

## DETECÇÃO DA ADIÇÃO FRAUDULENTA DE SORO DE QUEIJO EM LEITE: INTERFERÊNCIA DA ATIVIDADE DE PROTEASES BACTERIANAS

### Detection of fraudulent addition of whey cheese in milk: Interference of bacterial proteases activity

Gislene Bremer de Oliveira<sup>1</sup>  
Maria Dutra do Souto Gatti<sup>2</sup>  
Rômulo Cardoso Valadão<sup>3</sup>  
José Francisco Pereira Martins<sup>4</sup>  
Rosa Helena Luchese<sup>5\*</sup>

#### SUMÁRIO

Uma das fraudes econômicas mais comumente aplicadas ao leite fluido é a adição do soro de queijo. A ocorrência dessa fraude, no Brasil, é sugerida pela análise do índice de caseinomacropéptido (CMP), uma porção da molécula de  $\beta$ -caseína solúvel no soro. 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). Com o objetivo de avaliar esta interferência, foi inoculado no leite  $ca^6 10^3$  UFC/mL de *Pseudomonas* spp. seguido de incubação durante 2 e 5 dias 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 submetido à incubação 30 °C/30 d e o índice de CMP foi analisado nos tempos zero e 30 dias. Os resultados dos testes de atividade de proteases após 2 dias de incubação, usando como substrato a azocaseína, não diferiram significativamente ( $P > 0,05$ ) dos de 5 dias. Diferentemente, os índices de CMP no tempo zero do tratamento 5d/7 °C 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*.

**Termos para indexação:** caseinomacropéptido, protease, fraude, psicrotróficos.

#### 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 o soro um subproduto da indústria queijeira de baixo 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 corriqueiro.

1 Mestranda do Depto. de Tecnologia de Alimentos, UFRRJ, CEP 23890-000, Seropédica - RJ, Brasil.

2 Aluna do 10º período de Eng. de Alimentos da UFRRJ.

3 Me. Técnico do laboratório de Microbiologia de Alimentos da UFRRJ.

4 Ph.D. Prof. do Depto. de Tecnologia de Alimentos da UFRRJ.

5 Ph.D. Profa. do Depto. de Tecnologia de Alimentos da UFRRJ, e-mail: rhluche@ufrj.br

\* A quem a correspondência deve ser enviada.

6 Aproximadamente ou por volta de, do latim *circa*.

A legislação brasileira utiliza como critério de avaliação de qualidade do leite a determinação quantitativa do caseinomacropéptido (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; BRASIL, 2006b). 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  $\beta$ -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 psicrotróficos 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).

No Brasil esta situação passou a ter maior importância a partir de 2002, quando a prática de refrigerar o 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 reduzir custos operacionais, principalmente os relacionados ao transporte, e promover melhorias na qualidade do leite. Sobre esta IN, Fagundes et al. (2006) comenta que, apesar da racionalização da coleta e do transporte ser uma tendência mundial que beneficia toda a cadeia do leite, a refrigeração imediatamente após a ordenha diminui a multiplicação de bactérias mesófilas que causam a acidificação do leite, porém favorece a microbiota psicrotrófica, o que provoca diversas alterações no leite e seus derivados.

Os microrganismos psicrotróficos são assim definidos por serem capazes de crescer em temperatura igual ou inferior à 7° C, independentemente da sua temperatura ótima de crescimento (normalmente entre 20 e 30° C), e 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.). Devido aos procedimentos usuais de manutenção e coleta do leite refrigerado, em dois a três dias eles predominam na microbiota do leite cru (SØRHAUG e STEPANIAK, 1997; CROMIE, 1992).

As enzimas produzidas por psicrotróficos podem ser extracelulares, intracelulares ou periplasmáticas, sendo as duas últimas liberadas no leite após a lise celular devido ao tratamento térmico (KOHLMANN et al., 1991). As enzimas extracelulares, motivo de maior preocupação, podem agir no leite cru durante o crescimento das bactérias

psicrotróficas, e podem resistir ao tratamento térmico podendo resultar em defeitos de sabor, aroma e textura nos produtos lácteos durante estocagem e maturação (CROMIE, 1992; COGAN, 1977).

De acordo com Meer et. al (1991) apud Sørhaug e Stepaniak (1997), o gênero *Pseudomonas* representa não mais que 10% da microbiota do leite recém ordenhado. No entanto, outros autores relatam que estes microrganismos são os mais importantes psicrotróficos a predominar na microbiota do leite cru ou pasteurizado quando deteriorado sob refrigeração (McKELLAR, 1989; CROMIE, 1992; COUSIN, 1982; CHANDLER e McMEEKIN, 1985; MUIR, 1996). No leite cru refrigerado, dentre as espécies, a *P. fluorescens* é predominante (PINTO, 2004; ENEROTH, AHRNÉ e MOLIN, 2000).

Considerando-se a grande importância do leite na dieta, e a necessidade de assegurar a sua qualidade, combater fraudes e proteger o consumidor, o objetivo deste trabalho foi determinar a interferência da atividade proteolítica de bactérias psicrotróficas do gênero *Pseudomonas* no teste oficial que sugere a adição fraudulenta de soro de queijo ao leite. Considera que, atualmente, grande parte do leite cru é mantido sob refrigeração por períodos que variam de 24 a 96 horas desde a ordenha até o processamento final, tornando-se um ambiente propício para o desenvolvimento de bactérias psicrotróficas.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Leite UHT e Soro de Queijo

O leite UHT desnatado ZERO® (Barbosa & Marques, Governador Valadares - MG, fabricação 14/06/2008\_04 17:47) utilizado no experimento foi adquirido no mercado local de Seropédica/RJ. A esterilidade 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® (Bela Vista Produtos Enzimáticos Ind. & Com. Ltda, Bela Vista - SC) contendo quimosina, sendo este soro, imediatamente, aquecido a 80 °C durante 15 min em banho-maria (Tecnal, modelo TE056, Piracicaba, Brasil) para inativação enzimática (FUKUDA, ROIG e PRATA, 2004) e, em seguida, congelado até o momento da sua utilização.

### 2.2 Linhagens de *Pseudomonas* spp

Linhagens de *Pseudomonas 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 *Pseudomonas 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® 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.

### 2.3 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.

### 2.4 Avaliação da Ação Proteolítica em Ágar Leite

Adicionou-se ao ágar nutriente 10% de leite desnatado MOLICO® (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.

### 2.5 Desenho Experimental

Inicialmente preparou-se, para cada cultura ativa de 24 h, uma curva de concentração celular em caldo triptona de soja obtida por leitura espectrofotométrica das diluições 1:5, 1:10, 1:25 e 1:50. Cada curva foi relacionada a dados obtidos do plaqueamento de diluições decimais sucessivas da mesma cultura.

A cultura foi inoculada a leite UHT de modo a obter-se uma população final de *ca* de 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 dias 7 °C e, após este período, dividido em duas alíquotas, sendo que, uma delas permaneceu por mais 3 dias 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 (HiMedia, Mumbai, Índia). Em seguida estes leites foram submetidos a tratamento térmico por vapor fluente (aproximadamente 100 °C) por 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

enzima, de acordo com Rajmohan, Dodd e Waites (2002).

Retirou-se uma alíquota de 20 mL que foi submetida a 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% m/v, para inibir um eventual crescimento bacteriano (LE, DATTA e DEETH, 2006). Adicionou-se igual concentração aos tubos do branco. Alíquotas de 50 mL foram transferidas para quatro tubos estéreis sendo dois tubos contra-prova. Dois dos tubos foram congelados imediatamente após o tratamento térmico (tempo 0), 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 inteiramente repetido três vezes, para cada microrganismo.

### 2.6 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 M 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. Após este período, foram adicionados 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10%, sendo que, aos 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 absorbância do sobrenadante foi lida a 366 nm em espectrofotômetro (BELphotonics, modelo SP1105, Monza, Itália) e uma unidade de atividade enzimática foi definido como a quantidade de enzima necessária para produzir aumento de 0,01 de absorbância, por hora de reação.

### 2.7 Análise do Índice de Caseinoma-cropeptídeo (CMP)

As amostras de leite foram transportadas em gelo seco para o Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO) do MAPA, sediado em

Pedro Leopoldo, MG, onde foram analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) 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% (m/v), gota a gota e sob agitação constante. Após repouso de 60 min a temperatura ambiente, as amostras foram filtradas em papel filtro qualitativo (WHATMAN®, nº 5) e injetadas no cromatógrafo (Shimadzu) 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 µm. 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 concentração conhecida e rastreável a um padrão de concentração certificada (Dinâmica Química Contemporânea Ltda., Diadema, SP), 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.

Adicionalmente, preparou-se uma curva adicionando 2, 5, 10, 15, 20, 25 e 30% de soro de queijo ao mesmo leite utilizado no experimento, que foi analisado da mesma maneira.

## 2.8 Análise Estatística

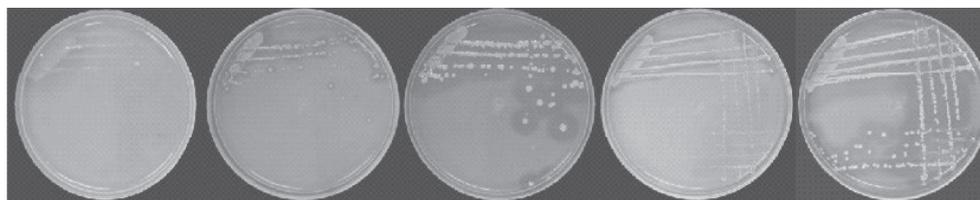
Os dados de UFC/mL, atividade de proteases e concentração de CMP, obtidos para cada microrganismo, foram analisados através de técnica de análise de variância e complementados pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância (VIEIRA, 2006) empregando-se o programa estatístico SISVAR 4.3.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Ação Proteolítica em Ágar Leite

O crescimento das colônias das *Pseudomonas* spp. e formação de halo, sob incubação a 7 °C, uma das temperaturas que simula o armazenamento refrigerado do leite segundo a IN 51, aconteceu após diferentes períodos e estão apresentados na Figura 1.

Com base na figura, observa-se que a linhagem de *P. aeruginosa*, ao longo de 16 d de incubação a 7 °C não apresentou halo de proteólise, enquanto a de *P. fluorescens* P88 apresentou colônias com halos após 6 d, e a de *P. fluorescens* P250 após 4 d. Estes dados são importantes porque reforçam a informação de que, apesar de fazer parte da microbiota do leite refrigerado, a espécie *P. aeruginosa* não é capaz de pleno crescimento a esta temperatura (MUNSCH-ALATOSSAVA e ALATOSSAVA, 2006). A espécie *P. aeruginosa* não é considerada um microrganismo psicrotrófico por alguns autores (SANTOS e LARANJA DA FONSECA, 2001) e, portanto, apresenta baixo potencial de deterioração do leite refrigerado.

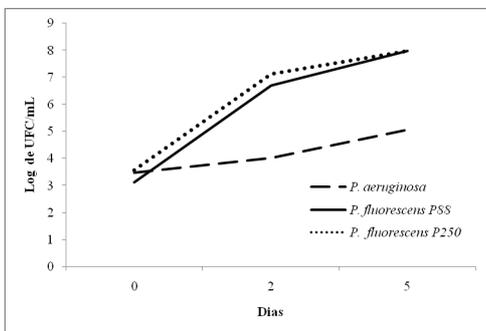


**Figura 1** – Ação proteolítica a 7°C: (a) *P. aeruginosa* após 16 d; (b) *P. fluorescens* P88 após 6 d; (c) *P. fluorescens* P88 após 9 d; (d) *P. fluorescens* P250 após 4 d; (e) *P. fluorescens* P250 após 7 d.

Quando incubados a 36 °C (*P. aeruginosa*) e a 30 °C (*P. fluorescens*) foi observado halo de proteólise em 24 h. A 21 °C estas bactérias apresentaram halo após 48 h.

### 3.2 Crescimento das culturas no leite

Partindo-se de um inóculo *ca* de 10<sup>3</sup> UFC/mL, considerado uma contaminação esperada para o leite, as diferentes *Pseudomonas* spp. utilizadas no experimento apresentaram aumento de população após 2 e 5 d conforme ilustrados na Figura 2, já os dados referentes a este crescimento encontram-se na Tabela 1.



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

Percebe-se que a espécie *P. aeruginosa* apresentou crescimento lento durante os períodos avaliados, com aumento de apenas 2 ciclos log em relação a população inicial após 5 dias de manutenção a 7°C. Por outro lado, o crescimento das linhagens de

*P. fluorescens* P88 e P250 aumentou em 4 ciclos log, comprovando que o leite mantido a 7 °C apresenta condições satisfatórias para o crescimento de bactérias psicotróficas.

Resultados similares foram obtidos por Pinto (2004) que, utilizando as estirpes 07A e 041 de *P. fluorescens*, com inóculo inicial de 10<sup>4</sup> UFC/mL em leite desnatado reconstituído 12% mantido a 7 °C, obtiveram contaminações de 10<sup>8</sup> 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 coletar leite de propriedades consideradas com higiene adequada, obtiveram contagens de 7,33 x 10<sup>3</sup> UFC/mL para leite recém-ordenhado e 1,02 x 10<sup>4</sup> 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 x 10<sup>5</sup> UFC/mL para o leite recém-ordenhado e 1,6 x 10<sup>5</sup> UFC/mL para o leite refrigerado nas mesmas condições.

Pinto, Martins e Vanetti (2006) também encontraram médias de contagens de *Pseudomonas* spp. de 2,8 x 10<sup>5</sup> UFC/mL em amostras de leite cru coletadas de tanques individuais, 1,3 x 10<sup>5</sup> UFC/mL de tanques coletivos e 2,0 x 10<sup>6</sup> 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.

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>7</sup> do MAPA com relação ao binômio tempo e temperatura de

**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>	3,48 <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. Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente (P < 0,05) pelo teste de Tukey, para cada microrganismo.

7 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).

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 psicrotrófica.

Vale ressaltar que, nas regiões sul, sudeste e centro-oeste ficou estabelecido que entre os meses de julho de 2008 e julho de 2011, a Contagem Padrão em Placas (CPP) dos leites oriundos dos tanques de refrigeração deve apresentar máximo de aeróbios mesófilos de  $7,5 \times 10^5$  UFC/mL, mas não se especificou limites para contagens de microrganismos psicrotróficos (BRASIL, 2002). Diversos autores citam a contagem de psicrotróficos, especialmente *P. fluorescens*, acima de  $10^6$  UFC/mL como deletéria para o produto acabado (PINTO, MARTINS e VANETTI, 2006; MARTINS, 2007; SHAH, 1994; SØRHAUG e STEPANIAK, 1991; COUSIN, 1982; STEPANIAK e SØRHAUG, 1995; STEPANIAK, 1991)

Neste contexto 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.

### 3.3 Atividade de proteases

A atividade de proteases no leite mantido a 7 °C foi pouco expressiva, mesmo no período de 5 d (Tabela 2).

Como esperado, os resultados da atividade enzimática de *P. aeruginosa* após 2 e 5 dias de incubação não diferiu significativamente ( $P > 0,05$ )

entre si. Já para *P. fluorescens* P88 e P250, a ausência de significância entre os resultados obtidos se deve a alta variabilidade dos resultados apresentados no teste.

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 psicrotróficas 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.

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/ 5mL), em leite desnatado reconstituído 12% inoculado com dois isolados de *P. fluorescens* (07A e 041). 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 °C, 4 °C, 7 °C 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.

Rajmohan, Dodd e Waites (2002), Kohlmann et al. (1991), Griffiths (1989) e Suhren (1989) reforçam que, um aumento significativo na produção de enzimas hidrolíticas por bactérias psicrotróficas ocorre somente no final da fase logarítmica ou início da fase estacionária de crescimento.

**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
	Atividade de proteases	Atividade de proteases	Atividade de proteases
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 absorbância de 0,01/h. Letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente ( $P > 0,05$ ) pelo teste Tukey.

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 e VANETTI, 2006) e desenvolvimento de gosto amargo em diferentes tipos de queijo e no próprio leite UHT (STEPANIAK e SØRHAUG, 1995). Mitchell & 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.

### 3.4 Índice de Caseinomacropeptídeo (CMP) no Leite Contaminado

O CMP, também chamado de glicomacropeptídeo quando apresenta porções de carboidrato na sua molécula, resulta da quebra da ligação peptídica da  $\kappa$ -caseína entre os aminoácidos 105-06 (ou PHE-MET). Desta cisão forma-se a para- $\kappa$ -caseína (1-105) que permanece nas micelas de caseína e o glicomacropeptídeo (106-169) que fica no soro (GUINEE & WILKINSON, 1992; VELOSO et al. 2002).

O leite UHT, ao ser encaminhado para prova oficial, congelado, deve ter, no máximo, 2 d de fabricação segundo normas internas do LANAGRO. 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 Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA) quando apresentar 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.

O leite utilizado neste experimento estava dentro do período de validade. No entanto, apresentou concentrações elevadas de CMP, possivelmente por ter sido adquirido no comércio e não segundo as normas do LANAGRO. Essa particularidade não impossibilitou a avaliação das diferenças pesquisadas neste trabalho.

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 (Tabela 3). As concentrações de CMP no tempo zero foram maiores que após 30 dias.

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

**Tabela 3** – Valores médios\* de concentração de CMP (mg/L) no leite nos tempos 0 e 30.

	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Pseudomonas fluorescens</i> P88		<i>Pseudomonas fluorescens</i> P250	
	CMP (mg/L)		CMP (mg/L)		CMP (mg/L)	
	Dia zero	Dia 30	Dia zero	Dia 30	Dia zero	Dia 30
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>

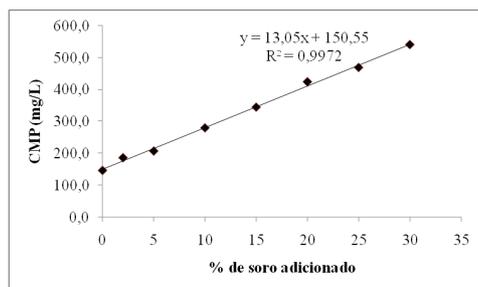
\*Valores médios de três repetições. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna, assim como letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem significativamente ( $P < 0,05$ ) pelo teste Tukey, para cada microrganismo.

por espectrometria de massa com ionização por eletrospray. De acordo com os autores, por serem menos específicas que a quimosina, clivam também as ligações 103-104, 104-105, 106-107 e 107-108.

A diminuição significativa das concentrações de CMP do tempo 0 para o 30 para as linhagens P88 e P250 de *P. fluorescens* que permaneceram durante 5 d a 7 °C, pode ser atribuída à alta concentração e/ou atividade das enzimas produzidas durante este período e que, devido à baixa especificidade, passaram, ao longo do tempo, a degradar o próprio CMP, o que vai de encontros a resultados obtidos por outro autores (informação verbal)<sup>8</sup>.

### 3.5 Índice de Caseinomacropéptido (CMP) no leite fraudado

Ao adicionar percentuais crescentes de soro de queijo ao leite, obteve-se concentrações também crescentes de CMP, conforme apresentado na Figura 3.



**Figura 3** – Concentração de CMP (mg/L) após diferentes porcentagens de soro de queijo serem adicionadas ao leite.

Percebe-se que, o leite, mesmo adicionado de 30% de soro de queijo, apresentou concentrações de CMP (541,2 mg/L) inferiores ao leite contaminado com *P. fluorescens* e mantido durante 5 d a 7°C.

### 4 CONCLUSÕES E/OU SUGESTÕES

A estocagem do leite contaminado com *P. fluorescens* por até 2 d/7 °C, mesmo propiciando ambiente adequado ao seu desenvolvimento, com contagens superiores a  $1 \times 10^6$  UFC/mL, não resultou em aumento significativo nos níveis de CMP. Já no leite mantido por 5d/7 °C, as alterações nos níveis de CMP antes do processamento e ao longo de 30 d de sua vida-de-prateleira foram significativas, confirmando que, nestas condições, os níveis de CMP não devem ser utilizados como

único critério indicador de fraude por adição de soro de queijo ao leite.

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 da fabricação é sensata, pois reduz a possibilidade de erro ou resultado falso-positivo na detecção de fraude por adição de soro de queijo ao leite. Na simulação de fraude pode ser constatado que, mesmo uma adição de 30% de soro ao leite, o aumento na concentração de CMP pode ser bastante inferior ao resultado da ação de *P. fluorescens*.

Também, face à relação que o CMP tem com a contaminação psicrotrofica do leite cru, este teste tem potencial de aplicação no embasamento 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) de modo a reduzir ao mínimo a contaminação inicial com bactérias psicrotólicas com potencial proteolítico. Em adição, a estocagem em temperaturas inferiores a 7 °C poderia conter o seu desenvolvimento.

### 5 AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos e ao LANAGRO/PL.

### SUMMARY

One of the most common economic frauds applied to fluid milk is the addition of the cheese whey. The occurrence this fraud, in Brazil, is suggested by the analysis of the caseinomacropéptide (CMP) index, a portion of the  $\beta$ -casein molecule soluble in the whey. However, the action of proteases produced by psychrotrophic microorganism can interfere with this test, leading to false-positive results, situation that started to have greater importance after the implementation of Normative Instruction 51 (2002). 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, milk was submitted to incubation 30 °C/30 d and the CMP index was analyzed at times zero and 30 days. The

<sup>8</sup> Informação fornecida pelo Prof. Sebastião César Cardoso Brandão (Depto. de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa), por telefone, em jan. 2009.

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*.

**Index terms:** caseinomacropetide, protease, fraud, psychrotrophic.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 set. 2003, Seção 1, Página 14.
- 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 2006b. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 15 dez. 2006b, Seção 1, Página 67.
- CARDOSO, R.R. **Influência da microbiota psicrotrofica 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.
- CHANDLER, R.E.; McMEEKIN, T.A. Temperature function integration and its relationship to the spoilage of pasteurized, homogenized milk. **Aust. J. Dairy Technol**, v. 40, p. 37-41, 1985.
- 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.
- 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.
- 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.
- ENEROTH, A.; AHRNÉ, S.; MOLIN, G. Contamination routes of gram-negative spoilage bacteria in the production of pasteurized milk, evaluated by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). **International Dairy Journal**. v.10, n. 5-6, p. 325-331, 2000.
- 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 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- LÓPEZ-FANDIÑO, R. et al. Proteolysis during storage of UHT milk: differences between whole and skim milk. **Journal of Dairy Research**, v. 60, p. 339-347, 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.
- MARTINS, M. L. **Caracterização de protease e lipase de *Pseudomonas fluorescens* e quorum sensing em bactérias psicrotróficas isoladas de leite**. 2007. 184 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG, 2007.
- MEER, R. R. et al. Psychrotrophic *Bacillus* spp. in fluid milk products: A review. **J. Food Protect.**, v. 54, p. 969-979, 1991.
- McKELLAR, R.C. **Enzymes of psychrotrophs in raw food**. CRC Press. Boca Raton, FL, 310 p. 1989.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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, 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, 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 proteinases on  $\epsilon$ -casein. **Journal of Dairy Research**, v. 67, 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.
- 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.
- SHAH, N.P. Psychrotrophs in Milk: A review. **Milchwissenschaft**, v. 49, p. 432-437, 1994.
- SØRHAUG, T.; STEPANIAK, L. Microbial enzymes in the spoilage of milk and dairy products. **Food Enzymology**, vol. 1 (Fox, P.F., ed.), p. 169-218, Elsevier, 1991.
- 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.
- STEPANIAK, L. Factors affecting quality and possibilities of predicting shelf-life of pasteurized and ultra-high temperature heated milks. **Ital. J. Food Sci.**, v. 4, p. 11-26, 1991.
- 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: **Enzymes of Psychrotrophs in Raw Foods** (McKellar, R.C., ed.), p. 3-34, CRC Press, Boca Raton.
- 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.
- VIEIRA, S. Análise de variância (ANOVA). São Paulo: Atlas, 2006. 204 p.