



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE**  
**ALIMENTOS**

**AVALIAÇÃO PROTEÔMICA VISANDO A AUTENTICIDADE DE MUÇARELA DE**  
**BÚFALA**

**BEN-HUR RAMOS FERREIRA GONÇALVES**

**ITAPETINGA**  
**BAHIA - BRASIL**  
**2015**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE**  
**ALIMENTOS**

**AVALIAÇÃO PROTEÔMICA VISANDO A AUTENTICIDADE DE MUÇARELA DE**  
**BÚFALA**

**BEN-HUR RAMOS FERREIRA GONÇALVES**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Área de Concentração em Ciência de Alimentos, para obtenção do título de "Mestre".

**Orientador (a):** DSc. Sibelli Passini Barbosa Ferrão

**Co-orientador:** DSc. Sérgio Augusto de Albuquerque Fernandes

**Co-orientador:** DSc. Antonio Silvio do Egito

**ITAPETINGA**  
**BAHIA - BRASIL**  
**2015**

637.30287 G624a	<p>Gonçalves, Ben-Hur Ramos Ferreira. Avaliação proteômica visando a autenticidade de muçarela de búfala. / Ben-Hur Ramos Ferreira Gonçalves. - Itapetinga: UESB, 2015. 97f.</p> <p>Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Área de Concentração em Ciência de Alimentos, para obtenção do título de "Mestre". Sob a orientação da Profa. D.Sc. Sibelli Passini Barbosa Ferrão e co-orientação do Prof. D.Sc. Sérgio Augusto de Albuquerque Fernandes e Prof. D.Sc. Antonio Silvio do Egito.</p> <p>1. Queijo muçarela de búfala – Cromatografia e eletroforese – Autenticidade. 2. Leite de búfala. 3. Peptídeos em queijos. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos. II. Ferrão, Sibelli Passini Barbosa. III. Fernandes, Sérgio Augusto de Albuquerque. IV. Egito, Antonio Silvio do. V. Título.</p> <p style="text-align: right;"><b>CDD(21): 637.30287</b></p>
--------------------	--

**Catálogo na fonte:**

Adalice Gustavo da Silva – CRB/5-535  
Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para Desdobramento por Assunto:

1. Queijo muçarela de búfala – Cromatografia e eletroforese – Autenticidade
2. Leite de búfala
3. Peptídeos em queijos.



**Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia**  
Programa de Pós-Graduação  
**Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos**



Áreas de Concentração: Engenharia de Alimentos  
Ciência de Alimentos

**DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO**

**Título:** AVALIAÇÃO PROTEÔMICA VISANDO A AUTENTICIDADE DE MUÇARELA DE BÚFALA.

**Autor (a):** BEN-HUR RAMOS FERREIRA GONÇALVES

**Orientador (a):** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sibelli Passini Barbosa Ferrão

**Co-orientador (a):** Prof.<sup>o</sup> Dr. Sérgio Augusto de Albuquerque Fernandes

Prof.<sup>o</sup> Dr. Antônio Silvío do Egito

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de **MESTRE EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CIÊNCIA DE ALIMENTOS**, pela Banca Examinadora.

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sibelli Passini Barbosa Ferrão (UESB)

  
Prof.<sup>o</sup> Dr. Rafael Da Costa Ilhéu Fontan (UESB)

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Janaina Silva de Freitas (UESB)

**Itapetinga-BA, 10 de fevereiro de 2015.**

*"Faça. Continue fazendo. Mesmo que não percebam a evolução. Continue fazendo. Mesmo que não deem valor as transformações. Faça e faça bem feito, mesmo que por estar tão próximo não sejam capazes de notar.*

*Tente, se errar, tente novamente. Se pensar em desistir, desista de pensar em desistir e continue acreditando. Quando estiver cansado, respire, se imagine onde deseja estar. Confie!..."*

*Tico Santa Cruz*

*À Deus*  
*Aos meus pais*  
*Aos meus irmãos*  
*À Grazielly*

*Dedico!*

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida, pela proteção, oportunidades e por me conceder saúde e sabedoria para conquistar meus objetivos.*

*Aos meus pais Francisco e Áurea, pelo amor, por sempre me incentivarem a estudar e por constituírem a base da minha educação e valores, pois sem eles, certamente, eu não alcançaria essa vitória.*

*Aos meus irmãos Gabriel e Rafael, que sempre estiveram ao meu lado em toda minha vida, sempre me apoiando e dividindo todos os momentos. Em especial à Gabriel pelos auxílios prestados na confecção deste trabalho. Sem eles não teria conquistado esse objetivo. Amo vocês!*

*À minha namorada Grazielly, minha princesa, pelo amor, carinho e companheirismo demonstrado, me acalmando nos momentos mais difíceis e vivendo comigo intensamente em busca desta conquista. Te amo!*

*À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), pela estrutura de laboratórios e pelos funcionários que possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho.*

*À minha orientadora, professora Dr<sup>a</sup>. Sibelli Ferrão, pela orientação e contribuição intelectual com tanta paciência e dedicação e, principalmente, pela confiança depositada em mim. Ela sempre me disse que com calma tudo daria certo.*

*Aos meus co-orientadores, professor Dr. Sérgio Fernandes e Dr. Antonio Silvio do Egito, pela contribuição, ampliando meus conhecimentos e enriquecendo esta pesquisa.*

*Aos membros da banca examinadora por aceitarem fazer parte da avaliação deste trabalho.*

*Ao professor Dr. Rafael Fontan pela atenção, prestatividade e importante auxílio durante as análises cromatográficas.*

*Aos professores Dr. Paulo Bonomo e Dr<sup>a</sup>. Renata Bonomo pelas contribuições e auxílios neste trabalho.*

*Ao Grupo de Estudos em Leite (GEL).*

*Aos colegas de Mestrado, em especial Abdias pela amizade.*

*À Capes pela concessão da bolsa.*

*Ao Laticínio EN, produtos Pytty, pela disponibilidade nos momentos necessários, em especial Seu Elias, Donas Nilzete, Hudson, Idalécio, Edmilson, Edgar, Cesinha, Lucas e Felipe.*

*A todos os meus familiares, padrinho, madrinha, tios, tias, primos e primas, em especial à minha tia Maria da Paz, pela preocupação e ajuda nos momentos difíceis e a minha cunhada Olga, sempre presente no meu dia-a-dia.*

*A todos aqueles que por ventura não tenham sido citados, mas que com certeza contribuíram de forma significativa para a realização deste trabalho.*

*Muito Obrigado!*



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Rebanho mundial de bubalinos, em cabeças, por continente.....	24
<b>Tabela 2:</b> Composição média do leite de diferentes espécies de mamíferos.....	26
<b>Tabela 3:</b> Componentes do gel de separação e concentração/empilhamento.....	43
<b>Tabela 4:</b> Valores médios ( $\pm$ DP) da composição química (umidade, cinzas, gordura e GES) dos queijos muçarela elaborados no tempo 0 e 20.....	47
<b>Tabela 5:</b> Valores médios ( $\pm$ DP) da composição química (proteína, EST e ESD) e caracterização físico-química (pH e acidez) dos queijos muçarela elaborados no tempo 0 e com 20 dias de refrigeração.....	48
<b>Tabela 6:</b> Equações estimadas de regressão ajustadas para composição química e caracterização físico-química dos queijos muçarela elaborados no tempo 0 e com 20 dias de refrigeração.....	50
<b>Tabela 7:</b> Valores médios ( $\pm$ DP) da composição química e caracterização físico-química de marcas comerciais de queijos muçarela de búfala com 20 dias de refrigeração.....	54

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Selo de Pureza 100% Búfalo.....	30
<b>Figura 2:</b> Fluxograma de produção dos queijos muçarela.....	41
<b>Figura 3:</b> Perfil eletroforético (SDS-PAGE) de queijos muçarela.....	57 e 58
<b>Figura 4:</b> Perfil eletroforético (SDS-PAGE) de amostras comerciais de queijo muçarela de búfala.....	61 e 62
<b>Figura 5:</b> Perfil eletroforético (SDS-PAGE) de peptídeos solúveis em água (PSA) extraídos de queijos muçarela.....	64 e 65
<b>Figura 6:</b> Perfil eletroforético (SDS-PAGE) de peptídeos solúveis em água (PSA) extraídos de amostras comerciais de queijo muçarela de búfala.....	67 e 68
<b>Figura 7:</b> Cromatogramas (RP-HPLC) de peptídeos solúveis em água (PSA) extraídos de queijos muçarela no tempo 0.....	69 e 70
<b>Figura 8:</b> Cromatogramas (RP-HPLC) dos peptídeos solúveis em água (PSA) 1 e 2 extraídos de queijos muçarela no tempo 0.....	71 e 72
<b>Figura 9:</b> Cromatogramas (RP-HPLC) dos peptídeos solúveis em água (PSA) 3 e 4 extraídos de queijos muçarela no tempo 0.....	72 e 73
<b>Figura 10:</b> Cromatogramas (RP-HPLC) dos peptídeos solúveis em água (PSA) 5, 6 e 7 extraídos de queijos muçarela no tempo 0.....	73 e 74
<b>Figura 11:</b> Cromatogramas (RP-HPLC) dos peptídeos solúveis em água (PSA) 8 extraídos de queijos muçarela no tempo 0.....	74 e 75
<b>Figura 12:</b> Cromatogramas (RP-HPLC) dos peptídeos solúveis em água (PSA) 9 extraídos de queijos muçarela no tempo 0.....	75 e 76
<b>Figura 13:</b> Cromatogramas (RP-HPLC) dos peptídeos solúveis em água (PSA) 10, 11 e 12 extraídos de queijos muçarela no tempo 0.....	76 e 77
<b>Figura 14:</b> Cromatogramas (RP-HPLC) dos peptídeos solúveis em água (PSA) 13, 14 e 15 extraídos de queijos muçarela no tempo 0.....	77 e 78
<b>Figura 15:</b> Cromatogramas (RP-HPLC) de peptídeos solúveis em água (PSA) extraídos de queijos muçarela no tempo 20.....	78 e 79
<b>Figura 16:</b> Cromatogramas (RP-HPLC) dos peptídeos solúveis em água (PSA) 10, 11 e 12 extraídos de queijos muçarela no tempo 20.....	80 e 81
<b>Figura 17:</b> Cromatogramas (RP-HPLC) de peptídeos solúveis em água (PSA) extraídos de amostras comerciais de queijo muçarela de búfala.....	82

<b>Figura 18:</b> Cromatogramas (RP-HPLC) de peptídeos solúveis em água (PSA) extraídos de amostras comerciais de queijo muçarela de búfala.....	83
<b>Figura 19:</b> Cromatogramas (RP-HPLC) de peptídeos solúveis em água (PSA) extraídos de amostras comerciais de queijo muçarela de búfala.....	84

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$	alfa
$\alpha_s$ -CN	alfa s-caseína
$a_w$	atividade de água
$\beta$	beta
$\beta$ -CN	beta-caseína
$\beta$ -LG	beta-lactoglobulina
cm	centímetro
$\gamma$	gama
$\gamma$ -CN	gama-caseína
$\gamma_1$ -CN	gama 1-caseína
$\gamma_2$ -CN	gama 2-caseína
$\gamma_3$ -CN	gama 3-caseína
g	grama
°C	grau Celsius
°D	grau Dornic
°	indicativo de ordem
$\kappa$	kapa
$\kappa$ -CN	kapa-caseína
kDa	quiloDalton
L	litro
>	maior
m	massa
$\leq$	menor ou igual
$\mu$ L	microlitro
$\mu$ V	microvoltz
mA	miliampere
mg	miligrama
mL	mililitro
'	minuto
min	minuto
nm	nanometro

n°	número
para-κ-CN	para-kapa-caseína
%	porcentagem
rpm	rotação por minuto
V	voltz
v	volume

## LISTA DE SIGLAS

ABCB	Associação Brasileira de Criadores de Búfalos
ABIQ	Associação Brasileira das Indústrias de Queijos
ANOVA	Análise de Variância Univariada
BA	Bahia
CA	Carabao
CEACROM	Centro de Estudos e Análises Cromatográficas
CEDETEC	Centro de Desenvolvimento e Difusão de Tecnologias
CGE	Eletroforese Capilar em Gel
CIEF	Focalização Isoelétrica Capilar
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CN	Caseína
CV	Coefficiente de variação
CZE	Eletroforese Capilar de Zona
DIC	Delineamento Inteiramente Casualizado
DOP	Denominação de Origem Protegida
DP	Desvio padrão
EC	Eletroforese Capilar
ESD	Extrato seco desengordurado
EST	Extrato seco total
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Ligado a Enzima
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
GA	GelAnalyzer
GES	Gordura no extrato seco
GMP	Glicomacropéptido
H <sup>+</sup>	Íons hidrogênio
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IEF	Focalização Isoelétrica
IG	Indicação Geográfica
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
JA	Jafarabadi
LEP	Laboratório de Engenharia de Processos

M	Marcador de massa molecular
ME	Mediterrâneo
Met <sub>106</sub>	Metionina 106
MU	Murrah
p	probabilidade
PA	Pará
PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
pH	Potencial hidrogeniônico
Phe <sub>105</sub>	Fenilalanina 105
pI	Ponto isoelétrico
PSA	Peptídeos solúveis em água
R <sup>2</sup>	Coefficiente de determinação
RIISPOA	Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
RP-HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Fase Reversa
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida em Dodecil Sulfato de Sódio
SQ <sub>TRAT</sub>	Soma de Quadrados dos Tratamentos
TCA	Ácido Tricloroacético
TFA	Ácido Trifluoroacético
TRB	Tratamento Referência Búfala
TRV	Tratamento Referência Vaca
TT	Tratamento Térmico
UESB	Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia
Ureia-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida em ureia
UV	Ultravioleta

## SUMÁRIO

RESUMO .....	19
ABSTRACT .....	20
1. Introdução.....	21
2. Revisão de literatura.....	23
2.1. Aspectos gerais da Bubalinocultura.....	23
2.2. População mundial de búfalos .....	23
2.3. Produção brasileira de leite de búfala .....	25
2.4. Características do leite de búfala .....	25
2.5. Muçarela de Búfala .....	28
2.6. Adulterações em muçarela de búfala .....	28
2.7. Metodologias analíticas para detecção de adulterações em produtos lácteos.....	30
2.8. Eletroforese .....	32
2.8.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) .....	33
2.9. Cromatografia .....	34
2.9.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) .....	35
2.10. Peptídeos em queijos.....	36
2.11. Importância da composição química e caracterização físico-química .....	37
3. Objetivos .....	38
3.1. Objetivo Geral.....	38
3.2. Objetivos Específicos .....	38
4. Material e Métodos.....	39



4.1.	Local e período do experimento .....	39
4.2.	Aquisição das amostras comerciais .....	39
4.3.	Elaboração dos queijos muçarela.....	39
4.3.1.	Percentuais de misturas dos queijos .....	39
4.3.2.	Processamento dos queijos .....	40
4.4.	Preparação geral das amostras .....	41
4.5.	Composição química e caracterização físico-química.....	41
4.6.	Eletroforese .....	42
4.6.1.	Preparação das amostras para análise eletroforética.....	42
4.6.2.	Análise do perfil eletroforético.....	42
4.6.3.	Preparação das placas .....	42
4.6.4.	Preparação dos géis .....	43
4.6.5.	Corrida eletroforética.....	44
4.6.6.	Fixação das proteínas.....	44
4.6.7.	Análise dos géis .....	44
4.7.	Extração dos peptídeos solúveis em água (PSA).....	45
4.8.	Análise dos peptídeos solúveis em água extraídos dos queijos por RP-HPLC em coluna C18 .....	45
4.9.	Análises estatísticas .....	45
5.	Resultados e Discussão .....	47
5.1.	Composição química e caracterização físico-química dos queijos muçarela elaborados .....	47
5.2.	Composição química e caracterização físico-química de marcas comerciais de muçarela de búfala .....	54

5.3.	Eletroforese (SDS-PAGE) dos queijos muçarela elaborados e muçarelas de búfala comerciais .....	57
5.4.	Eletroforese (SDS-PAGE) de peptídeos solúveis em água (PSA) extraídos de queijos muçarela elaborados e muçarelas de búfala comerciais .....	64
5.5.	Cromatografia Líquida (RP-HPLC) de peptídeos solúveis em água (PSA) extraídos dos queijos muçarela elaborados e muçarelas de búfala comerciais.....	69
6.	Conclusão .....	87
7.	Referências .....	88

## RESUMO

GONÇALVES, B. R. F. **Avaliação proteômica visando a autenticidade de muçarela de búfala**. Itapetinga – BA: UESB, 2015. 97 p. (Dissertação – Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos).\*

O preço elevado e a escassez do leite bubalino em algumas épocas do ano ocasionam adulterações em muçarela de búfala, especialmente pela inclusão de leite bovino. No presente trabalho objetivou-se adaptar metodologias de técnicas eletroforéticas e cromatográficas visando verificar a autenticidade de muçarela de búfala. Foram identificadas frações proteicas e peptídicas referentes às espécies bubalina e bovina em muçarelas elaboradas com diferentes formulações e amostras comerciais de muçarela de búfala, por meio da técnica eletroforética SDS-PAGE e cromatográfica RP-HPLC. Os queijos foram elaborados exclusivamente com leite de búfala (TRB), vaca (TRV) e inclusões crescentes de leite bovino ao bubalino (2,5%, 5,0%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%), totalizando 9 formulações, que foram congeladas no dia de fabricação (Tempo 0) e com 20 dias após a data de fabricação (Tempo 20). Análises de composição química e caracterização físico-química foram realizadas com três repetições em triplicata. Os resultados mostraram que não foi possível detectar fraudes por meio da composição química e caracterização físico-química dos queijos. A técnica SDS-PAGE mostrou-se eficiente na separação e identificação das frações proteicas das espécies em estudo, com a presença de peptídeos marcadores característicos das espécies bovina e bubalina. Cinco picos de peptídeos considerados importantes para diferenciação entre as espécies foram identificados por RP-HPLC, além de diferenças nos peptídeos e em suas quantidades entre os dois tempos de refrigeração estudados. De 18 amostras comerciais avaliadas, 4 foram consideradas fraudadas, em 5 suspeitou-se de adulteração e 9 apresentaram resultados satisfatórios. Estudos futuros poderão ser realizados objetivando-se ampliar conhecimentos a respeito dos peptídeos avaliados.

**Palavras-chave:** cromatografia, eletroforese, leite, peptídeos, queijos.

---

\* Orientador (a): Sibelli Passini Barbosa Ferrão, DSc., UESB. Co-orientadores: Sérgio Augusto de Albuquerque Fernandes, DSc., UESB; Antonio Silvio do Egito, DSc., EMBRAPA.

## ABSTRACT

GONÇALVES, B. R. F. **Proteomic evaluation to the authenticity of buffalo mozzarella.** Itapetinga – BA: UESB, 2015. 97 p. (Dissertation – Masters Degree in Food Engineering and Science).\*

The high price and scarcity of buffalo milk in some seasons cause adulteration in buffalo mozzarella, especially the inclusion of bovine milk. In the present study aimed to adapt methodologies electrophoretic and chromatographic techniques in order to verify the authenticity of buffalo mozzarella. Protein and peptide fractions were identified concerning bovine and buffalo in muçarelas prepared with different formulations and commercial samples of buffalo milk mozzarella, electrophoretic technique by SDS-PAGE and RP-HPLC chromatography. The cheeses were made exclusively from buffalo milk (TRB), cow (TRV) and increasing inclusions bovine milk the buffalo (2.5%, 5.0%, 10%, 20%, 30%, 40% and 50% ) totaling nine formulations, which were frozen in the manufacture of day (time 0) and 20 days after the date of manufacture (time 20). Chemical composition analysis and physicochemical characterization were performed in triplicate with three replications. The results showed that it was not possible to detect fraud through the chemical composition and physico-chemical characterization of cheeses. The SDS-PAGE technique proved efficient in separation and identification of the protein fractions of the species studied, with the presence of characteristic markers peptides of bovine and buffalo. Five peptide peaks considered important to differentiate between species were identified by RP-HPLC, as well as differences in the peptides and their quantities between the two study cooling times. 18 evaluated commercial samples, 4 were considered fraudulent, 5 suspected of tampering and 9 showed satisfactory results. Future studies could be carried out aiming to expand knowledge on the evaluated peptides.

**Keywords:** chromatography, electrophoresis, milk, peptides, cheeses.

---

\* Advisor (a): Sibelli Passini Barbosa Ferrão, DSc., UESB. Co-advisor: Sérgio Augusto de Albuquerque Fernandes, DSc., UESB; Antonio Silvio do Egito, DSc., EMBRAPA.

## 1. Introdução

A bubalinocultura consiste na criação e aproveitamento de búfalos selecionados e domesticados para geração de tração, produção de carne e leite. Nos últimos dez anos houve crescimento mundial no número de cabeças de búfalos para fins comerciais (FAO, 2014).

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2014), no Brasil a região Norte destaca-se como a área que detém o maior rebanho de búfalos (64,09% do total), porém mesmo com menor quantidade, cerca de 9,69% do total, a região Nordeste pode ser considerada como boa alternativa para a bubalinocultura.

O leite de búfala é utilizado para elaboração de derivados, em especial o queijo muçarela, que apresenta aceitação no mercado devido às características nutricionais e sensoriais. Esse tipo de atividade possui potencial de ampliação e é considerada promissora.

A maior disponibilidade do leite de búfala se dá quase que exclusivamente no outono/inverno, enquanto que em outro período do ano (primavera/verão) ocorre escassez dessa matéria-prima. Nesse contexto o preço do leite se eleva, e alguns criadores, fornecedores e até mesmo indústrias de laticínios acabam cometendo práticas ilegais, conhecidas como fraudes alimentares que, neste caso, consistem na adição de leite de vaca ao leite de búfala para elaboração de derivados.

No ano 2000, a Associação Brasileira de Criadores de Búfalos (ABCB) lançou um programa de certificação de queijos produzidos exclusivamente com leite de búfala, com o objetivo de garantir a autenticidade dos produtos. Queijos dos tipos muçarela, provolone, ricota e minas frescal, ao passarem por exames laboratoriais específicos, certificando-os da fabricação apenas com leite bubalino, recebem o “Selo de Pureza 100% Búfalo”.

Mesmo com a adoção do selo de pureza da ABCB ainda é possível encontrar adulterações em produtos derivados do leite de búfala. Nesse sentido, é importante avaliar as características relevantes a cada espécie.

Com o intuito de combater práticas ilegais e garantir a autenticidade da muçarela de búfala, algumas técnicas laboratoriais podem ser utilizadas, destacando-se: métodos eletroforéticos por meio de separação e identificação das frações correspondentes à caseína e/ou cromatográficos, através da separação e quantificação de peptídeos presentes nas amostras avaliadas.

Técnicas proteômicas tornaram-se ferramentas de pesquisa fundamentais no estudo de leite e derivados lácteos. Sendo assim, a identificação de peptídeos em queijos pode garantir ao produto

características próprias, não só como marcadores referentes a cada amostra, como também na identificação da individualidade do produto.

Considerando a necessidade de combater fraudes na produção e comercialização de queijo muçarela de búfala, este trabalho justificou-se na possibilidade de auxiliar pesquisas com questões científicas e sociais, pois propõe à adaptação e utilização de metodologias para verificação da autenticidade de muçarela de búfala, auxiliando e contribuindo com a fiscalização destes alimentos.

## **2. Revisão de literatura**

### **2.1. Aspectos gerais da Bubalinocultura**

A bubalinocultura caracteriza-se como o estudo, a criação e o aproveitamento de búfalos domésticos, também conhecidos como búfalos d'água (water buffalo). Os bubalinos são classificados zologicamente na família *Bovidae* (que, entre outros, incluem também bovinos, caprinos e ovinos), subfamília *Bovinae* e espécie *Bubalus bubalis* (BHAT, 1992; DAMÉ, 2006; ABCB, 2014).

Na literatura são descritas três subespécies: a) Variedade *bubalis* – é o búfalo preto, denominado búfalo de rio "river buffalo", utilizado para a produção de leite, sendo encontrado na Índia, Paquistão, Turquia, Itália, Brasil, entre outros países. Em território brasileiro, está representado pelas raças Murrah, Jafarabadi e Mediterrâneo; b) Variedade *kerebao* – é o búfalo de pântano "swamp buffalo", considerado excelente animal para trabalho. É encontrado na Malásia, China, Indonésia, Filipinas, Tailândia e outras localidades. No Brasil, está representado pela raça Carabao; c) Variedade *fulvus* – é o búfalo de coloração avermelhada. Nativo da região nordeste da Índia, vive em estado selvagem, sendo animal de menor porte que os demais (MARQUES, 1991; HAN et al., 2007).

### **2.2. População mundial de búfalos**

Segundo dados da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO, 2014), comparado com a espécie bovina, que apresentou cerca de 1,485 bilhões de cabeças no ano de 2012, o número de bubalinos é pequeno, porém mostrou crescimento ao longo dos últimos anos. O rebanho mundial de búfalos em 1990 foi de 148,379 milhões. No ano 2000 aumentou para, aproximadamente, 164,309 milhões de cabeças, enquanto que em 2012 já era de 199,093 milhões. A Tabela 1 mostra a distribuição e a proporção do rebanho mundial bubalinos por continente entre 1990 e 2012.

**Tabela 1:** Rebanho mundial de bubalinos, em cabeças, por continente.

Continente	1990	2000	2012
Ásia	143.302.442	159.393.869	193.256.484
África	2.897.492	3.379.435	3.985.025
América	1.405.162	1.108.426	1.268.702
Europa	578.919	232.499	372.838
Oceania	195.000	195.000	210.000
Mundial	148.379.015	164.309.229	199.093.049

**FONTE:** Adaptado de FAO (2014).

O continente asiático possui o maior rebanho, com o maior número de animais sendo observados na Índia e no Paquistão (AHMAD et al., 2008). Os búfalos se adaptam bem ao clima quente da Ásia, além do continente possuir programas de incentivo à produção de carne e leite de bubalinos para comercialização e consumo (BORGHESE, 2005).

Os bubalinos tiveram um crescimento médio de 25,5% ao longo dos últimos anos, contra apenas 12,7% dos bovinos. Isso se deve à ocupações de búfalos em localidades de difícil adaptação onde bovinos não tem condições de habitarem, além da maior rusticidade, longevidade e docilidade dos animais, bem como políticas de incentivo para a sua criação e surgimento de novas tecnologias com elaboração de derivados cárneos e lácteos bubalinos que, cada vez mais, fazem parte dos hábitos alimentares da população mundial (BORGHESE, 2005; FAO, 2014).

No Brasil, os búfalos foram introduzidos em 1890 na Ilha de Marajó - PA e, a partir daí, disseminaram-se para as demais regiões do país (FALEIRO, 2013).

O Brasil possui aproximadamente 1.262.000 de cabeças de búfalos espalhadas pelo país, com o maior efetivo desta espécie encontrando-se na região Norte (64,09%), seguido das regiões Sudeste (11,49%), Nordeste (9,69%), Sul (8,98%) e Centro-Oeste (5,75%) (IBGE, 2014).

Os búfalos são tradicionalmente considerados animais de tração. No Brasil e em muitas outras localidades, geralmente também são criados para a produção de carne e leite, com a escolha de animais selecionados e domesticados. Atualmente, as quatro raças comumente criadas no Brasil, Carabao (CA), Jafarabadi (JA), Mediterrâneo (ME) e Murrah (MU), são reconhecidas oficialmente pela ABCB (MARQUES, 1991; CUNHA NETO et al., 2005; ABCB, 2014).



### **2.3. Produção brasileira de leite de búfala**

O crescimento e desenvolvimento da bubalinocultura brasileira, dependendo da região do país, estão diretamente ligados à produção de leite e derivados. Nas regiões Nordeste e Sudeste observa-se a presença de bacias leiteiras em localidades onde existem laticínios especializados na industrialização do leite de búfala. Os principais fatores que impulsionaram essa atividade foram as novas tecnologias, aproveitando bem as características de rendimento do leite bubalino, com a elaboração de produtos derivados de boa qualidade nutricional e sensorial (BERNARDES, 2007).

A produção brasileira de leite de búfala destinada à industrialização vem crescendo, em média, 25% ao ano desde 2001. Estima-se que a produção de leite de búfala no Brasil seja superior a 92 milhões de litros por ano. Os produtores brasileiros notaram o potencial de mercado e passaram a investir nesta atividade (IBGE, 2014).

O crescimento na produção de leite de búfala se deve, entre outros fatores, ao aumento na demanda dos produtos, em especial os queijos (ANDRIGHETTO, 2011). Outro fator importante é que os produtores recebem valores diferenciados pelo litro de leite in natura de búfala, em torno de 40% a 50% a mais que o valor pago pelo litro de leite in natura de vaca (JESUS, 2014).

O estado do Pará é o maior produtor nacional de leite bubalino. Já a região Sudeste, principalmente devido ao estado de São Paulo, ocupa a liderança nacional na comercialização e receita gerada, por conta da maior concentração do mercado consumidor. A região Nordeste conta com um bom potencial de crescimento, apresentando o estado do Maranhão com maior produção (IBGE, 2014).

### **2.4. Características do leite de búfala**

Entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas saudáveis, bem alimentadas e descansadas. O leite de outros animais deve denominar-se segundo a espécie de que procede (BRASIL, 2011). Sendo assim, o leite de bubalinos deve ser denominado de leite de búfala.

Os componentes do leite de diferentes espécies de mamíferos (Tabela 2) caracterizam-se, basicamente, por água, proteínas, gordura, lactose, sólidos totais e sólidos desengordurados.

**Tabela 2:** Composição média do leite de diferentes espécies de mamíferos.

Espécie	Composição					
	Água (%)	Proteínas (%)	Gordura (%)	Lactose (%)	Sólidos Totais (%)	Sólidos Desengordurados (%)
Vaca	87,50	3,50	3,80	4,80	12,50	8,70
Búfala	82,00	4,00	7,50	5,10	18,00	10,50
Cabra	85,50	3,70	4,20	4,00	14,50	10,30
Ovelha	80,00	6,50	7,00	5,20	20,00	13,00

FONTE: Adaptado de SGARBIERI (1996); VENTURINI et al. (2007).

A água representa o maior componente percentual do produto, com aproximadamente 82% para o leite de búfala. É nesta fração que se encontram dispersos os componentes sólidos, denominados sólidos totais, constituídos de proteínas, gordura, lactose e sais na forma ionizada. Dos sólidos totais é subtraído o teor de lipídios (gordura), obtendo-se os sólidos não gordurosos ou desengordurados (proteínas, lactose e cinzas) (GONZÁLEZ et al., 2001; VENTURINI et al., 2007).

O leite de búfala apresenta, em geral, teores de proteínas, gordura, lactose, sólidos totais e sólidos desengordurados superiores ao leite de vaca, ocasionando maior rendimento industrial (SGARBIERI, 1996; VENTURINI et al., 2007; SINDHU e ARORA, 2011).

Algumas características diferenciam o leite de búfala do leite de outros animais. É um líquido de coloração branca, devido à ausência de pigmentos carotenoides (provitamina A) e sabor levemente adocicado (HUSSAIN et al., 2012).

As proteínas do leite são constituídas de caseínas na forma micelar ( $\alpha_{s1}$ -caseína,  $\alpha_{s2}$ -caseína,  $\beta$ -caseína e  $\kappa$ -caseína) e proteínas solúveis do soro ( $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactoalbumina e albumina). Além disso, o leite contém proteínas pouco abundantes, tais como, lactoferrina, imunoglobulinas, glicoproteínas e enzimas (RONCADA et al., 2012).

As micelas de caseína do leite bubalino, subdivididas nas frações  $\alpha_{s1}$ -caseína,  $\alpha_{s2}$ -caseína,  $\beta$ -caseína e  $\kappa$ -caseína, constituem em média, respectivamente, 35%, 15%, 32% e 5% do total. No leite bovino, a fração  $\alpha_{s1}$ -caseína constitui 40%,  $\alpha_{s2}$ -caseína 10%,  $\beta$ -caseína 45% e a  $\kappa$ -caseína representada por 10%. Estudos mostraram que a caseína do leite de búfala possui uma quantidade 25,5% superior de aminoácidos essenciais que o leite bovino (RONCADA et al., 2012).

A gordura, juntamente com as proteínas, são os constituintes do leite que apresentam maiores valores econômicos, sendo importantes em programas de pagamento por qualidade na indústria e na produção de alguns derivados lácteos. O teor de gordura é um parâmetro que contribui para desenvolvimento de sabor característico e melhoria da textura. É o componente mais variável do leite, sendo facilmente modificado de acordo com a alimentação, sanidade, idade e raça

do animal, entre outros. A determinação desse parâmetro é importante para verificar se o leite foi fraudado pela remoção do constituinte antes de chegar na indústria. No leite de búfala o teor de gordura geralmente está acima de 5,5% (VENTURINI et al., 2007).

A lactose, um dissacarídeo composto por glicose e galactose, é praticamente o único carboidrato presente no leite. É o principal constituinte nos processos de acidificação e também está relacionada com o valor nutritivo, textura e solubilidade, desempenhando papel preponderante na cor e sabor dos produtos elaborados. Em bubalinos, os teores de lactose são de, aproximadamente, 5,1% (GONZÁLEZ et al., 2001).

Representando as características físico-químicas, o potencial hidrogeniônico (pH) dos alimentos é um dos fatores que exercem influência sobre o crescimento, a sobrevivência e destruição de microrganismos. O pH do leite, que em condições normais varia de 6,4 a 6,8, pode ser considerado um indicador da qualidade higiênico-sanitária e estabilidade térmica (VENTURINI et al., 2007).

A acidez total do leite é caracterizada pela acidez proveniente de seus componentes, tais como caseína, albumina, fosfatos, dióxido de carbono e citratos, correspondendo a acidez natural (inicial), associada a acidez desenvolvida por degradação da lactose e posterior transformação em ácido láctico. O crescimento excessivo de bactérias no leite, devido à sua alta atividade de água ( $a_w$ ) associada com baixas condições higiênico-sanitárias de ordenha, manipulação e processamento, pode elevar a acidez a valores consideráveis. O leite de vaca, em condições consideradas adequadas e de acordo com a atual legislação deve apresentar valores de acidez que variem entre 0,14 g de ácido láctico/100 mL e 0,18 g de ácido láctico/100 mL (VENTURINI et al., 2007; AHMAD et al., 2008; BRASIL, 2011).

A acidez do leite de búfala é superior à do leite bovino. Isto se explica não só pelo fato de os bubalinos possuírem maiores quantidades de caseínas, que possuem aminoácidos com características anfóteras, atuando como ácido na titulação do teste de acidez, mas também por consequência dessas micelas estarem presentes em maior número e diâmetro (FALEIRO, 2013).

Devido a todas essas qualidades, o leite de búfala é uma excelente matéria-prima para a fabricação de queijos e outros derivados. Associado aos elevados teores de gordura, proteína e lactose, um dos principais diferenciais está também no reduzido número de células somáticas. Em conjunto, essas características permitem ao leite bubalino um rendimento de cerca de 40% superior ao leite bovino na elaboração de derivados (ANDRIGHETTO, 2011).

De acordo com Ménard et al. (2010), o leite de búfala pode prover ampla variedade de produtos, tais como, manteiga, queijos frescos e maturados, leite condensado, sorvetes, iogurtes e creme de leite. Destaca-se como exemplo de produto originalmente elaborado com esse tipo de

leite, o queijo muçarela na Itália. No Brasil, os principais produtos elaborados com leite bubalino são os queijos tipo muçarela e a ricota.

## **2.5. Muçarela de Búfala**

O queijo muçarela originou-se na Itália, nas regiões de Campana, Lazio, Apúlia e Molise, sendo essas localidades as únicas no mundo que detêm o selo da autêntica “*Mozzarella* de Búfala de Campana”, que é uma denominação de origem protegida (DOP) regulamentada por leis da União Europeia (ENNE et al., 2005; CZERWENKA et al., 2010; DALMASSO et al., 2011).

É um queijo de massa filada, produzido exclusivamente com leite de búfala integral e caracteriza-se por apresentar alta umidade ( $\leq 65\%$ ), alto teor de gordura na matéria seca ( $\geq 52\%$ ), massa elástica e sabor agradável (LOCCI et al., 2008; APONTE et al., 2010; AHMED et al., 2011).

No Brasil, entende-se por “*Mozzarella*”, “*Muzzarella*” ou “Muçarela” o queijo elaborado por filagem de massa acidificada (produto intermediário obtido por coagulação de leite por meio de coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas), complementada ou não pela ação de bactérias lácticas específicas (BRASIL, 1997).

Apesar da importância da pasteurização, na Itália, a muçarela é elaborada a partir de leite cru de búfala. Essas práticas são adotadas com o objetivo de não alterar o processamento original, além de garantir características particulares ao produto. No Brasil, produtores, transportadores e indústrias de laticínios geralmente utilizam leite de qualidade higiênico-sanitária duvidosa para produção do queijo muçarela, portanto só é permitida a utilização de leite pasteurizado. Ainda assim, muitas indústrias brasileiras elaboram queijos com leite cru (BUZI et al., 2009).

Em diversas localidades, produtos lácteos são elaborados utilizando-se misturas de leite de diferentes espécies. Nestes casos, torna-se necessária a avaliação da matéria-prima utilizada nestes produtos, principalmente em muçarela de búfala, com o objetivo de avaliar a autenticidade e garantir a segurança dos direitos dos consumidores (LÓPEZ-CALLEJA et al., 2005).

## **2.6. Adultrações em muçarela de búfala**

Fraude é definida como qualquer ato arditoso, enganoso, de má fé, com o intuito de lesar ou ludibriar, ou de não cumprir determinado dever. Portanto, a palavra fraude é associada a ações ilegais (HOUAISS e VILLAR, 2009).

O Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), em seu artigo 542 para leite e derivados, considera impróprio para consumo humano direto todo leite beneficiado que, entre outras características, esteja fraudado. Já no artigo 543, é considerado fraudado, adulterado ou falsificado o leite que:

- for adicionado de água;
- tiver sofrido subtração de qualquer dos seus componentes;
- for adicionado de substâncias conservadoras ou de quaisquer elementos estranhos à sua composição;
- for de um tipo e se apresentar rotulado como de outro de categoria superior;
- estiver cru e for vendido como pasteurizado;
- e for exposto ao consumo sem as devidas garantias de inviolabilidade.

Sendo assim, não deve-se elaborar derivados lácteos a partir de leite adulterado (BRASIL, 1997).

Vários são os aspectos decorrentes da adulteração em produtos lácteos, entre eles, a substituição e/ou omissão de certos componentes, adição de ingredientes para fazer parecer que o produto seja de qualidade superior e rotulagem falsa ou enganosa (MAYER, 2005). Tais adulterações incluem: mistura de leite de diferentes espécies na elaboração de queijos; incorporação de proteínas do soro na produção de queijos; e adição de caseínas ou proteínas do soro a produtos alimentares (VELOSO et al., 2002).

Proteções contra a substituição e/ou mistura de leite de diferentes espécies em produtos lácteos tornou-se um aspecto relevante no cenário mundial. Na Europa, leis exigem que produtores indiquem o tipo de leite utilizado na fabricação de queijos (LÓPEZ-CALLEJA et al., 2005).

A composição química e a produção do leite de búfala são influenciadas por diversos fatores, tais como, raça, lactação, idade, manejo, sanidade, condições climáticas, alimentação, período do ano, entre outros. Geralmente, a búfala produz cerca de 82% de leite no outono-inverno, causando falta de matéria-prima durante o verão (CZERWENKA et al., 2010; ANDRIGHETTO, 2011).

Para suprir a escassez e o preço mais elevado, alguns produtores e indústrias de produtos lácteos misturam leite de outras espécies ao de búfala, principalmente o da espécie bovina, o que configura fraude alimentar e prejudica a qualidade do produto final. Com o objetivo de combater esse tipo de fraude, a ABCB criou no ano 2000 o programa de certificação de queijos produzidos com leite de búfala chamado de “Selo de Pureza 100% Búfalo” (Figura 1). Esse selo garante, mediante exames laboratoriais de eletroforese realizados periodicamente, que o produto foi fabricado exclusivamente com leite de búfala (BUZI et al., 2009; CZERWENKA et al., 2010; ABCB, 2014).

**Figura 1:** Selo de Pureza 100% Búfalo



**FONTE:** ABCB (2014).

A adição de leite de vaca ao leite de búfala na produção de muçarela é constantemente realizada em diversas regiões do mundo, gerando ganhos financeiros significativos. Muçarela de búfala deve ser elaborada exclusivamente com leite de búfala, portanto qualquer traço de leite de vaca é considerado fraude. Com isso, para proteger os consumidores de práticas ilegais, diversas metodologias são utilizadas para avaliar a autenticidade desses produtos (DALMASSO et al., 2011).

## **2.7. Metodologias analíticas para detecção de adulterações em produtos lácteos**

Um dos objetivos dos métodos utilizados para avaliar a autenticidade de alimentos é identificar marcadores únicos ou grupos de marcadores que caracterizem, por exemplo, a individualidade de espécies na elaboração de produtos lácteos. As proteínas têm sido amplamente empregadas como marcadores por meio de técnicas bem estabelecidas e validadas (GUERREIRO et al., 2013).

A composição das frações proteicas do leite bovino já é bastante estudada por diversos pesquisadores, mas novas avaliações em relação às proteínas de leites de outras espécies, como o de búfala, apesar de já existirem estudos disponíveis, necessitam de caracterizações mais detalhadas. Para isso, técnicas proteômicas são adequadas para a obtenção dessas informações adicionais necessárias (HINZ et al., 2012).

Devido à grande variedade de produtos lácteos com diferentes características microbiológicas e bioquímicas, oriundos de leite de diferentes espécies e devido aos fatores que podem afetar o processo de maturação dos queijos, técnicas proteômicas empregadas comportam-se de maneiras distintas, geralmente sendo divididas em eletroforéticas, cromatográficas e imunológicas, que além de identificarem a diferença entre as espécies dos produtos, também podem quantificar de forma confiável as frações proteicas existentes (VELOSO et al., 2004; MAYER, 2005).

Os métodos eletroforéticos oferecem informações valiosas sobre o estudo das proteínas do leite, sendo utilizados na diferenciação do leite de várias espécies e/ou na mistura entre eles, permitindo a separação e identificação das proteínas. Uma das mais tradicionais técnicas de eletroforese, realizada em gel de poliacrilamida (PAGE), pode ser utilizada tanto na presença do surfactante dodecil sulfato de sódio (SDS) (SDS-PAGE - "Polyacrylamide Gel Electrophoresis in Sodium Dodecyl Sulfate") quanto de ureia (ureia-PAGE - "Polyacrylamide Gel Electrophoresis in Urea"). Com a evolução da tecnologia, técnicas mais sofisticadas foram desenvolvidas, tais como a eletroforese capilar (EC), que permitem redução no tempo de análise e detecções mais precisas no caso de adulterações. Os tipos de eletroforese capilar mais utilizados são a eletroforese capilar de zona (CZE - "capillary zone electrophoresis"), eletroforese capilar em gel (CGE - "capillary gel electrophoresis") e focalização isoelétrica capilar (CIEF - "capillary isoelectric focusing") (GÓMEZ-RUIZ et al., 2004; EGITO et al., 2006; SILVA, 2010).

O método oficial europeu de referência para detectar proteína bovina em produtos lácteos é a focalização isoelétrica (IEF Isoelectric focusing) da  $\gamma$ -caseína, que baseia-se na separação de acordo com o ponto isoelétrico (pI) da proteína. No ponto isoelétrico a migração da proteína se estabiliza por apresentar carga líquida nula, ou seja, o número de cargas positivas é similar ao número de cargas negativas (COMMISSION REGULATION, 1996; ENNE et al., 2005; LÓPEZ-CALLEJA et al., 2005; LOCCI et al., 2008).

Técnicas cromatográficas também são ferramentas muito utilizadas para caracterização proteômica de leite e derivados. Os métodos de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) estão entre os mais empregadas na detecção de adulterações em misturas, destacando-se a RP-HPLC ("Reverse-phase High Pressure Liquid Chromatography" ou cromatografia líquida de fase reversa) (SILVA, 2010; FONTENELE, 2013).

Ensaio imunológicos são frequentemente aplicados na área de alimentos para detecção qualitativa e quantitativa de frações proteicas, destacando-se o método ELISA ("Enzyme-Linked Immunosorbent Assay" ou Ensaio de Imunoabsorção ligado a enzima). Esse teste detecta a concentração de uma proteína de interesse em uma amostra que pode conter muitas proteínas diferentes. Porém, o problema é que este método nem sempre pode discriminar leite de espécies intimamente relacionadas, como a de vaca e búfala, e também não é aplicável a amostras tratadas termicamente (SILVA, 2010; DALMASSO et al., 2011).

Sendo assim, métodos eletroforéticos, cromatográficos e imunológicos, utilizados de forma individual ou em conjunto, são importantes na separação, identificação e quantificação das proteínas do leite de diferentes espécies (FONTENELE, 2013).

## 2.8. Eletroforese

A método eletroforético foi utilizado pela primeira vez em 1937 por Arne Tiselius, que separou proteínas não enzimáticas do soro sanguíneo em solução. Em 1962 foi aperfeiçoada por Ornstein e Davis com a introdução de poliacrilamida (FONTENELE, 2013).

É um método bioquímico utilizado para análise de partículas, por exemplo, separação de proteínas de acordo com a carga elétrica líquida da superfície externa, massa molecular e forma. Em um determinado tipo de gel, com a aplicação de potencial elétrico, moléculas de cargas positivas e negativas são atraídas para seus polos opostos e moléculas de menor massa molecular terão mais facilidade de migrar do que as de maior massa molecular, sendo possível a separação e identificação das frações proteicas (VELOSO, 2002).

Eletroforese pode ser conduzida com a proteína em sua forma nativa (eletroforese simples) ou com a proteína desnaturada pela ação de agentes desnaturantes, a exemplo do dodecil sulfato de sódio (SDS) (SGARBIERI, 1996).

Segundo Egito et al. (2006), as técnicas eletroforéticas apresentam alta sensibilidade mas, dependendo do tipo a ser utilizada, diferentes níveis de detecção podem ser identificados. A eletroforese em gel de poliacrilamida contendo ureia (ureia-PAGE) é capaz de detectar em torno de 2,5% de adição de leite bovino no leite de outras espécies. No entanto, outras técnicas, a exemplo da eletroforese capilar, conseguem identificar adulterações a partir de 1% (SILVA, 2010).

Eletroforese vem sendo utilizada em pesquisas de diversos autores (DI LUCCIA et al., 2008; PESIC et al., 2010; FALEIRO, 2013) objetivando separar, identificar e, algumas vezes, quantificar as proteínas do leite, auxiliando com resultados que expliquem com clareza a mistura de leite de diferentes espécies, os efeitos da proteólise e a verificação do comportamento das frações proteicas frente às condições de processamento e armazenamento de produtos lácteos (SGARBIERI, 2005).

Buzi et al. (2009) avaliaram, por meio da técnica ureia-PAGE, amostras de muçarela de búfala comercializadas no estado de São Paulo e relataram que 22% dos queijos estudados apresentaram a detecção de leite bovino em sua composição, devido às diferenças de mobilidade das frações da caseína bovina e bubalina.

Após a corrida eletroforética, as proteínas são visualizadas pela adição de um corante, que pode ser o azul de Coomassie e/ou o nitrato de prata, ligando-se às proteínas, revelando as bandas proteicas visíveis. Estes corantes permitem não só uma identificação qualitativa dos grupos de proteínas, como também uma quantificação aproximada, por meio de densitômetro no comprimento de onda correspondente à absorção da cor. Além disso, permitem a identificação das diferentes frações da caseína ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\kappa$ ), das proteínas do soro ( $\alpha$ -lactoalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina) e também



a visualização de peptídeos (VELOSO et al., 2004; WHITFORD, 2005; EGITO et al., 2006; GUERREIRO et al., 2013).

### **2.8.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

Durante vários anos, a eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida com o emprego de SDS (SDS-PAGE) para separação de proteínas do leite foi uma das principais ferramentas para análise das frações de caseína (RONCADA et al., 2012).

O SDS é um detergente aniônico que vincula-se à maioria das proteínas em quantidades proporcionais a massa molecular, com os peptídeos menores migrando mais rapidamente. Essa técnica é apropriada e tem sido muito utilizado para detectar alterações nas proteínas do soro e caseínas de produtos lácteos (VELOSO et al., 2002; WHITFORD, 2005).

Ao se tomar várias proteínas e submetê-las à eletroforese em gel de poliacrilamida mediante tratamento com SDS, a mobilidade dessas proteínas no gel será inversamente proporcional às massas moleculares. O mecanismo de atuação desta técnica ocorre da seguinte forma: concentração e separação das partículas devido a porosidade e pH do gel, migração por meio da aplicação de um campo elétrico devido à diferença de densidade de cargas de cada proteína e separação por diferença na massa molecular (SGARBIERI, 1996).

De forma geral, a técnica SDS-PAGE fundamenta-se na migração de proteínas por diferença de massa molecular. Com isso, frações proteicas que possuem menor massa molecular (menor tamanho), migram com maior facilidade pelo gel, localizando-se em regiões inferiores. Neste tipo de eletroforese é possível verificar no leite e/ou derivados a presença de proteínas denominadas de  $\alpha_s$ -CN e  $\beta$ -CN em locais distintos nos géis, justamente por possuírem diferentes massas moleculares, o que também pode ser explicado pela ação do SDS, que em contato com as proteínas causa modificações na estrutura da  $\alpha_s$ -CN, tornando-a com conformação estendida (linear). Como resultado a fração proteica adquire um tamanho aparentemente aumentado e, conseqüentemente, migração mais lenta em condições de SDS-PAGE (CRAMER e RICHARDSON, 1984).

Egito et al. (2006) estudaram Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (PAGE) na presença de Ureia (UREIA-PAGE) e Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE) para identificar adulteração do leite de cabra pela adição de leite de vaca. Como resultados, observaram que o método UREIA-PAGE foi o mais apropriado para identificação deste tipo de adulteração, não só no leite de cabra, como também no leite de outras espécies, explicado pela migração rápida da  $\alpha_{s1}$ -CN bovina. UREIA-PAGE conseguiu detectar fraudes de até 2,5% de misturas de leite. A técnica SDS-PAGE não foi considerada tão eficiente, porque a massa molecular das bandas analisadas foram bem

próximas, localizando-se em regiões similares nos géis, causando dificuldades na diferenciação entre as espécies, principalmente por conta da  $\alpha_{s1}$ -CN.

Portanto, a limitação desta técnica é que o perfil de proteínas de uma única espécie produz um padrão de bandas complexas e, mesmo quantidades pequenas de proteínas de outras espécies se sobrepõem as faixas de espécies específicas, sem falar que alguns tipos de queijos com altas incidências de proteólise geram uma interpretação incorreta dos resultados, ocasionando dúvidas e dificuldades na análise dos resultados (PESIC et al., 2011). Com isso, torna-se necessário complementar as informações por meio da avaliação de peptídeos extraídos das amostras a serem avaliadas.

## **2.9. Cromatografia**

A "International Union of Pure and Applied Chemistry" (IUPAC, 2014) define cromatografia como um método utilizado para separação de componentes de uma amostra, no qual os mesmos se distribuem entre a fase estacionária e a fase móvel. A fase estacionária pode ser um sólido, um líquido retido sobre um sólido ou um gel. Já a fase móvel pode ser líquida ou gasosa.

Um processo cromatográfico consiste na injeção de certa quantidade de amostra contendo uma mistura de solutos em um sistema composto por uma fase estacionária fixa e uma fase móvel fluida escoando em contato direto com a fase estacionária. A fase estacionária, geralmente é empacotada em uma coluna (POOLE, 2002).

O princípio geral de separação consiste em interações entre os constituintes da fase móvel e a fase estacionária. Os solutos possuem relações características com a fase estacionária, sendo transportados a velocidades distintas (NÓBREGA, 2004).

Com a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, a amostra é arrastada para dentro da coluna. E, dependendo das interações entre os solutos presentes na amostra e as fases, os mesmos serão retidos com maior ou menor facilidade em diferentes localidades da coluna. Quanto maior a interação pela fase estacionária, maior será o tempo para o soluto sair da coluna e, por meio de detectores na saída, é possível avaliar os perfis de cada constituinte em formas de cromatogramas, os quais fornecem informações a respeito da identificação do componente, por meio da posição do pico ao longo do tempo, ou seja, o tempo de retenção do composto, e também da sua quantidade, através da altura ou área do pico da amostra investigada em comparação a um determinado padrão da mesma substância (POOLE, 2002).

### 2.9.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (do inglês "High Performance Liquid Chromatography" - HPLC) pode ser definida como um processo de migração de solutos em fase móvel líquida, em que os componentes presentes em determinada amostra são seletivamente retidos pela fase estacionária (COLLINS et al., 1990).

A técnica mostra-se eficiente na separação, identificação e quantificação de proteínas e peptídeos, por apresentar cromatogramas com boas resoluções, resultando em análises automatizadas, eficientes e rápidas (VELOSO et al., 2002).

Esta técnica torna-se cada vez mais necessária na avaliação de compostos com propriedades funcionais, caso dos peptídeos presentes em queijos, por exemplo. Além disso, esses peptídeos podem servir como marcadores da qualidade desses alimentos, pois alguns deles podem ser característicos de determinada espécie animal. Com isso, a CLAE pode ser utilizada para identificação da presença de leite de vaca em leite e queijos de outras espécies (URBANKE et al., 1992; FONTENELE, 2013).

Diversas pesquisas evidenciaram a utilização de RP-HPLC. Ferreira e Caçote (2003) utilizaram esta técnica para detectar e quantificar teores de leite de vaca, ovelha e cabra em queijos portugueses com DOP, mostrando-se uma técnica sensível e precisa.

Ong et al. (2007) examinaram peptídeos com propriedades funcionais (peptídeos bioativos) em queijos Cheddar elaborados com adição de probióticos *Lactobacillus casei* sp, por meio de RP-HPLC.

Bonfatti et al. (2013) utilizaram RP-HPLC para separação e quantificação de proteínas do leite de búfala, em que as frações de caseína e as proteínas do soro, assim como suas variantes genéticas, foram detectadas e separadas em torno de 40 minutos, com eficiência nos resultados encontrados.

Fontenele (2013), por meio de RP-HPLC, avaliou o perfil de peptídeos de queijo coalho produzidos na região de Jaguaribe - CE, visando ao processo certificação de Indicação Geográfica (IG). Os resultados mostraram que os queijos oriundos do Ceará apresentaram perfis cromatográficos distintos em relação aos queijos de Pernambuco.

Com isso, mostra-se que RP-HPLC é uma técnica de separação de compostos muito utilizada na área de alimentos. Isso se deve, entre outros fatores, à sua boa sensibilidade, fácil adaptação e grande aplicabilidade. Esta técnica é considerada altamente discriminante e importante para avaliação da autenticidade e qualidade de queijos (PARENTE et al., 2012; SKOOG et al., 2001).

## 2.10. Peptídeos em queijos

Peptídeos são compostos resultantes da união entre dois ou mais aminoácidos, por meio de ligação peptídica. Podem ser descritos como fragmentos específicos de proteínas, utilizados para identificação da presença de leite de diferentes espécies na elaboração de derivados lácteos (DA SILVA, 2012).

Proteínas encontradas em alimentos são excelentes fontes de peptídeos. Na verdade, peptídeos são inativos dentro da proteína, sendo liberados somente por hidrólise enzimática no intestino e/ou hidrólise proteolítica por ação de microrganismos e enzimas proteolíticas (TIMÓN et al., 2014).

A proteólise é considerada um processo bioquímico complexo e importante que causa a degradação das proteínas (principalmente as caseínas) por enzimas proteolíticas, a peptídeos e aminoácidos, causando impactos para o desenvolvimento do sabor e textura de alguns alimentos, a exemplo dos queijos durante a maturação, como também com diversas funções benéficas para o organismo humano e com grande relevância em questões relacionadas à qualidade e autenticidade de produtos lácteos. A proteólise de queijos é influenciada por vários fatores, incluindo a ação da plasmina e quimosina (VELOSO et al., 2004; PARENTE et al., 2012; FONTENELE, 2013).

A ingestão de peptídeos afeta os principais sistemas do organismo, tais como: cardiovascular, digestivo, imunológico e nervoso. Vários são os efeitos benéficos associados à ingestão de peptídeos, também chamados de peptídeos bioativos, como efeitos antimicrobianos, anti-hipertensivos, imunomoduladores, antioxidantes, antibacterianos e hipocolesterolêmico. Geralmente, esses peptídeos possuem de 3 a 20 resíduos de aminoácidos responsáveis por suas atividades e funções (TIMÓN et al., 2014).

As proteínas do leite são consideradas umas das mais importantes fontes de peptídeos bioativos. Estudos com queijo Cheddar mostraram atividades anti-hipertensiva, imunomoduladora, opióides, antimicrobianas e antioxidantes (PRITCHARD et al., 2010).

Além dos efeitos benéficos para o organismo após a ingestão, reações proteolíticas podem ocasionar a formação e/ou degradação de peptídeos que auxiliem na identificação de queijos com características próprias, não só como marcadores referentes a cada amostra, como também na caracterização da individualidade do produto. Dessa forma, a identificação de peptídeos pode auxiliar no combate a adulterações em diversos tipos de queijos (DA SILVA, 2012; PARENTE et al., 2012).

## **2.11. Importância da composição química e caracterização físico-química**

A investigação da composição química ou centesimal (umidade, cinzas, gordura, gordura no extrato seco (GES), proteínas, extrato seco total (EST) e extrato seco desengordurado (ESD)) e características físico-químicas (acidez titulável e pH) de queijos muçarela servem para comprovar os aspectos gerais dos produtos. Czerwenka et al. (2010) afirmaram que a qualidade e composição de um alimento variam conforme a matéria-prima utilizada e as condições de processamento. Assim, o tipo leite utilizado na formulação do queijo, influencia diretamente nos parâmetros do produto final.

É de grande importância a realização dessas análises, pois são elas que indicam a real composição e qualidade, informando possíveis problemas provenientes de processamento e/ou matéria-prima (FRIANO et al., 2008).

O queijo muçarela brasileiro possui características físico-químicas e composição centesimal irregulares, devido à existência de padrões legais incompletos e da presença de grandes variações nos métodos de elaboração, em que cada indústria de várias localidades utilizam metodologias diferenciadas na fabricação dos produtos (FALEIRO, 2013).

Devido à aceitação e popularidade, o queijo muçarela vem ganhando novos consumidores. Essa oportunidade de mercado desperta grande interesse de várias empresas do setor de lácteos em incorporar a tecnologia deste produto em sua linha de produção. A muçarela de búfala pode ser considerada importante na alimentação, porque apresenta teor relevante de lipídeos, proteínas, minerais e vitaminas, sendo um substituto à muçarela de vaca (ABIQ, 2014).

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Adaptar metodologias de técnicas eletroforéticas e cromatográficas visando verificar a autenticidade de muçarela de búfala.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Avaliar os efeitos da proteólise sobre o tempo de refrigeração (Tempo 0 e Tempo 20) nas características dos queijos muçarela avaliados;
- Caracterizar a composição química e as propriedades físico-químicas das muçarelas avaliadas, por meio das análises de umidade, cinzas, gordura, gordura no extrato seco (GES), proteínas, extrato seco total (EST), extrato seco desengordurado (ESD), acidez titulável e pH;
- Identificar as frações proteicas dos queijos muçarela produzidos, por meio de estudos eletroforéticos (SDS-PAGE);
- Determinar o perfil eletroforético (SDS-PAGE) das muçarelas comerciais, a fim de detectar possíveis fraudes pela adição de leite de vaca;
- Realizar o estudo de peptídeos presentes nas muçarelas elaboradas e comerciais por meio de análise eletroforética (SDS-PAGE);
- Realizar o estudo cromatográfico (RP-HPLC) dos peptídeos presentes nas amostras elaboradas e comerciais;
- Determinar a menor quantidade de leite de vaca adicionado aos queijos muçarela que é possível de ser detectada em muçarela de búfala por meio das técnicas SDS-PAGE e RP-HPLC.

## **4. Material e Métodos**

### **4.1. Local e período do experimento**

O experimento foi conduzido na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), campus da cidade de Itapetinga - BA. A coleta das amostras comerciais de queijo muçarela de búfala foi realizada entre os meses de maio de 2014 e setembro de 2014, em diferentes localidades do estado da Bahia. Os leites bubalino e bovino para elaboração das muçarelas com diferentes formulações foram fornecidos por um laticínio localizado no município de Itapetinga - BA, nos meses de junho, julho e agosto de 2014, e os queijos foram processados no mesmo local e período da coleta dos leites. As análises químicas e físico-químicas dos queijos foram conduzidas na UESB, nos Laboratórios de Processamento de Leite e Derivados, Engenharia de Processos (LEP), Análise de Alimentos, Centro de Desenvolvimento e Difusão de Tecnologias (CEDETEC) e no Centro de Estudos e Análises Cromatográficas (CEACROM).

### **4.2. Aquisição das amostras comerciais**

Muçarelas de búfala foram obtidas em comércio varejista de diferentes localidades do estado da Bahia. Foram coletadas em embalagens comerciais de 500 g, vendidas sob refrigeração em temperaturas de 4 °C a 8 °C, 6 marcas comerciais de muçarela de búfala. De cada marca foram coletadas três diferentes lotes, cada lote correspondendo a uma repetição.

Após as coletas, os queijos foram mantidos sob refrigeração a 4 °C. Para que houvesse uma padronização das amostras e maior controle de proteólise, todos os queijos foram obtidos considerando-se um prazo máximo de 20 dias após a data de fabricação, sendo congelados a -20 °C no 20º dia de fabricação.

### **4.3. Elaboração dos queijos muçarela**

#### **4.3.1. Percentuais de misturas dos queijos**

Amostras experimentais de queijo muçarela foram processadas utilizando-se leite de búfala e vaca. Os queijos foram elaborados com quantidades variáveis e crescentes de leite bovino em adição ao bubalino (2,5%, 5,0%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%), bem como amostras de referência elaboradas, exclusivamente, com leite de búfala (tratamento referência búfala - TRB) e vaca (tratamento referência vaca - TRV).

### 4.3.2. Processamento dos queijos

O volume total de leite utilizado para cada formulação foi de 50 litros, com padronização do teor de gordura em aproximadamente 3,6% após o preparo das formulações.

Para a fabricação dos queijos muçarela (Figura 2), o leite obtido foi filtrado e pasteurizado a 65 °C/30 minutos, sob agitação constante, em tanque de dupla parede, com posterior resfriamento. Em seguida, foi realizada a adição dos seguintes ingredientes:

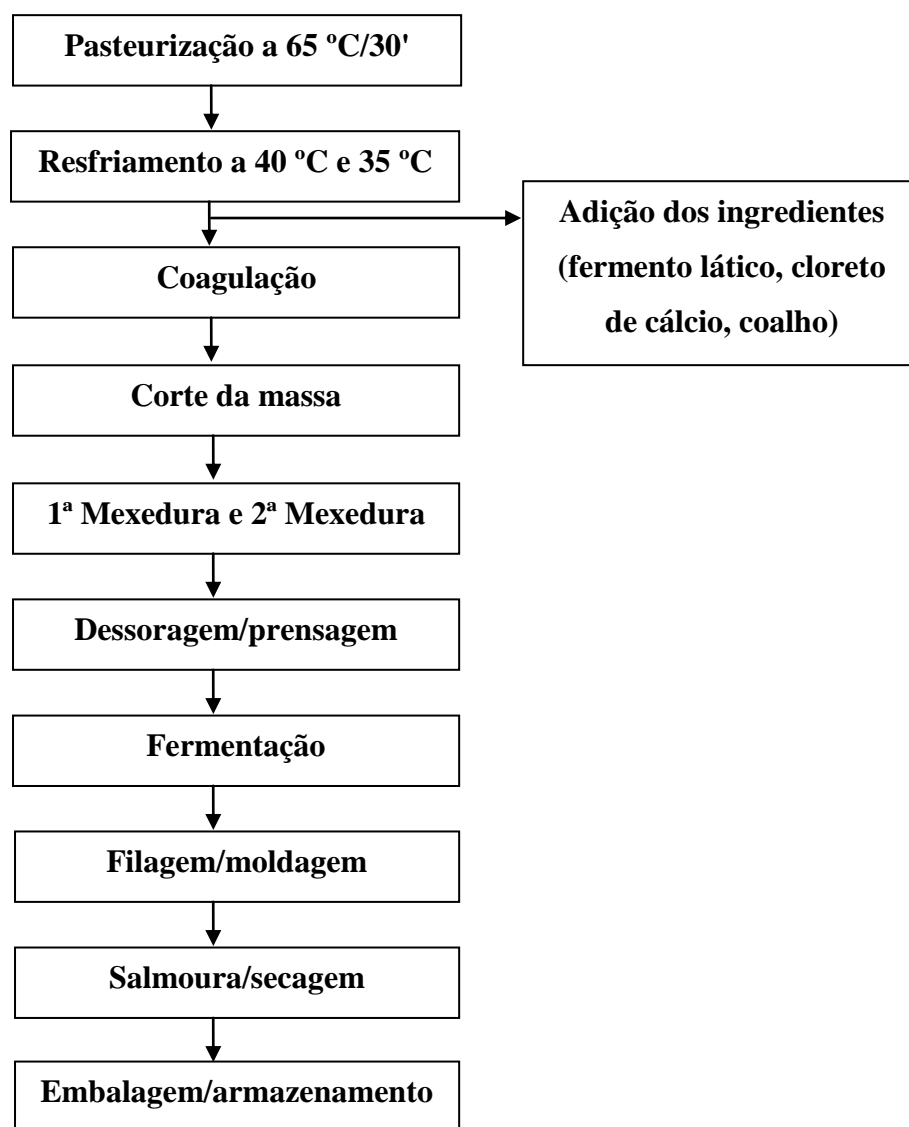
- 1,0 g de cultura láctica mesofílica liofilizada (Fermento DVS-R704 *Chr Hansen*), constituída pelas espécies *Lactococcus lactis* subespécie *cremoris* e *Lactococcus lactis* subespécie *lactis*, dissolvida em 1 litro de leite de búfala, adicionado a 40 °C.

- 10 mL de cloreto de cálcio a 50% (v/v) e 20 mL de coalho (coagulante líquido HA-LA® do Brasil - *Chr Hansen* - força 1:3:000) diluído em 50 mL de água potável, adicionados a 35 °C.

Após homogeneização e repouso de 20 minutos até a ocorrência da formação do coágulo (massa), o mesmo foi cortado (cerca de 1,0 cm de aresta) no sentido vertical e depois horizontal com o auxílio de liras. Procedeu-se lentamente a 1ª mexedura da massa, com elevação da temperatura até 40 °C, por 15 minutos e depois uma 2ª mexedura mais intensa de 15 minutos a 40 °C, até obter-se uma massa cozida e firme. Efetuou-se a dessoragem, com posterior prensagem da massa e fermentação da mesma por um período de, aproximadamente, 18 horas, até a massa atingir pH 4,9 - 5,1. Atingido o pH necessário, a massa foi fatiada em tiras finas, filada em água quente a 85 °C, cortada e moldada em fôrmas próprias (de aproximadamente 500 g) para queijo muçarela até remoção do soro, sendo viradas inicialmente de 10 em 10 minutos por 4 vezes. Assim, procedeu-se a salga dos queijos em salmoura a 20% (m/v) com temperatura de 12 °C por 1 hora, com posterior secagem em câmara fria à 12 °C, por 12 horas. Em seguida, os queijos foram embalados a vácuo em embalagens termoencolhíveis. Os queijos de todas as formulações foram processados em 3 repetições cada, totalizando 27 processamentos em dias diferentes. Diariamente as amostras foram enviadas ao Laboratório de Processamento de Leite e Derivados, onde uma amostra de cada formulação foi congelada imediatamente a -20 °C (Tempo 0) e outra foi mantida sob refrigeração a 4 °C por 20 dias, sendo congelada a -20 °C, no 20º dia após a data de fabricação (Tempo 20).



**Figura 2:** Fluxograma de produção dos queijos muçarela.



#### **4.4. Preparação geral das amostras**

As diferentes amostras de muçarela de búfala, tanto as comerciais quanto as elaboradas, foram descongeladas sob refrigeração a 4 °C por 2 horas para realização das análises.

#### **4.5. Composição química e caracterização físico-química**

Para composição e caracterização dos queijos foram determinados os teores de umidade, cinzas, gordura, gordura no extrato seco (GES), proteínas, extrato seco total (EST), extrato seco desengordurado (ESD), acidez titulável e pH. Todas as determinações das três repetições dos queijos foram realizadas em triplicata de acordo com metodologias descritas pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008).

## **4.6. Eletroforese**

### **4.6.1. Preparação das amostras para análise eletroforética**

Cerca de 20 g das amostras raladas de forma homogênea foram transferidas para frascos plásticos higienizados, identificados e colocados em ultrafreezer para congelamento a -80 °C por 24 horas. Após esse período, foram liofilizadas à -48 °C e 0,040 mBar por 72 horas em liofilizador de bancada FreeZone 4,5 L da marca LABCONCO. Depois de liofilizadas foram vedadas com parafilme e armazenadas a -20 °C até a realização da eletroforese.

Para a análise eletroforética as amostras liofilizadas foram descongeladas. Em eppendorfs, 2 mg de cada amostra foram pesadas, dissolvidas em 800 µL de solução tampão Tris-HCl (pH = 6,8), na presença de 0,1% de SDS e 5% de β-mercaptoetanol. Em seguida, após completa dissolução, foram aquecidas a 100 °C por 3 minutos e acrescidas de 200 µL de solução de 10% de glicerol e 0,01% de azul de bromofenol. Por fim, foram congeladas a -20 °C até o momento de utilização nas corridas eletroforéticas (EGITO et al., 2006).

### **4.6.2. Análise do perfil eletroforético**

A caracterização eletroforética das muçarelas foi realizada, em duplicata, segundo metodologia recomendada por Egito et al. (2006), por meio da técnica em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes com adição de SDS, em aparelho para eletroforese vertical da marca Apelex.

Utilizou-se géis de separação com 15% de poliacrilamida em 380 mmol/L de tampão Tris-HCl (pH 8,8), contendo 0,1% de SDS e géis de concentração/empilhamento de 5% de poliacrilamida em 125 mmol/L de tampão Tris-HCl (pH 6,8).

### **4.6.3. Preparação das placas**

Placas de vidro (10 cm x 10 cm) foram lavadas com solução detergente, enxaguadas com água destilada, higienizadas com álcool 70% e secas com papel toalha. Em seguida, montadas aos pares com a ajuda de espaçadores de 1,5 mm de espessura colocados entre as mesmas, e presilhas aplicadas nas laterais e na parte inferior para vedá-las. Foi verificado se existia vazamento entre as placas adicionando-se água destilada, caso não existisse vazamento, a água era descartada e as placas já montadas eram secas com tiras de papel toalha.

#### 4.6.4. Preparação dos géis

A preparação dos géis de separação e concentração/empilhamento foi realizada de acordo com a Tabela 3, sendo utilizadas placas de mini-géis.

**Tabela 3:** Componentes do gel de separação e concentração/empilhamento.

	Gel de separação	Gel de concentração
Reagentes	Volume ( $\mu\text{L}$ )	
Acrilamida / Bis-acrilamida	4110	520
Tampão de separação (pH 8,8)	2560	xxx
Tampão de concentração (pH 6,8)	xxx	1010
SDS 10% (m/v)	100	40
Temed	10	4
Persulfato de amônio 50% (m/v)	67	80

Após a preparação do gel de separação, o mesmo foi adicionado entre as placas de vidro e, em seguida, acrescentou-se água destilada na parte superior para auxiliar na polimerização. Esse processo durou cerca de 30 minutos. Após a polimerização, o molde foi inclinado cuidadosamente para remoção da água destilada.

A solução de concentração/empilhamento a 5% foi preparada, Em seguida, foi adicionada lentamente sobre o gel de separação polimerizado. Um molde em forma de pente foi acomodado sobre o gel de concentração, com o objetivo de formar canaletas/poços que permitiam a aplicação das amostras. Novamente, aguardou-se a polimerização do gel por, aproximadamente, 30 minutos.

Durante o preparo dos géis, as amostras que foram preparadas anteriormente foram descongeladas e homogeneizadas utilizando-se agitador vortex. Após a polimerização do gel de concentração, retirou-se o pente, adicionou-se solução tampão para preencher as canaletas e retirar as bolhas de ar, e com ajuda de uma micropipeta aplicou-se 10  $\mu\text{L}$  de cada amostra, de modo que a quantidade de proteína aplicada em cada canaleta foi de aproximadamente 20  $\mu\text{g}$ . As canaletas das extremidades foram descartadas e a primeira destinada ao padrão de massa molar SDS-PAGE (BIO-RAD), composto de aprotinin (6,5 kDa), lisozima (14,4 kDa), inibidor tripsina (21,5 kDa), anidrase carbônica (31 kDa), ovalbumina (45 kDa), albumina sérica (66,2 kDa), fosforilase b (97,4 kDa),  $\beta$ -galactosidase (116,2 kDa) e miosina (200 kDa). As demais canaletas (intermediárias) foram utilizadas para as amostras, totalizando 8 amostras por gel.

#### **4.6.5. Corrida eletroforética**

Para migração das proteínas utilizou-se corrente elétrica constante de 250 V, amperagem de 30 mA e temperatura controlada entre 4 °C e 8 °C por aproximadamente 1 hora.

#### **4.6.6. Fixação das proteínas**

Terminada a corrida eletroforética, o gel foi retirado das placas de vidro e as proteínas foram fixadas com 12% (m/v) de ácido tricloroacético (TCA) durante 30 min e, em seguida, imersas em solução corante com 0,1% de azul de Coomassie Brilhante G250, dissolvido em uma mistura de 50% de metanol e 2% de TCA, por 180 min. A descoloração foi realizada durante uma noite com solução de 30% de metanol e 7,5% de ácido acético. Os processos de fixação, coloração e descoloração foram realizados sob agitação lenta constante em mesa agitadora.

A seguir, o gel foi fotografado e, posteriormente, submetido a uma nova coloração com Nitrato de Prata, segundo protocolo adaptado de Bloom et al. (1987) com modificações. Para este procedimento o gel de poliacrilamida, corado com azul de Coomassie Brilhante G250, foi submetido a um processo de lavagem com água destilada em 3 incubações de 20 minutos. Após esta etapa, o gel foi incubado em solução de Tiosulfato de sódio por 1 minuto. Posteriormente, o gel foi imerso a uma solução de nitrato de prata 0,1% durante 30 minutos, sob ausência de luz. Após esta etapa, adicionou-se ao gel solução reveladora até o aparecimento das bandas coradas. Todas as fases do processo foram realizadas sob agitação lenta e constante. A reação foi interrompida com adição de ácido acético 1%.

#### **4.6.7. Análise dos géis**

Todas as imagens dos géis foram armazenadas para, posteriormente, passarem por formatação no programa Microsoft Office PowerPoint 2013 para identificação de cada banda proteica e análise de peptídeos.

Foi utilizado o programa GelAnalyzer 2010a (GA, 2014) para estimar as massas moleculares referentes a cada banda presente nos géis das amostras avaliadas. As avaliações foram conduzidas em duas repetições de imagens, obtendo-se a média das massas moleculares.

#### **4.7. Extração dos peptídeos solúveis em água (PSA)**

Amostras de muçarela ralada (10 g) foram homogeneizadas em 50 mL de água ultrapura em mesa agitadora, a 200 rpm por 1 hora. Em seguida, o conteúdo foi filtrado e centrifugado por 3 vezes consecutivas de 20 minutos a 4 °C e 4000 x g. No intervalo de cada centrifugação o sobrenadante foi filtrado em papel de filtro quantitativo nº 41. Os extratos contendo os peptídeos solúveis em água (PSA) foram congelados a -80 °C por 24 horas e liofilizados à -48 °C e 0,040 mBar por 72 horas em liofilizador de bancada FreeZone 4,5 L da marca LABCONCO. Depois de liofilizados foram vedados com parafilme e armazenados a -20 °C, segundo metodologia descrita por Ong et al. (2007) com modificações. Posteriormente estes peptídeos foram avaliados por meio de eletroforese SDS-PAGE nas mesmas condições descritas anteriormente e cromatografia líquida RP-HPLC.

#### **4.8. Análise dos peptídeos solúveis em água extraídos dos queijos por RP-HPLC em coluna C18**

Uma alíquota de 100 mg do PSA liofilizado foi dissolvida em 1 mL de solução a 5% (v/v) de acetonitrila (JT BAKER) e 0,1% (v/v) de ácido trifluoracético (TFA) (Sigma-Aldrich), submetida a agitação em vortex por 20 minutos e filtrada em filtro de nylon de 0,45 µm (M. NAGEL). Em seguida, a amostra foi submetida à cromatografia líquida de fase reversa (RP-HPLC) utilizando uma coluna C18 (250x4 mm de diâmetro interno, 5 mm de tamanho de partícula e 10 nm de porosidade; Supelco), acoplada de uma pré-coluna, conectada a um HPLC. Volumes de 20 µL contendo 4 mg de peptídeos foram injetados na coluna com gradiente linear 5% a 50% (v/v) de acetonitrila, contendo 0,1% (v/v) de TFA, durante 60 minutos com fluxo de 1 mL/min. A detecção foi realizada a 215 nm em um detector UV - Vis. A metodologia utilizada foi descrita por Ong et al. (2007) com modificações.

#### **4.9. Análises estatísticas**

O delineamento experimental utilizado na determinação da composição química e características físico-químicas dos queijos muçarela elaborados foi o Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC). A avaliação nas diferenças entre os dois tempos de refrigeração (Tempo 0 e Tempo 20) foi realizada por análise de variância univariada (ANOVA), com o teste F ao nível de 5% de probabilidade ( $\alpha = 0,05$ ). A análise dos resultados das formulações em um mesmo tempo de refrigeração foram submetidos à análise de regressão em função dos tratamentos à 5% de significância. Os modelos matemáticos foram escolhidos de acordo com os efeitos significativos do

modelo proposto ( $p \leq 0,05$ ), falta de ajustamento não significativa ( $p > 0,05$ ) e coeficientes de determinação ( $R^2$ ) em relação ao  $SQ_{\text{TRAT}}$  que foram capazes de explicar a variação total por meio da regressão ajustada.

Para as amostras comerciais, o delineamento experimental utilizado foi o DIC, por meio de ANOVA, com as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5% de probabilidade ( $\alpha = 0,05$ ).

Todos os procedimentos estatísticos foram executados por meio do programa estatístico R Development Core Team (2010).

## 5. Resultados e Discussão

### 5.1. Composição química e caracterização físico-química dos queijos muçarela elaborados

**Tabela 4:** Valores médios ( $\pm$  DP) da composição química (umidade, cinzas, gordura e GES) dos queijos muçarela elaborados no tempo 0 e 20.

Amostras	Variáveis							
	Umidade (%)		Cinzas (%)		Gordura (%)		GES (%)	
	Tempo 0	Tempo 20	Tempo 0	Tempo 20	Tempo 0	Tempo 20	Tempo 0	Tempo 20
<b>TRB</b>	39,05 $\pm$ 1,71	42,23 $\pm$ 1,46	3,42 $\pm$ 0,29	3,13 $\pm$ 0,20	28,33 $\pm$ 1,55	28,69 $\pm$ 0,60	48,63 $\pm$ 1,17	49,70 $\pm$ 2,18
<b>2,5%</b>	38,80 $\pm$ 3,81	40,64 $\pm$ 0,89	3,08 $\pm$ 0,51	3,20 $\pm$ 0,42	25,60 $\pm$ 2,53	25,33 $\pm$ 2,56	44,93 $\pm$ 3,87	45,43 $\pm$ 2,79
<b>5,0%</b>	40,51 <sup>a</sup> $\pm$ 1,27	44,22 <sup>b</sup> $\pm$ 1,73	3,35 $\pm$ 0,15	3,44 $\pm$ 0,16	24,12 $\pm$ 0,02	24,14 $\pm$ 0,84	41,22 $\pm$ 1,40	42,38 $\pm$ 1,67
<b>10,0%</b>	42,12 $\pm$ 0,64	42,18 $\pm$ 0,84	3,11 $\pm$ 0,04	3,38 $\pm$ 0,26	25,58 $\pm$ 2,01	25,80 $\pm$ 2,32	43,87 $\pm$ 2,32	45,13 $\pm$ 2,02
<b>20,0%</b>	42,11 $\pm$ 0,93	41,31 $\pm$ 1,00	3,18 $\pm$ 0,33	3,16 $\pm$ 0,23	26,07 $\pm$ 1,78	25,74 $\pm$ 2,20	44,77 $\pm$ 3,10	44,24 $\pm$ 3,88
<b>30,0%</b>	42,44 $\pm$ 1,22	43,31 $\pm$ 0,72	3,40 $\pm$ 0,32	3,19 $\pm$ 0,24	26,01 $\pm$ 0,96	25,19 $\pm$ 0,58	43,41 $\pm$ 1,90	43,06 $\pm$ 1,99
<b>40,0%</b>	42,72 $\pm$ 0,53	42,92 $\pm$ 1,02	3,17 $\pm$ 0,20	3,20 $\pm$ 0,16	26,05 $\pm$ 1,44	26,29 $\pm$ 1,61	45,27 $\pm$ 1,93	45,88 $\pm$ 2,95
<b>50,0%</b>	43,55 $\pm$ 0,55	43,75 $\pm$ 1,12	3,27 $\pm$ 0,52	3,14 $\pm$ 0,23	24,19 $\pm$ 0,79	24,68 $\pm$ 1,00	40,83 $\pm$ 1,19	40,84 $\pm$ 2,01
<b>TRV</b>	44,51 $\pm$ 0,88	45,86 $\pm$ 2,18	2,65 $\pm$ 0,05	3,00 $\pm$ 0,37	25,20 $\pm$ 1,89	25,42 $\pm$ 1,41	44,21 $\pm$ 3,92	44,68 $\pm$ 1,88
<b>CV (%)</b>	3,83	3,02	9,83	8,30	6,24	6,31	5,72	5,47

\* Médias seguidas por letras distintas nas linhas, em relação aos tempos de refrigeração (Tempo 0 e Tempo 20) para uma mesma variável, diferem estatisticamente entre si ( $p \leq 0,05$ ) pelo teste F, ao nível de 5% de probabilidade ( $\alpha = 0,05$ ). DP = desvio padrão. As amostras foram apresentadas em ordem crescente de adição de leite bovino ao bubalino para elaboração das muçarelas. TRB corresponde à amostra com 100% leite de búfala e TRV para amostra com 100% leite de vaca. GES refere-se ao teor de gordura convertida para base seca. CV = coeficiente de variação.

**Tabela 5:** Valores médios ( $\pm$  DP) da composição química (proteína, EST e ESD) e caracterização físico-química (pH e acidez) dos queijos muçarela elaborados no tempo 0 e com 20 dias de refrigeração.

Amostras	Variáveis									
	Proteína (%)		EST (%)		ESD (%)		Acidez (% ácido lático)		pH	
	Tempo 0	Tempo 20	Tempo 0	Tempo 20	Tempo 0	Tempo 20	Tempo 0	Tempo 20	Tempo 0	Tempo 20
<b>100% B.</b>	26,17 $\pm$ 1,72	24,83 $\pm$ 1,47	60,95 $\pm$ 1,71	57,77 $\pm$ 1,46	32,62 $\pm$ 3,15	29,08 $\pm$ 1,96	0,39 $\pm$ 0,07	0,40 $\pm$ 0,05	5,30 $\pm$ 0,06	5,33 $\pm$ 0,07
<b>2,5%</b>	25,81 $\pm$ 0,48	24,01 $\pm$ 0,96	61,20 $\pm$ 3,81	59,36 $\pm$ 0,89	35,60 $\pm$ 6,18	34,03 $\pm$ 3,15	0,40 $\pm$ 0,05	0,39 $\pm$ 0,01	5,28 $\pm$ 0,03	5,42 $\pm$ 0,11
<b>5,0%</b>	25,68 $\pm$ 0,43	24,29 $\pm$ 0,92	59,49 <sup>a</sup> $\pm$ 1,27	55,78 <sup>b</sup> $\pm$ 1,73	35,37 <sup>a</sup> $\pm$ 1,25	31,64 <sup>b</sup> $\pm$ 1,12	0,37 $\pm$ 0,06	0,37 $\pm$ 0,02	5,34 $\pm$ 0,03	5,37 $\pm$ 0,08
<b>10,0%</b>	24,90 $\pm$ 0,76	24,46 $\pm$ 0,43	57,88 $\pm$ 0,64	57,82 $\pm$ 0,84	32,30 $\pm$ 1,48	32,02 $\pm$ 2,81	0,36 $\pm$ 0,08	0,35 $\pm$ 0,00	5,39 $\pm$ 0,04	5,39 $\pm$ 0,06
<b>20,0%</b>	24,39 $\pm$ 0,06	24,51 $\pm$ 0,65	57,89 $\pm$ 0,93	58,69 $\pm$ 1,00	31,82 $\pm$ 1,54	32,94 $\pm$ 2,58	0,34 $\pm$ 0,06	0,31 $\pm$ 0,02	5,41 $\pm$ 0,02	5,37 $\pm$ 0,06
<b>30,0%</b>	24,59 $\pm$ 0,36	24,27 $\pm$ 0,07	57,56 $\pm$ 1,22	56,69 $\pm$ 0,72	31,55 $\pm$ 0,93	31,50 $\pm$ 0,99	0,32 $\pm$ 0,05	0,32 $\pm$ 0,02	5,38 $\pm$ 0,11	5,50 $\pm$ 0,14
<b>40,0%</b>	25,86 $\pm$ 1,37	24,71 $\pm$ 1,16	57,28 $\pm$ 0,53	57,08 $\pm$ 1,02	31,23 $\pm$ 0,99	30,78 $\pm$ 2,28	0,32 $\pm$ 0,07	0,31 $\pm$ 0,01	5,42 $\pm$ 0,08	5,43 $\pm$ 0,07
<b>50,0%</b>	24,06 $\pm$ 1,43	23,42 $\pm$ 1,06	56,45 $\pm$ 0,55	56,25 $\pm$ 1,12	32,26 $\pm$ 0,57	31,57 $\pm$ 0,72	0,31 $\pm$ 0,04	0,28 $\pm$ 0,04	5,42 $\pm$ 0,05	5,51 $\pm$ 0,11
<b>100% V.</b>	22,92 $\pm$ 0,31	22,36 $\pm$ 0,42	55,49 $\pm$ 0,88	54,14 $\pm$ 2,18	30,29 $\pm$ 2,48	28,73 $\pm$ 1,96	0,26 $\pm$ 0,02	0,26 $\pm$ 0,02	5,48 $\pm$ 0,11	5,54 $\pm$ 0,05
<b>CV (%)</b>	3,80	3,70	2,75	2,27	2,75	2,27	17,11	7,44	1,26	1,60

\* Médias seguidas por letras distintas nas linhas, em relação aos tempos de refrigeração (Tempo 0 e Tempo 20) para uma mesma variável, diferem estatisticamente entre si ( $p \leq 0,05$ ) pelo teste F, ao nível de 5% de probabilidade ( $\alpha = 0,05$ ). DP = desvio padrão. As amostras foram apresentadas em ordem crescente de adição de leite bovino ao bubalino para elaboração das muçarelas. TRB corresponde à amostra com 100% leite de búfala e TRV para amostra com 100% leite de vaca. EST refere-se ao extrato seco total contido nas amostras. ESD corresponde ao extrato seco desengordurado. A acidez foi expressa em % de ácido lático. CV = coeficiente de variação.



Como não houve interação estatística significativa ( $p > 0,05$ ) entre o tempo de refrigeração e as formulações em estudo, os fatores (Tempo e Tratamentos) foram analisados separadamente, ou seja, tempo e formulações atuaram de forma independente no experimento, não sendo necessário realizar o desdobramento da interação.

Os resultados das diferentes formulações dos queijos muçarela em relação aos tempos de refrigeração (Tempo 0 e Tempo 20), mostraram que houve diferença estatística significativa ao nível de 5% de probabilidade ( $p \leq 0,05$ ) para a amostra com 5,0% de leite de vaca em leite de búfala para as variáveis umidade, EST e ESD (Tabelas 4 e 5). Provavelmente o que pode ter ocorrido que influenciou nestas diferenças foram variações ao acaso que normalmente acontecem durante o processo de elaboração do queijo e no momento de realização das análises laboratoriais, já que foram resultados diferenciados dos demais. Como o EST e ESD são calculados baseados no teor de água contido nas amostras, com as diferenças estatísticas significativas na umidade, conseqüentemente, ocorreram diferenças entre os tempos no EST e ESD para a amostra 5,0%.

As similaridades e/ou diferenças observadas nos resultados certamente são influenciadas pelo tipo de matéria-prima utilizada (100% búfala, 100% vaca e formulações com diferentes percentuais de misturas de leites), bem como raças dos animais, estágio de lactação, alimentação, vegetação, clima, entre outros fatores, pois a qualidade e composição do leite está totalmente relacionada com as características do produto final.

Equações de regressão foram ajustadas para algumas das variáveis estudadas em ambos os tempos de refrigeração (Tabela 6).

**Tabela 6:** Equações estimadas de regressão ajustadas para composição química e caracterização físico-química dos queijos muçarela elaborados no tempo 0 e com 20 dias de refrigeração.

Variáveis	Tempo 0		Tempo 20	
	Equações estimadas	R <sup>2</sup>	Equações estimadas	R <sup>2</sup>
Umidade (%)	$\hat{Y} = 0,6802 X + 38,3555$	0,9239	***	***
Cinzas (%)	***	***	***	***
Gordura (%)	***	***	***	***
GES (%)	***	***	***	***
Proteína (%)	***	***	***	***
EST (%)	$\hat{Y} = -0,6802 X + 61,6445$	0,9239	***	***
ESD (%)	$\hat{Y} = -0,6802 X + 61,6445$	0,9239	***	***
Acidez	$\hat{Y} = -1,5520 X + 41,7888$	0,9297	$\hat{Y} = -1,7363 X + 41,9135$	0,9659
pH	$\hat{Y} = 0,0213 X + 5,2748$	0,8520	$\hat{Y} = 0,0221 X + 5,3298$	0,7480

\*GES refere-se ao teor de gordura convertida para base seca. EST refere-se ao extrato seco total contido nas amostras. ESD corresponde ao extrato seco desengordurado. A acidez foi expressa em % de ácido láctico. **Y** corresponde à variável resposta. **X** = níveis de tratamentos (formulações). R<sup>2</sup> refere-se ao coeficiente de determinação calculado em relação ao SQ<sub>TRAT.</sub> \*\*\* (não foi possível ajustar equação de regressão).

Não foi possível ajustar equações de modelo linear ou quadrático ( $p > 0,05$ ) para as variáveis cinzas, gordura, GES e proteína no tempo 0. Com 20 dias de estocagem sob refrigeração as equações não foram ajustadas para umidade, cinzas, gordura, GES, proteína, EST e ESD, indicando que não ocorreram diferenças estatísticas significativas entre as formulações (Tabela 6).

A partir das equações de regressão ajustadas verificou-se, no tempo 0, que o TRB possuiu os menores teores de umidade e pH e os maiores resultados de proteína, EST, ESD e acidez, ou seja, à medida que acrescentou-se leite de vaca para elaboração dos queijos foram observados os comportamentos descritos.

No tempo 20 concluiu-se que foram encontrados elevados valores de acidez para queijos com maiores percentuais de leite de búfala, ocorrendo o inverso para o pH.

A umidade é um dos fatores mais importantes que afetam os alimentos, pois possui efeito direto sobre a manutenção de qualidade dos mesmos (MARINO et al., 2010). De acordo com as médias de umidade relacionadas com seus respectivos desvios padrão, observou-se que existiram diferenças entre os resultados das amostras TRB e TRV no tempo 0 (Tabela 4).

Os resultados de umidade podem ser influenciados pelas etapas de corte e cozimento da massa na elaboração dos queijos, que por ser um processo manual, acontecem variações no tamanho das partículas e nas temperaturas empregadas no processamento. Quanto menor o tamanho das partículas (mais intenso foi o corte e a agitação durante o aquecimento), maior a sinerese do soro e menor a umidade do produto final. Em relação ao aquecimento, temperaturas mais elevadas e prolongadas ocasionam maior cozimento e expulsão de água.

Apesar do leite de búfala ser caracterizado como matéria-prima de umidade inferior quando comparado ao de vaca (SAMEEN et al., 2008), tendo seus constituintes mais concentrados, à medida que se acrescenta leite bovino ao bubalino na elaboração de queijo muçarela, teoricamente o valor da umidade deveria se elevar nas amostras estudadas, porém isso não ocorreu totalmente neste trabalho (Tabela 6), não houve um comportamento linear crescente para todas as formulações (Tempo 20), provavelmente por diferenças nas características dos leites utilizados nos vários dias de elaboração dos queijos e em decorrência das condições do processo e armazenamento sob refrigeração. Porém, ao se observar os dados, verificou-se que houve uma tendência de aumento da umidade à medida que adicionou-se leite de vaca nas amostras (Tempo 0).

A análise de cinzas refere-se ao conteúdo inorgânico remanescente após destruição da matéria orgânica do alimento. É uma técnica que fornece informações sobre o valor nutritivo de qualquer produto alimentício, auxiliando discussões sobre a quantidade de minerais. Pode-se afirmar que as amostras apresentaram pequenas diferenças entre si, dificultando na obtenção de equações de regressão e na diferenciação entre as espécies em estudo, até mesmo para TRB e TRV. Resultados inferiores ao deste trabalho foram observados por El Owni e Osman (2009) em muçarela de búfala, que encontraram valores médios de 2,38%, no entanto Sameen et al. (2008) observaram teor de cinzas de 4,11%.

Os resultados para o teor de gordura das amostras estudadas variaram de 24,12% a 28,69% entre os tempos de refrigeração, e esses valores foram convertidos para GES, ocorrendo aumento nos resultados, que passaram a variar de 41,22% a 49,70% (Tabela 4). Esses resultados certamente foram influenciados pela padronização (diminuição) do teor de gordura do leite para, aproximadamente, 3,6% na fabricação dos queijos. Esta padronização manual além de diminuir os resultados da matéria gorda, também pode influenciar nos resultados encontrados.

Para os teores de gordura e GES não foi possível ajustar modelo matemático de regressão, indicando que não detectou-se diferenças estatísticas entre as formulações de queijos em ambos os tempos de refrigeração, concluindo que essas variáveis não serviram para detectar adulterações em muçarela de búfala nas condições experimentais estudadas.

A gordura é o constituinte mais variável do leite. Durante a coagulação do leite para formação da massa por meio da adição de fermento láctico, cloreto de cálcio e coalho (quimosina), a depender das diferenças nas condições de processamento, quantidades variáveis de gordura podem ficar retidas na rede proteica, obtendo-se queijos com diferentes e menores valores de matéria gorda (WALSTRA et al., 2001).

Juntamente com a gordura, os valores de proteína contribuem para os resultados encontrados no EST, que são definidos como sendo a soma dos constituintes do leite, com exceção do teor de água. Verificou-se elevados valores de sólidos totais para o TRB quando comparado com o TRV no tempo 0 (Tabelas 5 e 6), em decorrência, principalmente, dos percentuais de gordura e proteína e, menores resultados de umidade. Esses valores também são provenientes de leite com alta concentração de sólidos, no caso do leite bubalino, o que confirma os maiores valores de EST para o TRB quando comparado com o TRV.

O ESD apresentou efeito linear decrescente (Tempo 0), porém não foi possível ajustar equação para esta variável nos queijos com 20 dias de estocagem sob refrigeração (Tabela 6). Normalmente, ESD pode ser definido como sendo os componentes do leite, com exceção dos teores de água e gordura, ou seja, é o EST menos a gordura. Tem importância para complementar os resultados encontrados pelo EST, pois como não envolve o teor de gordura, que é o componente mais variável do leite, muitas vezes, seus resultados são mais precisos e confiáveis.

O valor de acidez titulável do leite, expresso em percentual de ácido láctico, é um fator decisivo na elaboração de queijos, pois além de impedir a utilização do leite quando os resultados desta variável se encontram elevados, acima de 18°D (BRASIL, 2011), indica particularidades da textura do produto. O teor de acidez das amostras pode ser influenciado pela ação de bactérias lácticas fermentativas, que durante o seu desenvolvimento utilizam lactose como fonte de energia, convertendo-a em ácido láctico, elevando os níveis desta variável. Em queijos muçarela, é desejável a ação destas bactérias, a qual durante a fermentação produzem substâncias aromáticas, fator importante nas características e na qualidade do produto. Em queijos, a acidez também é decorrente da ação do fermento láctico utilizado na fabricação.

Teoricamente, a muçarela de búfala deve possuir maiores valores de acidez quando comparada com a muçarela de vaca (AHMAD et al., 2008), fato que ocorreu neste trabalho (Tabela

6). Isto pode ser explicado em decorrência do leite bubalino possuir elevados teores de proteína, que acabam sendo contabilizadas nos testes de acidez titulável, elevando assim a acidez das amostras.

A medida do pH é um fator de grande importância para que o processamento do queijo muçarela ocorra de maneira adequada. Teoricamente, é inversamente proporcional à atividade dos íons  $H^+$  efetivamente dissociados (CECCHI, 2003). Antes da etapa de filagem da massa, é necessário que o pH da mesma esteja situado entre 4,9 e 5,1, devido a acidificação pela ação de bactérias lácticas. No produto final os valores de pH variaram de 5,28 a 5,54 para os dois tempos de refrigeração (Tabela 5).

## 5.2. Composição química e caracterização físico-química de marcas comerciais de muçarela de búfala

Amostras comerciais de muçarela de búfala, em três lotes distintos (três repetições), foram avaliadas em relação à composição química e caracterização físico-química (Tabela 7).

**Tabela 7:** Valores médios ( $\pm$  DP) da composição química e caracterização físico-química de marcas comerciais de queijos muçarela de búfala com 20 dias de refrigeração.

Amostras	Variáveis								
	Umidade (%)	Cinzas (%)	Gordura (%)	GES (%)	Proteína (%)	EST (%)	ESD (%)	Acidez (%) ácido láctico	pH
<b>A</b>	43,42 <sup>a</sup> $\pm$ 2,08	3,56 <sup>a</sup> $\pm$ 0,09	30,51 <sup>abc</sup> $\pm$ 2,83	53,99 <sup>ab</sup> $\pm$ 5,43	20,88 <sup>ab</sup> $\pm$ 1,13	56,58 <sup>a</sup> $\pm$ 2,08	26,06 <sup>a</sup> $\pm$ 3,54	0,30 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,04	5,47 <sup>bcd</sup> $\pm$ 0,10
<b>B</b>	43,10 <sup>a</sup> $\pm$ 2,35	2,33 <sup>b</sup> $\pm$ 0,12	30,67 <sup>abc</sup> $\pm$ 1,45	53,90 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,75	20,29 <sup>ab</sup> $\pm$ 1,47	56,90 <sup>a</sup> $\pm$ 2,35	26,23 <sup>a</sup> $\pm$ 1,05	0,28 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,00	5,57 <sup>abc</sup> $\pm$ 0,02
<b>C</b>	40,70 <sup>a</sup> $\pm$ 1,21	2,32 <sup>b</sup> $\pm$ 0,05	33,77 <sup>a</sup> $\pm$ 0,69	56,97 <sup>a</sup> $\pm$ 2,30	19,60 <sup>b</sup> $\pm$ 0,29	59,30 <sup>a</sup> $\pm$ 1,21	25,54 <sup>a</sup> $\pm$ 1,89	0,35 <sup>a</sup> $\pm$ 0,05	5,40 <sup>cd</sup> $\pm$ 0,03
<b>D</b>	41,84 <sup>a</sup> $\pm$ 1,07	3,23 <sup>a</sup> $\pm$ 0,03	31,62 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,76	54,36 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,31	19,87 <sup>b</sup> $\pm$ 0,74	58,16 <sup>a</sup> $\pm$ 1,07	26,54 <sup>a</sup> $\pm$ 0,31	0,29 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,05	5,58 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,01
<b>E</b>	42,69 <sup>a</sup> $\pm$ 1,77	3,23 <sup>a</sup> $\pm$ 0,26	26,64 <sup>c</sup> $\pm$ 1,97	46,46 <sup>b</sup> $\pm$ 2,59	22,65 <sup>a</sup> $\pm$ 1,21	57,31 <sup>a</sup> $\pm$ 1,77	30,68 <sup>a</sup> $\pm$ 1,42	0,24 <sup>b</sup> $\pm$ 0,02	5,67 <sup>a</sup> $\pm$ 0,10
<b>F</b>	43,29 <sup>a</sup> $\pm$ 1,42	3,51 <sup>a</sup> $\pm$ 0,39	29,14 <sup>bc</sup> $\pm$ 1,20	51,43 <sup>ab</sup> $\pm$ 3,11	18,67 <sup>b</sup> $\pm$ 0,63	56,71 <sup>a</sup> $\pm$ 1,42	27,57 <sup>a</sup> $\pm$ 2,38	0,31 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,06	5,39 <sup>d</sup> $\pm$ 0,05
<b>CV (%)</b>	4,02	6,73	5,45	5,55	4,89	2,97	7,52	12,78	1,13

\* Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade ( $\alpha = 0,05$ ). DP = desvio padrão. As amostras A, B, C, D, E e F correspondem às marcas comerciais de muçarela de búfala. GES representa o teor de gordura convertido para base seca. EST refere-se ao Extrato Seco Total presente nas amostras e ESD corresponde ao Extrato Seco Desengordurado contido nos queijos. CV = coeficiente de variação.

No Brasil não existe regulamento técnico específico para determinação das variáveis de qualidade de muçarela de búfala, sendo assim, neste trabalho foram utilizados os padrões estabelecidos para muçarela de búfala de Campana (D.M., 2003), queijos em geral (BRASIL, 1996) e queijo muçarela (BRASIL, 1997).

De acordo com o Decreto del Ministero delle Politiche Agricole e Forestali, Itália (D.M., 2003), em seu artigo 3, muçarela de búfala deve apresentar teor mínimo de gordura na matéria seca de 52% e umidade máxima de 65%.

Por meio do Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos (BRASIL, 1996), queijos frescos ou maturados são produtos que devem ser classificados tendo por base a umidade e o percentual de matéria gorda no extrato seco. Quanto ao teor de água os produtos podem ser divididos em: queijos de baixa umidade ou de consistência dura (com umidade em até 35,9%); queijos de média umidade ou de consistência semidura (com teor de água entre 36% e 45,9%); queijos de alta umidade ou de consistência macia (com valores entre 46% e 54,9%); e queijos de altíssima umidade ou de consistência mole (com umidade mínima de 55%). Já em relação à GES podem ser classificados em: extra gordos ou duplo creme (que contém no mínimo 60% de gordura); gordos (contendo entre 45% e 59,9% de matéria gorda); semigordos (contendo entre 25% e 44,9%); magros (contendo entre 10% e 24,9% de gordura); e desnatados (com resultados inferiores a 10%).

Pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Queijo Mozzarella (Muzzarella ou Mussarella) (BRASIL, 1997), aplicado para muçarela de vaca, esses queijos devem ser produtos de média, alta ou muito alta umidade, com valores máximos de 60% de água; e extragordos, gordos a semigordos, com teores mínimos de 35% de GES.

De acordo com a análise estatística aplicada não houve diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ) para os teores de umidade, EST e ESD, porém houve diferença estatística significativa ( $p \leq 0,05$ ) para os teores de cinzas, gordura, GES, proteína, acidez e pH (Tabela 7).

A umidade das amostras variou entre 40,70% e 43,42% (Tabela 7), com todos os valores situando-se abaixo do máximo de 65% estabelecido pela legislação para muçarela de búfala da Campana (D.M., 2003), sendo classificadas como queijos de média umidade ou de consistência semidura (BRASIL, 1996; BRASIL, 1997).

Com isso, percebe-se que todas as marcas estão de acordo com a legislação italiana e a legislação brasileira para queijos e queijo muçarela, tanto em relação à umidade quanto em relação ao teor de GES. Observa-se que a gordura variou entre 26,64% e 33,77%, com esses valores sendo convertidos para GES, para correta comparação com os valores exigidos pela legislação, passando a variar de 46,46% à 56,97%.

De acordo com a legislação brasileira, todas as amostras apresentaram valores de GES acima do estabelecido, sendo classificadas como queijos gordos (BRASIL, 1996; BRASIL, 1997). Pelo Decreto para muçarela de búfala da Campana (D.M., 2003), as amostras E e F apresentaram resultados inferiores ao estabelecido pela legislação.

Os resultados obtidos para o teor de cinzas variaram entre 2,32% e 3,56%, sendo inferiores aos encontrados por Faleiro (2013), que avaliou diferentes marcas de muçarela de búfala comercializadas no estado da Bahia. Essas diferenças podem ser explicadas devido às condições experimentais das pesquisas, que foram conduzidas em períodos distintos, sendo influenciadas pelas variações na composição do leite e tecnologia de fabricação dos queijos.

Os teores de proteína variaram entre 18,67% e 22,65% e foram semelhantes aos encontrados por Faleiro (2013), que obteve valores entre 19,09% e 22,14%. Com isso, não foi possível verificar a autenticidade das marcas comerciais por esta variável, pois o que leva à diferenciação entre as espécies em estudo não são os teores de proteína total quantificados pelo método Kjeldhal e sim os subprodutos gerados a partir de reações de proteólise, tais como peptídeos presentes em cada amostra.

Foram observados valores de EST variando entre 56,71% a 59,30% e ESD de 25,54% a 30,68%, resultados que são influenciados pelos elevados teores de sólidos totais presentes nas amostras.

A acidez, em % de ácido láctico, das amostras variou entre 0,24% e 0,31%, enquanto o pH apresentou resultados entre 5,39 e 5,58. Foi possível observar uma tendência em que as amostras que apresentaram os maiores valores de acidez possuíram os menores valores de pH, enquanto que a marca E, que apresentou a menor acidez, possuiu o maior pH.

Essas diferenças encontradas podem ser explicadas por variações nas condições de processamento e elaboração das amostras, tais como o tipo e a quantidade de fermento láctico utilizado, qualidade do leite, entre outros fatores. Sabe-se que, a depender do tipo de fermento utilizado na elaboração de queijos, observa-se diferenças entre a acidificação e o tempo de acidificação da massa. Queijos podem ser elaborados por meio de culturas lácticas de bactérias mesófilas, termófilas ou até a própria microbiota natural do leite, que ocasiona diferenças na fermentação e, assim, nos valores de pH e acidez.

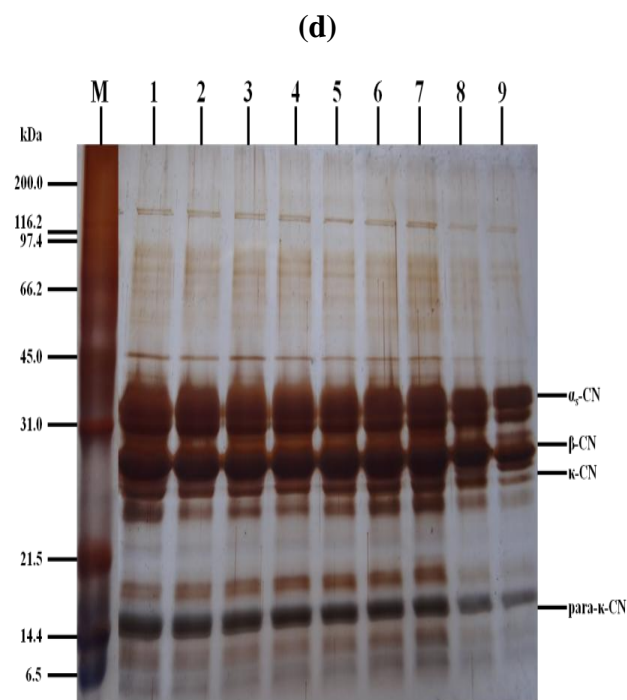
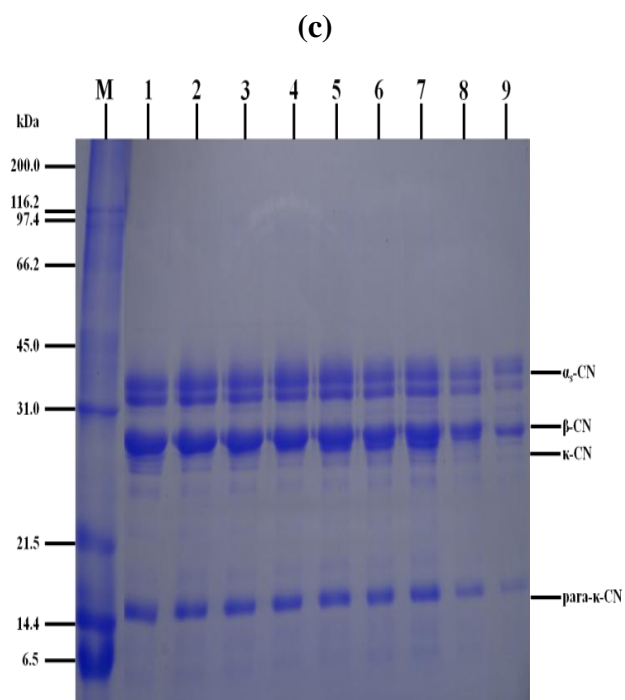
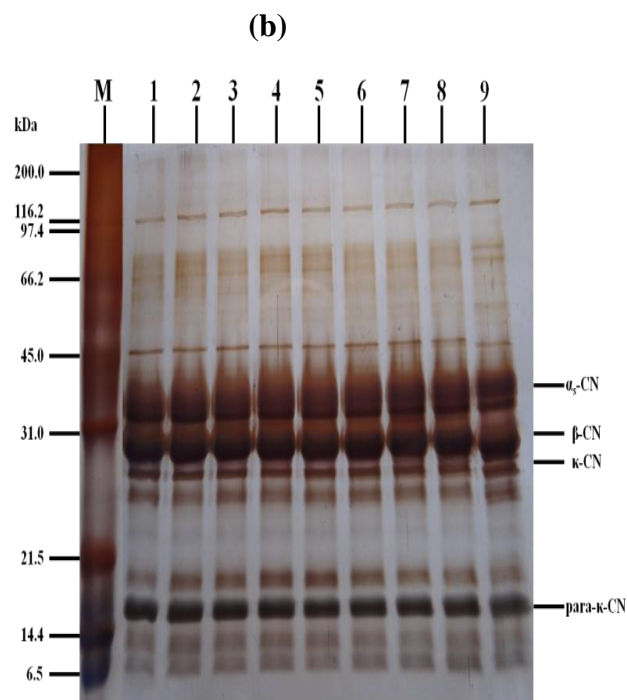
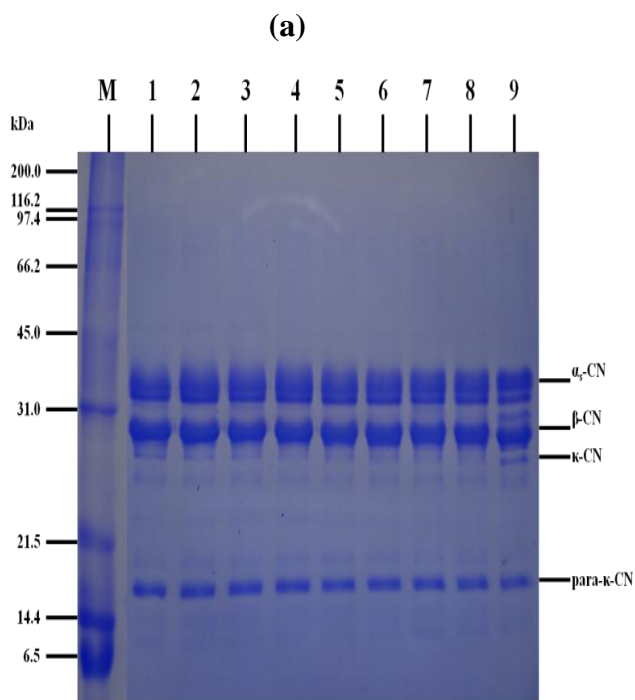


### 5.3. Eletroforese (SDS-PAGE) dos queijos muçarela elaborados e muçarelas de búfala comerciais

A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE), no presente estudo foi realizada com o intuito de comparar os perfis eletroforéticos de queijos de búfala, vaca e muçarelas adicionadas com diferentes percentuais de leite bovino e bubalino, visando obter respostas que auxiliem no combate a fraudes em muçarela de búfala. As amostras TRB e TRV foram utilizadas como referências, pois possuem padrão eletroforético diferenciado para cada espécie, a exemplo da fração  $\alpha_s$ -CN do leite de búfala, que possui estrutura diferenciada e mobilidade no gel um pouco maior quando comparada à do leite de vaca (Figura 3).

É importante ressaltar que foram avaliados queijos no tempo 0, ou seja, aqueles que foram congelados imediatamente no dia da data de fabricação, e queijos congelados no 20º dia de refrigeração em temperaturas de 4°C. Segundo Jesus (2014), queijo muçarela de búfala armazenado em temperaturas de refrigeração por mais de 20 dias apresenta grande formação de peptídeos resultantes de atividade proteolítica, o que dificultaria na interpretação dos resultados.

**Figura 3:** Perfil eletroforético (SDS-PAGE) de queijos muçarela, (a) corados com azul de Coomassie (Tempo 0), (b) corados com nitrato de prata (Tempo 0), (c) corados com azul de Coomassie (Tempo 20), (d) corados com nitrato de prata (tempo 20). (M) Marcador de massa molecular (kDa); (1) muçarela com 100% leite de búfala (TRB); (2) muçarela com 2,5% de leite bovino em leite bubalino; (3) muçarela com 5,0% de leite bovino em leite bubalino; (4) muçarela com 10,0% de leite bovino em leite bubalino; (5) muçarela com 20,0% de leite bovino em leite bubalino; (6) muçarela com 30,0% de leite bovino em leite bubalino; (7) muçarela com 40,0% de leite bovino em leite bubalino; (8) muçarela com 50,0% de leite bovino em leite bubalino; (9) muçarela com 100% leite de vaca (TRV).  $\alpha_s$ -CN =  $\alpha_s$ -caseína;  $\beta$ -CN =  $\beta$ -caseína;  $\kappa$ -CN =  $\kappa$ -caseína; para- $\kappa$ -CN = para- $\kappa$ -caseína.



Nos géis elaborados pela técnica SDS-PAGE verificou-se a  $\beta$ -CN em uma região inferior quando comparada com a  $\alpha_s$ -CN, resultado, principalmente, devido à diferença de massa molecular entre elas. Na maioria das amostras foi possível observar a presença da  $\alpha_s$ -CN,  $\beta$ -CN e para- $\kappa$ -caseína. Na elaboração das muçarelas, é necessário a utilização da enzima quimosina (coalho) para coagulação e formação da massa dos queijos. Isso resulta na perda de estabilidade da  $\kappa$ -CN, que atua como estabilizadora das micelas, não permitindo a precipitação por ação dos sais de cálcio. A

quimosina atua especificamente na ligação peptídica entre os aminoácidos Phe<sub>105</sub>-Met<sub>106</sub> da  $\kappa$ -CN, originando dois fragmentos: a para- $\kappa$ -caseína e o glicomacropéptido (GMP). A maior parte da para- $\kappa$ -CN, por ser de natureza apolar, orienta-se para o interior das micelas, ao passo que o GMP, em virtude de sua polaridade, tem a sua maior parte sendo eliminado no soro, o que explica o pouco aparecimento de  $\kappa$ -CN e a presença de para- $\kappa$ -CN nas amostras (SGARBIERI, 2005; VIEIROS, 2005; EGITO et al., 2006).

No tempo 0 (Figura 3 (a) e (b)), as massas moleculares das frações proteicas da  $\alpha_s$ -CN foram de 33 kDa para as amostras 1 a 6, 34 kDa para as amostras 7 e 8 e 35 kDa para a 9, confirmando-se as diferenças de mobilidade da  $\alpha_s$ -CN entre as espécies, com as bandas das amostras com maiores percentuais de leite de vaca situando-se em regiões mais superiores do gel. Na  $\beta$ -CN houve distinções entre a amostra 9 e as demais, com massas moleculares de 28 kDa e 29 kDa, respectivamente. A  $\kappa$ -CN e a para- $\kappa$ -CN de todas as formulações foram idênticas, com massas moleculares de 26 kDa e 18 kDa, respectivamente.

Assim, concluiu-se que pequenas diferenças podem ser encontradas comparando-se as amostras 1 e 9, principalmente nas regiões da  $\alpha_s$ -CN, porém distinções na mobilidade da  $\beta$ -CN também foram observadas (Figura 3 (a) e (c)). Então, à medida que aumentou-se os percentuais de leite bovino em leite bubalino para elaboração de queijo muçarela, ocorreram pequenas alterações na estrutura e mobilidade da  $\alpha_s$ -CN e  $\beta$ -CN das amostras.

Com a estocagem dos queijos sob refrigeração por 20 dias, observou-se a intensificação de peptídeos resultantes de proteólise, com degradação das frações  $\alpha_s$ -CN e  $\beta$ -CN, principalmente nas regiões abaixo da  $\beta$ -CN da amostra 1 (Figura 3 (d)). Ou seja, o aparecimento de bandas nessa região são resultados de atividades proteolíticas e não de fraudes por adição de leite de vaca, pois observou-se na amostra de muçarela de vaca no tempo 0 (amostra 9) a presença de uma pequena banda abaixo da  $\beta$ -CN, porém com o armazenamento sob refrigeração por alguns dias, neste caso 20 dias, essa mesma banda perde intensidade na amostra 9 e aparece com maior intensidade na espécie bubalina (amostra 1), ou seja, não é característica da espécie bovina. Nas condições experimentais utilizadas, muçarela com 100% leite de vaca (amostra 9) foi mais susceptível à proteólise, com perda de intensidade das frações proteicas e peptídeos.

Para o tempo 20 (Figura 3 (c) e (d)), as massas moleculares das frações proteicas calculadas foram de 32 kDa para as amostras 1 a 6, 33 kDa para as amostras 7 e 8 e 34 kDa para a 9, novamente existindo diferenças de mobilidade da  $\alpha_s$ -CN entre as espécies, ou seja, a partir de 40% de adição de leite bovino em muçarela de búfala já existem alterações na mobilidade da  $\alpha_s$ -CN. Na  $\beta$ -CN houve diferenças entre as amostras 8 e 9 e as demais, com massas moleculares de 28 kDa e 27 kDa, respectivamente. Da amostra 1 até a 6 a massa molecular da  $\kappa$ -CN foi de 24 kDa, sendo 25

kDa para as demais amostras. Já a para- $\kappa$ -CN verificou-se diferenças entre os tratamentos, com massas moleculares de 17 kDa para as amostras 1 a 6 e 18 kDa para as demais. Ou seja, no geral, concluiu-se, em ambos os tempos de refrigeração, que as pequenas diferenças entre as frações proteicas dos tratamentos avaliados, são melhores observados a partir de 30% a 40% de inclusão de leite bovino.

Com a necessidade de detectar com maior intensidade as frações proteicas e a presença de peptídeos não visualizados na coloração com azul de Coomassie, utilizou-se a coloração por nitrato de prata, já que é uma técnica mais sensível. A revelação por nitrato de prata é um método 100 vezes mais preciso quando comparado com a utilização de azul de Coomassie, já que o mesmo consegue detectar nanogramas de proteínas (CANDIANO et al., 2004).

Os mesmos comportamentos da coloração com azul de Coomassie foram observados na coloração com nitrato de prata. As amostras avaliadas sofreram alterações na  $\alpha_s$ -CN à medida que adicionou-se percentuais de leite de vaca para elaboração dos queijos. Abaixo da região da para- $\kappa$ -CN foi possível visualizar a presença de, provavelmente,  $\gamma_2$ -CN e  $\gamma_3$ -CN, ocasionadas pela ação do agente coagulante na elaboração dos queijos (coalho), que hidrolisa a  $\kappa$ -CN, ocasionando perda de proteção da  $\beta$ -CN. Com isso, a plasmina passa a atuar com maior facilidade, proporcionando a formação destes peptídeos. As bandas que apareceram acima da para- $\kappa$ -CN provavelmente são peptídeos que se intensificaram por proteólise após 20 dias de refrigeração (Figura 3 (b) e (d)).

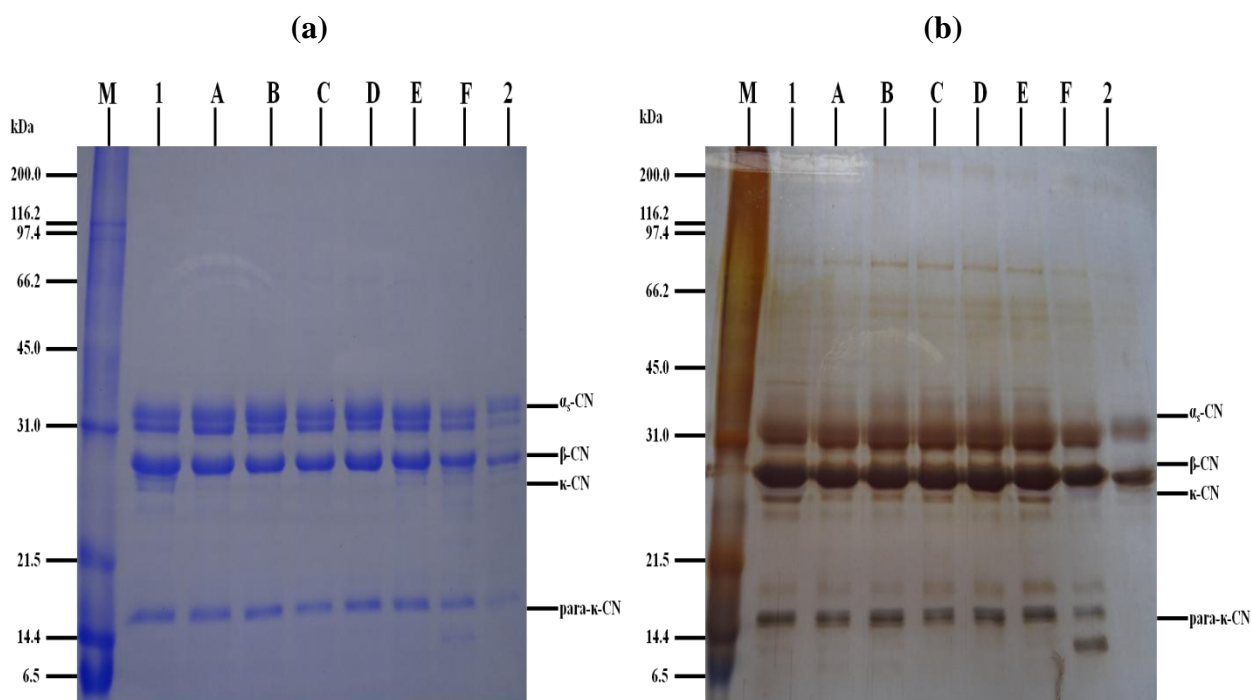
A estrutura da  $\beta$ -CN é susceptível a hidrólise pela protease plasmina, uma enzima proteolítica de origem endógena, produzindo fragmentos peptídicos referidos como  $\gamma$ -CN, que permanecem nas micelas de caseína. Outras pequenas estruturas também são formadas devido a ação da plasmina, porém estas se difundem para a fase líquida (soro) na elaboração de queijos (SGARBIERI, 2005).

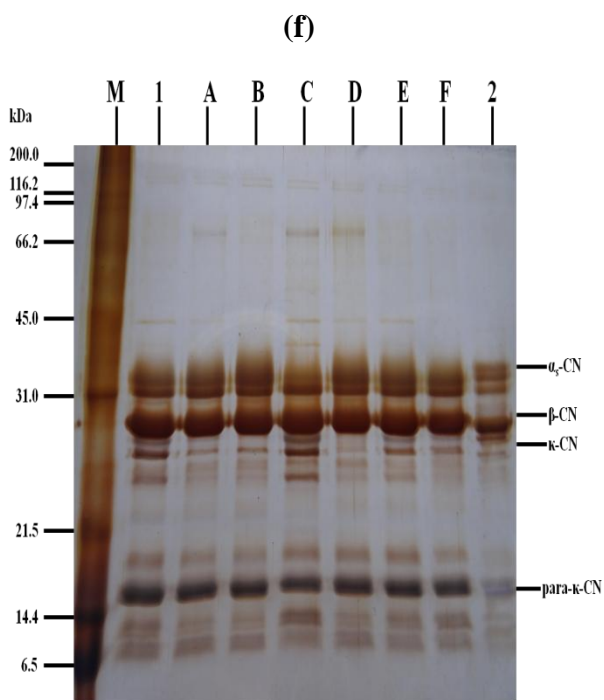
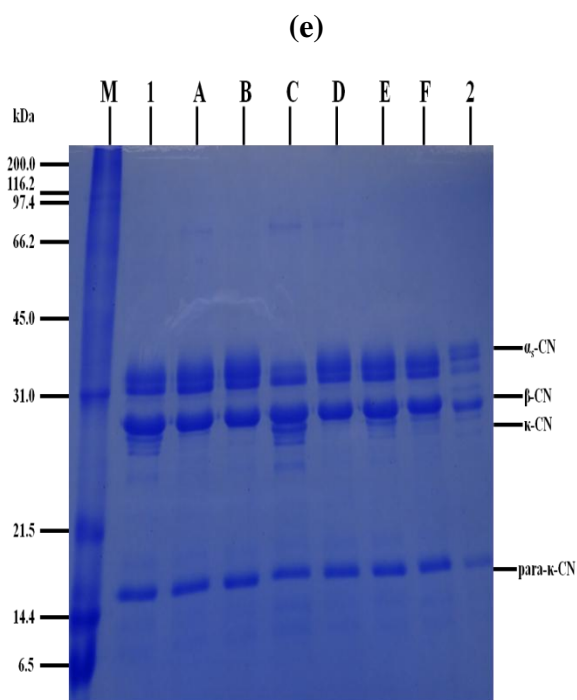
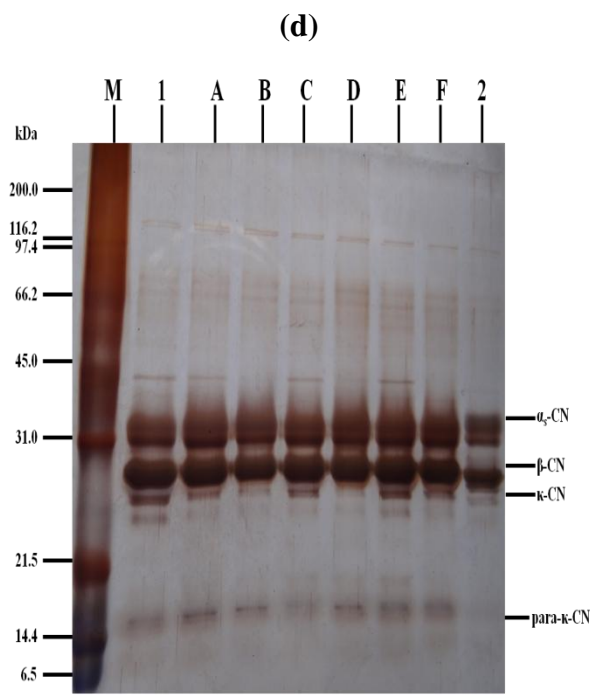
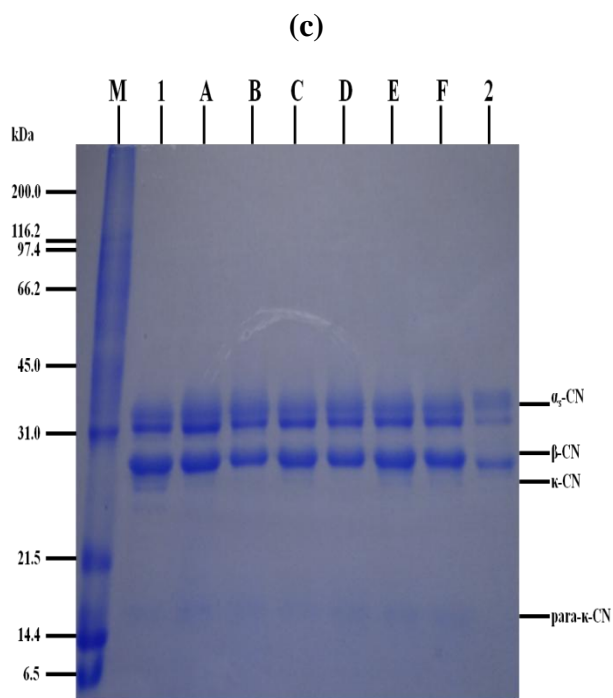
Após 20 dias de estocagem sob refrigeração aumentou-se a intensidade dos peptídeos presentes na amostra 1 e peptídeos menos intensos passaram a ser observados na amostra 9. Bandas abaixo da  $\beta$ -CN que naturalmente aparecem em muçarela de vaca (Tempo 0), sofreram degradação e perderam intensidade. Na amostra 1 esses peptídeos foram visualizados com mais facilidade após 20 dias de estocagem das amostras sob refrigeração, sendo consequência de atividade proteolítica (Figura 3 (d)). Portanto, estes resultados encontrados demonstram as diferenças entre proteólise e suspeitas de fraude e também evidenciam as pequenas diferenças existentes entre muçarela de búfala e vaca, e as alterações que ocorrem com adições de leite bovino em bubalino.

Seis marcas comerciais adquiridas no estado da Bahia foram analisadas em três repetições, cada repetição correspondendo a um lote diferente do produto, totalizando dezoito amostras, sendo

comparadas com os tratamentos TRB e TRV para auxiliar nas análises e conclusão dos resultados (Figura 4).

**Figura 4:** Perfil eletroforético (SDS-PAGE) de amostras comerciais de queijo muçarela de búfala, (a) corados com azul de Coomassie (1ª repetição), (b) corados com nitrato de prata (1ª repetição), (c) corados com azul de Coomassie (2ª repetição), (d) corados com nitrato de prata (2ª repetição), (e) corados com azul de Coomassie (3ª repetição), (f) corados com nitrato de prata (3ª repetição). (M) Marcador de massa molecular (kDa); (1) muçarela TRB; A, B, C, D, E e F correspondem às marcas comerciais analisadas; (2) muçarela TRV;  $\alpha_s$ -CN =  $\alpha_s$ -caseína;  $\beta$ -CN =  $\beta$ -caseína;  $\kappa$ -CN =  $\kappa$ -caseína; para- $\kappa$ -CN = para- $\kappa$ -caseína.





Como consequência de processamentos diferenciados na elaboração de cada uma das amostras comerciais e não conhecendo-se o processo de fabricação das marcas, a  $\beta$ -CN do leite perde sua estabilidade de formas distintas, resultado, por exemplo, do tipo de tratamento térmico (TT) aplicado ao leite, tempo de acidificação da massa pela utilização do fermento láctico, com variações nos tipos de cultura láctica, nas quantidades e concentrações, e da hidrólise da  $\kappa$ -CN pela

ação do coelho. Com isso, a plasmina passa a atuar livremente sobre a  $\beta$ -CN, originando a formação de peptídeos.

No primeiro lote das marcas a amostra F foi a única que apresentou um comportamento semelhante ao padrão muçarela de vaca, principalmente nas bandas correspondentes à  $\alpha_s$ -CN e  $\beta$ -CN (Figura 4 (a) e (b)). Portanto, suspeitou-se da adição de leite de vaca no referido lote desta marca. Porém, a presença de peptídeos abaixo da região da para- $\kappa$ -CN nesta amostra, originados provavelmente por degradação proteolítica da  $\beta$ -CN pela ação da plasmina, formando  $\gamma$ -CN, podem ter ocasionado mudanças na estrutura e mobilidade das frações proteicas. Estes fragmentos de  $\beta$ -CN são uma fração heterogênea, composta de peptídeos (segmento 29–209), (segmento 106–209) e (segmento 108–209), designados como  $\gamma_1$ -CN,  $\gamma_2$ -CN e  $\gamma_3$ -CN, respectivamente. Isso pode ser relacionado com efeitos de proteólise, pois mesmo as amostras tendo todos os cuidados em relação às temperaturas e ao tempo de refrigeração e congelamento com 20 dias após a data de fabricação, não se sabe quais foram as condições a que foi submetida antes da coleta. As demais marcas apresentaram comportamento semelhante ao padrão de muçarela de búfala, não havendo, portanto, suspeita de fraude por esses critérios, o que leva à conclusão de que os fabricantes utilizaram apenas leite de búfala na fabricação das muçarelas.

Pelos critérios acima, não foi possível detectar irregularidades no segundo lote das marcas avaliadas na Figura 4 (c) e (d). A estrutura e mobilidade da  $\alpha_s$ -CN,  $\beta$ -CN e para- $\kappa$ -CN de todas as amostras foram semelhantes entre si e muito parecidas com o padrão muçarela de búfala, o que leva a conclusão de que as empresas cumpriram com o que foi especificado no rótulo dos produtos.

No terceiro lote das marcas, as amostras não reproduziram semelhanças com o padrão muçarela de vaca, não havendo suspeitas de fraudes (Figura 4 (e) e (f)). Na amostra C observou-se degradação na  $\alpha_s$ -CN, com formação de peptídeos nas regiões de 26 kDa e 12 kDa.

Faleiro (2013) utilizou o método SDS-PAGE visando avaliar a autenticidade de muçarelas de búfala comercializadas no estado da Bahia. De 18 amostras de diferentes marcas comerciais avaliadas, 7 (38,9%) foram consideradas fraudadas pela adição de leite bovino. Segundo a autora, a identificação da fraude ocorreu de acordo com a presença da  $\gamma_1$ -CN, que naturalmente está presente no perfil eletroforético de amostras com 100% leite de vaca, porém foi visto no presente trabalho que a fração que a autora se referiu à  $\gamma_1$ -CN na verdade não está presente exclusivamente em muçarela 100% vaca. Na Figura 4 observou-se que as bandas abaixo da  $\beta$ -CN provavelmente são peptídeos e que também estão presentes em muçarela de búfala após 20 dias de estocagem sob refrigeração, não podendo, portanto, servir de marcadores para verificação de autenticidade.

Para todos as amostras avaliadas os mesmos comportamentos foram observados nos dois tipos de coloração, com melhores detecções por meio do nitrato de prata. Nos géis visualizou-se

que, após coloração com nitrato de prata, intensificaram-se as bandas das proteínas e peptídeos presentes.

Nas condições experimentais estudadas, foi possível verificar mudanças de comportamento ocorridas nas frações proteicas das amostras avaliadas, a fim de facilitar a detecção de fraude em muçarela de búfala, por adulteração com leite bovino. Porém os mesmos devem ser comprovados com o auxílio de técnicas mais detalhadas.

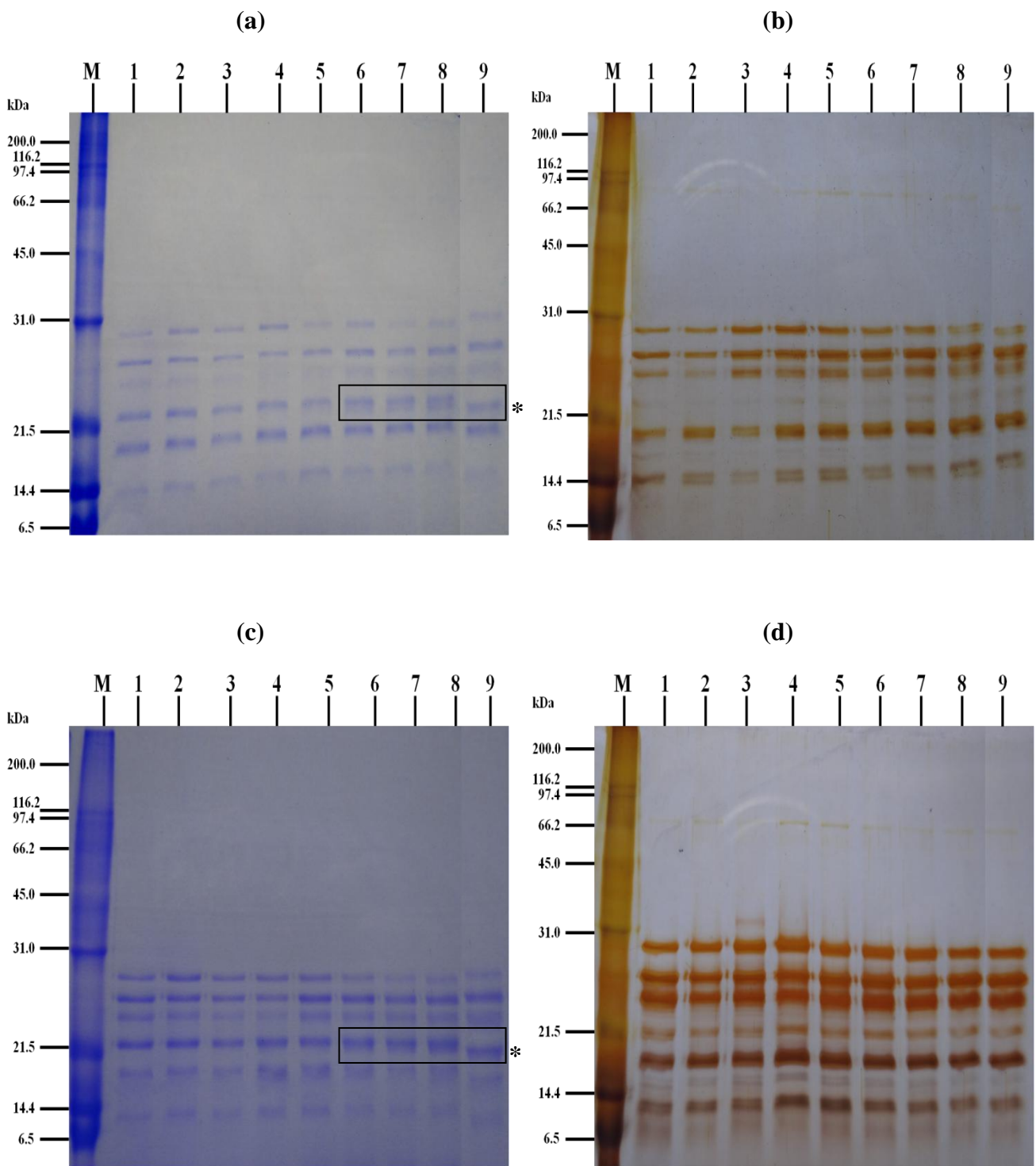
A identificação de peptídeos pode ser um diferencial na obtenção de respostas para detecção de fraudes em muçarela de búfala, pois a descoberta da presença de pelo menos um peptídeo marcador individual, ou grupos de peptídeos que caracterizem as espécies em estudo podem auxiliar no combate às adulterações e obtenção de respostas sobre o problema em questão.

#### **5.4. Eletroforese (SDS-PAGE) de peptídeos solúveis em água (PSA) extraídos de queijos muçarela elaborados e muçarelas de búfala comerciais**

Visando obter respostas mais precisas e reveladoras sobre similaridades e diferenças existentes entre os perfis eletroforéticos de muçarela de búfala e vaca, foi realizada a extração dos peptídeos solúveis em água (PSA) presentes nas amostras, nos diferentes tempos de refrigeração, com posterior utilização da técnica SDS-PAGE para separação e visualização destes peptídeos. Assim, foi possível verificar peptídeos distintos e semelhantes nas espécies em estudo (Figura 5).

**Figura 5:** Perfil eletroforético (SDS-PAGE) de peptídeos solúveis em água (PSA) extraídos de queijos muçarela, (a) corados com azul de Coomassie (Tempo 0), (b) corados com nitrato de prata (Tempo 0), (c) corados com azul de Coomassie (Tempo 20), (d) corados com nitrato de prata (Tempo 20). (M) Marcador de massa molecular (kDa); (1) muçarela com 100% leite de búfala; (2) muçarela com 2,5% de leite bovino em leite bubalino; (3) muçarela com 5,0% de leite bovino em leite bubalino; (4) muçarela com 10,0% de leite bovino em leite bubalino; (5) muçarela com 20,0% de leite bovino em leite bubalino; (6) muçarela com 30,0% de leite bovino em leite bubalino; (7) muçarela com 40,0% de leite bovino em leite bubalino; (8) muçarela com 50,0% de leite bovino em leite bubalino; (9) muçarela com 100% leite de vaca. \* peptídeo marcador bovino (23 kDa).





Peptídeos presentes em queijos são originados de diversas formas. A plasmina, enzima naturalmente presente no leite, é parcialmente inativada durante o tratamento térmico (TT), pasteurização, porém seus inibidores são totalmente inativados. Portanto, após o TT e a utilização da enzima quimosina na elaboração de queijos, a atividade da plasmina sobre a  $\beta$ -CN é intensificada, sendo favorecida pelas condições de processamento e armazenamento das amostras. Além da plasmina, principal protease do leite, outras proteinases provenientes de microrganismos,

especialmente bactérias psicotróficas, as quais crescem em baixas temperaturas, podem ser encontradas e suas enzimas são resistentes ao TT. Estas proteinases podem hidrolisar a  $\alpha_{s1}$ -CN formando peptídeos. Ou seja, além da existência natural, podendo existir peptídeos marcadores individuais de determinada espécie, a presença intensificada de peptídeos em produtos lácteos, pode ser atribuída à ação das proteinases do leite (plasmina) ou microrganismos, sendo que, muitas espécies podem obter respostas diferenciadas na intensificação e/ou degradação de peptídeos por proteólise (GRAPIN et al., 1985; FOX e McSWEENEY, 1998).

Apesar dos queijos de vaca e búfala possuírem peptídeos com características semelhantes, foi possível observar diferenças entre eles, principalmente em relação à estrutura e mobilidade nos géis (Figura 5 (a) e (b)).

Detectou-se a presença de peptídeos que podem servir como marcadores na diferenciação entre queijos muçarela de búfala e vaca, auxiliando com respostas sobre adulterações. Na região de 23 kDa foram identificados peptídeos que podem ser característicos da espécie bubalina. Abaixo dessas bandas observou-se peptídeos, representados pelo asterisco na figura, que podem ser referentes à espécie bovina, não sendo encontrados em amostras de muçarela de búfala (Figura 5 (a) e (c)).

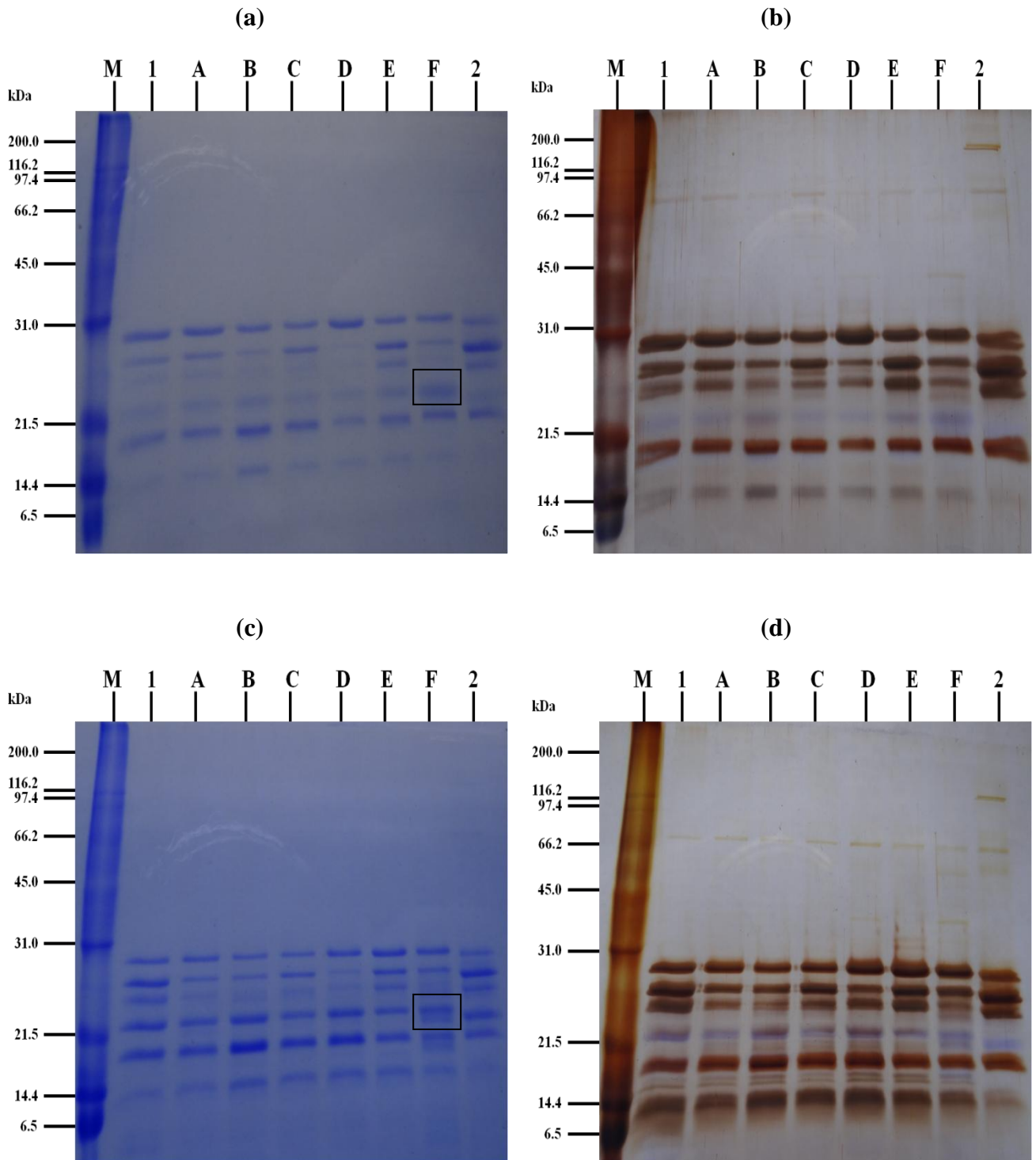
É importante observar que a presença dos peptídeos característicos de vaca só puderam ser notados nos queijos elaborados a partir da adição de 30% de leite bovino ao bubalino, ou seja, a técnica mostrou-se eficiente para detecção da adulteração a partir desta adição (Figura 5 (a) e (c)).

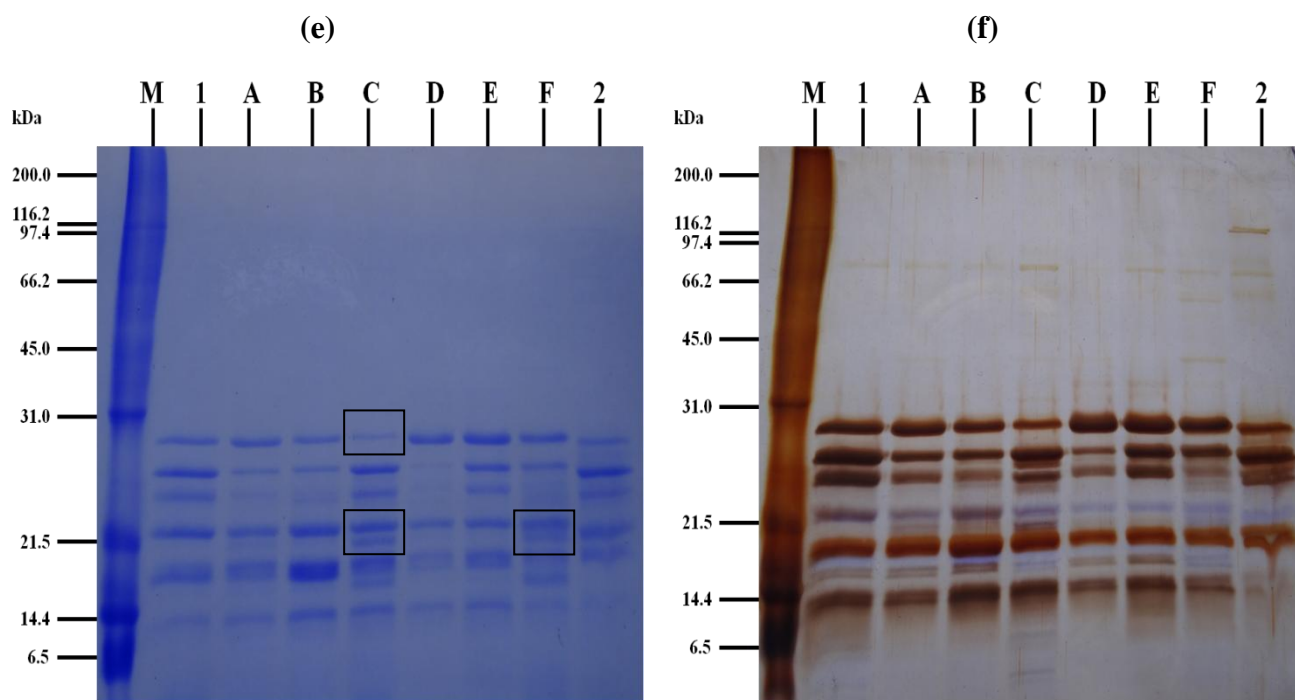
Na região de 23 kDa as bandas de peptídeos que apareceram nas colorações por azul de Coomassie e que podem ser marcadores das espécies bubalina e bovina, não puderam ser observadas com a mesma intensidade na coloração por nitrato de prata, em ambos os tempos de refrigeração. Isso ocorreu, provavelmente, por conta de reações que não favoreceram o aparecimento dos peptídeos marcadores na coloração por nitrato de prata (Figura 5).

Verificou-se que com o passar do tempo de estocagem sob refrigeração, os queijos foram afetados, revelando a intensificação da presença dos peptídeos, resultados de ação proteolítica e/ou naturalmente presentes nas amostras (Figura 5 (b) e (d)).

Nas amostras comerciais foi possível observar a presença de peptídeos marcadores da espécie bovina em amostras de muçarela de búfala (Figura 6). Ou seja, em alguns lotes das marcas avaliadas existiram suspeitas de adulteração por adição de leite de vaca, o que não é permitido pela legislação.

**Figura 6:** Perfil eletroforético (SDS-PAGE) de peptídeos solúveis em água (PSA) extraídos de amostras comerciais de queijo muçarela de búfala, (a) corados com azul de Coomassie (1ª repetição), (b) corados com nitrato de prata (1ª repetição), (c) corados com azul de Coomassie (2ª repetição), (d) corados com nitrato de prata (2ª repetição), (e) corados com azul de Coomassie (3ª repetição), (f) corados com nitrato de prata (3ª repetição). (M) Marcador de massa molecular (kDa); (1) muçarela com 100% leite de búfala; A, B, C, D, E e F correspondem às marcas comerciais analisadas; (2) muçarela com 100% leite de vaca.





Foi possível detectar a presença de peptídeos característicos da espécie bovina na amostra F do primeiro lote (Figura 6 (a)), assemelhando-se com os resultados das frações proteicas (Figura 4 (a) e (b)). Portanto, as suspeitas de adulteração que foram vistas anteriormente nesta amostra aumentaram com a eletroforese dos peptídeos.

Novamente a amostra F do segundo lote apresentou o peptídeo característico da espécie bovina (Figura 6 (c)), evidenciando o que não foi visto anteriormente na análise das frações proteicas. Portanto suspeitou-se de fraude no referido lote desta marca. Nas demais amostras não foi possível detectar a presença do peptídeo marcador bovino, bem como os demais sendo semelhantes aos da espécie bubalina, com os resultados concordando com os anteriores (Figura 4 (c) e (d)).

No terceiro lote das marcas verificou-se que as amostras C e F apresentaram o peptídeo marcador da espécie bovina, suspeitando-se de fraudes (Figura 6 (e)). Os peptídeos da região de 28 kDa da amostra C são semelhantes aos da mesma região da espécie bovina, confirmando-se a suspeita de fraude no referido lote desta marca.

Segundo estudos desta pesquisa a presença do peptídeo referido como marcador da espécie bovina em amostras de muçarela de búfala só foi possível com maior facilidade após a adição de, no mínimo, 30% de leite de vaca. Portanto, com a técnica eletroforética utilizada, concluiu-se que as marcas comerciais adulteradas possuíam, pelo menos, 30% de leite bovino em sua composição. As demais amostras que não foram consideradas fraudadas nestas condições experimentais, se por ventura apresentaram leite bovino em sua composição, possuem menos de 20% do total de leite utilizado, devido ao não aparecimento do peptídeo marcador bovino.

No presente estudo, todas as amostras indicavam no rótulo que o leite de búfala era a única matéria-prima utilizada. De acordo com a análise das amostras comerciais de queijo muçarela de búfala, nem todos os lotes das marcas estavam em conformidade com as especificações do rótulo e a legislação. A amostra que continha o "Selo de Pureza 100% Búfalo" concedido pela ABCB impresso na embalagem, segundo a análise de peptídeos, continha apenas leite bubalino em sua composição, comprovando, assim, a sua veracidade.

Prado (2010) relatou que quando um laticínio quer adquirir o "Selo de Pureza 100% Búfalo" da ABCB, paga taxas e assina um contrato no qual se compromete a trabalhar exclusivamente com leite de búfala na elaboração dos produtos. O laticínio passa uma série de avaliações técnicas e, a partir daí, seus produtos são analisados por meio de técnicas laboratoriais. Em geral, quatro vezes ao ano são recolhidos aleatoriamente produtos derivados de leite de búfala da referida marca no mercado, sendo encaminhados para análise eletroforética, onde as amostras passam por um teste de pureza que detecta se há ou não presença de leite de vaca ou de outras espécies.

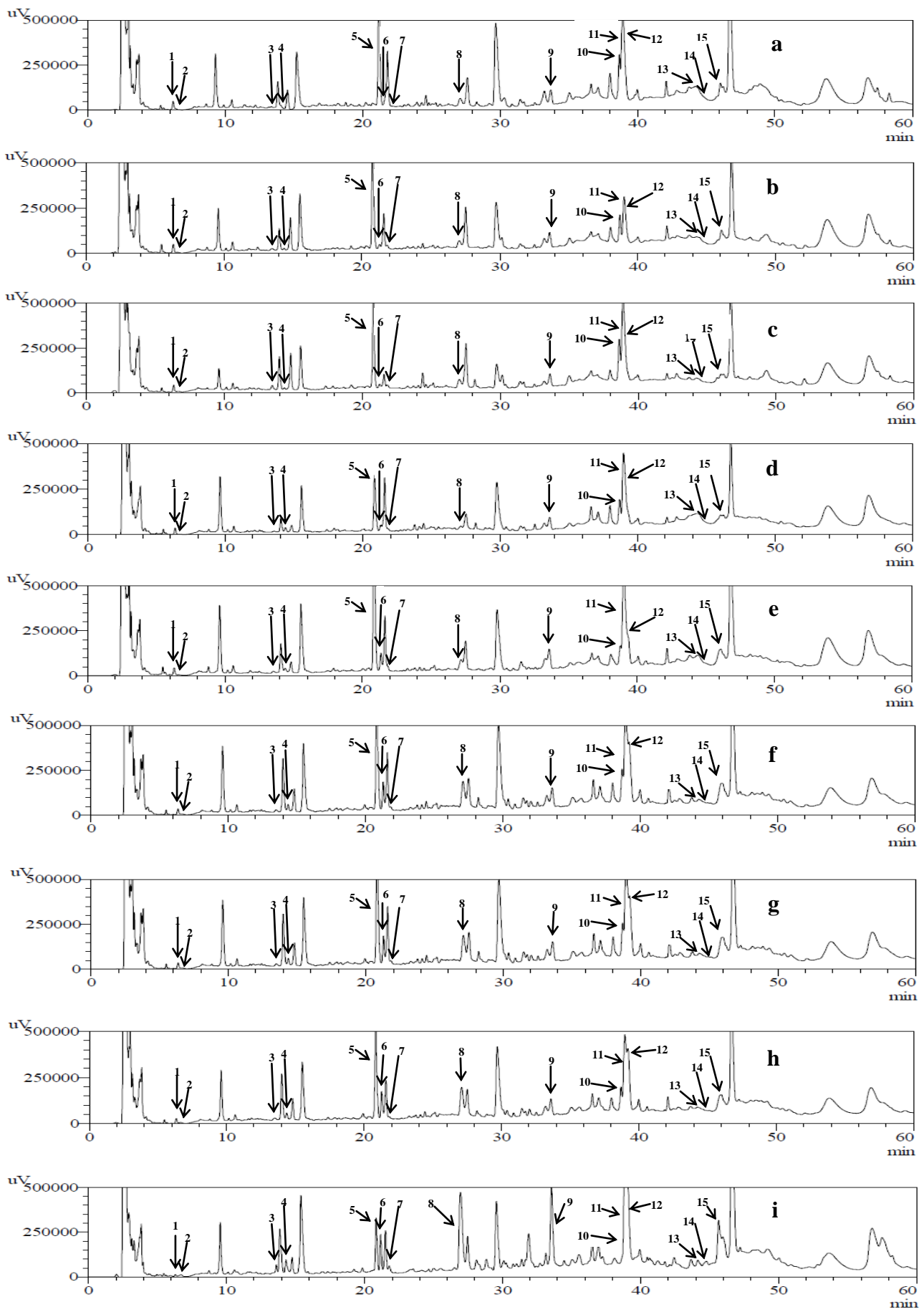
Pelo que foi visto, a análise de eletroforese SDS-PAGE dos peptídeos presentes nas amostras foi mais eficiente do que a análise das frações proteicas, podendo passar a ser utilizada como parâmetro de identidade na diferenciação entre as espécies.

A verificação desses peptídeos por cromatografia poderá auxiliar com mais clareza na obtenção de respostas para detecção de fraudes em muçarela de búfala, visto que as espécies tiveram peptídeos característicos distintos.

### **5.5. Cromatografia Líquida (RP-HPLC) de peptídeos solúveis em água (PSA) extraídos dos queijos muçarela elaborados e muçarelas de búfala comerciais**

Os peptídeos definidos como principais, que certamente irão auxiliar em suspeitas de fraudes em muçarela de búfala por adição de leite de vaca, foram numerados de 1 a 15 nos cromatogramas das diferentes formulações de queijos. Os demais, após análise, não foram considerados importantes neste estudo, pois são similares entre as formulações estudadas (Figura 7).

**Figura 7:** Cromatogramas (RP-HPLC) de peptídeos solúveis em água (PSA) extraídos de queijos muçarela no tempo 0. 1 a 15: peptídeos em diferentes tempos de retenção. (a) TRB; (b) muçarela com 2,5% de leite bovino em leite bubalino; (c) muçarela com 5,0% de leite bovino em leite bubalino; (d) muçarela com 10,0% de leite bovino em leite bubalino; (e) muçarela com 20,0% de leite bovino em leite bubalino; (f) muçarela com 30,0% de leite bovino em leite bubalino; (g) muçarela com 40,0% de leite bovino em leite bubalino; (h) muçarela com 50,0% de leite bovino em leite bubalino; (i) TRV.



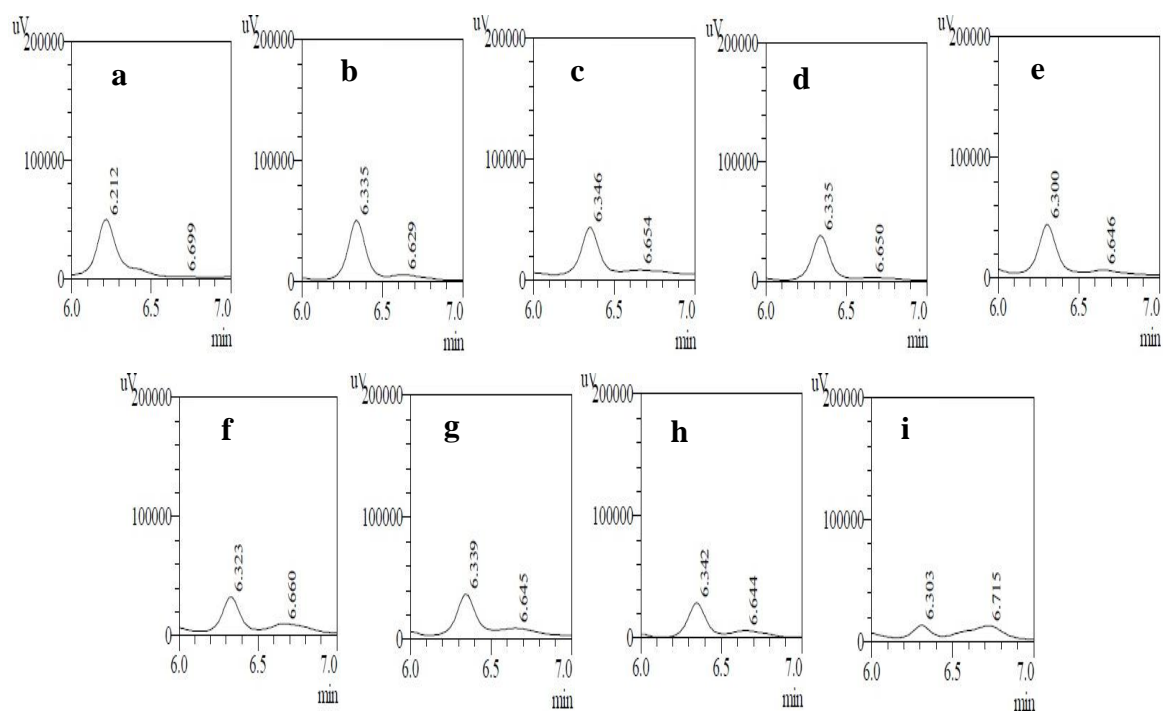
A partir das análises cromatográficas, no tempo 0 percebeu-se que o TRV caracterizou-se por apresentar alguns peptídeos característicos da espécie bovina e/ou outros em maiores ou menores quantidades (segundo Parente et al. (2012) representadas visualmente pelo tamanho dos picos), em menor importância o TRB comportou-se da mesma forma, podendo serem utilizados como parâmetros para detecção de leite de vaca em muçarela de búfala. Ou seja, à medida que acrescentou-se leite bovino nos queijos, pequenas alterações ocorreram em alguns peptídeos, com a intensificação e/ou diminuição do tamanho dos picos presentes nas amostras.

Os resultados encontrados mostraram-se importantes para detecção de fraudes em muçarela de búfala, pois a maior presença de peptídeos característicos da espécie bovina no presente estudo é essencial, fato que ocorreu, facilitando na análise de adulterações por leite de vaca em amostras comerciais.

Os picos representados nas imagens pelos números 1 e 2 (Figura 8) comportaram-se de maneiras distintas nas formulações. O pico número 1 diminuiu à medida em que acrescentou-se leite bovino nos queijos, enquanto que o segundo pico, apesar de ser pequeno, pode ser característico de vaca, não sendo encontrado no TRB.

**Figura 8:** Cromatogramas (RP-HPLC) dos peptídeos solúveis em água (PSA) 1 e 2 extraídos de queijos muçarela no tempo 0. (a) TRB; (b) muçarela com 2,5% de leite bovino em leite bubalino; (c) muçarela com 5,0% de leite bovino em leite bubalino; (d) muçarela com 10,0% de leite bovino em leite bubalino; (e) muçarela com 20,0% de leite bovino em leite bubalino; (f) muçarela com 30,0% de leite bovino em leite bubalino; (g) muçarela com 40,0% de leite bovino em leite bubalino; (h) muçarela com 50,0% de leite bovino em leite bubalino; (i) TRV.

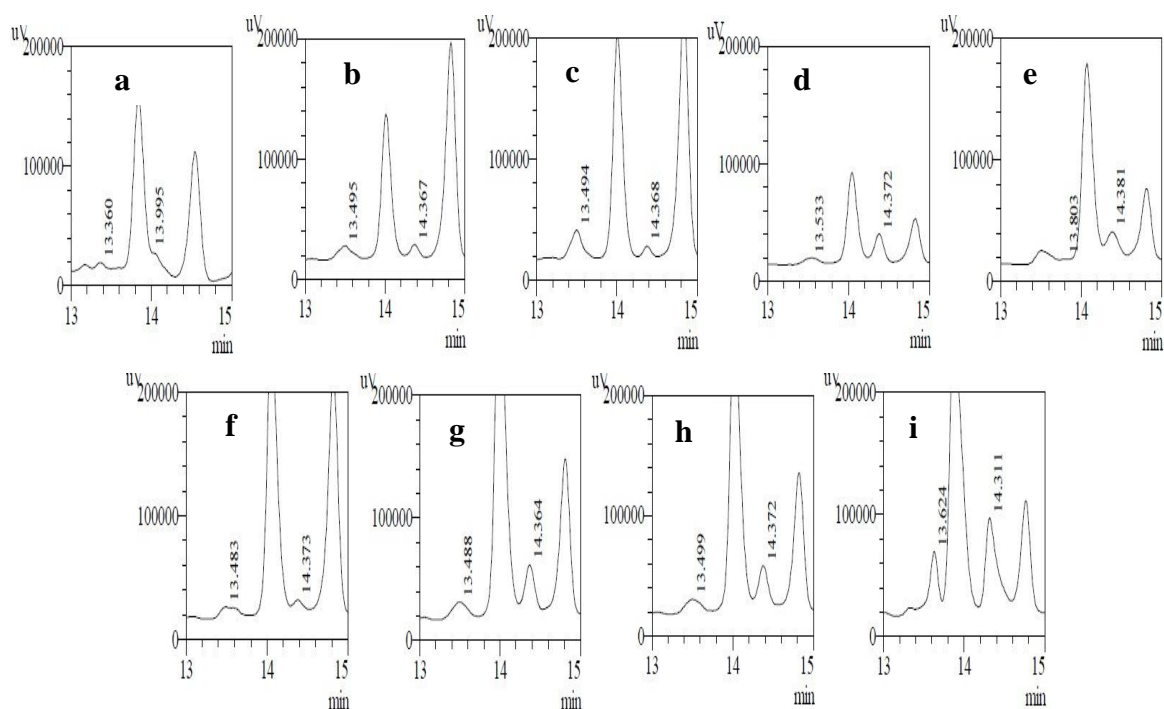




Os peptídeos 3 e 4, possuíram menor tamanho em TRB, assim, quanto maior foi o percentual de leite de vaca nos queijos, ocorreu um pequeno aumento no tamanho destes picos. Estes peptídeos não foram considerados característicos da espécie bovina, mas em decorrência da diferença de tamanho entre eles nas formulações e a depender das transformações que poderão ocorrer no tempo 20, poderão ser utilizados no combate a adulterações (Figura 9).

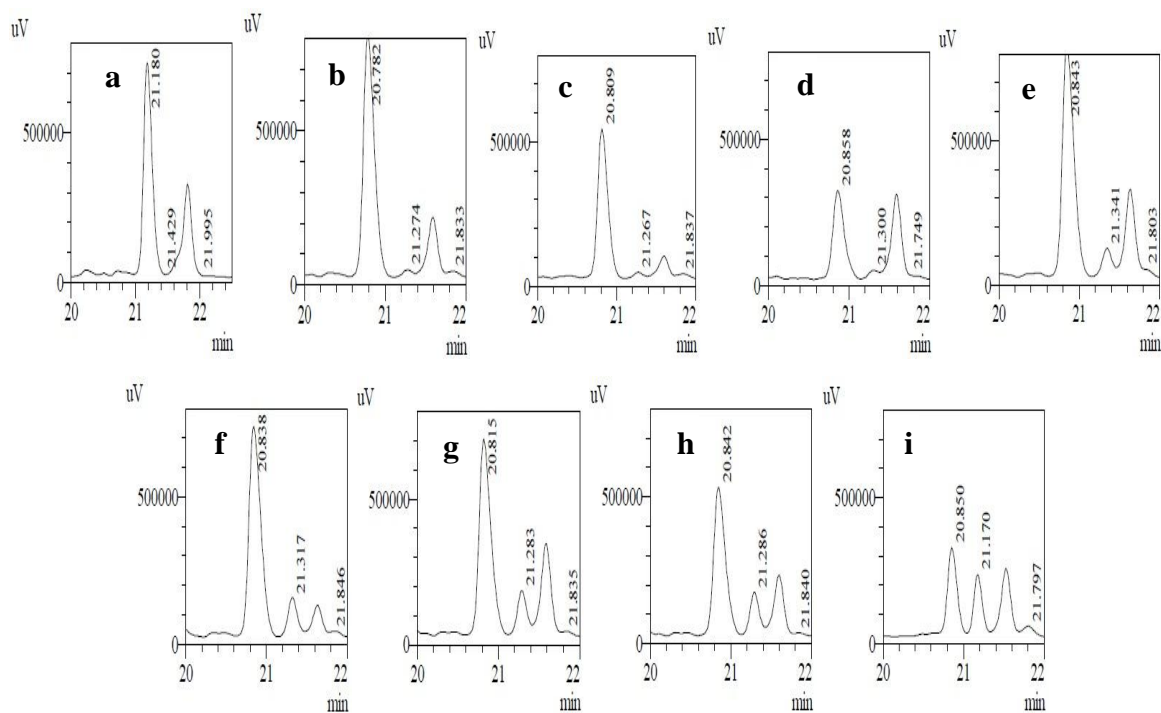
**Figura 9:** Cromatogramas (RP-HPLC) dos peptídeos solúveis em água (PSA) 3 e 4 extraídos de queijos muçarela no tempo 0. (a) TRB; (b) muçarela com 2,5% de leite bovino em leite bubalino; (c) muçarela com 5,0% de leite bovino em leite bubalino; (d) muçarela com 10,0% de leite bovino em leite bubalino; (e) muçarela com 20,0% de leite bovino em leite bubalino; (f) muçarela com 30,0% de leite bovino em leite bubalino; (g) muçarela com 40,0% de leite bovino em leite bubalino; (h) muçarela com 50,0% de leite bovino em leite bubalino; (i) TRV.





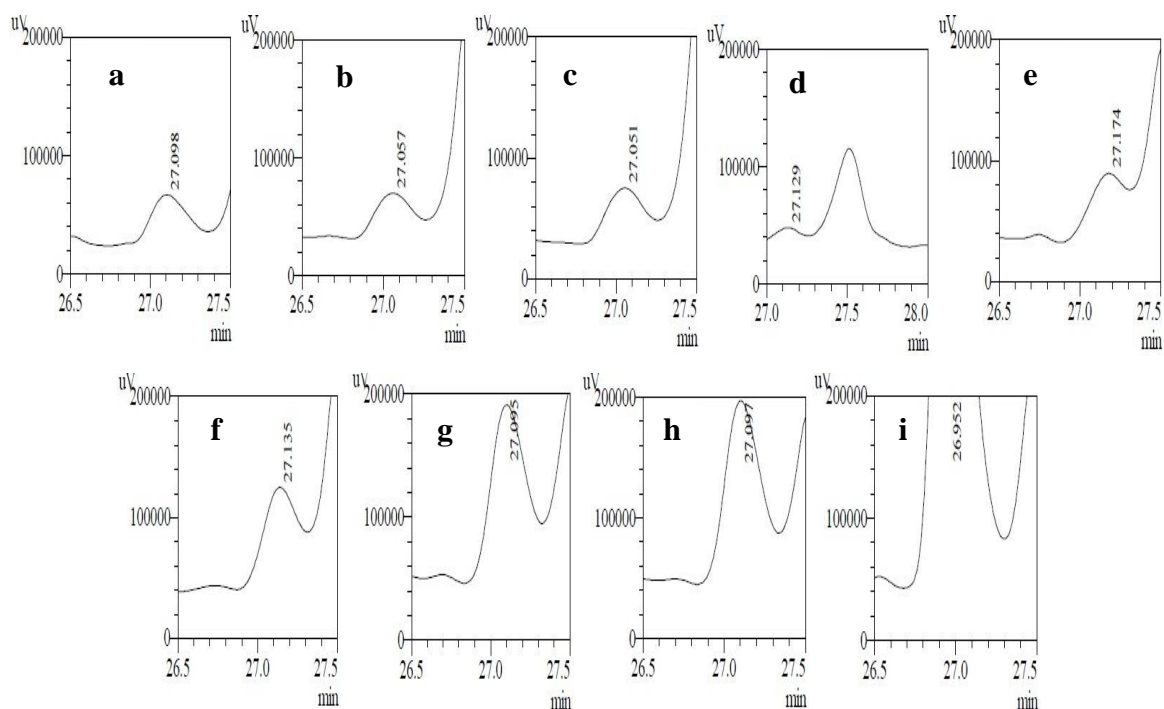
Na região com tempo de retenção entre 20 minutos e 22 minutos, três frações de peptídeos foram consideradas importantes. Os peptídeos marcados com o número 5 foram significativamente superiores no TRB e, mesmo não sendo característicos de búfalos, a diminuição significativa desta fração em amostras comerciais poderá levantar suspeitas de fraudes. Já os peptídeos 6 e 7 não foram visualizados no TRB, passando a aparecer nas formulações posteriores devido à presença de leite de vaca nas amostras. A adição de apenas 2,5% de leite de vaca nas amostras avaliadas foi possível de ser detectada pela análise dos peptídeos 6 e 7. Assim, concluiu-se que, provavelmente, estes são marcadores da espécie bovina, portanto a presença destes em muçarela de búfala não deve ser observada, configurando adulterações por adição de leite bovino (Figura 10).

**Figura 10:** Cromatogramas (RP-HPLC) dos peptídeos solúveis em água (PSA) 5, 6 e 7 extraídos de queijos muçarela no tempo 0. (a) TRB; (b) muçarela com 2,5% de leite bovino em leite bubalino; (c) muçarela com 5,0% de leite bovino em leite bubalino; (d) muçarela com 10,0% de leite bovino em leite bubalino; (e) muçarela com 20,0% de leite bovino em leite bubalino; (f) muçarela com 30,0% de leite bovino em leite bubalino; (g) muçarela com 40,0% de leite bovino em leite bubalino; (h) muçarela com 50,0% de leite bovino em leite bubalino; (i) TRV.



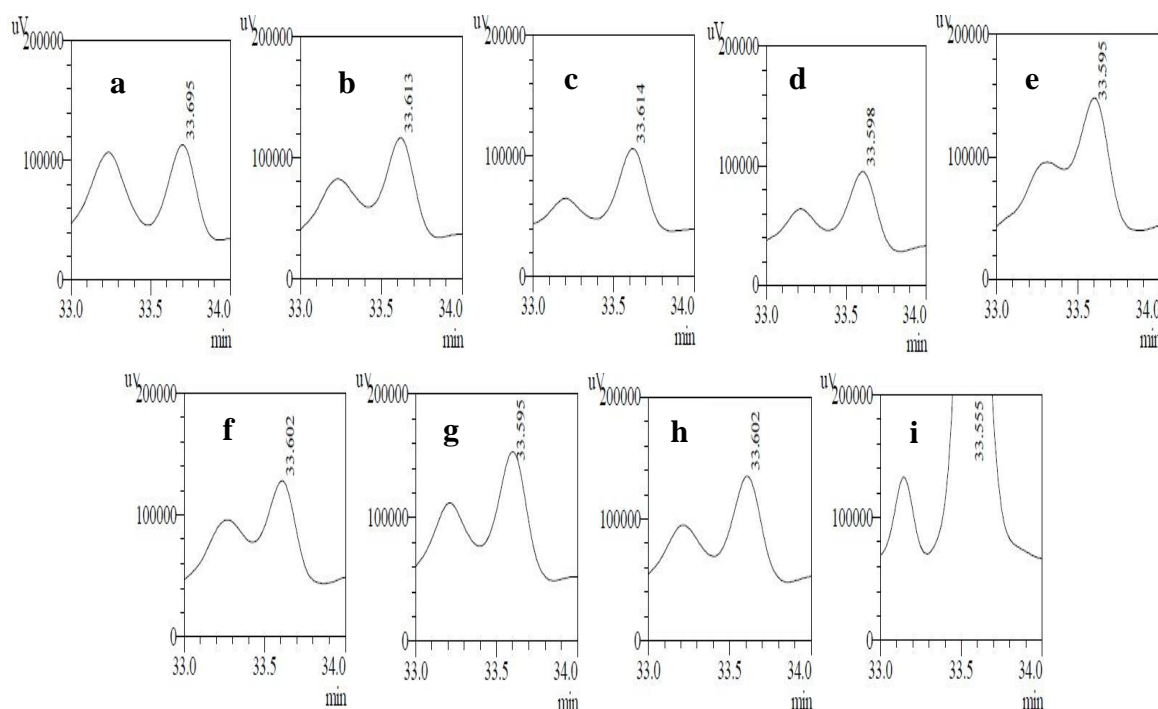
Na região de 27 minutos foi observado um pico de peptídeos que cresceu em maiores concentrações de leite bovino, sendo mais característico a partir da adição de 30% de leite de vaca nos queijos. Portanto, amostras comerciais que apresentarem este pico mais elevado, poderão estar fraudadas com, no mínimo, 40% de leite de vaca em suas formulações (Figura 11).

**Figura 11:** Cromatogramas (RP-HPLC) dos peptídeos solúveis em água (PSA) 8 extraídos de queijos muçarela no tempo 0. (a) TRB; (b) muçarela com 2,5% de leite bovino em leite bubalino; (c) muçarela com 5,0% de leite bovino em leite bubalino; (d) muçarela com 10,0% de leite bovino em leite bubalino; (e) muçarela com 20,0% de leite bovino em leite bubalino; (f) muçarela com 30,0% de leite bovino em leite bubalino; (g) muçarela com 40,0% de leite bovino em leite bubalino; (h) muçarela com 50,0% de leite bovino em leite bubalino; (i) TRV.



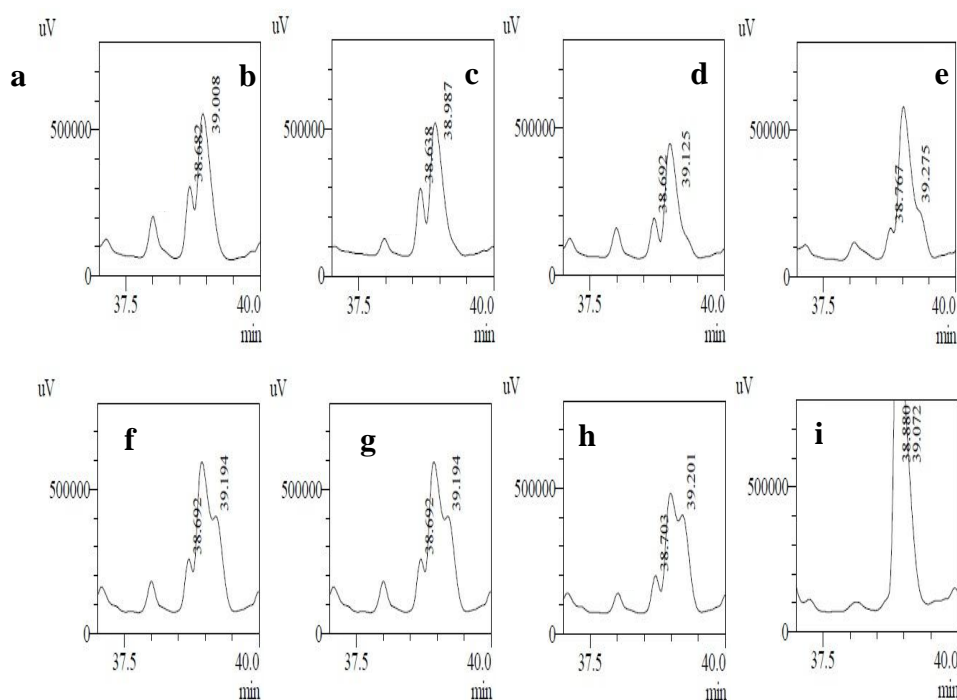
Em 33 minutos foi visualizado peptídeos que não apresentaram picos tão diferentes com a adição de leite bovino nas formulações. Porém, ao observar-se o TRV, verificou-se que este pico aumentou consideravelmente (Figura 12).

**Figura 12:** Cromatogramas (RP-HPLC) dos peptídeos solúveis em água (PSA) 9 extraídos de queijos muçarela no tempo 0. (a) TRB; (b) muçarela com 2,5% de leite bovino em leite bubalino; (c) muçarela com 5,0% de leite bovino em leite bubalino; (d) muçarela com 10,0% de leite bovino em leite bubalino; (e) muçarela com 20,0% de leite bovino em leite bubalino; (f) muçarela com 30,0% de leite bovino em leite bubalino; (g) muçarela com 40,0% de leite bovino em leite bubalino; (h) muçarela com 50,0% de leite bovino em leite bubalino; (i) TRV.



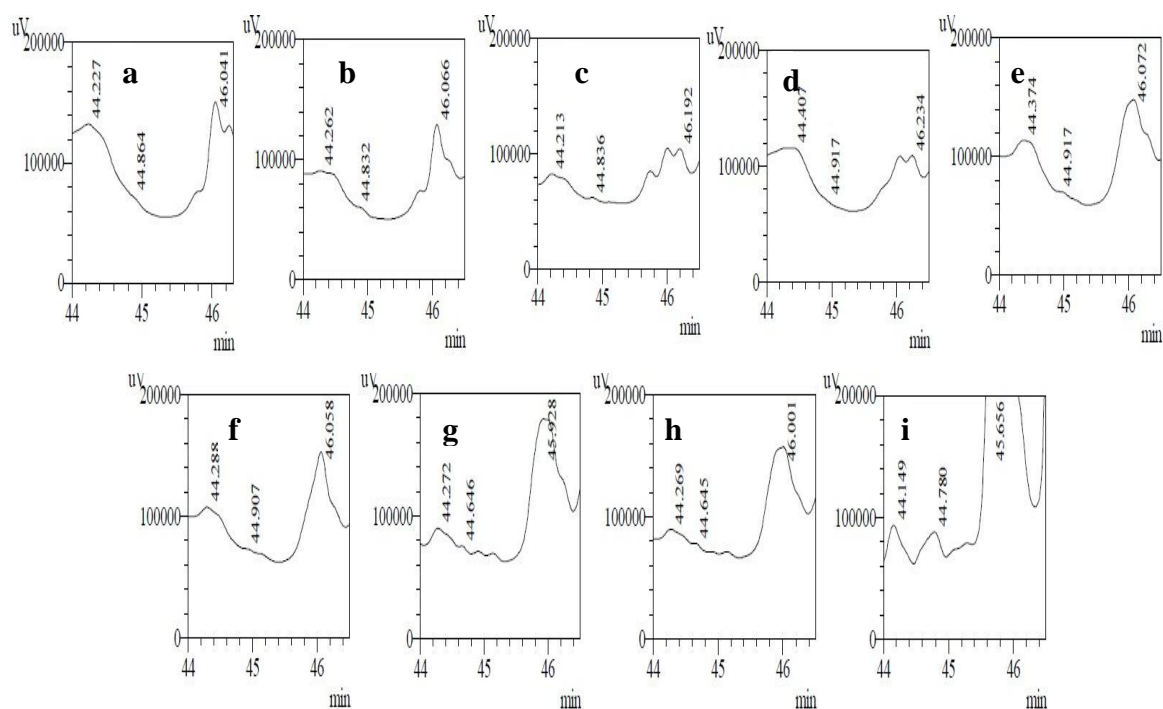
A partir de, aproximadamente, 38 minutos ocorreu um fato importante entre as amostras analisadas. O peptídeo marcado com o número 10 foi visto no TRB e nas demais formulações, com exceção do TRV. Assim, concluiu-se que este pico pode ser considerado um marcador da espécie bubalina. O pico de peptídeos marcado com o número 11 também só não foi visto no TRV, sendo considerado característico da espécie bubalina. Os peptídeos marcados com o número 12 só passaram a estar presentes a partir da adição de 20% de leite de vaca, com maior destaque a partir da formulação de 30%, podendo ser considerados marcadores da espécie bovina. Porém, observou-se que no TRV este pico não foi visualizado da mesma forma que nas imagens das formulações anteriores. Isso significa que o pico número 12 do TRV é o mesmo número 12 que aparece nas misturas a partir de 20%. O TRB apresentou um pico elevado nesta região, assim como o TRV, assim concluiu-se que estes picos, apesar de semelhantes nos tamanhos e tempos de retenção, são distintos, sendo característicos das espécies bubalina e bovina, respectivamente (Figura 13).

**Figura 13:** Cromatogramas (RP-HPLC) dos peptídeos solúveis em água (PSA) 10, 11 e 12 extraídos de queijos muçarela no tempo 0. (a) TRB; (b) muçarela com 2,5% de leite bovino em leite bubalino; (c) muçarela com 5,0% de leite bovino em leite bubalino; (d) muçarela com 10,0% de leite bovino em leite bubalino; (e) muçarela com 20,0% de leite bovino em leite bubalino; (f) muçarela com 30,0% de leite bovino em leite bubalino; (g) muçarela com 40,0% de leite bovino em leite bubalino; (h) muçarela com 50,0% de leite bovino em leite bubalino; (i) TRV.



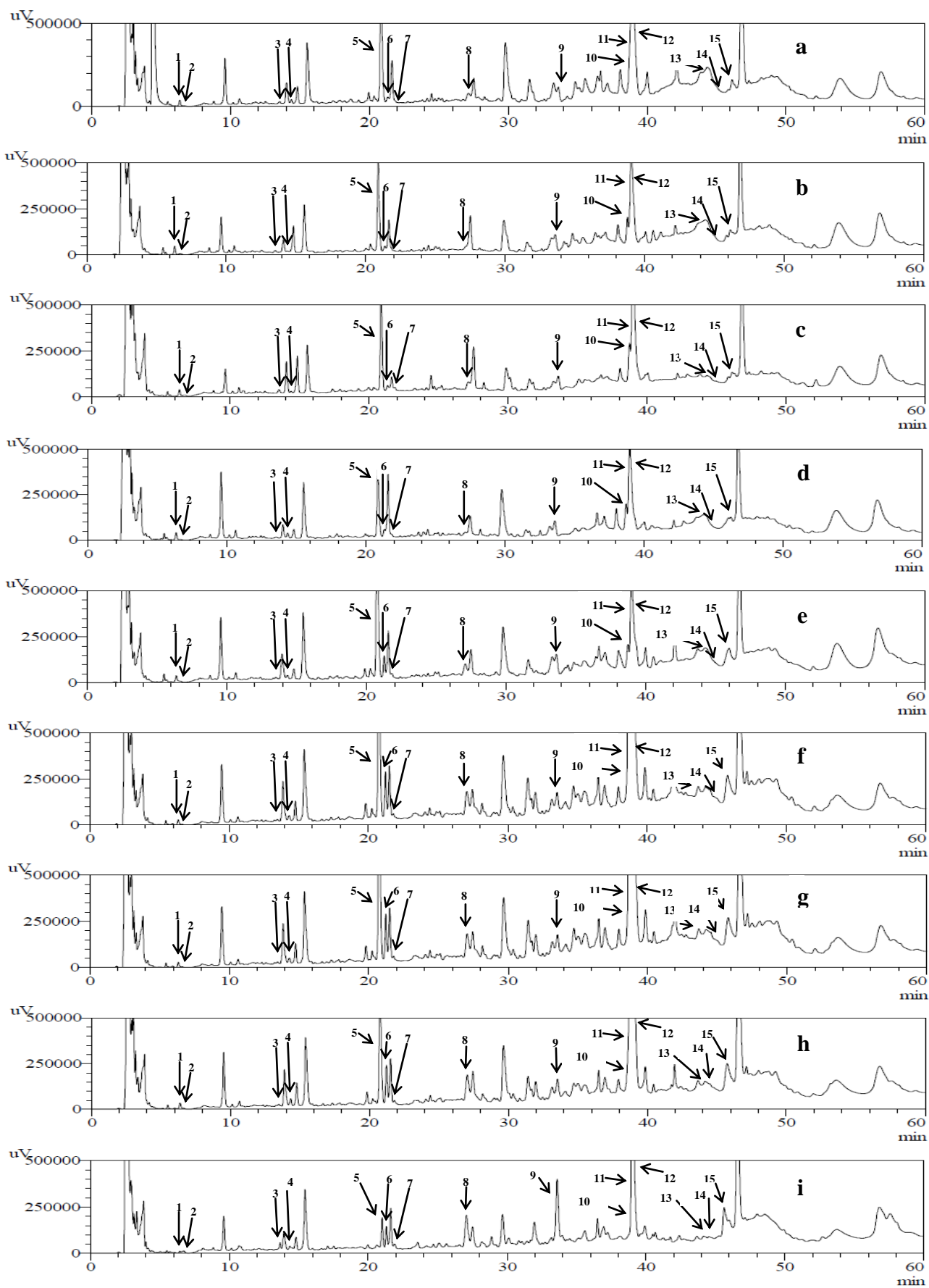
Na região entre 44 minutos e 46,5 minutos foram marcados três peptídeos importantes que podem auxiliar em detecções de adulterações em muçarela de búfala por adição de leite de vaca. O peptídeo marcado com o número 13 diminuiu com o acréscimo de leite de vaca nas amostras, enquanto que os de número 14 e 15 aumentaram, comportando-se de maneiras opostas (Figura 14).

**Figura 14:** Cromatogramas (RP-HPLC) dos peptídeos solúveis em água (PSA) 13, 14 e 15 extraídos de queijos muçarela no tempo 0. (a) TRB; (b) muçarela com 2,5% de leite bovino em leite bubalino; (c) muçarela com 5,0% de leite bovino em leite bubalino; (d) muçarela com 10,0% de leite bovino em leite bubalino; (e) muçarela com 20,0% de leite bovino em leite bubalino; (f) muçarela com 30,0% de leite bovino em leite bubalino; (g) muçarela com 40,0% de leite bovino em leite bubalino; (h) muçarela com 50,0% de leite bovino em leite bubalino; (i) TRV.



Com o armazenamento dos queijos por 20 dias sob refrigeração, os peptídeos presentes nas amostras foram analisados, objetivando-se verificar o efeito da proteólise e, com isso, a ocorrência de peptídeos como marcadores das espécies bovina e bubalina, auxiliando na diferenciação entre as mesmas e na detecção de adulteração em muçarela de búfala. Esta etapa foi importante, pois as amostras comerciais foram estudadas neste tempo de refrigeração (Figura 15).

**Figura 15:** Cromatogramas (RP-HPLC) de peptídeos solúveis em água (PSA) extraídos de queijos muçarela no tempo 20. 1 a 15: peptídeos em diferentes tempos de retenção. (a) TRB; (b) muçarela com 2,5% de leite bovino em leite bubalino; (c) muçarela com 5,0% de leite bovino em leite bubalino; (d) muçarela com 10,0% de leite bovino em leite bubalino; (e) muçarela com 20,0% de leite bovino em leite bubalino; (f) muçarela com 30,0% de leite bovino em leite bubalino; (g) muçarela com 40,0% de leite bovino em leite bubalino; (h) muçarela com 50,0% de leite bovino em leite bubalino; (i) TRV.



Os mesmos 15 peptídeos foram avaliados, sendo que alguns comportaram-se da mesma forma que no tempo 0, podendo serem utilizados como marcadores das espécies, já outros se modificaram devido aos efeitos proteolíticos, não sendo mais considerados como marcadores e/ou foram descartados para análise de adulterações.

Os peptídeos marcados com os números 1, 3, 4, 5, 8, 9, 13, 14 e 15 comportaram-se de maneira similar com o que foi visto no tempo 0. Mas, não foram considerados eficientes para detecção de adulteração, pois só constataram diferenças entre as espécies búfala e vaca e não entre as formulações com fraudes, portanto foram descartados no combate à adulterações em muçarela de búfala, já que amostras comerciais quando estiverem fraudadas terão alguma quantidade de leite bovino misturado ao bubalino, não sendo possível detectar a fraude por esses picos de peptídeos.

O peptídeo número 2 que anteriormente foi considerado marcador bovino, passou a estar presente em pequenas quantidades em muçarela de búfala após 20 dias sob refrigeração, não sendo possível a sua utilização para análise de adulteração em muçarelas de búfala comerciais.

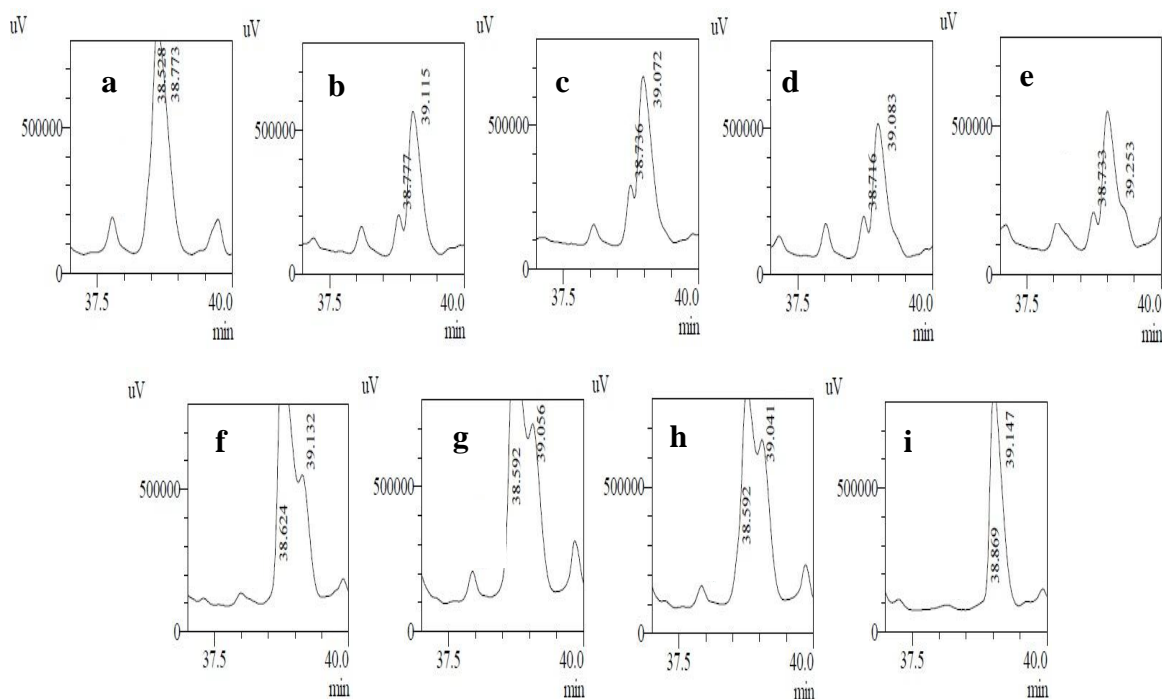
A fração numerada de 6 que, no tempo 0, foi considerada marcador de vaca, apareceu por efeitos de proteólise no TRB após 20 dias de refrigeração das amostras, descartando-se a possibilidade de facilmente detectar adulterações em muçarela de búfala quando presente após análise, porém quantidades elevadas desta fração em amostras comerciais poderão levantar suspeitas referentes à autenticidade da marca. A fração número 7, apesar de ser um pequeno pico, continuou sendo marcador da espécie bovina, com detecções a partir de 5% de leite de vaca, portanto não deve estar presente em amostras comerciais. Estas 2 frações foram consideradas importantes para avaliação de muçarela de búfala.

O pico de peptídeos marcado com o número 10 (Figura 16) modificou-se em relação ao tempo 0, ou seja, desapareceu no TRB do tempo 20, devido aos efeitos de proteólise nesta amostra. Porém, nas demais formulações, com exceção do TRV, este pico ainda apareceu, confirmando-se como marcador da espécie bubalina. Assim, concluiu-se que, a depender dos efeitos proteolíticos sofridos pelo queijo durante o processamento e, principalmente, no armazenamento, a presença deste pico caracteriza a referida espécie. Portanto, amostras comerciais de muçarela de búfala poderão ou não apresentar este pico, a depender dos efeitos de proteólise sofridos pelas mesmas.

**Figura 16:** Cromatogramas (RP-HPLC) dos peptídeos solúveis em água (PSA) 10, 11 e 12 extraídos de queijos muçarela no tempo 20. (a) TRB; (b) muçarela com 2,5% de leite bovino em leite bubalino; (c) muçarela com 5,0% de leite bovino em leite bubalino; (d) muçarela com 10,0% de leite bovino em leite bubalino; (e) muçarela com 20,0% de leite bovino em leite bubalino; (f)



muçarela com 30,0% de leite bovino em leite bubalino; (g) muçarela com 40,0% de leite bovino em leite bubalino; (h) muçarela com 50,0% de leite bovino em leite bubalino; (i) TRV.

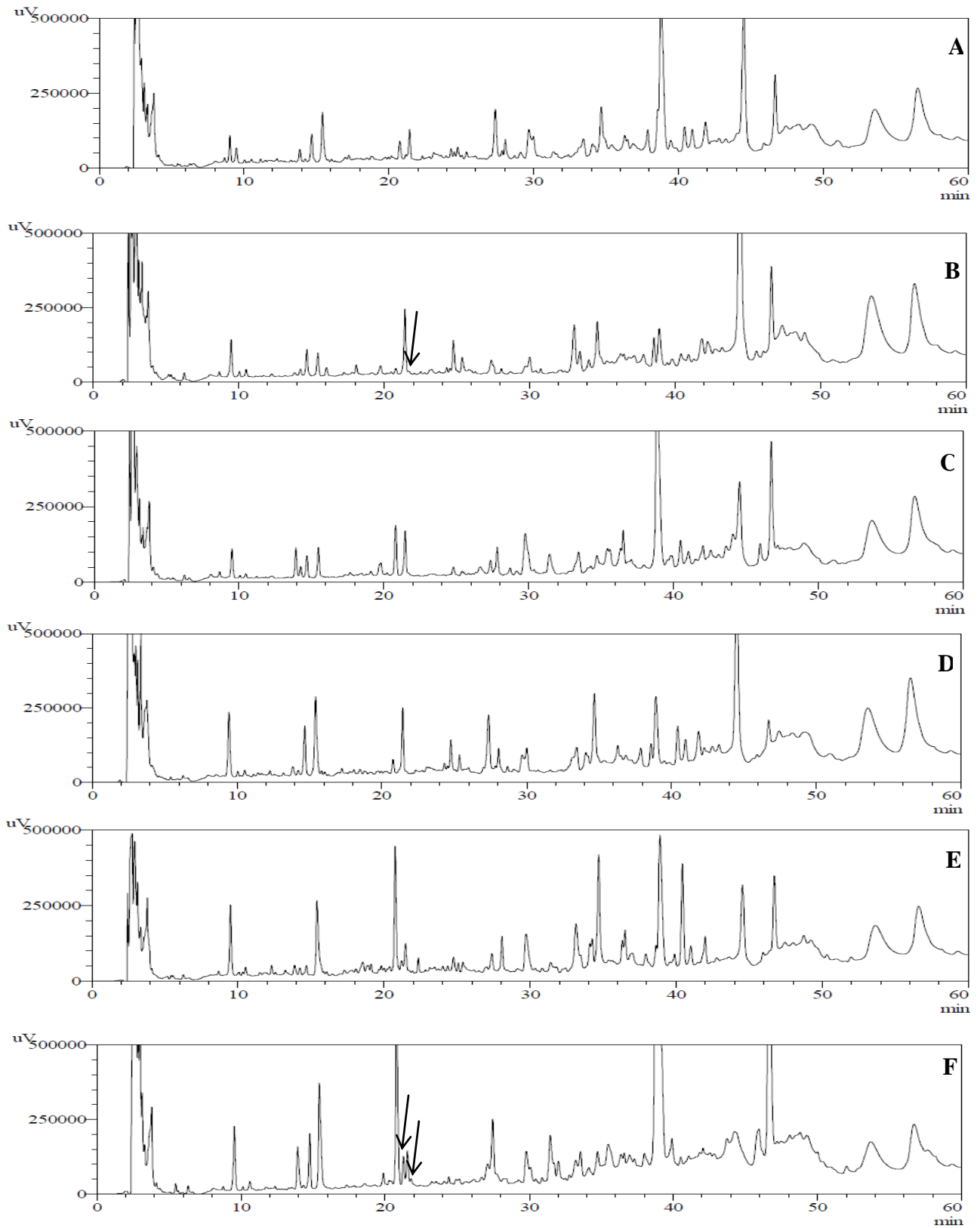


A fração número 11 somente não apareceu no TRV, sendo considerado marcadores da espécie bubalina. Já as frações numeradas como 12 comportaram-se de maneira semelhante às mesmas do tempo 0, surgindo a partir da amostra com 20% de leite de vaca, crescendo com o acréscimo de leite bovino nas formulações. Em TRV as frações referentes a espécie bubalina desapareceram, com a ocorrência apenas do pico de peptídeos do leite de vaca (Figura 16).

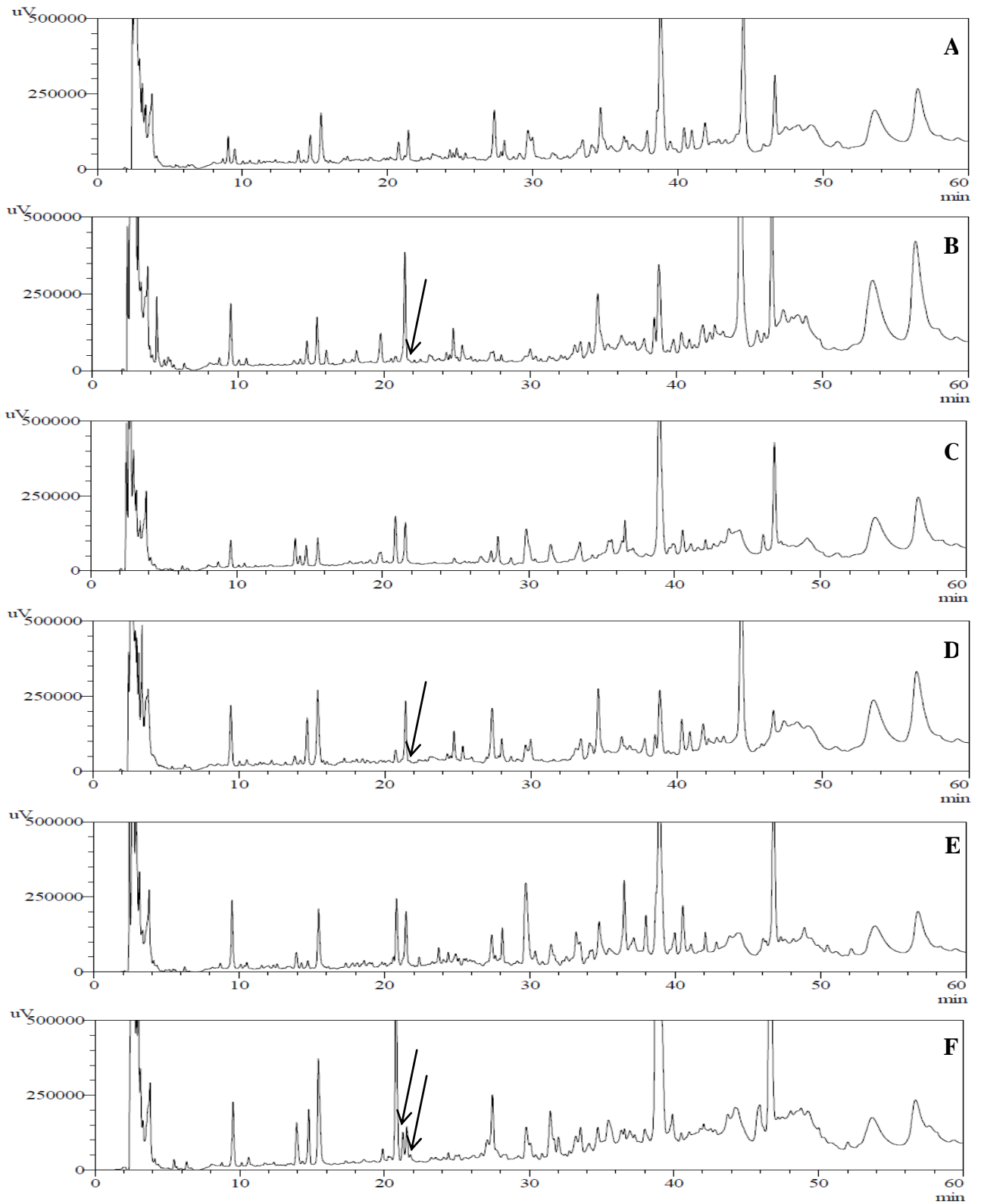
Assim, percebeu-se que muçarela com diferentes formulações são afetadas de diversas formas por efeitos de proteólise durante a estocagem. O que antes era considerado peptídeo marcador e/ou eficiente na detecção de fraude (Figura 7) foi descartado com o armazenamento das amostras sob refrigeração por 20 dias (Figura 15). Nas condições experimentais estudadas, concluiu-se que os peptídeos numerados por 6, 7, 10, 11 e 12 foram os mais importantes, podendo, de certa forma, levantar suspeitas sobre a utilização do tipo de leite, bubalino ou bovino, utilizado na elaboração de muçarela de búfala. Complementando as informações, foi visto que não foi possível verificar adulterações em muçarela de búfala sem o controle do tempo de armazenamento das amostras, ou seja, é necessário levar em consideração a data de fabricação das mesmas.

Os perfis das amostras comerciais foram semelhantes entre si, com a presença das mesmas frações de peptídeos, porém existiram diferenças nos tamanhos e tempos de retenção dos picos e, até mesmo, entre os lotes de uma mesma marca (Figuras 17, 18 e 19).

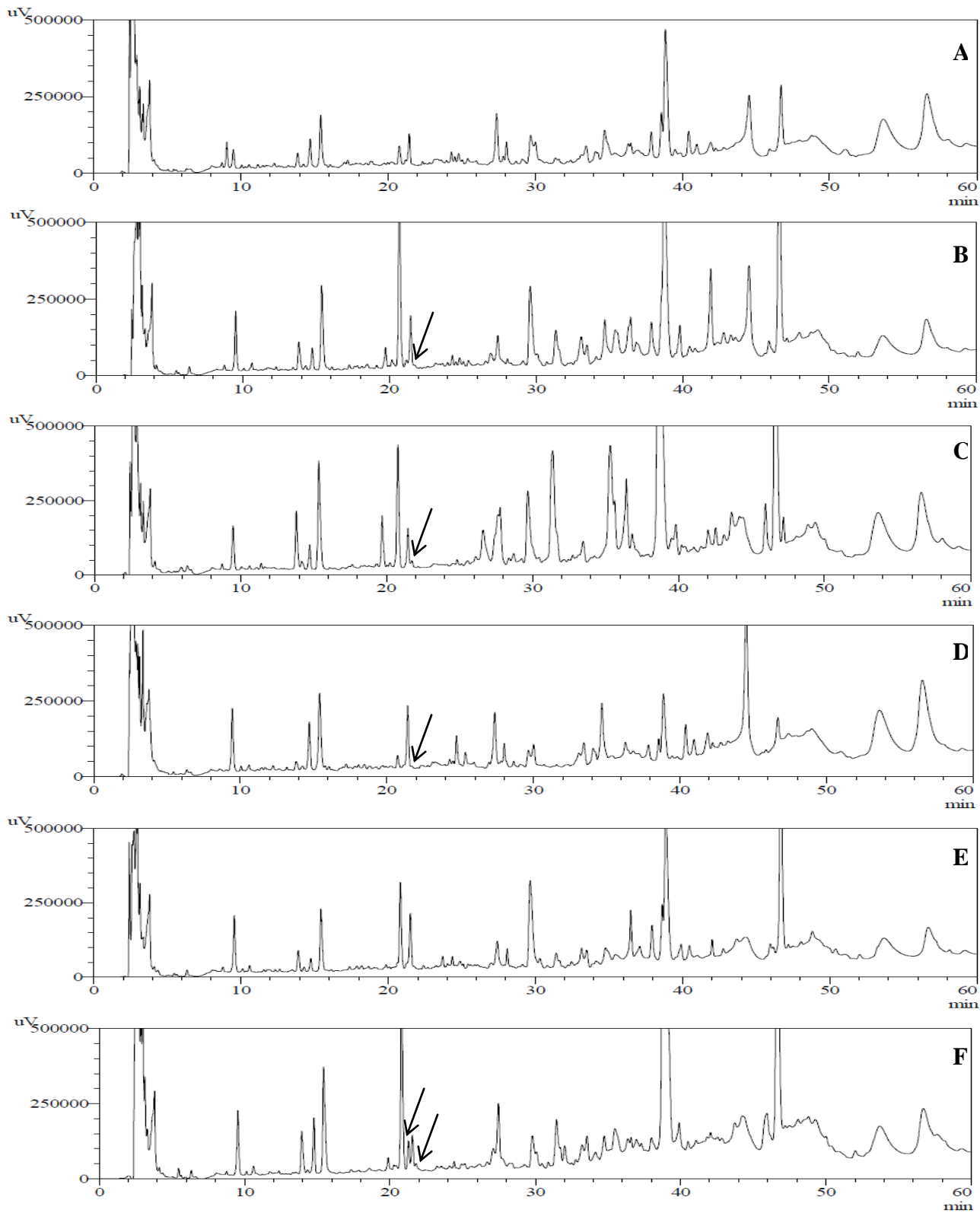
**Figura 17:** Cromatogramas (RP-HPLC) de peptídeos solúveis em água (PSA) extraídos de amostras comerciais de queijo muçarela de búfala (1ª repetição). A, B, C, D, E e F correspondem às marcas comerciais analisadas.



**Figura 18:** Cromatogramas (RP-HPLC) de peptídeos solúveis em água (PSA) extraídos de amostras comerciais de queijo muçarela de búfala (2ª repetição). A, B, C, D, E e F correspondem às marcas comerciais analisadas.



**Figura 19:** Cromatogramas (RP-HPLC) de peptídeos solúveis em água (PSA) extraídos de amostras comerciais de queijo muçarela de búfala (3ª repetição). A, B, C, D, E e F correspondem às marcas comerciais analisadas.



No total 6 marcas comerciais, em 3 diferentes lotes (repetições), foram avaliadas nas mesmas condições experimentais. Os cromatogramas foram comparados com os estudados anteriormente (Figuras 7 e 15), objetivando-se levantar conclusões a respeito da veracidade das informações sobre o tipo de matéria-prima (leite) contida nos rótulos das embalagens.

Não conhecendo-se os diversos processos de fabricação das amostras, porém sabendo-se das diferenças entre a elaboração das mesmas, concluiu-se que as diferenças existentes observadas podem ser oriundas dessas variações.

As diferenças entre as massas moleculares (Figura 5 (a) e (c)) e os tempos de retenção (Figuras 7 e 15) dos possíveis peptídeos marcadores das espécies estudados permitiram a identificação de adulterações em amostras comerciais de muçarela de búfala.

Em 9 das 18 amostras comerciais estudadas, não foram vistos a presença de peptídeos que levantaram suspeitas de fraudes por adição de leite de vaca. Os resultados foram semelhantes ao que foi visto na análise de eletroforese, tanto das frações proteicas quanto dos peptídeos presentes nos queijos. Assim, estas marcas estão de acordo com a legislação e no que está especificado em suas embalagens, com a utilização apenas de leite de búfala nas formulações.

Em 5 queijos avaliados, representados pelo primeiro lote (repetição) da marca B (Figura 17), segundo lote (repetição) das marcas B e D (Figura 18) e no terceiro lote (repetição) das marcas B e D (Figura 19), levantou-se suspeitas de fraudes pela pouca presença da fração de peptídeos numerados por 7, assemelhando-se com os cromatogramas das formulações com adições de leite bovino, sendo distintos do padrão TRB estudado. Por meio dos estudos desta pesquisa, possivelmente, se estas amostras estiverem fraudadas, as adulterações foram realizadas por quantidades inferiores a 20% de leite de vaca, devido ao não aparecimento do pico número 12, característico da espécie bovina a partir da adição de 20% de leite de vaca.

Em 4 das 18 amostras estudadas, os três lotes (repetições) da marca F e o terceiro lote (repetição) da marca C (Figuras 17, 18 e 19), foram detectadas semelhanças com os cromatogramas característicos de vaca e/ou à presença de frações de peptídeos considerados possíveis marcadores da espécie bovina. Assim, concluiu-se, por meio dos resultados, que estas amostras estão fraudadas com a adição de leite de vaca nas formulações. As adulterações ocorridas, se realmente estiverem presentes, não ocorreram em níveis baixos e sim em grande escala, principalmente nos três lotes da amostra F, devido ao aparecimento do pico número 12, característico de vaca a partir de 20%. À medida em que estes queijos são vendidos como muçarela de búfala, o que ocorre é fraude, falta de respeito e engano aos consumidores.

Resultados semelhantes, a respeito de adulterações por leite de vaca em amostras de muçarela de búfala, foram encontrados por Czerwenka et al. (2010). Os pesquisadores avaliaram

quinze amostras compradas em mercado austríaco (bancas de mercado, supermercados e delicatessens) e três adicionais em supermercados italianos. Os resultados foram avaliados tendo como base a  $\beta$ -lactoglobulina como marcador para diferenciação entre as espécies, por meio de cromatografia líquida de fase reversa (RP-HPLC) e espectrometria de massa. Em doze das quinze amostras da Áustria e nas três italianas não foi detectado  $\beta$ -LG bovina, indicando que o leite de vaca não foi adicionado aos queijos. As três amostras restantes da Áustria, em contraste, apresentaram quantidades substanciais de  $\beta$ -LG bovina.

Além das condições discutidas neste trabalho, pesquisas de diversos autores tornam possível à utilização de outros marcadores e/ou por outras técnicas para detectar adulterações em muçarela de búfala, como as concentrações de proteínas (BOTTERO et al., 2002; LÓPEZ-CALLEJA et al., 2005) e DNA (ENNE et al., 2005).

Os dados apresentados no presente trabalho mostraram-se importantes na detecção de adulterações por adição de leite bovino em muçarela de búfala. Trabalhos posteriores poderão ser desenvolvidos com o intuito de, até mesmo, quantificar com exatidão o nível de adulteração empregado nas amostras. Foi visto que fraudes a partir de 5,0% foram detectadas por meio de análise ao peptídeo número 7. A presença do peptídeo número 12 confirmou adulterações superiores a, no mínimo, 20% de leite bovino em muçarela de búfala.

O controle nos tempos de refrigeração das amostras foi de grande importância, pois foi visto que as diferenças entre os dois tempos avaliados (Tempo 0 e Tempo 20) influenciaram significativamente nas características dos peptídeos, que sofreram efeitos de proteólise (PARENTE et al., 2012), degradando e/ou surgindo picos de peptídeos, alterando a correta definição dos verdadeiros marcadores das espécies em estudo.

O sequenciamento dos aminoácidos presentes nos referidos peptídeos considerados marcadores poderá sanar dúvidas em relação à real existência de características próprias das espécies, confirmando à utilização destes peptídeos, por meio das técnicas empregadas, como avaliadores da autenticidade de muçarela de búfala.

## **6. Conclusão**

Não foi possível avaliar a autenticidade de muçarela de búfala por meio das análises de composição química e caracterização físico-química das amostras. As marcas comerciais avaliadas encontraram-se de acordo com as legislações brasileiras para umidade e GES.

Eletroforese SDS-PAGE mostrou-se eficiente para diferenciar as frações proteicas entre bovinos e bubalinos, com a ocorrência de peptídeos marcadores para as espécies estudadas. 4 amostras avaliadas tiveram suspeitas de adulteração por adição de leite de vaca nas formulações entre as 18 amostras comerciais de muçarela de búfala avaliadas.

Cromatografia RP-HPLC revelou a presença de possíveis peptídeos marcadores das espécies, concordando com os resultados eletroforéticos. Foi possível detectar com mais clareza a autenticidade de amostras comerciais de muçarela de búfala, em que 4 foram consideradas adulteradas, 5 suspeitas e 9 obedecendo à legislação, com apenas leite de búfala na composição.

Os resultados desta pesquisa mostraram-se importantes e eficientes na detecção de fraudes em muçarela de búfala, porém estudos futuros deverão ser realizados objetivando-se detalhar os possíveis peptídeos marcadores das espécies, concluindo a respeito da identidade dos mesmos.

## 7. Referências

ABCB. Associação Brasileira de Criadores de Búfalos. Disponível em: < <http://bufalo.com.br/> >. Acesso em: 28/05/2014.

ABIQ. Associação Brasileira das Indústrias de Queijo. Queijos no Brasil. Disponível em: < [http://www.abiq.com.br/nutricao\\_queijosbrasil\\_ant.asp](http://www.abiq.com.br/nutricao_queijosbrasil_ant.asp) >. Acesso em: 30/05/2014.

AHMAD, S.; GAUCHER, I.; ROUSSEAU, F.; BEAUCHER, E.; PIOT, M.; GRONGNET, J. F.; GAUCHERON, F. Effects of acidification on physico-chemical characteristics of buffalo milk: A comparison with cow's milk. **Food Chemistry**, v. 106, p. 11-17, 2008.

AHMED, N. S.; ABD EL-GAWAD, M. A. M.; EL-ABD, M. M.; ABD-RABOU, N. S. Properties of Buffalo Mozzarella Cheese as Affected by Type of Coagulante. **Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria**, v. 10, n. 3, p. 339-357, 2011.

ANDRIGHETTO, C. Cadeia produtiva do leite de búfala. In: Simpósio da Cadeia Produtiva da Bubalinocultura, 2011, Botucatu. **Anais...** Botucatu, 2011.

APONTE, M.; PEPE, O.; BLAIOTTA, G. Short communication: Identification and technological characterization of yeast strains isolated from samples of water buffalo Mozzarella cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 6, p. 2358-2361, 2010.

ARAÚJO, K. B. S.; RANGEL, A. H. N.; FONSECA, F. C. E.; AGUIAR, E. M.; SIMPLÍCIO, A. A.; NOVAES, L. P.; JÚNIOR, D. M. L. Influence of the year and calving season on production, composition and mozzarella cheese yield of water buffalo in the State of Rio Grande Do Norte, Brazil. **Italian Journal of Animal Science**, v. 11, n. 16, p. 87-91, 2012.

BERNARDES, O. Bubalinocultura no Brasil: situação e importância econômica. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 3, p. 293-298, 2007.

BHAT, P. N. **Genetics of River Buffaloes**. Buffalo production. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V, 1992. p. 13-94.



BLOOM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant protein, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, n. 2, p. 93-99, 1987.

BONFATTI, V.; GIANTIN, M.; ROSTELLATO, R.; DACASTO, M.; CARNIER, P. Separation and quantification of water buffalo milk protein fractions and genetic variants by RP-HPLC. **Food Chemistry**, v. 136, p. 364-367, 2013.

BORGHESE, A. **Buffalo production and research**. Rome: FAO, 2005. 317 p.

BOTTERO, M. T.; CIVERA, T.; NUCERA, D.; ROSATI, S.; SACCHI, P.; TURI, R. M. A multiplex polymerase chain reaction for the identification of cow's and sheep's milk in dairy products. **International Dairy Journal**, v. 13, p. 277-282, 2003.

BRASIL. Portaria nº 146, de 07 de março de 1996. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. RIISPOA. Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 1997. 154 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 364 de 1997. Regulamento Técnico para fixação de Identidade e Qualidade do queijo *Mozzarella* (*Muzzarella* ou Mussarela). **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62 de 2011. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade de Leite. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 29 de dezembro de 2011. 24 p.

BUZI, K. A.; PINTO, J. P. A. N.; RAMOS, P. R. R.; BIONDI, G. F. Análise microbiológica e caracterização eletroforética do queijo mussarela elaborado a partir de leite de búfala. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 1, p. 7-11, 2009.

CANDIANO, G.; BRUSCHI, M.; MUSANTE, L.; SANTUCCI, L.; GHIGGERI, G. M.; CARNEMOLLA, B.; ORECCHIA, P.; ZARDI, L.; RIGHETTI, P. G. Blue Silver: a very sensitive

colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, v. 25, n. 9, p. 1327-1333, 2004.

CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. Campinas: Ed. da Unicamp, 2003. 280 p.

CHEN, L.; LIU, H. Effect of emulsifying salts on the physicochemical properties of processed cheese made from mozzarella. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 4823-4830, 2012.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos**. Campinas: Editora Unicamp, 1990, 279 p.

COMMISSION REGULATION. Reference method for the detection of cow's milk and caseinate in cheeses from ewes' milk, goats' milk and buffaloes' milk or mixtures of ewes', goats' and buffaloes' milk. EC n°1081/96 of 14 June 1996. **Official Journal of the European Communities**, p. 15-25, 1996.

CRAMER, L. K.; RICHARDSON, T. Anomalous behavior of bovine  $\alpha_1$  - and  $\beta$  -caseins on gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate buffers. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 234, p. 476–486, 1984.

CUNHA NETO, O. C. **Avaliação do iogurte natural produzido com leite de búfala contendo diferentes níveis de gordura**. 2003. 71 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga.

CZERWENKA, C.; MÜLLER, L.; LINDNER, W. Detection of the adulteration of water buffalo milk and mozzarella with cow's milk by liquid chromatography-mass spectrometry analysis of  $\beta$ -lactoglobulin variants. **Food Chemistry**, v. 122, p. 901-908, 2010.

DA SILVA, R. A. **Caracterização microbiológica, físico-química, proteômica e bioativa de queijos de Coalho Artesanal produzidos na Região Agreste do Estado de Pernambuco-Brasil**. 2012. 195 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

DALMASSO, A.; CIVERA, T.; LA NEVE, F.; BOTTERO, M. T. Simultaneous detection of cow and buffalo milk in mozzarella cheese by Real-Time PCR assay. **Food Chemistry**, v. 124, n. 1, p. 362-366, 2011.

DAMÉ, M. C. F. **Búfalo: animal de tração**. Embrapa Clima Temperado. Documentos 173 versão online. Pelotas, Ed. 1, p.1-24, 2006. Disponível em: < [http://www.cpact.embrapa.br/publicacoes/download/documentos/documento\\_173.pdf](http://www.cpact.embrapa.br/publicacoes/download/documentos/documento_173.pdf) >. Acesso em: 12/06/2013.

DI LUCCIA, A.; PICARIELLO, G.; TRANI, A.; ALVITI, G.; LOIZZO, P.; FACCIA, M.; ADDEO, F. Occurrence of beta-casein fragments in cold-stored and curdled river buffalo (*Bubalus bubalis* L.) milk. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 4, p. 1319-1329, 2008.

D.M. Decreto del Ministero delle Politiche Agricole e Forestali, del 18 settembre 2003. Disciplina di produzione della denominazione di origine protetta della “Mozzarella di Bufala Campana”. **Gazzetta Ufficiale** N.258 del 6 novembre, 2003.

EGITO, A. S.; ROSINHA, G. M. S.; LAGUNA, L. E.; MICLO, L.; GIRARDET, J. M.; GAILLARD, J. L. Método eletroforético rápido para detecção da adulteração do leite caprino com leite bovino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 5, p. 932-939, 2006.

ENNE, G.; ELEZ, D.; FONDRINI, F.; BONIZZI, I.; FELIGINI, M.; ALEANDRI, R. High-performance liquid chromatography of governing liquid to detect illegal bovine milk's addition in water buffalo Mozzarella: Comparison with results from raw milk and cheese matrix. **Journal of Chromatography A**, v. 1094, p. 169-174, 2005.

FALEIRO, A. dos S. **Caracterização eletroforética, composição centesimal e propriedades físicas para verificação da autenticidade da muçarela de búfala comercializada no estado da Bahia**. 2013. 72 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Banco de dados FAOSTAT**. Disponível em: < <http://faostat3.fao.org/> >. Acesso em: 02/06/2014.

FERREIRA, I. M. P. L. V. O.; CAÇOTE, H. Detection and quantification of bovine, ovine and caprine milk percentages in protected denomination of origin cheeses by reverse-phase high-performance liquid chromatography of beta-lactoglobulins. **Journal Chromatography A**, v. 1015, p. 111-118. 2003.

FONTENELE, M. A. **Caracterização físico-química, avaliação sensorial, proteômica e bioquímica do queijo coalho do Jaguaribe - CE visando o processo de indicação geográfica - IG**. 2013. 146p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual do Ceará, Ceará.

FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. **Dairy Chemistry and Biochemistry**. Ed. Blackie Academic & Professional. 1998. 478 p.

FRIANO, T. C.; VAN DENDER, A. G. F.; LISSERE, A. M.; SPADOTI, L. M.; DOMINGOS L. D.; SILVA, P. G.; SOUZA, K. B. de. Caracterização físico-química de mozzarella de leite de búfala obtida a partir de massa fermentada e congelada. **Anais do 2º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC**. Campinas, SP: Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL, 2008.

G. A. GelAnalyzer 2010a. Disponível em: < <http://www.gelanalyzer.com/index.html> >. Acesso em: 20/05/2014.

GÓMEZ-RUIZ, J. A.; MIRALLES, B.; AGÜERA, P.; AMIGO, L. Quantitative determination of  $\alpha_{s2}$ - and  $\alpha_{s1}$ -casein in goat's milk with different genotypes by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, p. 279-284, 2004.

GONZÁLEZ, F. H. D.; DÜRR, J. W.; FONTANELI, R. S.; PERES, J. R.; BARROS, L.; CEBALLO, P. P. **Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras**. Porto Alegre: Gráfica UFRGS, 2001. 72 p.

GRAPPIN, R.; RANK, T. C.; OLSON, N. F. Primary proteolysis of cheese proteins during ripening. A review. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 68, n. 3, p. 531-540, 1985.

GUERREIRO, J. S.; BARROS, M.; FERNANDES, P.; PIRES, P.; BARDSLEY, R. Principal component analysis of proteolytic profiles as markers of authenticity of PDO cheeses. **Food Chemistry**, v. 136, n. 3-4, p. 1526-1532, 2013.

HAN, B.; MENG, Y.; LI, M.; YANG, Y.; REN, F.; ZENG, Q.; NOUT, M. J. R. A survey on the microbiological and chemical composition of buffalo milk in China. **Food Control**, v. 18, p. 742-746, 2007.

HINZ, K.; O'CONNOR, P. M.; HUPPERTZ, T.; ROSS, R. P.; KELLY, A. L. Comparison of the principal proteins in bovine, caprine, buffalo, equine and camel milk. **Journal of Dairy Research**, v. 79, p. 185-191, 2012.

HOUAISS, A.; VILLAR, M. S. **Dicionário Houaiss da Língua Portuguesa 2009**. Rio de Janeiro: Objetiva, 2009. 1986 p.

HUSSAIN, I.; YAN, J.; GRANDISON, A. S.; BELL, A. E. Effects of gelation temperature on Mozzarella-type curd made from buffalo and cows' milk: 2. Curd yield, overall quality, and casein fractions. **Food Chemistry**, v. 135, p. 1404-1410, 2012.

IAL. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos** / coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea. - 4ª edição. 1ª edição digital. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020 p.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa Pecuária Municipal. **SIDRA**. Disponível em: < <http://www.sidra.ibge.gov.br/> >. Acesso em: 02/06/2014.

IUPAC. International Union of Pure and Applied Chemistry. **Definição Internacional de Cromatografia**. Disponível em: < <http://www.iupac.org/> >. Acesso em: 26/12/2014.

JESUS, C. S. **Efeito do tempo de congelamento da coalhada fermentada de leite de búfala sobre a qualidade do queijo muçarela armazenado sob refrigeração**. Itapetinga - BA: UESB, 2014. 69 p. Dissertação - Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos.

LOCCI, F.; GHIGLIETTI, R.; FRANCOLINO, S.; IEZZI, R.; OLIVIERO, V.; GAROFALO, A.; MUCCHETTI, G. Detection of the cow milk in cooked buffalo Mozzarella used as Pizza topping. **Food Chemistry**, v. 107, p. 1337-1341, 2008.

LÓPEZ-CALLEJA, I.; ALONSO, G.; FAJARDO, V.; RODRÍGUEZ, M. A.; HERNÁNDEZ, P. E.; GARCÍA, T.; MARTÍN, R. PCR detection of cow's milk in water buffalo milk and mozzarella cheese, **International Dairy Journal**, v. 15, n. 11, p. 1122-1129, 2005.

MAMEDE, M. E. O.; VIANA, A. C.; SOUZA, A. L. C.; FARIAS, S. A. O.; ARAUJO, P. A. Estudo das características sensoriais e da composição química de queijo de coalho industrializado. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 3, p. 364-370, 2010.

MARINO, A. L. F.; BORGES, M. T. M. R.; BRUGNARO, C.; CANNIATTI-BRAZZACA, S. G.; SPOTO, M. H. F.; VERRUMA-BERNARDI, M. R. Características Físico-Químicas e Sensoriais de Marcas Comerciais de Queijo Mozarela de Leite de Búfala. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 3, p. 358-63, 2010.

MARQUES, J. R. F. **Avaliação genético-quantitativa de alguns grupamentos raciais de bubalinos (*Bubalus bubalis* L.)**. 1991. 134 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

MAYER, H. K. Milk species identification in cheese varieties using electrophoretic, chromatographic and PCR techniques. **International Dairy Journal**, v. 15, n. 6-9, p. 595-604, 2005.

MÉNARD, O.; AHMAD, S.; ROUSSEAU, F.; BRIARD-BRION, V.; GAUCHERON, F.; LOPEZ, C. Buffalo vs. cow milk fat globules: Size distribution, zeta-potential, compositions in total fatty acids and in polar lipids from the milk fat globule membrane. **Food Chemistry**, v. 120, n. 2, p. 544-551, 2010.

NÓBREGA, E. S. **Separação da mistura binária proteica de  $\alpha$ -lactoalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina por cromatografia de exclusão molecular utilizando reciclo externo estacionário**. 2004. 140p. Tese (Doutorado) - Unicamp.

ONG, L.; HENRIKSSON, A.; SHAH, N. P. Angiotensin converting enzyme-inhibitory activity in Cheddar cheeses made with the addition of probiotic *Lactobacillus casei* sp. **Lait**, v. 87, n. 2, p. 149-165, 2007.

PARENTE, E.; PATEL, H.; CALDEO, V.; PIRAINO, P.; MCSWEENEY, P. LH. RP-HPLC peptide profiling of cheese extracts: A study of sources of variation, repeatability and reproducibility. **Food Chemistry**, v. 131, n. 4, p. 1552-1560, 2012.

PESIC, M.; BARAC, M.; VRVIC, M.; RISTIC, N.; MACEJ, O.; STANOJEVIC, S. Qualitative and quantitative analysis of bovine milk adulteration in caprine and ovine milks using native-PAGE. **Food Chemistry**, v. 125, n. 4, p. 1443-1449, 2011.

POOLE, C. F. **The essence of chromatography**. Amsterdam: Elsevier Science B.V. 2002. 936p.

PRADO, M. C. de A. **Gato por lebre?** Revista Folha de São Paulo. 2010. Disponível em: < <http://selodabufala.com.br/2011/02/folha-sp-gato-por-lebre/> >. Acesso em 02/10/14.

PRITCHARD, S. R.; PHILLIPS, M.; KAILASAPATHY, K. Identification of bioactive peptides in commercial Cheddar cheese. **Food Research International**, v. 43, n. 5, p. 1545–1548, 2010.

RONCADA, P.; PIRAS, C.; SOGGIU, A.; TURK, R.; URBANI, A.; BONIZZI, L. Farm animal milk proteomics. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 14, p. 4259-4274, 2012.

SAMEEN, A.; ANJUM, F. M.; HUMA, N.; NAWAZ. Quality evaluation of mozzarella cheese from different milk sources. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 7, n. 6, p. 753-756, 2008.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos proteicos: propriedades, degradações, modificações**. São Paulo – SP: Livraria Varela, 1996. 518 p.

SGARBIERI, V. C. Revisão: Propriedades Estruturais e Físico-Químicas das Proteínas do leite. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 8, n. 1, p. 43-56, 2005.

SILVA, R. V. S. **Detecção da presença de leite bovino no leite caprino por imunocromatografia e ELISA**. Patos - PB: UFCG, 2010. 34 p. Dissertação - Mestrado em Medicina Veterinária.

SINDHU, J. S.; ARORA, S. Buffalo Milk. **Encyclopaedia of Dairy Sciences**, 2ed. p. 503–511. 2011.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Principios de análisis instrumental**. Madri: McGraw Hill, 5 ed., 2001. 1028p.

TIMÓN, M. L.; PARRA, V.; OTTE, J.; BRONCANO, J. M.; PETRON, M. J. Identification of peptides radicals elimination (<3 kDa) Burgos cheese type. **LWT - Food Science and Technology**, v. 57, n. 1, p. 359-365, 2014.

URBANKE, W.; LUF, W.; BRANDL, E. Use of HPLC for control of the adulteration of milk and milk products of different species, **Z Lebensm Unters Forsch**, v. 195, p.137-142. 1992.

VELOSO, A. C. A.; TEIXEIRA, N.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O.; FERREIRA, M. A. Detecção de adulteração em produtos alimentares contendo leite e/ou proteínas lácteas. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 609-15, 2002.

VELOSO, A. C. A.; TEIXEIRA, N.; PERES, A. M.; MENDONÇA, A.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O. Evaluation of cheese authenticity and proteolysis by HPLC and urea-polyacrylamide gel electrophoresis. **Food Chemistry**, v. 87, p. 289-295, 2004.

VENTURINI, K. S.; SARCINELLI, M. F.; DA SILVA, L. C. **Características do Leite**. Boletim Técnico: Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), 2007. 80 p.

VEIROS, C. B. R. Contributo para a Caracterização do Queijo Terrincho: Estudo da Proteólise e Avaliação da Autenticidade por HPLC/UV, 2005, 145 p. **Dissertação (Mestrado)** em Controle de Qualidade, Universidade do Porto, Porto.

WALSTRA, P.; GEURTS, T. J.; NOOMEN, A.; JELLEMA; VAN BOEKEL, M. A. J. S. **Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos**. Zaragoza: Acribia, 2001.



WHITFORD, D. **Proteins: Structure and Function**. The Atrium, Siurthern Gate, Chichester, England, 2005. 511 p.