008).

Ainda que não existam levantamentos precisos do total de soro produzido pela indústria de laticínios, supõe-se que, no Brasil, aproximadamente 50% do soro seja despejado diretamente na rede fluvial, sem qualquer tratamento, causando poluição e danos ambientais devido à elevada Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) para a sua degradação no ambiente (PEREIRA et al., 2007). De acordo com Richards (2002 apud TULLIO; KARKLE; CÂNDIDO, 2007), quando o soro é dispensado sem tratamento produz uma DBO de 30.000 a 50.000 mg O<sub>2</sub>/L. Este valor é, aproximadamente, 100 vezes maior do que o esgoto doméstico. Uma indústria com média de produção de 10.000 L/d polui mais que uma população de 5.000 habitantes.

O uso racional do soro como matéria-prima para obtenção de uma grande variedade de produtos alimentícios (COTON, 1985), assim como o estabelecimento de suas propriedades funcionais (SGARBIERI, 2004; SMITHERS, 2008) são áreas de estudo de grande interesse.

### 3.5 Proteólise no Leite

O leite, produto de secreção das glândulas mamárias, é um fluido viscoso constituído de uma fase líquida e partículas em suspensão, formando uma emulsão natural, estável em condições normais de temperatura ou de refrigeração. É uma das principais fontes de proteínas na alimentação de animais jovens e de humanos de todas as idades e pode ser considerado o alimento mais completo da natureza e o único que satisfaz as necessidades nutricionais dos recém-nascidos (SGARBIERI, 1996).

O leite de vaca, o mais importante do ponto de vista comercial e industrial, é composto de água (87,3%) e sólidos totais (12,7%), assim distribuídos: proteínas totais (3,3 a 3,5%), gordura (3,5 a 3,8%), lactose (4,9%), minerais (0,7%) e vitaminas (SGARBIERI, 2005).

As proteínas do leite podem ser classificadas em quatro grupos, de acordo com as suas propriedades físico-químicas e estruturais: a) caseínas; b) proteínas do soro; c) proteínas das membranas dos glóbulos de gordura; d) enzimas e fatores de crescimento (SGARBIERI, 1996; LOURENÇO, 2000).

Caseína é a classe dominante das proteínas do leite, representando, aproximadamente, 80% das proteínas totais. Ela é uma mistura de várias fosfoproteínas muito semelhantes que, junto com a gordura, dá a cor branca ao leite (BOBBIO; BOBBIO, 1992).

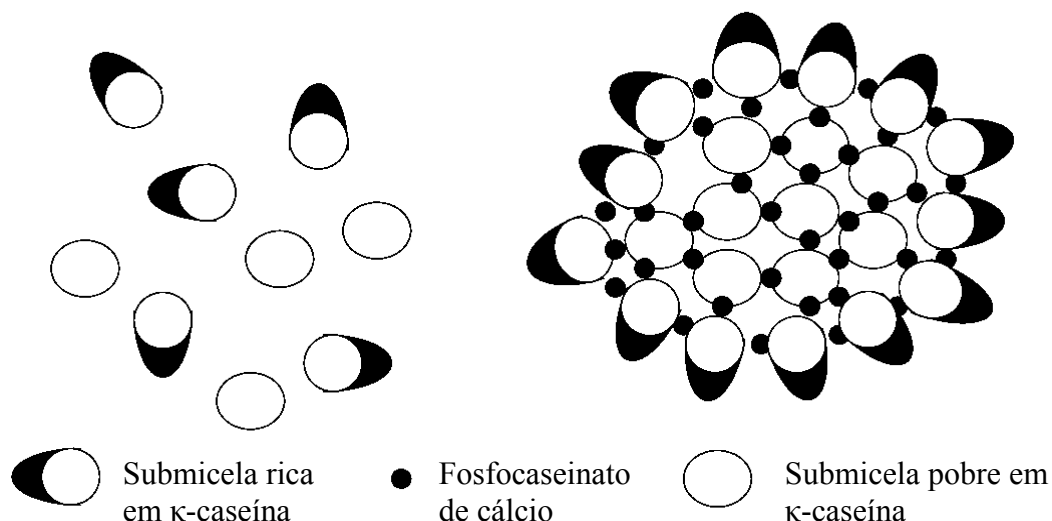
As caseínas são classificadas em quatro subgrupos: caseínas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\kappa$  e  $\gamma$ , sendo que as caseínas  $\alpha$  formam uma família de proteínas com características diferentes ( $\alpha_{s0}$  a  $\alpha_{s5}$ ). Dentro de cada grupo de caseínas aparecem ainda variantes genéticas, que são mutações que ocorreram na estrutura primária das caseínas, em que um ou mais aminoácidos foram substituídos por outros na seqüência primária da cadeia polipeptídica (SGARBIERI, 1996).

A caseína está presente no leite em forma de micelas, que são complexos esféricos contendo 92% de proteína e 8% de sais inorgânicos, principalmente fosfato de cálcio (FOX, 1992 apud FUKUDA, 2003).

A solubilidade da  $\kappa$ -caseína não é afetada pela presença de Ca<sup>2+</sup> em virtude de suas características estruturais e da localização de suas moléculas na superfície das micelas. Portanto, atua como estabilizadora das micelas, não permitindo a precipitação das caseínas sensíveis ao Ca<sup>2+</sup> por ação dos sais de cálcio do leite (SGARBIERI, 2005).

As micelas possuem uma estrutura porosa devido à sua composição em submicelas, que estão ligadas ao fosfocaseinato de cálcio. O modelo aceito atualmente é aquele em que o

teor de  $\kappa$ -caseína nas submicelas varia e que as deficientes em  $\kappa$ -caseína estão localizadas no interior das micelas, enquanto as ricas em  $\kappa$ -caseína estão concentradas na superfície, dando às micelas uma camada rica em  $\kappa$ -caseína com alguma  $\alpha_{s1}$ - $\alpha_{s2}$  e  $\beta$ -caseínas também expostas na superfície (Figura 2). Esse modelo sugere que a região hidrofílica carboxiterminal da  $\kappa$ -caseína se projeta para a superfície, dando às micelas uma aparência “pilosa”, e é essa a camada responsável pela estabilidade da micela e que, se for removida, compromete a estabilidade coloidal e a caseína coagula ou precipita (FOX; McSWEENEY, 1998 apud FUKUDA, 2003).



**Figura 2.** Modelo esquemático da submicela na micela de caseína. Fonte: HORNE (2006).

A  $\kappa$ -caseína consiste em uma cadeia polipeptídica com 169 aminoácidos, com resíduos de cisteína nas posições 11 e 88 e um resíduo de serina fosfatada na posição 149. Possui variantes genéticas A e B que diferem na composição dos aminoácidos nas posições 136 e 148. A molécula pode conter até cinco cadeias laterais de carboidratos (N-acetilgalactosamina, galactose e ácido N-acetilneuramínico), porém os sítios de glicosilação não são bem conhecidos. Pela ação da quimosina e algumas outras proteases, a cadeia polipeptídica é clivada especificamente na ligação fenilalanina-metionina (105-106), formando os fragmentos 1-105, denominado para- $\kappa$ -caseína que permanece nas micelas de caseína, e 106-169, denominado glicomacropéptido (GMP) ou CMP, em função da presença ou não de carboidratos na sua molécula, que fica no soro (BANKS; DALGLEISH; ROOK, 1981; GUINEE; WILKINSON, 1992; VELOSO et al., 2000).

Esta separação, segundo Sgarbieri (2005), é devido à fração GMP (região carboxiterminal) concentrar os resíduos de aminoácidos ácidos e a maioria hidrófilos, já a para- $\kappa$ -caseína (região aminoterminal) concentra os resíduos de aminoácidos básicos e apolares, compondo uma região insolúvel que se orienta para o interior das micelas e interage, por meio de grupos hidrofóbicos, com as caseínas  $\alpha_s$  e  $\beta$  dispostas no núcleo da micela.

A coagulação do leite pela quimosina acontece em dois estágios separados e sequenciais. No primeiro estágio, o componente estabilizador da micela de caseína, a  $\kappa$ -caseína, é hidrolisado. No segundo, agora com a sensibilidade da  $\kappa$ -caseína alterada, as micelas sofrem agregação quando em temperaturas maiores que 20 °C formando o gel (ALAIS, 1956; WAUGH; VAN HIPPEL, 1956 apud GUINEE; WILKINSON, 1992).

Embora a hidrólise da  $\kappa$ -caseína por outras proteinases ácidas que não a quimosina bovina seja estudada, assume-se que todo o coalho comercial hidrolisa a ligação Phe-Met.

Entretanto, a agregação característica das micelas pelos coalhos substitutos difere daquela tratada pela quimosina, indicando diferenças na extensão ou especificidade da hidrólise da  $\kappa$ -caseína (FOX, 1989).

Galindo-Amaya, Valbuena-Colmenares e Rojas-Villaruel (2006) comprovaram após a aplicação da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) em amostras de soro doce, assim como em suas misturas com leite (1%, 5%, 10% e 50%), que o GMP se evidenciou como um trímero de 20,9 kDa. Já no mesmo teste realizado com amostras de soro ácido e de leite cru fresco essa molécula estava ausente.

### 3.6 Bactérias Psicotróficas

O leite, além de ser um meio nutritivo, apresenta ambiente físico-químico favorável para a multiplicação de microrganismos e, por seu um produto de origem animal sujeito a diferentes métodos de produção, pode se contaminar por um vasto espectro de tipos microbianos (GILMOUR; ROWE, 1981).

O uso de baixas temperaturas na conservação de alimentos se baseia no fato de que o crescimento microbiano pode ser retardado por temperaturas acima da de congelamento e inibido por temperaturas abaixo do congelamento, em função da dependência da temperatura para a atividade das enzimas microbianas (JAY, 2005).

Sobre a granelização do leite, Fagundes et al. (2006) comentam que, apesar de racionalização da coleta e do transporte do leite ser uma tendência mundial que beneficia toda a cadeia do leite, a sua refrigeração imediatamente após a ordenha visa diminuir a multiplicação de bactérias mesófilas acidificantes, no entanto, permite maior competitividade à microbiota psicotrófica, capazes de provocar diversas alterações tanto no leite como em seus derivados. Segundo Cousin e Bramley (1981), a manutenção e coleta do leite cru refrigerado fazem com que, em dois a três dias, os psicotróficos predominem na microbiota deste produto. Portanto, estes microrganismos se tornaram um problema sério para a indústria de laticínios (COUSIN, 1982).

Os microrganismos psicotróficos são assim definidos por serem capazes de crescer em temperatura igual ou inferior a 7 °C, independentemente da sua temperatura ótima de crescimento (normalmente entre 20 e 30° C) e produzir colônias visíveis ou turbidez dentro de 7 a 10 dias (CROMIE, 1992; JAY, 2005). São representados tanto por Gram-negativos (ex. *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Alcaligenes*, *Chromobacterium* e *Flavobacterium* spp.) como por Gram-positivos (ex. *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Microbacterium* spp.) (SØRHAUG; STEPANIAK, 1997).

Os microrganismos psicotróficos possuem algumas características responsáveis pela adaptação ao frio. Rose (1968 apud JAY, 2005) afirma que o conteúdo lipídico normal da maioria das bactérias está entre 2 e 5%, sendo a maior parte ou mesmo todo o conteúdo localizado na membrana celular. Para Jay (2005), quando crescem em baixas temperaturas, as bactérias psicotróficas sintetizam lipídios neutros e fosfolipídeos contendo um aumento na proporção de ácidos graxos insaturados, o que leva a um decréscimo no ponto de fusão dos lipídios e tem a função de manter o seu estado líquido e móvel, permitindo assim a atividade da membrana. Este conceito, chamado de “teoria da solidificação dos lipídeos”, segundo o autor, foi proposto primeiramente por Gaughran (1947) e Allen (1953).

As baixas temperaturas também se traduzem em efeitos no mecanismo fisiológico bacteriano, entre eles, a menor taxa metabólica e a maior eficiência da membrana no transporte de solutos, pois as permeases de transporte de psicotróficos são, aparentemente, mais ativas do que as permeases de mesófilos e, qualquer que seja o mecanismo de aumento



de transporte, foi demonstrado que psicrotróficos são mais eficientes na absorção de solutos sob baixas temperaturas do que mesófilos (JAY, 2005).

Cromie (1992) afirma que os microrganismos psicrotróficos são, potencialmente, a mais importante causa da diminuição da qualidade de produtos e, certamente, o fator limitante da vida-de-prateleira do leite cru mantido sobre as condições atuais de ordenha e estocagem.

Os microrganismos psicrotróficos são ubíquos na natureza, podendo estar presente no solo, na água, em plantas ou animais. Portanto, os procedimentos inadequados de higiene na cadeia produtiva do leite e a microbiota contaminante do ambiente são considerados as principais causas de contaminação dos produtos por microrganismos psicrotróficos deterioradores e/ou patogênicos. Além disso, o seu número é também relacionado com o binômio tempo/temperatura no qual o leite é mantido até o processamento (COUSIN, 1982; PINTO; MARTINS; VANETTI, 2007).

Quando o leite é obtido em condições sanitárias adequadas, a microbiota psicrotrófica representa menos de 10% da microbiota total do leite fresco, já em condições não sanitárias representa mais de 75% (NIELSEN, 2002 apud CARDOSO, 2006).

A água utilizada no processo de produção de leite deve ser potável, apesar disso, muitas fazendas leiteiras utilizam, durante o processo de produção de leite, água de poços, lagos e outras fontes onde nenhum tratamento prévio é realizado. Estas fontes podem estar contaminadas com microrganismos de origem fecal e de uma grande variedade de saprófitas oriundos do solo e da vegetação, incluindo *Pseudomonas* spp., coliformes e outros bacilos Gram-negativos (COUSIN; BRAMLEY, 1981; SOUSA, 2005).

Se não tratada, a água, em contato com os equipamentos de ordenha e recipientes, pode servir de veículo de microrganismos contaminantes, podendo o número ser insignificante em termos de UFC/mL no leite, no entanto, a multiplicação dessas bactérias na água residual dos equipamentos pode resultar em sérias contaminações através do estabelecimento e desenvolvimento de microrganismos indesejáveis (COUSIN; BRAMLEY, 1981).

Santana et al. (2004), ao avaliarem a contaminação do leite em diferentes pontos da produção leiteira de quatro propriedades localizadas no Paraná, comprovaram que a água residual da limpeza dos equipamentos (latões e tanques de refrigeração) apresentaram contagens médias de psicrotróficos iguais a  $9,2 \times 10^5$  UFC/mL para latões e  $2,6 \times 10^7$  UFC/mL para tanques de refrigeração. Os autores consideraram também como alta a contagem de psicrotróficos em tetos higienizados inadequadamente e apresentaram como  $4 \times 10^5$  UFC/cm<sup>2</sup> a média de três propriedades.

Antunes et al. (2002 apud LORENZETTI, 2006) relataram a presença de microrganismos psicrotróficos representando 23% da microbiota do leite *in natura*, os quais, em condições de refrigeração, multiplicaram-se mais rapidamente do que a microbiota mesofílica, tornando-se predominante. Alguns outros estudos também realizados no Brasil evidenciaram altas contagens de microrganismos psicrotróficos ( $10^5$ - $10^8$  UFC/mL) no leite cru refrigerado (BRITO; BRITO; PORTUGAL, 2002; BRUM; GONÇALVES; MASSON, 2004; MENDONÇA et al., 2001; SOUZA et al., 1999).

Silva (2005) coletou amostras de tanques de refrigeração individuais e comunitários e encontrou populações de psicrotróficos variando de  $10^2$  a  $10^6$  UFC/mL, sendo 81% Gram-negativos.

Silva (2004) avaliou a população de psicrotróficos no leite cru proveniente de três estados brasileiros (SP, RS e GO) nas estações seca e chuvosa e encontrou os seguintes resultados: (SP)  $1,4 \times 10^6$  UFC/mL na seca e  $6,2 \times 10^6$  na chuvosa; (RS)  $3,3 \times 10^6$  UFC/mL na seca e  $3,9 \times 10^6$  UFC/mL na chuvosa; (GO)  $1,5 \times 10^7$  UFC/mL na seca e  $6,8 \times 10^7$  UFC/mL na chuvosa.

Vidal-Martins et al. (2005) coletaram amostras de leite nos meses de janeiro (A) e abril (B) em laticínios do estado de São Paulo e verificaram que a média da população psicotrófica em A ( $2 \times 10^9$  UFC/mL) foi superior a encontrada em B ( $4,4 \times 10^7$  UFC/mL). Os autores relacionaram estes resultados com o grau de contaminação inicial e o binômio tempo e temperatura em que o leite permaneceu desde a ordenha até o seu processamento. Além desses, outros fatores, também citados, foram as estações do ano, as práticas de produção, manuseio na propriedade rural, localização geográfica, temperatura de permanência do leite e distância do transporte entre a propriedade rural e o local de beneficiamento.

De 68 bactérias isoladas de amostras de leite cru obtidas na Finlândia por Munsch-Alatossava e Alatossava (2006), 60 (88%) eram psicotróficas, mostrando ubiquidade deste grupo microbiano.

Segundo Cousin e Bramley (1981), alguns graus de contaminação por psicotróficos na produção do leite cru são inevitáveis, no entanto, boas práticas higiênicas durante a ordenha podem minimizar estes níveis, sendo, segundo os autores, as ordenhadeiras e os tanques para estocagem do leite as maiores fontes de contaminação. Pinto, Martins e Vanetti (2007) também comentam que o controle da microbiota psicotrófica no leite constitui um fator importante para assegurar a qualidade de alguns produtos lácteos, entretanto, reconhecem que a contaminação é frequente e de difícil controle.

Uma alternativa é colocada por Cousin e Bramley (1981), ao afirmarem que, quando o leite é refrigerado e estocado a  $\leq 4$  °C, a baixa temperatura pode normalmente prevenir a multiplicação bacteriana por pelo menos 24 h, permanecendo a microbiota similar a presente inicialmente.

### 3.7 *Pseudomonas* spp.

O gênero *Pseudomonas* é composto de bacilos retos ou curvos (0,5-1  $\mu\text{m}$  x 1,5 x 4  $\mu\text{m}$ ), Gram-negativos, com mobilidade flagelar, catalase e oxidase positivos, quimiorganotróficos e aeróbios. Possuem metabolismo respiratório não fermentativo e condições bastante simples são requeridas para o seu crescimento (GILMOUR; ROWE, 1981).

O principal gênero bacteriano a predominar no leite cru refrigerado é o *Pseudomonas*. Dentre as espécies psicotróficas deste gênero com importância na qualidade do leite e derivados destacam-se *P. fluorescens*, espécie mais comumente isolada, *P. fragi*, *P. putida* e *P. putrefaciens*, sendo que a espécie *P. fluorescens* apresenta cinco biovars e a *P. putida* dois biovars (SANTOS; LARANJA DA FONSECA, 2001; SUHREN, 1989).

*P. aeruginosa*, apesar de ser considerada não psicotrófica por alguns autores (SANTOS; LARANJA DA FONSECA, 2001), pode estar presente na microbiota do leite, ser encontrada no solo e água e também comumente isolada de infecções do trato urinário e de mastite. É nutricionalmente versátil, cresce em temperatura de 42 °C, mas não a 4 °C, e apresenta temperatura ótima de crescimento 37 °C. Outras características intrínsecas à *P. aeruginosa* são: é agente patogênico em humanos e animais e pode ser diferenciada de outras espécies do gênero *Pseudomonas* devido a sua capacidade de crescimento a 41°C (SANTOS; LARANJA DA FONSECA, 2001).

Já a *P. fluorescens* é encontrada predominantemente na água e no solo e geralmente está associada à deterioração de alimentos, particularmente se refrigerados previamente ao consumo. É também nutricionalmente versátil, cresce em temperatura de 4 °C, mas não a 42 °C, e apresenta temperatura ótima de crescimento de aproximadamente 25-30 °C (GILMOUR; ROWE, 1981).

Jay (2005) coloca que espécies psicrotróficas do gênero *Pseudomonas* possuem entre 59 e 72% de lipídeos insaturados em sua membrana, o que lhes confere maior versatilidade em temperaturas de refrigeração quando comparadas a muitos outros microrganismos.

Muir (1996) também afirma que o gênero *Pseudomonas* é considerado o mais importante entre os psicrotróficos, podendo ser encontrado em aproximadamente 10% da microbiota do leite recém ordenhado. Segundo o autor, este gênero é representado por espécies que apresentam os menores tempos de multiplicação em temperaturas entre 0 e 7 °C (4-12 h) e podem crescer em temperaturas tão baixas quanto -10 °C.

Desmaures e Gueguem (1997 apud SANTOS; LARANJA DA FONSECA, 2001), em extenso trabalho de monitoramento da qualidade de leite cru refrigerado, apontaram o gênero *Pseudomonas* como o mais importante em termos de contaminação microbiológica.

A contaminação dos produtos lácteos por estes microrganismos origina-se do suprimento de água de qualidade inadequada, deficiências de procedimentos de higiene e ordenha na fonte de produção e/ou na indústria de laticínios (PINTO; MARTINS; VANETTI, 2007). Para Cousin e Bramley (1981), a contaminação por *Pseudomonas*, inclusive na água que abastece a sala de ordenha, faz com que ocorra a sua presença no leite, bem como o seu desenvolvimento em condições de refrigeração.

Percebe-se que a refrigeração do leite, por si só, não é garantia de qualidade. É extremamente importante que o leite cru seja obtido em condições higiênico-sanitárias adequadas para diminuir a contaminação inicial e, desta forma, a redução da temperatura pode manter a contagem microbiana em níveis baixos. Salienta-se que, quanto maior o tempo de estocagem sob baixas temperaturas (7 a 10 °C) de um leite apresentando alta contagem inicial de microrganismos, maiores serão as possibilidades de alterações no produto final (leite pasteurizado ou UHT e queijos), pela ação de microrganismos psicrotróficos, com o predomínio do gênero *Pseudomonas* (MUIR, 1996).

### **3.8 Enzimas Produzidas por Bactérias Psicrotróficas**

O crescimento bacteriano apresenta quatro fases principais. A primeira, denominada fase lag, é caracterizada pelo crescimento lento em virtude da adaptação do microrganismo ao meio de cultura e é seguida da fase log de rápido crescimento exponencial. A terceira fase é denominada estacionária, pois a diminuição dos nutrientes e o acúmulo de metabólitos tóxicos diminuem também a velocidade de crescimento dos microrganismos e o número de divisões celulares e mortes se igualam. Por último, a fase de declínio, quando o número de mortes suplanta progressivamente o de novas células (ICMSF, 1980).

A maioria das bactérias psicrotróficas, por serem inativadas pela pasteurização, com exceção do gênero *Bacillus*, não seria um problema sério para a indústria de laticínios, porém, uma característica importante dos psicrotróficos comumente encontrados no leite e produtos derivados é a sua capacidade de síntese, durante a fase log, de enzimas extracelulares que degradam os componentes do leite (SANTOS; LARANJA DA FONSECA, 2001; SHAH, 1994).

Outras enzimas, também de origem microbiana, podem estar localizadas dentro das bactérias (intracelulares) ou associadas à parede celular (periplasmáticas) e serem liberadas no leite quando ocorre lise celular das bactérias devido ao tratamento térmico. Desta forma, em conjunto com as enzimas extracelulares, podem exercer influência sobre a qualidade do leite (KOHLMANN et al., 1991).

Apesar disso, as enzimas extracelulares, em particular, proteases e lipases, são motivo de maior preocupação por serem capazes de resistir ao aquecimento (COGAN, 1977 apud CROMIE, 1992) e agir no leite cru durante o crescimento das bactérias psicrotróficas,

sobreviver ao tratamento térmico e continuar a produzir “off flavours” e outros tipos de danos aos produtos lácteos durante estocagem e maturação (CROMIE, 1992).

Proteases, lipases e fosfolipases produzidas por bactérias psicrotróficas, principalmente *Pseudomonas* spp., apesar de estáveis a altas temperaturas (podem sobreviver também ao tratamento UHT), são sensíveis a temperaturas na faixa de 50 a 60 °C. Apresentam temperatura ótima na faixa de 30 a 45 °C e possuem baixa energia de ativação, portanto, são mais ativas na faixa de 4 a 7 °C do que as enzimas produzidas por microrganismos mesófilos (SØRHAUG; STEPANIAK, 1997).

As proteases termorresistentes produzidas por *Pseudomonas* spp. psicrotróficas, típicas do leite cru, possuem peso molecular entre 40 a 50 kDa e valor D a 70 °C igual a 118 min ou mais (FAIRBARN; LAW, 1986). Apesar de algumas espécies secretar dois ou três tipos diferentes de proteases, a grande maioria são metaloenzimas contendo um átomo de zinco e até oito átomos de cálcio por molécula (McKELLER, 1989 apud SANTOS; LARANJA DA FONSECA, 2001). Segundo Fairbairn e Law (1986), o ambiente também influencia na produção de proteases, pois, para *Pseudomonas* spp., a produção de proteases aumenta com a redução da temperatura.

Dentre as espécies, a *P. fluorescens* é o maior representante da microbiota proteolítica (EWINGS; O’CONNOR; MITCHELL, 1984). Wang e Jayaro (2001) também observaram que 80% dos isolados de *P. fluorescens* do leite cru refrigerado apresentaram atividade proteolítica.

Em trabalho desenvolvido por Jaspe et al. (1995), o gênero *Pseudomonas*, após sofrer incubação em baixas temperaturas durante o período de 3 d, apresentou, respectivamente, atividade proteolítica, atividade lipolítica e taxa de crescimento cerca de 1000, 280 e 10 vezes superior, quando comparadas com amostras que não sofreram tal período de incubação.

Geralmente, as proteases bacterianas também atacam a  $\kappa$ -caseína produzindo a para- $\kappa$ -caseína e resultando na desestabilização da micela e coagulação do leite. O ataque preferencial à  $\kappa$ -caseína é esperado, pois esta fração está localizada na superfície da micela e acessível à degradação inicial. As  $\alpha$  e  $\beta$ -caseínas são também atacadas, sendo a  $\beta$ -caseína mais suscetível que a  $\alpha$ -caseína. As caseínas são degradadas em polipeptídios de pequeno peso molecular e aminoácidos. Algumas proteases bacterianas atacam as caseínas em ordens de preferência diferentes da acima citada, porém, as proteínas do soro não são degradadas (CROMIE, 1992).

Os hidrolisados podem ser caracterizados utilizando-se basicamente quatro métodos, que fornecem diferentes informações: a) eletroforese (PAGE) em presença de uréia, que permite boa resolução dos peptídeos com relação à sua carga; b) eletroforese (PAGE) em presença de SDS, que apresenta uma relação muito boa dos peptídeos, especialmente com relação à sua massa; c) cromatografia (HPLC) de fase reversa, que permite uma resolução muito boa dos peptídeos com relação aos aspectos de hidrofobicidade e hidrofiliabilidade e d) cromatografia (HPLC) de exclusão, que permite uma separação satisfatória dos peptídeos com base em seu tamanho (informação verbal)<sup>2</sup>.

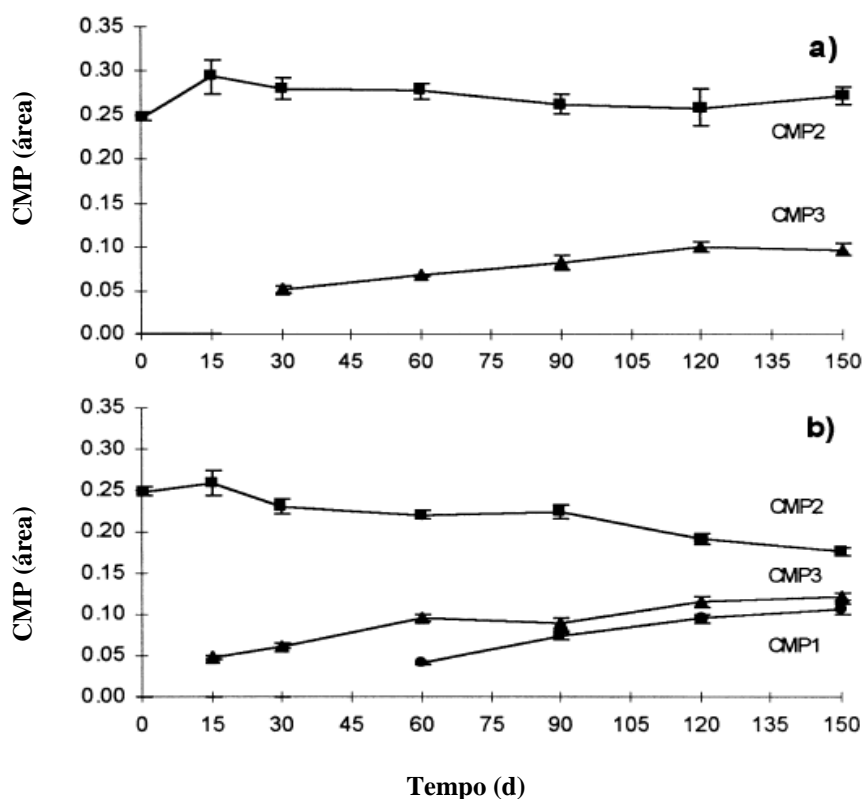
Recio et al. (2000a), utilizando o CMP com referência de peptídeo produzido após a hidrólise da  $\kappa$ -caseína, analisaram esta molécula quando oriunda da ação da quimosina ou de proteases produzidas por *P. fluorescens* B52. A separação da molécula foi feita por HPLC de fase reversa e eletroforese capilar e, adicionalmente, espectrometria de massa foi utilizada para identificação dos peptídeos. Os autores encontraram resultados coincidentes com os da degradação previamente encontrada em leite UHT estocado e concluíram que as proteases

---

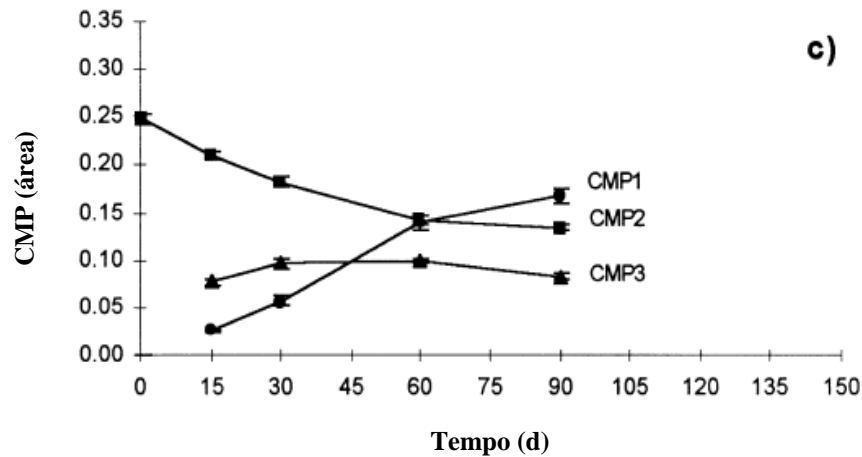
<sup>2</sup> Informação fornecida por FOX, P.F. (Department of Food Chemistry, University College of Cork), em 1997 apud FURTADO (1999).

psicrotróficas também hidrolisam a caseína na ligação 105-106, levando à formação do CMP, no entanto, são menos específicas que a quimosina e clivam as ligações 103-104, 104-105, 106-107 e 107-108. Para eles, a presença de CMP em leite UHT não pode ser considerada exclusivo indicador de adulteração do leite com soro de queijo, no entanto, a medida da área dos picos do cromatograma das diferentes formas CMP presentes pode possibilitar esta detecção.

Recio et al. (2000b), após incubarem leite cru a 4 °C/24 h, tempo considerado suficiente pelos autores para o crescimento de microrganismos psicrotróficos e acúmulo de proteases termorresistentes, o adulteraram com 6,4% de soro de queijo em pó reconstituído e trataram essa mistura termicamente (137 °C/4 s). Em seguida, incubaram a 10, 20 e 30 ± 2 °C, analisando-as, por eletroforese capilar (CE), técnica que permite a separação das três mais importantes formas do CMP, nos tempos zero, 15, 30, 60, 90 e 120 d. No dia zero, apenas um pico de CMP (CMP2) foi detectado, já para as amostras submetidas à incubação, o grau de proteólise foi dependente da temperatura de estocagem, sendo que, a 10 °C, o CMP2 permaneceu constante e após 30 d surgiu um pico de CMP3. A 20 °C, o CMP3 surgiu aos 15 d e após 60 d observou-se um aumento paralelo de CMP1 e CMP3, enquanto CMP2 começou a decair após 90 d. A 30 °C, o CMP2 sofreu rápida diminuição acompanhada do surgimento de CMP3 e da elevação de CMP1 e, após 90 d, os eletroforegramas indicaram alta degradação proteolítica, o que interferiu na precisão da integração do pico (Figura 3).



**Figura 3.** Evolução integrada das áreas dos picos CMP1, CMP2 e CMP3, por eletroforese capilar, durante estocagem a 10 °C (a) e 20 °C (b) de leite cru incubado a 4 °C/24 h, submetido a tratamento UHT e adicionado de 6,4% (v/v) de soro de queijo em pó reconstituído em água para 8,87% (m/v). Fonte: RECIO et al. (2000b).



**Figura 3.** Continuação. Evolução integrada das áreas dos picos CMP1, CMP2 e CMP3, por eletroforese capilar durante estocagem a 30 °C (c) de leite cru incubado a 4 °C/24 h, submetido a tratamento UHT e adicionado de 6,4% (v/v) de soro de queijo em pó reconstituído em água para 8,87% (m/v). Fonte: RECIO et al. (2000b).

Pinto (2004) avaliou o efeito do crescimento de dois isolados de *P. fluorescens* (07A e 041) sobre as proteínas do leite utilizando SDS-PAGE. Para isso, inoculou em amostras de leite populações de *ca* 10<sup>6</sup> UFC/mL e incubou a 2, 4, 7 e 10 °C, analisando-as após 1, 2, 4 e 6 d. Concluiu que mesmo a 2 °C as alterações na fração  $\kappa$ -caseína puderam ser constatadas para ambos os isolados. A incubação a 4 °C acelerou a degradação de  $\beta$  e  $\kappa$ -caseína, com degradação completa de todas as frações caseínicas em 6 d (07A) e 4 d (041). A 7 °C e a 10 °C houve aceleração da deterioração das frações caseínicas, sendo que, após 2 d a 7 °C, houve degradação da  $\beta$  e  $\kappa$ -caseína e o aparecimento de para- $\kappa$ -caseína. Concluiu, portanto, que, mesmo nas temperaturas de refrigeração propostas para a conservação do leite cru na fonte de produção e no estabelecimento industrial podem ocorrer o comprometimento da qualidade da matéria-prima e, como consequência, dos derivados do leite, incluindo o leite UHT.

Segundo Santos e Laranja da Fonseca (2001), a atividade enzimática dos psicrotróficos passa a ter grande importância quando as contagens ultrapassam 10<sup>6</sup> UFC/mL. Já Adams, Barach e Speck (1976 apud FUKUDA, 2003) afirmam que certas cepas hidrolisam a  $\kappa$ -caseína a baixas populações (aproximadamente 10<sup>4</sup> UFC/mL).

Pinto et al. (2006) afirmam que, embora no Brasil não exista regulamentação específica quanto à qualidade microbiológica do leite cru destinado à fabricação de produtos lácteos específicos, é possível, com base nos dados da literatura, considerar imprudente a fabricação de produtos a partir de leite cru com contagem de psicrotróficos superior a 5 x 10<sup>6</sup> UFC/mL.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Leite UHT e Soro de Queijo

O leite UHT desnatado ZERO<sup>®</sup> (Barbosa & Marques, Governador Valadares - MG, fabricação 14/06/2008\_04 17:47) utilizado no experimento foi adquirido no mercado local de Seropédica/RJ. A estabilidade microbiológica do produto foi determinada pela contagem de aeróbios viáveis de acordo com o estabelecido na IN 62 do MAPA (BRASIL, 2003).

O soro de queijo foi obtido no restaurante universitário da UFRRJ, após preparo do queijo utilizando coagulante comercial COALA<sup>®</sup> (Bela Vista Produtos Enzimáticos Ind. & Com. Ltda, Bela Vista - SC) contendo quimosina e outras proteases, sendo este soro, imediatamente, aquecido a 80 °C durante 15 min em banho-maria (Tecnal, modelo TE056, Piracicaba, Brasil) para inativação enzimática (FUKUDA; ROIG; PRATA, 2004) e, em seguida, congelado até o momento da sua utilização.

### 4.2 Linhagens de *Pseudomonas* spp.

Linhagens de *P. fluorescens* P88 e P250 foram obtidas da coleção do laboratório de Microbiologia da EMBRAPA Gado de Leite, Juiz de Fora - MG, e a linhagem de *P. aeruginosa* foi obtida do laboratório de bacteriologia do Instituto de Veterinária da UFRRJ. Todas as linhagens foram isoladas de leite e identificadas com base em testes bioquímicos. No caso de *P. fluorescens* P88 e P250, foram utilizados Kits API<sup>®</sup> NE (bioMérieux, Marcy l'Etoile, França), obtendo-se 98,6 a 99,9% de identidade para esta espécie.

As linhagens foram selecionadas com base na sua capacidade proteolítica em ágar leite.

### 4.3 Manutenção das Culturas

As culturas padrão foram transferidas para ágar nutriente (Merck, Darmstadt, Alemanha) inclinado e mantidas a 4 °C, sendo transferidas para novo meio de manutenção a cada 4 meses.

No momento da utilização, a ativação das culturas foi realizada em caldo triptona de soja (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) com três repicagens sucessivas, sendo incubadas a 30 °C (*P. fluorescens*) ou 36 °C (*P. aeruginosa*) por 24 h.

### 4.4 Avaliação da Ação Proteolítica em Ágar Leite

Adicionou-se ao ágar nutriente 10% de leite desnatado MOLICO<sup>®</sup> (Nestlé) reconstituído a 100 g/L estéril (110 °C/10 min) e plaqueou-se as culturas em estrias. As placas foram incubadas a 7, 21 e 30 °C para *P. fluorescens* e a 7, 21 e 36 °C para *P. aeruginosa*, e avaliadas quanto à formação de halo transparente de proteólise ao redor das colônias.

### 4.5 Padronização do Inóculo - Desenvolvimento da Curva Padrão

Determinou-se, para as três culturas, a equação de regressão linear que permite transformar dados de absorvância em UFC/mL, com a finalidade de conhecer a concentração exata do inóculo.

A partir da suspensão celular obtida após 24 h da terceira repicagem da cultura em caldo triptona de soja, foram preparadas as diluições 1:5, 1:10, 1:25 e 1:50 no mesmo caldo triptona de soja estéril (121 °C/15 min) e determinou-se o valor de absorvância (densidade ótica) a 470 nm de cada uma das diluições em espectrofotômetro (BELphotonics, modelo SP1105, Monza, Itália).

Concomitantemente, determinou-se a contagem do número de células através do plaqueamento em superfície de alíquotas de 0,1 mL de diluições decimais sucessivas das culturas em água peptonada (HiMedia, Mumbai, Índia) 0,1%, utilizando-se o meio ágar padrão para contagem (HiMedia, Mumbai, Índia). As placas foram incubadas em estufa a 36 °C (*P. aeruginosa*) e a 30 °C (*P. fluorescens*) durante 24 h e, logo após, foi feita a contagem transformando em UFC/mL.

Estes valores foram relacionados e plotados em um gráfico de Absorvância x UFC/mL para determinação da equação da reta através de regressão linear simples.

#### **4.6 Desenho Experimental**

A cultura foi inoculada ao leite UHT de modo a obter-se uma população final de *ca* 10<sup>3</sup> UFC/mL. Uma alíquota deste leite, não inoculada, foi separada para incubação e servir como branco.

O leite inoculado foi incubado durante 2 d a 7 °C e, após este período, dividido em duas alíquotas, sendo que, uma delas permaneceu por mais 3 d a 7 °C, de modo a simular prováveis intervalos de tempo entre a ordenha inicial e o processamento final. O crescimento microbiano ao final destes períodos foi monitorado por plaqueamento em ágar padrão para contagem. Em seguida, estes leites foram submetidos a tratamento térmico por vapor fluente (aproximadamente 100 °C) durante 5 min, testado previamente quanto à capacidade de destruir as células bacterianas (com base em testes de esterilidade) e por não ser considerado deletério para as enzimas, de acordo com Rajmohan, Dodd e Waites (2002).

Retirou-se uma alíquota de 20 mL que foi submetida à centrifugação (Sigma, modelo 2K15, Osterode am Harz, Alemanha) a 21000 x g durante 15 min a 5 °C, sendo o sobrenadante livre de células (extrato enzimático) congelado e utilizado na determinação da atividade de proteases.

O restante do leite foi adicionado de solução de azida sódica, esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm, de modo a conter uma concentração final de 0,05%, para inibir um eventual crescimento bacteriano (LE; DATTA; DEETH, 2006). Adicionou-se igual concentração aos tubos do branco. Alíquotas de 50 mL foram transferidas para quatro tubos estéreis sendo dois tubos contraprova. Dois dos tubos foram congelados imediatamente após o tratamento térmico (tempo zero), e os outros dois foram incubados a 30 °C durante 30 d, de modo a simular parte da vida-de-prateleira do leite UHT, sendo congelados ao final deste período (tempo 30). Estas amostras foram mantidas congeladas até análise do índice de CMP. O branco foi submetido a tratamento similar.

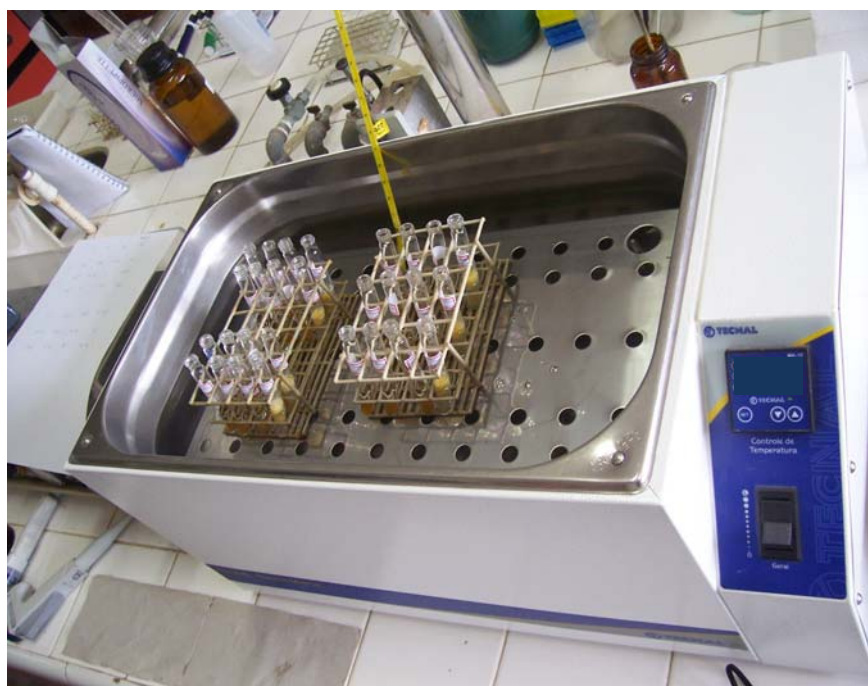
Este procedimento foi repetido três vezes, para cada microrganismo.

#### **4.7 Determinação da Atividade de Proteases**

Utilizou-se metodologia proposta por Ewings, O'Connor e Mitchell (1984), com modificações. Para isso, 1 mL de solução de azocaseína (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)



(0,5% m/v dissolvida em solução tampão 0,1 molar de Tris-HCl, pH 7,5), 700 µl de solução tampão 0,1 M Tris-HCl, pH 7,5 e 500 µl de extrato enzimático descongelado em temperatura ambiente, foram incubados em banho-maria a 37 °C durante 2 h (Figura 4). Após este período, foram adicionados 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10%, sendo que, nos tubos considerados brancos o TCA foi adicionado previamente ao extrato enzimático. As amostras foram então colocadas em banho de gelo durante 15 min e centrifugadas a 4000 rpm durante 10 min. A absorvância do sobrenadante foi lida a 366 nm em espectrofotômetro e uma unidade de atividade enzimática foi definido como a quantidade de enzima necessária para produzir aumento de 0,01 de absorvância, por hora de reação.



**Figura 4.** Amostras em banho-maria para a determinação da atividade enzimática.

#### **4.8 Análise do Índice de Caseinomacropéptido (CMP)**

As amostras de leite foram transportadas em gelo seco para o LANAGRO (Pedro Leopoldo - MG), onde foram analisadas por HPLC em coluna de filtração em gel e detecção ultravioleta (UV), seguindo a metodologia oficial do MAPA para quantificação de CMP proveniente da ação proteolítica de enzimas (BRASIL, 2006a).

As amostras foram descongeladas em temperatura ambiente e, logo após, a cada alíquota de 10 mL foram adicionados 5 mL de ácido tricloroacético a 24%, gota a gota e sob agitação constante. Após repouso de 60 min em temperatura ambiente, as amostras foram filtradas em papel qualitativo (WHATMAN<sup>®</sup>, nº 5) (Figura 5).



**Figura 5.** Amostras sendo filtradas após adição de TCA e repouso durante 60 min.

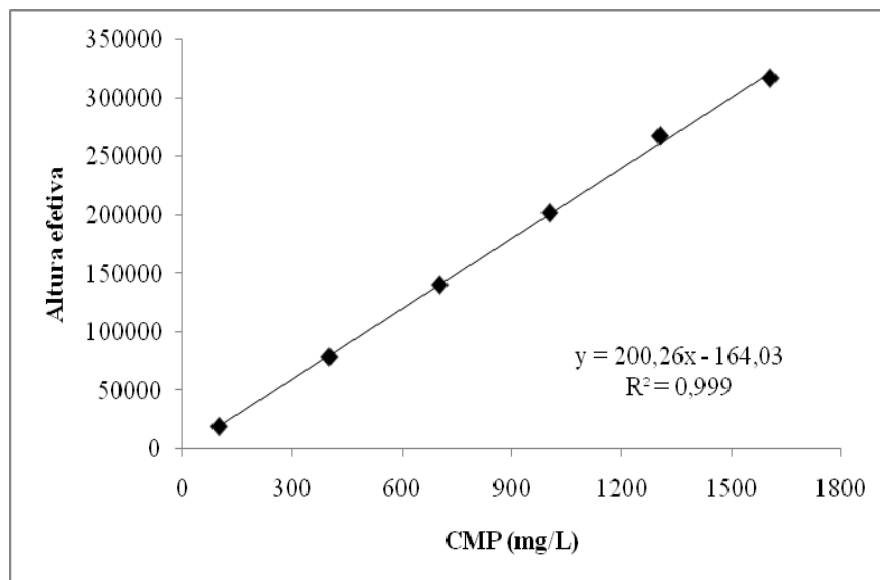
As amostras filtradas foram injetadas no cromatógrafo (Shimadzu) (Figura 6), composto dos seguintes módulos: degaseificador DGU-20A<sub>5</sub>, bomba Prominence LC 20 AT, injetor automático SIL-10AF, detector UV-visível SDP 20A, interface CBM-20A e software LC solution. A coluna utilizada foi a Zorbax GF-250 da Agilent, pN 884973-901, 250 mm de comprimento, 9,4 mm de diâmetro interno e tamanho de partícula de 4  $\mu\text{m}$ .



**Figura 6.** Cromatógrafo utilizado para a determinação do índice de CMP (mg/L)

A fase móvel foi uma solução tampão fosfato pH 6,0 (1,74 g de hidrogenofosfato de potássio; 12,37 g de dihidrogenofosfato de potássio e 21,41 g de sulfato de sódio em, aproximadamente, 700 mL de água deionizada destilada), com fluxo de 1,5 mL/min. O pH da solução foi ajustado para 6,0 utilizando solução de ácido fosfórico a 3 mol/L e solução de hidróxido de potássio a 3 mol/L. A solução foi transferida para um balão volumétrico de 1000 mL e o volume foi completado com água deionizada destilada e filtrada em membrana de 0,45 µm. Antes do uso, a solução foi degaseificada em banho de ultrassom durante 15 min. O comprimento de onda foi de 210 nm.

Preparou-se uma curva padrão utilizando leite cru de procedência conhecida e recém ordenhado, adicionando ao mesmo 100, 400, 700, 1000, 1300 e 1600 mg/L de padrão de CMP de concentração conhecida e rastreável a um padrão de concentração certificada (Dinâmica Química Contemporânea Ltda., Diadema, SP) (Figura 7), além de um branco de leite cru. Construiu-se um gráfico de concentração (mg/L) versus a altura efetiva do pico e foi calculada a regressão linear da curva aceitando valores de  $R > 0,95$ . Identificou-se o pico com o mesmo tempo de retenção do CMP padrão e as concentrações presentes nas amostras foram calculadas em mg/L, com uma casa decimal, com base na curva de calibração.



**Figura 7.** Curva de calibração construída com leite recém ordenhado adicionado de concentrações crescentes de padrão de CMP.

Adicionalmente, volumes crescentes de soro de queijo foram adicionados ao mesmo leite utilizado no experimento (2, 5, 10, 15, 20, 25 e 30%), que foi analisado da mesma maneira.

#### 4.9 Análise Estatística

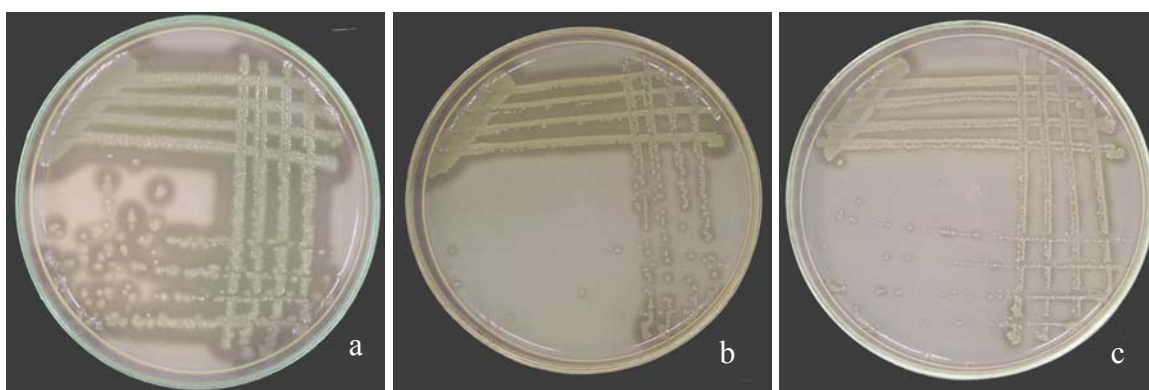
Os dados de UFC/mL, atividade de proteases e CMP (mg/L) obtidos para cada microrganismo foram analisados através de técnica de análise de variância e complementados pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância (VIEIRA, 2006), empregando-se o

programa estatístico SISVAR 4.3. A possível correlação entre UFC/mL e CMP (mg/L) foi analisada com base na prova de Pearson, com nível de significância 0,05, empregando-se o programa estatístico XLSTAT-Pro 7.5.

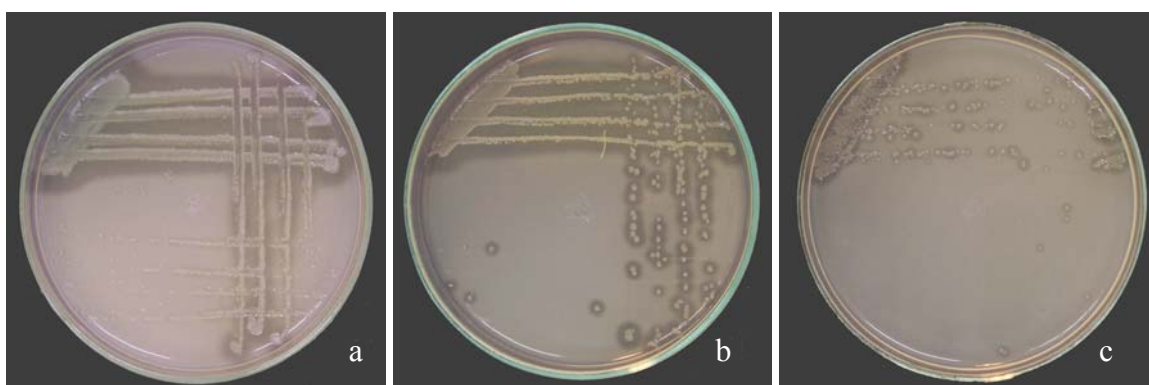
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Ação Proteolítica em Ágar Leite

O crescimento das colônias das *Pseudomonas* spp. e formação de halo sob incubação a 30/36 °C e a 21 °C estão dispostos nas Figuras 8 e 9, respectivamente. Observou-se que a formação do halo de proteólise foi mais rápida sob temperaturas próximas da ótima de crescimento do microrganismo. Quando incubados a 36 °C (*P. aeruginosa*) e a 30 °C (*P. fluorescens*) houve formação de halo de proteólise em 24 h. Já a 21 °C, estas bactérias apresentaram halo após 48 h.

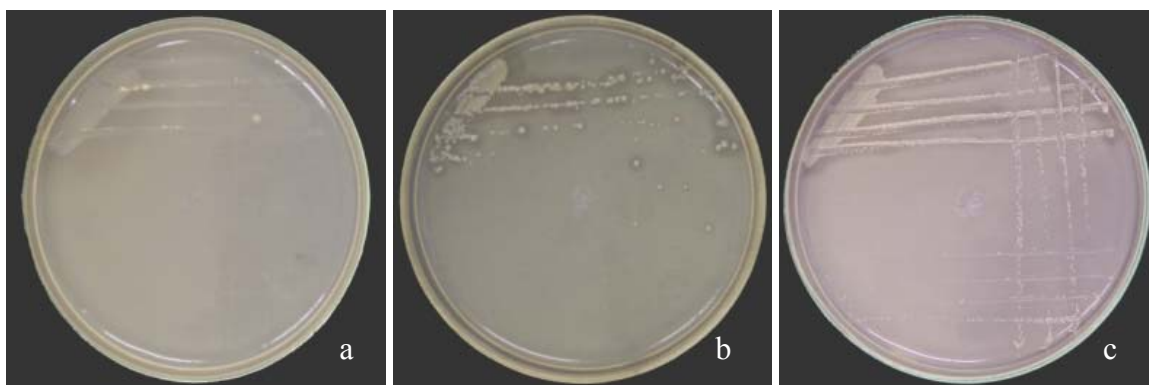


**Figura 8.** Ação proteolítica após 24 h de incubação a 36 °C (*P. aeruginosa*) e a 30 °C (*P. fluorescens*): (a) *P. aeruginosa*; (b) *P. fluorescens* P88; (c) *P. fluorescens* P250.



**Figura 9.** Ação proteolítica após 48 h de incubação a 21 °C: (a) *P. aeruginosa*; (b) *P. fluorescens* P88; (c) *P. fluorescens* P250.

Por outro lado, quando incubados a 7 °C (temperatura que simula o armazenamento refrigerado do leite segundo a IN 51) os halos surgiram após diferentes períodos, exceto para a linhagem de *P. aeruginosa* que em até 16 d de incubação a 7 °C não apresentou halo de proteólise. *P. fluorescens* P88 apresentou colônias com halos após 6 d e *P. fluorescens* P250 após 4 d (Figura 10).



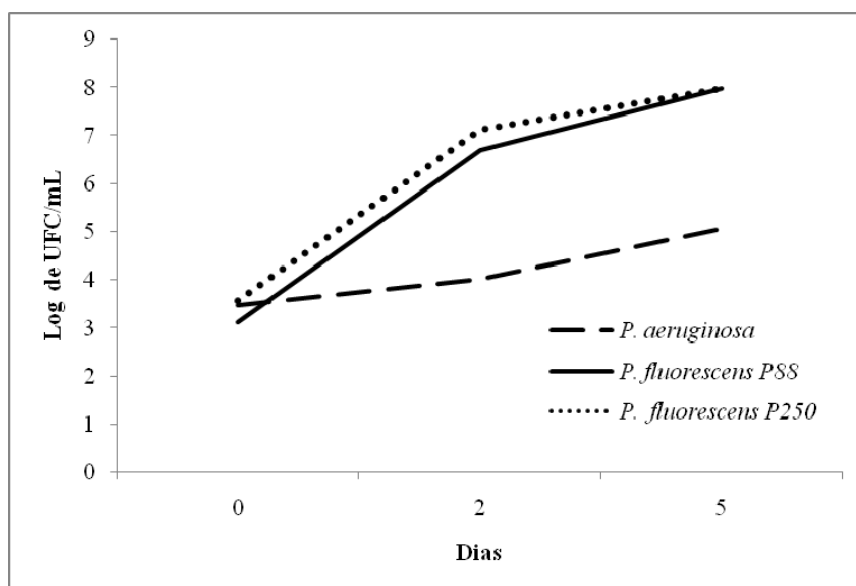
**Figura 10.** Ação proteolítica a 7 °C: (a) *P. aeruginosa* após 16 d; (b) *P. fluorescens* P88 após 6 d; (c) *P. fluorescens* P250 após 4 d.

Estes dados são importantes porque reforçam a informação que, apesar de fazer parte da microbiota do leite refrigerado e estar envolvida em casos de deterioração (MARKS; GRANDISON; LEWIS, 2001), a espécie *P. aeruginosa* não é capaz de pleno crescimento a esta temperatura (MUNSCH-ALATOSSAVA; ALATOSSAVA, 2006).

A mesma linhagem de *P. fluorescens* P88 foi utilizada por Silva (2005) e avaliada quanto à formação de halo de proteólise em temperaturas de 4, 7, 10 e 21 °C. A 4 °C o autor observou o aparecimento do halo entre o 7° e 8° d, já a 7 e a 10 °C no 4° d e a 21 °C entre o 2° e 3° d.

## 5.2 Crescimento das Culturas no Leite

Partindo-se de um inóculo de *ca* de  $10^3$  UFC/mL, considerado uma contaminação esperada para o leite, as diferentes *Pseudomonas* spp. utilizadas no experimento apresentaram curva de crescimento de população após 2 e 5 d a 7 °C conforme ilustrados na Figura 10.



**Figura 11.** Crescimento da população de *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* P88 e *P. fluorescens* P250 no decorrer de 2 e 5 d a 7 °C.



Os resultados obtidos do crescimento das culturas diferiram significativamente entre si ( $P < 0,05$ ) nos diferentes períodos para as três linhagens de *Pseudomonas* avaliadas (Tabela 1).

**Tabela 1.** Valores médios\* de log de UFC/mL de *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* P88 e *P. fluorescens* P250 inoculadas no leite e no decorrer de 2 e 5 d a 7 °C.

	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> P88	<i>Pseudomonas fluorescens</i> P250
	Log de UFC/ mL	Log de UFC/ mL	Log de UFC/ mL
0 d	3,48 <sup>c</sup>	3,12 <sup>c</sup>	3,58 <sup>c</sup>
2 d	4,03 <sup>b</sup>	6,71 <sup>b</sup>	7,14 <sup>b</sup>
5 d	5,07 <sup>a</sup>	7,99 <sup>a</sup>	7,99 <sup>a</sup>

\*Valores médios de três repetições. Médias de tratamentos com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Resultados similares foram obtidos por Pinto (2004) que, utilizando as estirpes 07A e 041 de *P. fluorescens* com inóculo inicial de  $10^4$  UFC/mL em leite desnatado reconstituído a 12% e mantido a 7 °C, obteve contaminações de  $10^8$  UFC/mL em 4 e 5 d, respectivamente.

Alguns autores comprovaram a presença significativa de bactérias do gênero *Pseudomonas* spp. em leite cru recém-ordenhado, assim como a sua capacidade de multiplicação. Dentre eles, Fagundes et al. (2006) que, ao coletarem leite de propriedades consideradas com higiene adequada, obtiveram contagens de  $7,33 \times 10^3$  UFC/mL para leite recém-ordenhado e  $1,02 \times 10^4$  UFC/mL após refrigeração a 5-8 °C durante 48 h. Já para propriedades consideradas com higiene inadequada, os autores encontraram populações de  $1,08 \times 10^5$  UFC/mL para o leite recém-ordenhado e  $1,6 \times 10^5$  UFC/mL para o leite refrigerado nas mesmas condições.

Pinto, Martins e Vanetti (2006) também encontraram média de contagens de *Pseudomonas* spp. igual a  $2,8 \times 10^5$  UFC/mL em amostras de leite cru coletadas de tanques individuais,  $1,3 \times 10^5$  UFC/mL de tanques coletivos e  $2,0 \times 10^6$  UFC/mL de silo industrial, o que reforça a importância do controle das condições de higiene na ordenha, na tentativa de diminuir a ocorrência deste importante deteriorante.

Segundo Arcuri (2003), *Pseudomonas* spp. isoladas de leite cru que demonstram crescimento rápido no leite apresentam tempo de geração entre 8 e 12 h a 3 °C e entre 5,5 e 10,5 h em temperaturas entre 3 e 5 °C, o que é suficiente para causar deterioração em leite com, inicialmente, apenas uma UFC/mL em um período de 5 d.

Silva (2005), ao fazer o isolamento de bactérias psicrotróficas de 20 amostras de leite coletadas em tanques comunitários e 23 em tanques individuais de propriedades situadas na Zona da Mata (MG) e região Sudeste do RJ, encontrou 43% de *Pseudomonas* spp., sendo *P. fluorescens* a espécie predominante (37,6%). Adicionalmente, o autor verificou qualitativamente a atividade proteolítica e lipolítica de *Pseudomonas* spp. a 4, 7, 10 e 21 °C, e comprovou que 60,57% destes microrganismos apresentaram atividade proteolítica e lipolítica em todas as temperaturas estudadas.

Quanto a *P. aeruginosa*, Iramain et al. (2005) ao coletarem amostras de água e leite em 122 propriedades leiteiras na Argentina, apesar de não terem isolado *P. aeruginosa* no leite, encontraram este microrganismo em 27% das amostras de água coletadas em fontes subterrâneas e em 34% de amostras coletadas em tanques. Já Grover e Srinivasan (1988) isolaram *P. aeruginosa* em 19 de 21 amostras de leite cru coletadas na Índia, assim como em

1 de 20 de leite pasteurizado, em 19 de 20 de creme de leite cru, em 4 de 20 de manteiga, em 16 de 20 de paneeir<sup>3</sup> e em 14 de 20 de sorvete.

Considerando que as linhagens de *P. fluorescens* utilizadas neste trabalho apresentaram crescimento considerável nas condições de tempo e temperatura utilizados, percebe-se que são corretas as medidas preconizadas pela IN 51<sup>4</sup> do MAPA com relação ao binômio tempo e temperatura de manutenção do leite desde a ordenha até o seu processamento, podendo a temperatura de 4 °C ser mais eficiente do que a de 7 °C no controle da microbiota psicotrófica.

Vale ressaltar que, nas regiões Sul, Sudeste e Centro-oeste do Brasil ficou estabelecido que entre os meses de jul. de 2008 e jul. de 2011, a Contagem Padrão em Placas (CPP) dos leites oriundos dos tanques de refrigeração deve apresentar máximo de  $7,5 \times 10^5$  UFC/mL de aeróbios mesófilos, mas não se especificou os limites para as contagens de psicotróficos (BRASIL, 2002).

### 5.3 Atividade de Proteases

A atividade de proteases no leite mantido a 7 °C foi pouco expressiva, mesmo no período de 5 d (Tabela 2). Para *P. aeruginosa* verificou-se pouca variação entre a atividade das enzimas produzidas durante 2 e 5 d. Já para *P. fluorescens* P88 e P250, a ausência de significância entre os resultados obtidos foi devido ao alto desvio padrão dos resultados observados no teste.

**Tabela 2.** Valores médios\* de atividade de proteases produzidas por *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* P88 e *P. fluorescens* P250 no decorrer de 2 e 5 d a 7 °C, após tratamento térmico (100 °C/5 min).

	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> P88	<i>Pseudomonas fluorescens</i> P250
2 d	0,25 <sup>a</sup>	0,3 <sup>a</sup>	0,3 <sup>a</sup>
5 d	0,3 <sup>a</sup>	3,2 <sup>a</sup>	1,4 <sup>a</sup>

\*Valores médios de três repetições, realizadas, cada uma, em triplicata. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir aumento na absorvância de 0,01/h. Médias de tratamentos com letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Considerando as populações alcançadas para cada microrganismo neste trabalho e comparando com resultados obtidos por outros pesquisadores, percebe-se certa similaridade de resultados. É o caso de Cardoso (2006) que, ao estocar o leite cru a 10 °C observou que ao final de 4 d de estocagem a população de bactérias psicotróficas proteolíticas foi de  $1,2 \times 10^8$  UFC/mL e que esta população não foi suficiente para aumentar, acentuadamente, a concentração de proteases no leite.

<sup>3</sup> Tipo de queijo popular na Índia.

<sup>4</sup> De acordo com ela, o leite deve atingir, em até 3 h após o término da ordenha, temperatura igual ou inferior a 4 °C quando se trata de tanques que refrigeração que utilizam o princípio de expansão direta ou igual ou inferior a 7 °C quando se trata de tanques que utilizam princípio de imersão. Também preconiza que o leite seja encaminhado ao estabelecimento processador em até 48 h após a ordenha, mas recomenda como ideal período de tempo não superior a 24 h (BRASIL, 2002).



No entanto, para Costa et al. (2002 apud CARDOSO, 2006), uma população de  $10^7$  UFC/mL de *P. fluorescens* resultou em aumento considerável, de até 500%, na atividade proteolítica em leite estocado a 6 °C.

Pinto (2004) avaliou o grau de proteólise, baseado em concentrações de tirosina (mg/5 mL), em leite desnatado reconstituído 12% inoculado com dois isolados de *P. fluorescens* (07A e 041) e verificou que as concentrações permaneceram constantes até que a população bacteriana atingisse  $10^8$  UFC/mL, o que coincidiu com o início da fase estacionária de crescimento nas temperaturas de 2, 4, 7 e 10 °C.

Pinto (2005) afirma que a produção de proteases por *P. fluorescens* 07A em seis meios de cultivo, inclusive leite desnatado reconstituído a 12%, ocorreu apenas quando a cultura atingiu o final da fase logarítmica de crescimento e apresentou alta densidade populacional, ou seja, entre  $10^8$  e  $10^9$  UFC/mL.

Kohlmann et al. (1991) selecionaram uma linhagem de *P. fluorescens* e uma de *P. fragy* a partir das suas capacidades em crescer em temperatura de refrigeração e produzir proteases em leite desnatado reconstituído. Estas culturas foram inoculadas no leite e, de acordo com estes autores, começaram a produzir proteases extracelulares somente após 7 d de manutenção a 7 °C, quando as culturas entraram no fim da fase log e início da fase estacionária. Já as proteases intracelulares foram detectadas em apenas 20 h em outros trabalhos desenvolvidos com as mesmas culturas.

Griffiths (1989), Rajmohan, Dodd e Waites (2002) e Suhren (1989) também afirmam que um aumento significativo na produção de enzimas hidrolíticas por bactérias psicotróficas ocorre somente no final da fase logarítmica ou início da fase estacionária de crescimento.

Diferentes autores afirmam que leites com contagens de psicotróficos na ordem de  $10^6$  UFC/mL podem conter enzimas em quantidade suficiente para causar problemas no produto final, como diminuição no rendimento de queijos (CARDOSO, 2006), geleificação do leite UHT (PINTO; MARTINS; VANETTI, 2006) e desenvolvimento de gosto amargo em diferentes tipos de queijo e no próprio leite UHT (STEPANIAK; SØRHAUG, 1995). Mitchell e Ewings (1985 apud LE, DATTA E DEETH, 2006) comentam que baixas concentrações de enzimas são suficientes para causar degradações indesejáveis no leite UHT durante o período de armazenamento em temperatura ambiente. Portanto, é possível que estas concentrações de enzima possam estar abaixo do nível de detecção das técnicas convencionalmente utilizadas para avaliação da atividade de proteases nesta ordem de crescimento.

#### **5.4 Índice de Caseinomacropeptídeo (CMP) no Leite Contaminado**

O leite UHT ao ser encaminhado para prova oficial, congelado, deve ter, segundo normas internas do LANAGRO, no máximo, 2 d de fabricação. É considerado apto ao consumo quando apresenta concentrações de CMP inferiores a 30 mg/L. Pode ser destinado a fabricação de derivados lácteos quando encontra-se com concentrações de CMP entre 30 e 75 mg/L, ou ser destinado à alimentação animal, à indústria química ou outro destino avaliado tecnicamente pelo DIPOA quando apresenta concentração de CMP acima de 75 mg/L (BRASIL, 2006b).

As concentrações de CMP (mg/L) presentes nos leites mantidos durante 2 e 5 d a 7 °C, tratados termicamente após este período (tempo 0) e incubados a 30 °C durante 30 d (tempo 30) encontram-se na Tabela 3.

**Tabela 3.** Valores médios\* de concentração de CMP (mg/L) nos leites inoculados com *Pseudomonas* spp. e mantidos durante 2 e 5 d a 7 °C, tratados termicamente após este período (tempo zero d) e incubados a 30 °C durante 30 d (tempo 30 d).

	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Pseudomonas fluorescens</i> P88		<i>Pseudomonas fluorescens</i> P250	
	CMP (mg/L)		CMP (mg/L)		CMP (mg/L)	
	zero d	30 d	zero d	30 d	zero d	30 d
Branco	117,4 <sup>bb</sup>	145,9 <sup>aa</sup>	117,4 <sup>ba</sup>	145,9 <sup>ba</sup>	117,4 <sup>ba</sup>	145,9 <sup>ba</sup>
2 d	125,5 <sup>ab</sup>	134,3 <sup>ba</sup>	124,2 <sup>ba</sup>	135,8 <sup>ba</sup>	123,7 <sup>ba</sup>	158,8 <sup>ba</sup>
5 d	125,2 <sup>ab</sup>	136,3 <sup>ba</sup>	988,1 <sup>aa</sup>	462,2 <sup>ab</sup>	1024,4 <sup>aa</sup>	519,6 <sup>ab</sup>

\*Valores médios de três repetições. Médias de tratamentos com letras diferentes minúsculas na mesma coluna, assim como maiúsculas na mesma linha, diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, para cada microrganismo.

O leite utilizado neste experimento estava dentro do período de validade. Apesar disso, o branco (não inoculado) apresentou concentrações elevadas de CMP, possivelmente por ter sido adquirido no comércio e não segundo as normas do LANAGRO para essa determinação, ou seja, leite recentemente processado, colhido na própria indústria. Mesmo assim, conseguiu-se verificar acréscimo nos níveis de CMP nos leites inoculados com *Pseudomonas* spp.

De acordo com os dados apresentados, percebe-se que *P. aeruginosa* não apresentou diferença significativa entre as concentrações de CMP do leite mantido durante 2 e 5 d a 7 °C, para os tempos 0 e 30. Apresentou, porém, diferença significativa em relação ao branco. Por outro lado, os resultados dos índices de CMP das linhagens de *P. fluorescens* P88 e P250 após 5 dias de incubação a 7 °C foram significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ) dos de 2 dias de incubação e do branco não inoculado, tanto no tempo zero como após 30 d de armazenamento a 30 °C. Para *P. fluorescens*, as concentrações de CMP no tempo zero foram maiores que após 30 dias para o tratamento 5 d.

De acordo com Payens (1978 apud DATTA; DEETH, 2001), as proteases produzidas por bactérias psicrotróficas agem sobre a caseína de forma semelhante à quimosina, liberando, portanto, o CMP. Apresentam, porém, menor especificidade pela ligação 105-106. A mesma colocação foi feita por Recio et al. (2000a), quando separaram os principais peptídeos oriundos da ação de proteases de bactérias psicrotróficas sobre a  $\kappa$ -caseína por cromatografia de fase reversa e eletroforese capilar e os identificaram por espectrometria de massa.

Os resultados obtidos por Recio et al. (2000a, b) vão ao encontro dos resultados obtidos neste experimento, onde houve diminuição significativa do índice de CMP após incubação a 30 °C/30d, quando comparado ao tempo zero, para ambas as linhagens de *P. fluorescens* que permaneceram, previamente ao tratamento térmico, 5 d a 7 °C. Este fenômeno pode, portanto, ser atribuído a alta concentração e/ou atividade das enzimas produzidas durante o período de refrigeração e que, devido à baixa especificidade, passaram a degradar o próprio CMP. Resultados parecidos foram obtidos também por outro autor brasileiro (informação verbal)<sup>5</sup>.

Benitez, Ponce e Noa (2001) analisaram 13 amostras de leite em pó pelo mesmo método utilizado neste trabalho (HPLC com filtração em gel) e encontraram concentrações menores que 1% (v/v) de soro de queijo em três delas.

<sup>5</sup> Informação fornecida pelo Prof. Sebastião César Cardoso Brandão (Depto. de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa) de trabalho ainda não publicado, por telefone, em jan. 2009.

Martínez-Penagos et al. (1993), considerando a ação de bactérias psicrotróficas sobre a  $\kappa$ -caseína que, produzindo peptídeos similares ao GMP pode levar a resultados falso-positivos para a fraude por adição de soro de queijo ao leite, incubaram leite cru por 4 e 7 d a 7 °C, além de adicionar 4,6% de soro de queijo em leite UHT comercial. Todas estas amostras foram submetidas à avaliação do índice de GMP por HPLC em coluna gélida (A) e HPLC em fase reversa (B). Os autores concluíram que o método A foi mais susceptível a interferência de outros peptídeos do que o método B e recomendaram o método B como forma de confirmar amostras positivas no teste A. Com base em trabalhos com este, o método oficial da União Européia para a determinação da adição de soro preconiza uma prova de triagem realizada através de HPLC por filtração em gel e a confirmação por HPLC em fase reversa (EC REGULATION, 2001).

Vilela (1987) utilizou a técnica SDS-PAGE com tampão Tris-Glicina e concluiu que o método foi sensível para detectar adições menores que 0,5% de soro de queijo ao leite pasteurizado e em pó, além de não sofrer interferência quando aplicado em leite refrigerado.

Segundo Creamer (1991 apud PARDO; NATALUCCI, 2002), as técnicas eletroforéticas normalmente utilizadas para os estudos das proteínas do leite (SDS-PAGE, Uréia-PAGE ácida ou alcalina) não conseguem separar claramente os componentes da caseína e, no caso de leite com caseína hidrolisada, somente os peptídeos maiores podem ser visualizados adequadamente. Por este motivo, Pardo e Natalucci (2002) analisaram peptídeos oriundos da caseína bovina através das técnicas Uréia-PAGE e Tricina-SDS-PAGE e concluíram que a separação de bandas no eletroforegrama na Tricina-SDS-PAGE foi melhor e estas puderam ser prontamente detectadas e quantificadas, até mesmo os peptídeos de baixo peso molecular, o que, para eles, são produtos de degradação com alta mobilidade eletroforética e que não podem ser detectados em uma única etapa por outros métodos. Além disso, os autores afirmaram que na Uréia-PAGE a  $\kappa$ -caseína não foi detectada.

Rodríguez López et al. (2001) também testaram métodos eletroforéticos com os tampões Tris-Tricina e Tris-Glicina para detectar GMP em amostras de soro de queijo (positiva) e leite cru recém ordenhado (negativa). Observaram uma fração proteica no soro inexistente no leite, o que afirmaram se tratar do GMP. Além disso, comprovaram que o com Tris-Tricina apresentou melhor resolução do que o com Tris-Glicina.

Apesar de Creamer (1991) afirmar que SDS-PAGE não é eficaz para peptídeos menores, no México, Montáñez et al. (2000) avaliaram a presença de CMP através desta técnica em 108 amostras de leite em pó e obtiveram 14,81% de amostras positivas para fraude por adição de soro. De acordo com estes autores, o trabalho foi realizado com leite em pó para descartar a possibilidade da atividade proteolítica de organismos psicrotróficos, comuns em leite fluido. Para isso se basearam na afirmação de Martínez-Penagos (1993) de que a ação de proteases de bactérias psicrotróficas como *Pseudomonas* spp. poderiam produzir resultados falso-positivos quando se trata de leite cru refrigerado, e afirmaram que esta atividade proteolítica não se apresenta em leite desidratado devido, principalmente, aos requerimentos de umidade destes microrganismos e sem o qual, não é possível a sua proliferação. Pelo que se observa, esta afirmativa não considera a qualidade do leite previamente ao processo de atomização.

Neste mesmo país e utilizando a mesma técnica (SDS-PAGE), Urbán et al. (2002) encontraram esta adulteração em 13,76% de amostras de leite cru (n= 138), em 57,1% de amostras de leite pasteurizado (n= 84) e em 37,5% de amostras de leite UHT (n= 96), sendo as amostras de leite processado coletadas em pontos de venda. Estes autores mencionaram a ação de bactérias psicrotróficas e afirmaram que esta técnica não apresenta esta interferência, se baseando também nos resultados de Urbán et al. (1998).

Urbán et al. (1998) inocularam *P. aeruginosa* no leite recém pasteurizado e mantiveram durante 72 h a 6 °C e, utilizando SDS-PAGE, afirmaram que a detecção de CMP

proveniente do soro de queijo por esta metodologia não apresenta interferência da ação de bactérias psicrotróficas.

Os níveis de CMP também foram analisados por Reyes et al. (2007) em oito marcas (n= 288) de leite pasteurizado adquiridos no comércio da cidade de Aguascalientes (México) utilizando SDS-PAGE, espectrofotometria de luz visível e HPLC por filtração em gel. Encontraram 31,6 ± 3,2% de amostras positivas, com média de 6,5 ± 0,47% de soro adicionado. Estas amostras foram recolhidas mensalmente durante 12 meses e, por isso, os autores relacionaram os dados obtidos do índice de CMP com as estações verão e inverno e concluíram que a adição fraudulenta de soro de queijo possuía uma tendência estacional, com maior frequência e concentração no inverno. Estes autores não mencionaram a ação de bactérias psicrotróficas.

Galindo-Amaya, Valbuena-Colmenares e Rojas-Villaruel (2006) avaliaram, também por SDS-PAGE, 15 amostras de leite pasteurizado e cinco de leite em pó comercializados na Venezuela. Encontraram GMP em 10 amostras de leite pasteurizado de quatro marcas diferentes.

Martín-Hernández et al. (2008) desenvolveram uma fita colorimétrica (cGMP®, Operon, s.a, Zaragoza, Espanha<sup>6</sup>) capaz de realizar a detecção de GMP de forma rápida, portanto, de fácil emprego em plataformas de recebimento de laticínios. Os testes foram realizados em leite cru, pasteurizado, UHT e em pó reconstituído adicionados de 0, 1, 2, 4 e 16% de soro de queijo em pó reconstituído. A sensibilidade apresentada por este teste foi de ≥ 4% de soro de queijo adicionado, no entanto, os autores reconhecem a sua limitação, quando realizado em leite de qualidade microbiológica ruim.

## 5.5 Correlação entre log de UFC/mL e CMP (mg/L)

Os coeficientes de correlação entre UFC/mL e CMP (mg/L) encontram-se na Tabela 4.

**Tabela 4.** Coeficiente de correlação linear de Pearson entre log de UFC/mL e CMP (mg/L) para *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* P88 e *P. fluorescens* P250 após 2 e 5 d/7 °C.

		2 d	5 d
		CMP (mg/L)	CMP (mg/L)
<i>P. aeruginosa</i>	Log de UFC/mL	0,700	0,594
<i>P. fluorescens</i> P88	Log de UFC/mL	0,819*	0,960*
<i>P. fluorescens</i> P250	Log de UFC/mL	0,811	0,998*

\*Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Observa-se que a espécie *P. aeruginosa* não apresentou correlação significativa entre as variáveis estudadas em ambos os períodos. Já a linhagem P88 de *P. fluorescens* apresentou correlação significativa nos dois períodos estudados e a P250 apresentou correlação forte após 2 d e significativa após 5 d.

Estes dados também evidenciaram que melhor adaptação da *P. fluorescens* P88 e P250 nas condições a que foram submetidas proporcionou aumento paralelo das variáveis UFC e

<sup>6</sup> www.operon.es

CMP, já a situação contrária, observada através do comportamento de *P. aeruginosa*, ressalta que, mesmo após o crescimento da população de um ciclo log (entre 2 d e 5 d), a produção de enzimas não ocorreu de modo a aumentar significativamente a concentração de CMP. A cultura de *P. aeruginosa* ainda apresentava-se, no 5º d de refrigeração, em plena fase exponencial.

### 5.6 Índice de Caseinomacropéptido (CMP) no Leite Fraudado

As concentrações de CMP (mg/L) no leite fraudado propositalmente com soro de queijo encontram-se na Tabela 5.

**Tabela 5.** Concentração de CMP (mg/L) nas diferentes porcentagens de soro de queijo adicionado ao leite.

% de soro adicionado	CMP (mg/L)
0	146,5
2	186,5
5	207,4
10	280,1
15	345,1
20	424,6
25	469,4
30	541,2

A análise da tabela revela que o leite, mesmo adicionado de 30% de soro de queijo, apresentou concentração de CMP (541,2 mg/L) inferior ao leite contaminado com *P. fluorescens* P88 e P250 e mantido durante 5 d a 7 °C (988,1 e 1024,2 mg/L, respectivamente).

## 6 CONCLUSÕES

- A estocagem do leite contaminado com *P. fluorescens* por 2 d/7 °C, mesmo propiciando o seu desenvolvimento, com contagens superiores a  $1 \times 10^6$  UFC/mL, não resultou em aumento significativo do índice de CMP;
- A estocagem do leite contaminado com *P. fluorescens* por 5 d/7 °C resultou em aumento significativo do índice de CMP antes do processamento e após 30 d de sua vida-de-prateleira, confirmando que, nestas condições, este índice não deve ser utilizado como único critério indicador de fraude por adição de soro de queijo ao leite. Ressalta-se ainda que, após os referidos 30 d houve redução de aproximadamente 50% desse índice, possivelmente em função da ação das próprias proteases bacterianas que o originaram, o que demonstra que a exigência do MAPA de que as amostras de leite UHT sejam coletadas, congeladas e encaminhadas para análise oficial no prazo máximo de 2 d do processamento é sensata, pois reduz a possibilidade de erro;
- O teste de atividade de proteases utilizando como substrato a azocaseína mostrou-se pouco sensível para avaliar enzimas produzidas no leite por *P. fluorescens* com população de até  $10^8$  UFC/mL;
- Na simulação de fraude pode ser constatado que, mesmo com adição de 30% de soro de queijo ao leite o aumento na concentração de CMP foi apenas cerca da metade do obtido após inoculação de *P. fluorescens* e incubação durante 5 d/7 °C;
- O índice de CMP analisado segundo a IN 68 (BRASIL, 2006) mostrou-se extremamente eficiente na determinação da proteólise bacteriana, podendo vir a ser utilizado como teste preditivo da vida-de-prateleira do leite UHT;
- O índice de CMP analisado segundo a IN 68 (BRASIL, 2006) pode servir de critério para orientação de políticas públicas e do setor industrial para planejamento e ações de melhoria da qualidade do leite (higiene operacional, higienização na ordenha, coleta, transporte e recepção) visando o controle da contaminação inicial com bactérias psicotróficas com potencial proteolítico;
- A estocagem do leite em temperaturas inferiores a 7 °C poderia conter de forma mais satisfatória o desenvolvimento de bactérias psicotróficas.

## 7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Determinar o potencial proteolítico de outras linhagens de *P. fluorescens*, assim como de outros microrganismos psicrotróficos comuns no leite refrigerado, combinados ou em cultura axênica, e a implicação da sua presença e crescimento no teste de detecção fraudulenta de soro de queijo ao leite, utilizando como branco leite de qualidade satisfatória e recém processado, portanto, com índice de CMP tendendo a zero;
- Determinar possíveis diferenças no índice de CMP de leites fraudados com soros obtidos a partir da ação de coalhos contendo diferentes enzimas proteolíticas;
- Desenvolver um método rápido de detecção de soro de queijo em leite, que possa ser utilizado como forma de triagem por fiscais do MAPA no exercício de suas funções;
- Desenvolver metodologia capaz de detectar apenas o CMP oriundo da ação da quimosina e outras enzimas coagulantes.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, D. M.; BARACH, J. T.; SPECK, L. Effect of psychrotrophic bacteria from raw milk on milk proteins and stability of milk proteins to ultrahigh temperature treatment. **Journal of Dairy Science**, v.59, n.5, p.823-827, 1976.

AGÊNCIA BRASIL. **Laudo da Polícia Federal confirma adulteração em leite da operação Ouro Branco**. Disponível em:

<<http://www.agenciabrasil.gov.br/noticias/2007/12/04/materia.2007-12-04.2838356304/view>>. Acesso em: 01 mar. 2008.

ALAIS, C. XIV International Dairy Congress. II. pp. 823-828, 1956.

ALLEN, M. B. The thermophilic aerobic sporeforming bacteria. **Bacteriol. Rev.**, v. 17, p. 125-173, 1953.

ALMEIDA, W. M. **Principais fraudes em produtos de origem animal**. 2007. Disponível em: <

[http://www.google.com/search?q=cache:Md14WO1pTzYJ:https://www.defesa.gov.br/eventos\\_s\\_temporarios/2007/sem\\_alimentacao/palestras/FRAUDES\\_POA%2520%2520.ppt+fraudes+em+produtos+de+origem+animal&hl=pt-BR&ct=clnk&cd=1&gl=br](http://www.google.com/search?q=cache:Md14WO1pTzYJ:https://www.defesa.gov.br/eventos_s_temporarios/2007/sem_alimentacao/palestras/FRAUDES_POA%2520%2520.ppt+fraudes+em+produtos+de+origem+animal&hl=pt-BR&ct=clnk&cd=1&gl=br)>. Acesso em: 01 mar. 2008.

ANTUNES, V. C. et al. Contagem total de microrganismos mesófilos e psicrotróficos no leite cru e pasteurizado transportado via latão ou granelizado. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. Juiz de Fora, v. 57, n. 327, p. 199, jul./ago. 2002.

ARCURI, E. F. Influência de bactérias psicrotróficas na qualidade do leite e produtos lácteos. In: BRITO, J. R. F; PORTUGAL, J. A. B. **Diagnóstico da qualidade do leite, impacto para a indústria e a questão dos resíduos de antibióticos**. 1º ed. Juiz de Fora: Templo Gráfica e Editora, p. 105-115, 2003.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE LEITE LONGA VIDA (ABLV). **Leite longa vida**. 2007a. Disponível em: <<http://www.ablv.org.br/leiteLongaVida/index11.html>>. Acesso em 07 fev. 2008.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE LEITE LONGA VIDA (ABLV). **A verdade do leite começa a aparecer**. 2007b. Disponível em <http://www.averdadesobreleite.org.br/verdade-comeca-a-aparecer/>. Acesso em 07 fev. 2008.

BANKS, W.; DALGLEISH, D. G.; ROOK, J. A.F. In: ROBINSON, R. K. **Dairy Microbiology**. Londres: Applied Science Publishers LTD., 1981. v. 1, cap. 1. ISBN: 0-85334-948-7.

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Introdução à química dos alimentos**. 2º ed. São Paulo: Varela, 1992.



BENITEZ, E.; PONCE, P.; NOA, M. Detection of rennet whey in powder milk by gel filtration high performance liquid chromatography (GFC-HPLC). **Revista de Salud Animal**, v. 23, n. 1, p. 27-31, 2001.

BRASIL. Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952. Aprova o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 07 jul. 1997. Seção 1, p. 10785.

BRASIL. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Aprova os Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite tipo B, do Leite tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 20 set. 2002, Seção 1, Página 13.

BRASIL. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água, determinando que sejam utilizados no Sistema de Laboratório Animal do Departamento de Defesa Animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 set. 2003, Seção 1, Página 14.

BRASIL. Instrução Normativa nº 16, de 23 de agosto de 2005. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebida Láctea. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 24 ago. 2005, Seção 1, Página 7.

BRASIL. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos, determinando que sejam utilizados nos Laboratórios Nacionais Agropecuários. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 14 dez. 2006a, Seção 1, Página 8.

BRASIL. Instrução Normativa nº 69, de 13 de dezembro de 2006. Institui Critério de Avaliação da Qualidade do Leite in natura, Concentrado e em Pó, Reconstituídos, com base no Método Analítico Oficial Físico-Químico denominado “Índice CMP”, de que trata a Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 15 dez. 2006b, Seção 1, Página 67.

BRASIL. Lei nº 9677, de 02 de julho de 1998. Altera dispositivo do Capítulo III do Título VIII do Código Penal, incluindo na classificação dos delitos considerados hediondos crimes contra a saúde pública, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 03 jul. 1998.

BRASIL. Portaria nº 370, de 04 de setembro de 1997. Aprova a inclusão do citrato de sódio no Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do leite UHT (UAT). **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 08 set. 1997. Seção 1, p. 19700.

BREMER, M. C. E. G. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine rennet whey powder in milk powder and buttermilk powder. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 294-302, 2008.

BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; PORTUGAL, J. A. B. Identificação de contaminantes bacterianos no leite cru de tanques de refrigeração. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Anais do XIX Congresso Nacional de Laticínios, v. 57, p. 83-88, 2002.

BRUM, J. V. F.; GONÇALVES, N. B.; MASSON, M. L. Pesquisa de microrganismos psicrotróficos em leite cru produzido nos estados do Paraná e Santa Catarina. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Anais do XXI Congresso Nacional de Laticínios, v. 59, p. 150-154, 2002.

CAMARGO, D. S. et al. Bebida fermentada à base de soro de leite e isolado protéico de soja. **Semina**, v. 21, p. 45-51, 2000.

CARDOSO, R. R. **Influência da microbiota psicrotrófica no rendimento de queijo minas frescal elaborado com leite estocado sob refrigeração**. 2006. 57 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG, 2006.

CARVALHO, B. M. A. et al. Métodos de detecção de fraude em leite por adição de soro de queijo. **REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria**. v. 8, n. 6, 2007.

COGAN, T. M. A review of heat resistance lipases and proteinases and the quality of dairy products. **Irish J. Food Sci. Technol.** v. 1, p. 95-105, 1977.

COSTA, L. M. et al. Purificación y caracterización de proteasas de *Pseudomonas fluorescens* y sus efectos sobre las proteínas de la leche. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 52, p. 1-13, 2002.

COTON, S. G. Whey resources and utilization. **J. Soc. Dairy Technol.**, v. 38, p. 97-100, 1985.

COUSIN, M. A. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review. **J. Food Protect.**, v. 45, p. 172-207, 1982.

COUSIN, C. M.; BRAMLEY, A. J. The microbiology of raw milk. In: ROBINSON, R.K. **Dairy Microbiology**. Londres: Applied Science Publishers LTD., 1981. v. 1, cap. 4. ISBN: 0-85334-948-7.

CREAMER, L. K. Electrophoresis of cheese. **Bulletin of the IDF** 26, p. 14-28, 1991.

CROMIE, S. Psychrotrophs and their enzyme residues in cheese milk. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v. 47, p. 96-100, 1992.

DATTA, N.; DEETH, H. C. Age gelation of UHT milk – A review. **Trans IChemE**, v. 79, Part C, p. 197-210, 2001.

DESMASURES, N.; GUEGUEN, M. Monitoring the microbiology of high quality by monthly sampling over 2 years. **Journal of Dairy Research**. V.64, p. 271-280, 1997.

EC REGULATION nº 213/2001. Methods for the analysis and quality evaluation of the milk and the milk products. **Official Journal of the European Communities**, L037, p. 1-99, 2001.

EWINGS, K. N.; O'CONNOR, R. E.; MITCHELL, G. E. Proteolytic microflora of refrigerated raw milk in south east Queensland. **The Australian Journal of Dairy Technology**, Jun., p. 65-68, 1984.

FAGUNDES, C. M. et al. Presença de *Pseudomonas* spp. em função de diferentes etapas da ordenha com distintos manejos higiênicos e no leite refrigerado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 2, p. 568-572, 2006.

FAIRBARN, D. J.; LAW, B. A. Proteinases of psychrotrophic bacteria: their production, properties, effects, and control. **J. Dairy Res.**, v. 53, p. 139-177, 1986.

FELÍCIO, P. E. Adulteração do leite mostra que é hora de investir no Sistema de Inspeção Sanitária Federal. **Revista ABCZ**, Uberaba, n. 41, nov/dez., 2007, p. 77.

FOX, P. F. Chemistry of the caseins. In: **Advanced Dairy Chemistry – 1: Proteins**, 1. ed. London: Blackie Academic & Professional, 1992. cap.2, p.63-110.

FOX, P. F. Proteolysis during cheese manufacture and ripening. **J. Dairy Sci.**, 72:1379-1400, 1989.

FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. Milk proteins. In: **Dairy Chemistry and Biochemistry**. 1 ed. London: Blackie Academic & Professional, cap. 4 e 5, p. 146-264, 1998.

FUKUDA, S. P. **Estudo da correlação entre o método da ninidrina ácida e a cromatografia líquida de alta eficiência para dosagem de glicomacropéptido e caseinomacropéptido em leite**. 2003. 137 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP, 2003.

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

FURTADO, M. M.; LOURENÇO NETO, J. P. M. **Tecnologia de queijos: Manual técnico para a produção industrial de queijos**. São Paulo: Dipemar, p. 76-77, 1994.

FURTADO, M. A. M. **Caracterização de hidrolisados de proteína láctea co-precipitada**. 1999. 129 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos).- Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG, 1999.

GALINDO-AMAYA, L. M.; VALBUENA-COLMENARES, E.; ROJAS-VILLARROEL, E. Estandarización de la detección del glicomacropéptido por PAGE-SDS como índice de adulteración de leche. **Revista Científica**, FCV-LUZ, v. 16, n. 3, p. 308-314, 2006.

GAUGHRAN, E. R. I. The thermophilic microorganisms. **Bacteriol. Rev.**, v. 11, p. p. 189-225, 1947.

GILMOUR, A.; ROWE, M. T. Micro-organisms associated with milk. In: ROBINSON, R.K. **Dairy Microbiology**. Londres: Applied Science Publishers LTD., 1981. V. 1, cap. 2. ISBN: 0-85334-948-7.

- GRIFFITHS, M. W. Effect of temperature and milk fat on extracellular enzyme synthesis by psychrotrophic bacteria during growth in milk. **Milchwissenschaft**, v. 44, p. 539-543, 1989.
- GROVER, S.; SRINIVASAN, R. A. Isolation and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* from milk and milk products. **Indian Journal of Dairy Science**, v. 43, n. 3, p. 326-329, 1988.
- GUINEE, T. P.; WILKINSON, M. G. Rennet coagulation and coagulants in cheese manufacture. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v. 45, n. 4, p. 94-104, 1992.
- HEGG, C. De ânimo revigorado. Entrevista. Associação Brasileira das Indústrias de Queijo (ABIQ), jun. 2005. Disponível em:  
<[http://www.abiq.com.br/imprensa/artigos\\_detalhes.asp?id=18](http://www.abiq.com.br/imprensa/artigos_detalhes.asp?id=18)>. Acesso em: 07 fev. 2009.
- HORNE, D. S. Casein micelle structure: Models and muddles **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 11, p. 148-153, 2006
- INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). **Ecologia microbiana de los alimentos**. Factores que afectan a la supervivência de los microorganismos em los alimentos. Zaragoza - Espanha: Acribia, 1980. v.1 , 332 p. ISBN: 84-200-0519-3.
- IRAMAIN, M. S. et al. *Pseudomonas aeruginosa* in water and raw milk: preliminary report. **InVet-Investigacion Veterinaria**, v. 7, n. 1, p. 133-137, 2005.
- JASPE, A. et al. Cooling raw milk: change in the spoilage potential of contaminating *Pseudomonas*. **Journal of Food Protection**. V. 58, p. 915-921, 1995.
- JAY, M. J. **Microbiologia de Alimentos**. 6ª ed. - Porto Alegre: Artmed, 2005. 711 p.
- KOHLMANN, K.L. et al. Production of proteases by psychrotrophic microorganisms. **Journal of Dairy Science**. V. 74, p. 3275-3283, 1991.
- LE, T. X., DATTA, N.; DEETH, H.C. A sensitive HPLC method for measuring bacterial proteolysis and proteinase activity in UHT milk. **Food Research International**, v. 39, p. 823-830, 2006.
- LIZIEIRE, R. S.; CAMPOS, O. F. EMBRAPA Gado de Leite. **Instrução técnica para o produtor de leite: Soro de queijo “in natura” na alimentação do gado de leite**. 2006. ISSN nº 1518-3254
- LÓPEZ-FANDIÑO, R. et al. Proteolysis during storage of UHT milk: differences between whole and skim milk. **Journal of Dairy Research**, v. 60, p. 339-34, 1993a.
- LÓPEZ-FANDIÑO, R. et al. Application of reversed-phase HPLC to the study of proteolysis in UHT milk. **Journal of Dairy Research**, v. 60, p. 111-1167, 1993b.

LORENZETTI, D. K. **Influência do tempo e da temperatura no desenvolvimento de microrganismos psicrófilos no leite cru de dois estados da região sul**. 2006. 71 f. Dissertação (Mestrado) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, PR, 2006.

LOURENÇO, E. J. **Tópicos de proteínas de alimentos**. Jaboticabal, São Paulo: Ed. Funep, p. 179-231, 2000.

MARKS, N. E.; GRANDISON, A. S.; LEWIS, M. J. Challenge testing of the lactoperoxidase system in pasteurized milk. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 4, p. 735-741, 2001.

MARTÍN, A. **Un senador denuncia la manipulación fraudulenta de la leche a partir de suero de importación: El Ministerio de Sanidad ya ha tomado muestras en varias empresas lecheras**. 1988. Disponível em: <  
[http://www.elpais.com/articulo/sociedad/senador/denuncia/manipulacion/fraudulenta/leche/partir/suero/importacion/elpepisoc/19881111elpepisoc\\_14/Tes/](http://www.elpais.com/articulo/sociedad/senador/denuncia/manipulacion/fraudulenta/leche/partir/suero/importacion/elpepisoc/19881111elpepisoc_14/Tes/)>. Acesso em: 10/02/2008.

MARTÍNEZ-PENAGOS, A. et al. Influence of milk proteolysis on methods for detection of cheese whey. **Alimentaria**, v. 30, n. 243, p. 47-50, 1993.

MARTÍN-HERNÁNDEZ, C. et al. Immunochromatographic lateral-flow test strip for the rapid detection of added bovine rennet whey in milk and milk powder. **International Dairy Journal**, xxx, p. 1-4, 2008.

MATTA, A. A. ACP – Fraude do leite. 2003. Disponível em:  
<http://www.mp.rs.gov.br/consumidor/acoes/id977.htm>. Acesso em: 23 jan. 2008.

MCKELLER, R.C. **Enzymes of psychrotrophs in raw food**. CRC Press. Boca Raton, FL, 310 p. 1989.

MENDONÇA, A.H. et al. Qualidade microbiológica de leite cru resfriado: comparação de diferentes procedimentos e locais de coleta. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Anais do XVIII Congresso Nacional de Laticínios, v. 56, p. 282-288, 2001.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Blitz apreende 162,9 toneladas de produtos lácteos por adição proibida de soro ao leite**. 2003b.

Disponível em:  
<[http://extranet.agricultura.gov.br/pubacs\\_cons/ap\\_detalhe\\_noticia\\_cons\\_web?p\\_id\\_publicacao=4078&ds\\_palavra\\_chave=leite&dt\\_inicio\\_publicacao=01/01/1900&dt\\_fim\\_publicacao=31/12/9999](http://extranet.agricultura.gov.br/pubacs_cons/ap_detalhe_noticia_cons_web?p_id_publicacao=4078&ds_palavra_chave=leite&dt_inicio_publicacao=01/01/1900&dt_fim_publicacao=31/12/9999)>. Acesso em: 06 mar. 2008.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **MAPA e Polícia Federal desmontam quadrilha que fraudava leite em pó**. 2008. Disponível em: <  
[http://extranet.agricultura.gov.br/pubacs\\_cons/ap\\_detalhe\\_noticia\\_cons\\_web?p\\_id\\_publicacao=12084&ds\\_palavra\\_chave=operacao\\_lactose&dt\\_inicio\\_publicacao=01/01/1900&dt\\_fim\\_publicacao=31/12/9999](http://extranet.agricultura.gov.br/pubacs_cons/ap_detalhe_noticia_cons_web?p_id_publicacao=12084&ds_palavra_chave=operacao_lactose&dt_inicio_publicacao=01/01/1900&dt_fim_publicacao=31/12/9999)>. Acesso em: 26 mai. 2008.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **MAPA intensifica fiscalização do leite**. 2004. Disponível em: <[http://extranet.agricultura.gov.br/pubacs\\_cons/ap\\_detalhe\\_noticia\\_cons\\_web?p\\_id\\_publicacao=4868&ds\\_palavra\\_chave=leite&dt\\_inicio\\_publicacao=01/01/1900&dt\\_fim\\_publicacao=31/12/9999](http://extranet.agricultura.gov.br/pubacs_cons/ap_detalhe_noticia_cons_web?p_id_publicacao=4868&ds_palavra_chave=leite&dt_inicio_publicacao=01/01/1900&dt_fim_publicacao=31/12/9999)>. Acesso em: 06 mar. 2008.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **MAPA interdita laticínio que adulterava leite para merenda escolar**. 2003a. Disponível em: <[http://extranet.agricultura.gov.br/pubacs\\_cons/ap\\_detalhe\\_noticia\\_cons\\_web?p\\_id\\_publicacao=4037&ds\\_palavra\\_chave=leite&dt\\_inicio\\_publicacao=01/01/1900&dt\\_fim\\_publicacao=31/12/9999](http://extranet.agricultura.gov.br/pubacs_cons/ap_detalhe_noticia_cons_web?p_id_publicacao=4037&ds_palavra_chave=leite&dt_inicio_publicacao=01/01/1900&dt_fim_publicacao=31/12/9999)>. Acesso em: 06 mar. 2008.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Para entender o processo de fiscalização e o sistema de inspeção de leite**. 2007. Disponível em: <[http://extranet.agricultura.gov.br/pubacs\\_cons/ap\\_detalhe\\_noticia\\_cons\\_web?p\\_id\\_publicacao=10599&ds\\_palavra\\_chave=leite&dt\\_inicio\\_publicacao=01/01/1900&dt\\_fim\\_publicacao=31/12/9999](http://extranet.agricultura.gov.br/pubacs_cons/ap_detalhe_noticia_cons_web?p_id_publicacao=10599&ds_palavra_chave=leite&dt_inicio_publicacao=01/01/1900&dt_fim_publicacao=31/12/9999)>. Acesso em: 06 mar. 2008.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **MAPA publica medida para combater a fraude do leite**. 2006. Disponível em: <[http://extranet.agricultura.gov.br/pubacs\\_cons/ap\\_detalhe\\_noticia\\_cons\\_web?p\\_id\\_publicacao=9150&ds\\_palavra\\_chave=leite&dt\\_inicio\\_publicacao=01/01/1900&dt\\_fim\\_publicacao=31/12/9999](http://extranet.agricultura.gov.br/pubacs_cons/ap_detalhe_noticia_cons_web?p_id_publicacao=9150&ds_palavra_chave=leite&dt_inicio_publicacao=01/01/1900&dt_fim_publicacao=31/12/9999)>. Acesso em: 06 mar. 2008.

MITCHELL, G. E.; EWINGS, K. N. Quantification of bacterial proteolysis causing gelation in UHT-treated milk. **New Zealand Journal of Dairy Science and Technology**, v. 20, p. 65-76, 1985.

MONTÁÑEZ, C. D. A. et al. Detección de glucomacropéptido (GMP) como indicador de adulteración con suero de quesería em leche deshidratada. **Veterinaria Mexico**, v. 31, n. 3, p. 217-222, jul.-set., 2000.

MUIR, D.D. The shelf-life of dairy products: factors influencing raw and fresh products. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v.49, p. 24-32, 1996.

MUNSCH-ALATOSSAVA, P.; ALATOSSAVA, T. Phenotypic characterization of raw milk-associated psychrotrophic bacteria. **Microbiological Research**, v. 161, p. 334-346, 2006.

NIELSEN, S. S. Plasmin system and microbial proteases in milk: characteristics, roles and relationship. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 6628-6634, 2002.

PAYENS, T. A. J. On different modes of casein clotting; the kinetics of enzymatic coagulation compared. **Neth. Milk Dairy J.**, v. 32, n. 2, p. 170-183, 1978.

PARDO, M. F.; NATALUCCI, C. L. Electrophoretic analysis (Tricine-SDS-PAGE) of bovine caseins. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 21, n. 1, p. 57-60, 2002.

PEREIRA, L. S. et al. Metodologia analítica para detecção de fraude por adição de soro ao leite bovino. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v. 29, n. 3, jul./set. 2007.

- PERKS, B. Fighting food fraud with science. **Chemistry World**, v.4, n. 9, p. 48-52, 2007.
- PINTO, C. L. O.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. Bactérias psicrotróficas e importância de seu controle na cadeia produtiva do leite. **Informe Agropecuário**, v.28, n. 238, p. 29-37, mai/jun. 2007.
- PINTO, C. L. O.; MARTINS, M.L.; VANETTI, M.C.D. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicrotróficas proteolíticas. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 26 (3): 645-651, jul.-set. 2006.
- PINTO, C. L. O. et al. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicrotróficas proteolíticas. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 26(3): 645-651, jul.-set. 2006.
- PINTO, C. L. O. **Bactérias psicrotróficas proteolíticas do leite cru refrigerado granelizado destinado a produção de UHT**. 2004. 111 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG, 2004.
- PINTO, U. M. **Quorum sensing em bactérias psicrotróficas proteolíticas isoladas de leite**. 2005. 87 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG, 2005.
- RAJMOHAN, S.; DODD, C. E. R.; WAITES, W. M. Enzymes from isolates of *Pseudomonas fluorescens* involved in food spoilage. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 205-213, 2002.
- RECIO, I. et al. Characterization of peptides produced by the action of psychrotrophic on  $\kappa$ -casein. **Journal of Dairy Research**, v.67, n.4, p.625-630, 2000a.
- RECIO, I. et al. Detection of rennet whey solids in UHT milk by capillary electrophoresis. **International Dairy Journal**, v. 10, p. 333-338, 2000b.
- RECIO, I. et al. Study of the formation of caseinomacropetides in stored ultra-high-temperature-treated milk by capillary electrophoresis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 3845-3848, 1996.
- REYES, J. et al. Adulteración de leche pasteurizada con suero de quesería en la ciudad de Aguascalientes. **Avances en Investigación Agropecuaria**, v. 11, n. 2, p. 23-34, 2007.
- RICHARDS, N. S. P. S. Soro lácteo: perspectivas industriais e proteção ao meio ambiente. **Food Ingredients**, v.3, n.17, p.20-27, 2002.
- RODRÍGUEZ LÓPEZ, D. et al. Detección de adulteración de leche con suero de quesería por medio de um sistema tipo Elisa. In: XXVI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica, 2006. Guanajuato. **Anais...** Guanajuato: SMB, 2006.
- ROSE, A. H. Physiology of microorganisms at low temperature. **J. Appl. Bacteriol**, v.31, p. 1-11, 1968.

SANTANA, E. et al. Milk contamination in different points of the dairy process. Ii) mesophilic, psychrotrophic and proteolytic microorganisms. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 25, n. 4, p. 349-358, out./dez. 2004.

SANTOS, M. V.; LARANJA DA FONSECA, L.F. Importância e efeito de bactérias psicrotróficas sobre a qualidade do leite. **Hig. Aliment.**, v. 15, n. 82, p. 13-19, 2001.

SÂNZIO, R. **Leite terá teste preciso, diz Ministério**. 2007. Disponível em: <[http://www.cbql.com.br/index.php?option=com\\_content&task=view&id=696&Itemid=38](http://www.cbql.com.br/index.php?option=com_content&task=view&id=696&Itemid=38)>. Acesso em: 15 fev. 2009.

SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro do leite. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 17, n. 4, p. 379-409, out./dez., 2004.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradação, modificações**. São Paulo: Varela, 1996.

SGARBIERI, V. C. Revisão: propriedades estruturais e físico-químicas das proteínas do leite. **Braz. J. Food Technol.**, v. 8, n. 1, p. 43-56, jan./mar., 2005.

SHAH, N. P. Psychrotrophs in Milk: A review. **Milchwissenschaft**, v. 49, p. 432-437, 1994.

SILVA, P. D. L. **Avaliação, identificação e atividade enzimática de bactérias psicrotróficas presentes no leite cru refrigerado**. 2005, 119p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, 2005.

SILVA, P. H. F. **Leite UHT: fatores determinantes para sedimentação e geleificação**. 1º ed. Juiz de Fora: Templo Gráfica e Editora, 2004. 128 p. ISBN 85-904345-1-6

SMITHERS, G. W. Whey and whey proteins - From 'gutter-to-gold'. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 695-704, 2008.

SØRHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. **Trends in Food Science & Technology**, v. 8, p. 35-41, 1997.

SOUSA, M. R, P. **Higienização de equipamentos de ordenha mecanizada canalizada: diagnóstico de procedimentos tecnológicos**. 2005, 52p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2005.

SOUZA, M. R. et al. Avaliação da qualidade do leite resfriado, estocado em propriedades rurais por 48 horas e recebido emu na indústria de laticínios. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Anais do XVI Congresso Nacional de Laticínios, v. 54, p. 238-241, 1999.

STEPANIAK, L.; SØRHAUG, T. Thermal denaturation of bacterial enzymes in milk. In: **Heat Induced Changes in Milk** (Fox, P.F., ed.), p. 349-363, International Dairy Federation, Brussels, Belgium, 1995.



SUHREN, G. Producer microorganisms. In: MCKELLER, R.C. **Enzymes of psychrotrophs in raw food**. CRC Press. Boca Raton, Fl, 310 p. 1989.

TEIXEIRA, L. V.; FONSECA, L. M. Perfil físico-químico do soro de queijos mozzarella e minas-padrão produzidos em várias regiões do estado de Minas Gerais. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 60, n. 1, p. 243-250, 2008.

TIMM, C. D.; OLIVEIRA, D. S. **Nova legislação do leite no Brasil**. 2007. Disponível em: <<http://www.ufpel.tche.br/veterinaria/inspleite/documentos/prelo/legisla.pdf>>. Acesso em: 26 mar. 2008.

TULLIO, L. T.; KARKLE, E. N. L.; CÂNDIDO, L. M. B. Review: isolation and purification of milk whey glycomacopeptide. **B. CEPPA**, Curitiba, v. 25, n. 1, p. 121-132, 2007.

URBÁN, G. et al. Detección de adulteración con suero de queseria en leches fluidas mexicanas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). **Rev. Salud Anim.** V. 24, n. 1, p. 60-64, 2002.

URBÁN, G. et al. Separación por electroforesis (PAGE-SDS) del caseinomacropéptido liberado por quimosina sobre la  $\kappa$ -caseína. Efeito de proteólisis por bacterias psicrótrofas. **Agro sur**, v. 26, n. 2, Valdivia, jul., 1998.

VELLOSO, C. Celso Velloso: As ações do Ministério para o combate à fraude de leite no Brasil. Entrevista. **Milkpoint**, mai. 2003. Disponível em <<http://www.milkpoint.com.br/?actA=7&areaID=50&secaoID=126&noticiaID=8435>>. Acesso em: 22 jan. 2008.

VELOSO, A. C. V. et al. Detecção das adulterações em produtos alimentares contendo leite e/ou proteínas lácteas. **Quím. Nova**, v. 25, n. 4, p. 609-615, 2002.

VIDAL-MARTINS et al. Evolução do índice proteolítico e do comportamento reológico durante a vida de prateleira de leite UAT/UHT. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 24, n. 4, p. 698-704, 2005.

VIEIRA, S. **Análise de variância (ANOVA)**. São Paulo: Atlas, 2006. 204 p.

VILELA, S. C. **Deteccion de suero de queseria agregado a leche pasteurizada y leche en polvo. Determinacion del glicomacropéptido por eletroforesis**. 1987. Dissertação (Mestrado) - Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile, 1987.

WANG, L.; JAYARAO, B. M. Phenotypic and genotypic characterization of *Pseudomonas fluorescens* isolated from bulk tank milk. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 1421-1429, 2001.

WAUGH, D. F.; VAN HIPPEL, P. H. **Journal of the American Chemical Society**, 78, 4576-4582, 1956.

## 9 APÊNDICES

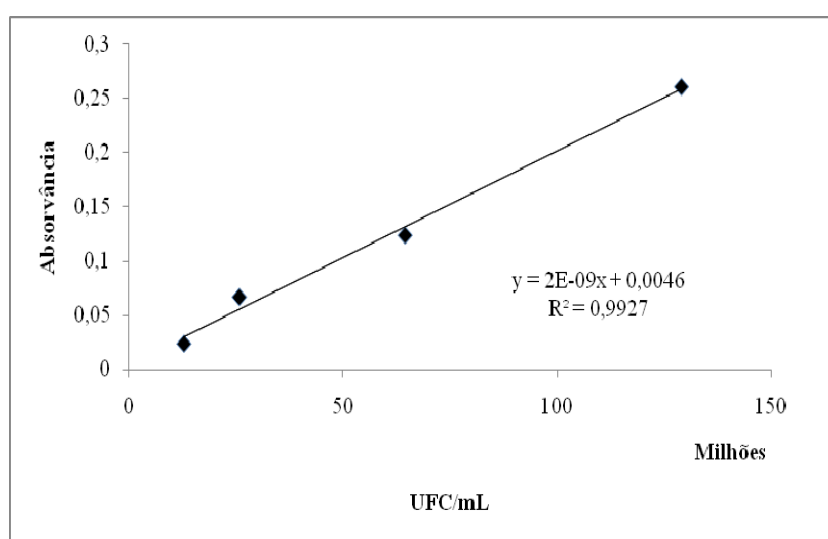
A - Curva de concentração celular de *P. aeruginosa*

B - Curva de concentração celular de *P. fluorescens* P88

C - Curva de concentração celular de *P. fluorescens* P250

**A - Curva de concentração celular de *P. aeruginosa***

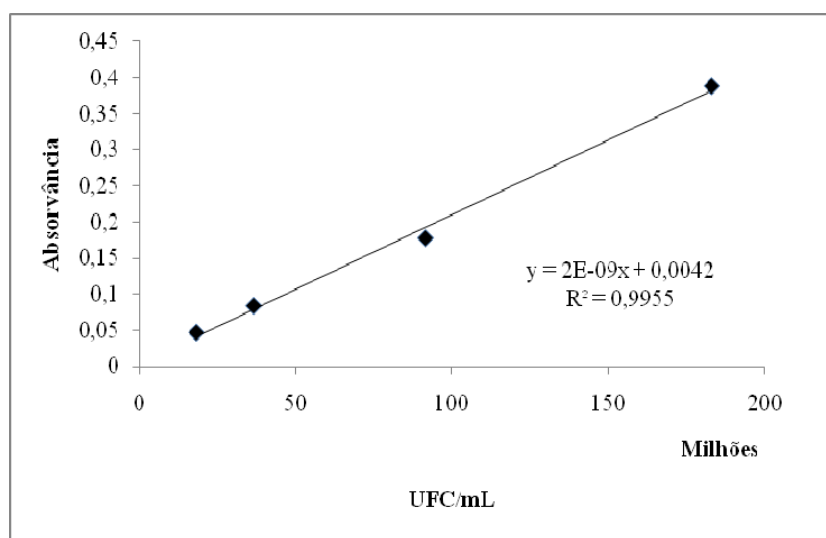
<i>P. aeruginosa</i>		
Diluição	Absorvância	UFC/mL
1/50	0,024	$645000000/50 = 12900000$
1/25	0,067	$645000000/25 = 25800000$
1/10	0,124	$645000000/10 = 64500000$
1/5	0,261	$645000000/5 = 129000000$



Coeficiente linear (*P. aeruginosa*):  $1,97121 \cdot 10^{-9}$

## B - Curva de concentração celular de *P. fluorescens* P88

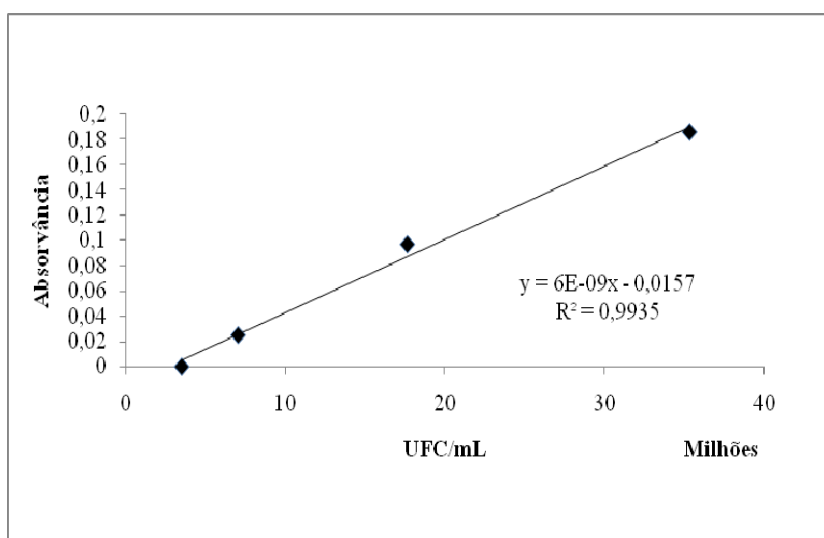
<i>P. fluorescens</i> P88		
Diluição	Absorvância	UFC/mL
1/50	0,047	$915000000/50 = 18300000$
1/25	0,084	$915000000/25 = 36600000$
1/10	0,178	$915000000/10 = 91500000$
1/5	0,389	$915000000/5 = 183000000$



Coeficiente linear (*P. fluorescens* P88):  $2,06758^{-9}$

**C - Curva de concentração celular de *P. fluorescens* P250**

<i>P. fluorescens</i> P250		
Diluição	Absorvância	UFC/mL
1/50	0	$176500000/50 = 3530000$
1/25	0,025	$176500000/25 = 7060000$
1/10	0,097	$176500000/10 = 17650000$
1/5	0,186	$176500000/5 = 35300000$



Coeficiente linear (*P. fluorescens* P250):  $5,83338^{-9}$