



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

**CARACTERIZAÇÃO ELETROFORÉTICA, COMPOSIÇÃO CENTESIMAL E  
PROPRIEDADES FÍSICAS PARA VERIFICAÇÃO DA AUTENTICIDADE DA  
MUÇARELA DE BÚFALA COMERCIALIZADA NO ESTADO DA BAHIA**

**AMANDA DOS SANTOS FALEIRO**

**ITAPETINGA – BAHIA**

**2013**



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

**CARACTERIZAÇÃO ELETROFORÉTICA, COMPOSIÇÃO CENTESIMAL E  
PROPRIEDADES FÍSICAS PARA VERIFICAÇÃO DA AUTENTICIDADE DA  
MUÇARELA DE BÚFALA COMERCIALIZADA NO ESTADO DA BAHIA**

**AMANDA DOS SANTOS FALEIRO**

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

**Orientadora:** DSc. Sibelli Passini Barbosa Ferrão

**Co-orientadores:** DSc. Antonio Silvio do Egito e  
DSc. Sérgio Augusto de Albuquerque Fernandes

**ITAPETINGA – BAHIA**

**2013**

637.30287 F177c	<p>Faleiro, Amanda dos Santos.          Caracterização eletroforética, composição centesimal e propriedades físicas para verificação da autenticidade da muçarela de búfala comercializada no estado da Bahia. / Amanda dos Santos Faleiro. - Itapetinga: UESB, 2013.          71f.</p> <p>Dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB – Campus de Itapetinga. Sob a orientação da Profa. D.Sc. Sibelli Passini Barbosa Ferrão e co-orientação do Prof. D.Sc. Antonio Silvio do Egito e Prof. D.Sc. Sérgio Augusto de Albuquerque Fernandes.</p> <p>1. Queijo muçarela de búfala – Comercialização na Bahia – Autenticidade. 2. Muçarela de búfala - Eletroforese - Composição centesimal - Propriedades físicas. 3. Fraude em queijo. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. II. Ferrão, Sibelli Passini Barbosa. III. Egito, Antonio Silvio do. IV. Fernandes, Sérgio Augusto de Albuquerque. V. Título.</p> <p style="text-align: center;">CDD(21): 637.30287</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 – Comercialização na Bahia – Autenticidade
2. Muçarela de búfala - Eletroforese - Composição centesimal - Propriedades físicas
3. Fraude em queijo



## DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

**Título:** “CARACTERIZAÇÃO ELETROFORÉTICA, COMPOSIÇÃO CENTESIMAL E PROPRIEDADES FÍSICAS PARA VERIFICAÇÃO DA AUTENTICIDADE DA MUÇARELA DE BÚFALA COMERCIALIZADA NO ESTADO DA BAHIA”.

**Autor:** AMANDA DOS SANTOS FALEIRO

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Sibelli Passini Barbosa Ferrão, DSc., UESB

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ENGENHARIA DE PROCESSOS DE ALIMENTOS, pela Banca Examinadora.

  
Prof<sup>a</sup>. Sibelli Passini Barbosa Ferrão, DSc., UESB

  
Prof<sup>a</sup>. Renata Cristina Ferreira Bonomo, DSc., UESB

  
Prof<sup>a</sup>. Janaina Silva de Freitas, DSc., UESB

Data da Realização: 28 de Fevereiro de 2013.



*À minha mãe, pelo amor e dedicação  
todos os dias da minha vida.*

*Ao meu amor Igor,  
pelo amor e incentivo.*

***AMO VOCÊS!***

*Dedico*

## *Agradecimentos*

*Primeiramente agradeço ao meu Pai Eterno e Todo Poderoso, **Deus** tu és o meu refúgio e a minha fortaleza.*

*Aos meus pais, **Carlos e Alaíde**, pelo incentivo na minha formação profissional. Em especial a minha **MÃE** que mesmo morando longe, sempre se fazia presente nas minhas dificuldades, com muitas orações e conselhos.*

*As minhas maravilhosas irmãs, **Carla e Lorena**, pelo amor, carinho e atenção. Sou grata por sermos grandes amigas e companheiras.*

*Aos meus amados sobrinhos **João Pedro, Maria Luisa e Leonardo**, pelo sorriso e amor a cada encontro, também aproveito o momento para pedir desculpas, pela minha ausência em muitas cerimônias marcantes na vida de vocês. E também aos meus sobrinhos emprestados **Rafael e Caio** pelos momentos de alegria.*

*Ao meu amor **Igor**, sempre presente no decorrer desta trajetória. Agradeço pelo companheirismo, incentivo e amor dedicado ao longo dessa jornada. Aos seus pais **William e Zélia**, sou grata pelo carinho.*

*Aos meus cunhados (a), **Fabício, Luiz Cláudio e Vanessa**, pelo carinho e atenção.*

*Aos meus familiares, que estiveram sempre na torcida.*

*A minha orientadora **Dra. Sibelli Passini Barbosa Ferrão**. Que não é só uma simples orientadora, é uma grande amiga. Agradeço pelo carinho, apoio e confiança na realização desta pesquisa.*

*Aos meus co-orientadores **Dr. Antonio Sílvio do Egito e Dr. Sérgio Augusto de Albuquerque Fernandes**, pelo incentivo e apoio no desenvolvimento desta pesquisa.*

*À **Prof<sup>a</sup>. Renata Bonomo, Prof<sup>a</sup>. Cristiane Patrícia, Prof<sup>a</sup>. Janáina Freitas, Prof. Luciano Brito, Prof. Modesto Chaves e Prof. Paulo Valter** por cederem o espaço e os equipamentos dos laboratórios que coordenam.*

*Ao **Prof. Paulo Bonomo** pela ajuda indispensável nas análises estatísticas.*

*À **Embrapa – Caprinos e Ovinos** no aprendizado da técnica de eletroforese. Em especial ao pesquisador **Egito** que me ensinou todo procedimento da técnica.*

*Ao casal **Roberta e Leandro**. Agradeço pela recepção em Sobral – CE, vocês são amigos espetaculares.*

*Aos **funcionários da Embrapa**, muito obrigada pelo apoio e carinho concedido. Em especial a minha amiga **Teresinha**.*

*À **Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB)** pelas instalações e por disponibilizar seus funcionários para a realização desta pesquisa.*

*A toda equipe do **Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos**.*

*Ao **setor de transporte** que se responsabilizaram na coleta de leite.*

*Ao **Laticínio Rocha** e ao proprietário **Walmick** pela concessão do leite de búfala.*

*Ao **Laticínio Pytty** e ao proprietário **Elias** por ceder as suas instalações para a realização desta pesquisa.*

*Ao **Grupo de Estudos em Leite (GEL)**, meu agradecimento pela disponibilidade e contribuição de cada um de vocês durante esses anos de convívio. Especialmente a **Aninha e Dani** pelo carinho, incentivo, amizade e companheirismo.*

*Aos colegas de Mestrado, pelo carinho, apoio e diversão durante esses dois anos de curso.*

*Às Professoras **Renata Bonomo e Janaína Freitas** que aceitaram participar e colaborar com este trabalho fazendo parte da banca.*

*A **CAPES**, pela concessão da bolsa de estudo.*

*Às **companheiras de república** e às minhas **queridas vizinhas** agradeço pelo companheirismo e amizade.*

*E a **todos os amigos** que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento desta pesquisa.*

***Muito obrigada!***

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1.</b> Resumo das principais frações protéicas do leite bovino .....	17
<b>Tabela 2.</b> Componentes do gel de separação a 15% de poliacrilamida .....	40
<b>Tabela 3.</b> Componentes do gel de concentração a 5% de poliacrilamida .....	40
<b>Tabela 4.</b> Médias e coeficiente de variação (CV), para composição centesimal de queijos comerciais de muçarela de búfala .....	62
<b>Tabela 5.</b> Médias e coeficiente de variação (CV), para as propriedades físicas de queijos comerciais de muçarela de búfala .....	64

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Montagem do gel .....	41
<b>Figura 2.</b> Comparação eletroforética das caseínas de queijo muçarela de búfala e de vaca, em gel de poliacrilamida na presença de SDS .....	43
<b>Figura 3.</b> Perfil eletroforético (SDS-PAGE) da simulação de adulteração de queijo muçarela de búfala com leite de vaca, revelado com Azul de Coomassie .....	45
<b>Figura 4.</b> Perfil eletroforético (SDS-PAGE) da simulação de adulteração de queijo muçarela de búfala com leite de vaca, revelado com Nitrato de Prata .....	46
<b>Figura 5.</b> Perfil eletroforético (SDS-PAGE) de amostras comerciais de queijo muçarela, revelado com Azul de Coomassie .....	47
<b>Figura 6.</b> Perfil eletroforético (SDS-PAGE) de amostras comerciais de queijo muçarela, revelado com Nitrato de Prata .....	47
<b>Figura 7.</b> Perfil eletroforético (SDS-PAGE) de amostras comerciais de queijo muçarela, revelado com Azul de Coomassie .....	48
<b>Figura 8.</b> Perfil eletroforético (SDS-PAGE) de amostras comerciais de queijo muçarela, revelado com Nitrato de Prata .....	49
<b>Figura 9.</b> Perfil eletroforético (SDS-PAGE) de amostras comerciais de queijo muçarela, revelado com Azul de Coomassie .....	49
<b>Figura 10.</b> Perfil eletroforético (SDS-PAGE) de amostras comerciais de queijo muçarela, revelado com Nitrato de Prata .....	50

## Lista de símbolos e siglas

°C	Grau Celsius
°D	Graus Dornic
°H	Graus Hortvet
mmol/L –	Milimol por litro
ABCB	Associação Brasileira de Criadores de Búfalo
CN	Caseína
CNS	Caseínas
ESD	Extrato Seco Desengordurado
EST	Extrato Seco Total
GES	Gordura no Extrato Seco
g/L	Gramas por Litro
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MM	Marcador de massa molar
PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
SDS	Dodecilsulfato de sódio
ST	Sólidos Totais
TRB	Tratamento referência búfala
TRV	Tratamento referência vaca
NT	Nitrogênio Total
UESB	Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

## Sumário

1. INTRODUÇÃO .....	12
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	14
2.1. Bubalinocultura e a produção leiteira .....	14
2.2. Características do leite de búfala x vaca .....	15
2.3. Muçarela de búfala .....	18
2.4. Adulteração .....	20
2.5. Métodos aplicáveis à detecção de misturas de leites de diferentes espécies .....	21
2.5.1. Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) .....	23
3. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA .....	25
CAPITULO I – Caracterização eletroforética para verificação de autenticidade da muçarela de búfala comercializada no Estado da Bahia	
RESUMO .....	33
ABSTRACT .....	34
1. INTRODUÇÃO .....	35
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	37
2.1. Obtenção de queijos para desenvolvimento da metodologia de eletroforese .....	37
2.1.1. Matéria-prima .....	37
2.1.2. Percentuais de mistura dos queijos .....	37
2.1.3. Processamentos dos queijos .....	37
2.2. Obtenção das amostras comerciais .....	38
2.3. Preparo das amostras .....	38
2.4. Análise eletroforética .....	39
2.4.1. Método SDS-PAGE .....	39
2.4.2. Preparação das placas .....	39
2.4.3. Preparação dos géis .....	40
2.4.4. Corrida eletroforética .....	41
2.4.5. Fixação das proteínas .....	41
2.4.6. Análise dos géis .....	42
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	43
3.1. Análise eletroforética (SDS-PAGE) da caseína do queijo muçarela de búfala, de vaca e misturas .....	43

3.2. Análise eletroforética (SDS-PAGE) da caseína de amostras comerciais de queijo muçarela de búfala .....	46
4. CONCLUSÃO .....	52
5. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA .....	53
CAPITULO II Composição centesimal e propriedades físicas para verificação de autenticidade de muçarelas de búfala comercializadas no Estado da Bahia	
RESUMO .....	56
ABSTRACT .....	57
1. INTRODUÇÃO .....	58
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	60
2.1. Obtenção das amostras .....	60
2.2. Realização das análises .....	60
2.2.1. Composição centesimal .....	60
2.2.2. Propriedades físicas .....	61
2.3. Análises Estatísticas .....	61
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	62
3.1. Composição centesimal .....	62
3.2. Propriedades físicas .....	64
4. CONCLUSÃO .....	67
5. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA .....	68

## 1. INTRODUÇÃO

O queijo muçarela de búfala começou a ser produzido na Itália após o século XII com uso de leite de búfala e atualmente está difundido por todo o mundo. No Brasil, corresponde ao principal produto obtido a partir da Bubalinocultura e possui um mercado específico com grande potencial de ampliação.

Os bubalinos diferem de taurinos e zebuínos em vários aspectos, como os hábitos comportamentais e as características de interação com o meio ambiente. O aumento da demanda de derivados de leite de búfala nas últimas décadas valorizou a espécie bubalina na pecuária leiteira mundial. Os produtores brasileiros notaram o potencial de mercado e passaram a investir nesta criação. Basicamente, os investimentos foram aplicados em melhorias nas condições e/ou práticas de manejo, que resultaram em melhor desempenho das características produtivas e reprodutivas (SENO et al., 2007).

Os bubalinos exibem produtividade leiteira economicamente superior aos zebuínos, ou seja, o litro de leite é produzido à menor custo, evidenciando, sobretudo, uma rusticidade extraordinária inerente à espécie. Este fato tem contribuído para estimular a criação destes animais, principalmente em locais de difícil desenvolvimento da pecuária bovina e agricultura (CUNHA NETO et al., 2005). A industrialização do leite bubalino no Brasil é uma realidade, pois, além do queijo muçarela, diversos laticínios têm elaborado vários derivados (queijo frescal, ricota, bebida láctea e etc.) a partir deste leite (GUERRA et al., 2005).

Em 2005, o litro de leite de búfala era vendido para laticínios que produzem derivados puros de leite de búfala e/ou que produzem com o leite misturado por R\$ 0,75 a R\$ 0,90, e para cooperativas, que revendem o produto para grandes indústrias, pelo mesmo preço do leite bovino R\$ 0,48 a R\$ 0,55. O valor pago pelo litro de leite de búfala, quando comprado por laticínios que produzem derivados lácteos exclusivamente com leite de búfala, tradicionalmente possui um acréscimo de 50% sobre o valor pago pelo leite bovino. Isto se dá em função das características físico-químicas do leite de búfala que permitem um aumento no rendimento industrial de 50% e possui valor agregado junto ao mercado varejista por ser de búfala, devido ao sabor diferenciado, levemente adocicado, e as características nutricionais favoráveis, como o menor teor de colesterol (BASTIANETTO, 2005).

A espécie bubalina é considerada poliéstrica estacional de dias curtos, com aumento da fertilidade no outono-inverno. Com os partos concentrados, principalmente, no final das estações chuvosas (CAMPANILE et al., 2007). No entanto, durante o verão, enquanto a demanda por derivados aumenta, a disponibilidade desse produto diminui pela falta de

matéria-prima. Devido a essas flutuações sazonais para disponibilidade do leite de búfala, aliado ao preço mais elevado comparado com o leite de vaca, a adição de leite de outras espécies nos laticínios durante a elaboração da muçarela de búfala torna-se uma fraude frequente. Por isso, atualmente, são aplicados diversos métodos laboratoriais a fim de se detectar tal adulteração.

Várias técnicas têm sido desenvolvidas para proteger o consumidor de fraudes com a adição de leite bovino à muçarela de búfala, todas capazes de detectar as proteínas do leite bovino, e entre esses estão vários métodos analíticos baseados na identificação e quantificação das frações protéicas dos quais os principais são métodos de reação em cadeia da polimerase (PCR), cromatográficos, imunológicos e eletroforéticos (FELIGINI et al., 2005). Segundo Addeo et al. (1990), o método oficial da Comunidade Europeia detecta a presença de leite de vaca em muçarela de búfala com base na diferença de mobilidade eletroforética das  $\gamma_2$ - e  $\gamma_3$  caseínas (CNs) de origem bovina e bubalina, originada por hidrólise da caseína (CN) e controlada pela ação da plasmina, extraída do queijo.

Enquanto que na Itália a palavra muçarela denomina necessariamente o queijo oriundo do leite de búfala, pesquisas indicam que, para o consumidor brasileiro, uma peça de queijo branco redonda e envolta em água é sinônimo de muçarela de búfala. Para garantir os direitos do consumidor, a Associação Brasileira de Criadores de Búfalos (ABCB) criou no ano de 2000, o Selo de Pureza 100% Búfalo.

O Selo de Pureza tem como objetivo garantir aos consumidores um produto puro protegendo o mercado das fraudes cometidas hoje por diversas indústrias com a adição de leite bovino para a elaboração de derivados. A garantia destes produtos é fornecida por uma equipe técnica que efetua visitas aos laticínios e pontos de venda, coletando amostras para avaliação feitas em laboratórios credenciados que utilizam o método aprovado pelas autoridades Europeias para detecção de caseína de leite de vaca, encontrado na Commission Regulation (EC) No 213/2001, artigo 10 e anexo XV (DIAS, 2009).

Nesse sentido, objetivou-se desenvolver e avaliar o método da eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) em condições desnaturantes (SDS-PAGE), empregando duas metodologias de coloração, além de avaliar a composição centesimal e as propriedades físicas para verificação da qualidade e identificação de adulteração por adição de leite de vaca em muçarelas de búfala comercializadas no Estado da Bahia.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Bubalinocultura e a produção leiteira

Na classificação zoológica, os búfalos domésticos pertencem à família Bovidae, subfamília Bovinae, espécie *Bubalus bubalis*, sendo distinto do búfalo africano, *Syncerus caffer* e do búfalo americano, *Bison bison* (DAMÉ, 2006). São classificados em três variedades: *bubalis*, vulgarmente chamados búfalos de rio (representada pelas raças Mediterrâneo, Jafarabadi e Murrah); *kerebau*, chamados de búfalos de pântano (representada pela raça Carabao ou Rosilho) e *fulvus* (representada pela raça Baio) (CARMO, 2006).

A espécie *Bubalus bubalis* possui maior resistência a ectoparasitoses, menor frequência de mastite, são menos exigentes quanto à qualidade das pastagens e gramíneas e, conseqüentemente, apresentam menor custo de produção (AMARAL & ESCRIVÃO, 2005).

No Brasil, os búfalos foram introduzidos em 1895 na Ilha do Marajó, no Estado do Pará, a partir deste período iniciaram-se outras importações de lotes de búfalos para diversas regiões brasileiras. A Amazônia abriga as três variedades de búfalos do Brasil que agrupam animais das raças reconhecidas oficialmente pela Associação Brasileira de Criadores de Búfalos (ABCB) (MESQUITA et al., 2001; OLIVIERI, 2004).

A produção de búfalos no Brasil, a partir dos anos 1990 apresentou significativa expansão de unidades industriais dedicadas à produção de derivados de leite de búfalas que, pelo maior rendimento industrial e produção de produtos de maior valor agregado lhes tem permitido remunerar a matéria prima a preços cerca de duas vezes maiores que aqueles pagos ao leite bovino e, diversamente deste, de uma forma geralmente uniforme durante o ano, estimulando de forma pronunciada a expansão de propriedades dedicadas à sua exploração, particularmente no sudeste do país e/ou junto aos maiores centros consumidores (BERNARDES, 2007).

Segundo estimativas, o rebanho nacional bubalino está em torno de três milhões e meio de cabeças, dos quais o Estado do Pará detém cerca de um milhão e meio de animais, que estão distribuídos na ilha de Marajó e no Baixo e Médio Amazonas. A taxa anual de crescimento do rebanho é superior a 10%, mais de cinco vezes a de bovinos no Brasil, embora existam estimativas de que esta taxa esteja próxima de 16% (MOURA CARVALHO & LOURENÇO JÚNIOR, 2001; REGGETI & TERECAI, 2006).

Estima-se, segundo a ABCB, que a produção de leite de búfalas no Brasil foi de 92,3 milhões de litros em 2004, produzidos por cerca de 82 mil búfalas em 2.500 rebanhos, e que

existam pelo menos 150 indústrias produzindo derivados de leite de búfalas, que transformam anualmente cerca de 45 milhões de litros de leite em 18,5 mil toneladas de derivados, gerando um faturamento bruto da ordem de US\$ 55 milhões aos laticínios e de, aproximadamente, US\$ 17 milhões aos criadores (BERNARDES, 2006).

A produção de leite de búfala se tornou destaque em todo o mundo, cerca de 90 milhões de toneladas foram produzidos no ano de 2009, ocupando o segundo lugar no ranking mundial. Esta produção representou 13% da produção mundial de leite, com uma taxa de crescimento anual de aproximadamente 3,1% em comparação ao crescimento de 1,3% do aumento da produção anual de leite de vaca (IDF, 2010).

No Brasil são consideradas excelentes búfalas leiteiras aquelas que produzem, em média, mais de 7 litros de leite por dia. A produção individual por fêmea/lactação pode atingir entre 4.000 e 6.000 litros/300 dias de lactação. Porém, a baixa produtividade média das búfalas no Brasil, diagnosticada em 6,0 litros diários em 270 dias de lactação, pode ser explicada pelas condições em que as búfalas são criadas, com sistemas de produção de leite a pasto sem suplementação alimentar, e lento processo de melhoramento genético dos animais (BASTIANETTO, 2005).

Além da tradicional muçarela outros derivados começam a ser produzidos a partir do leite de búfalas tais como os queijos tipo minas frescal, a ricota, o doce de leite, o queijo tipo coalho, o iogurte e o provolone. Caracteristicamente, se tem verificado uma maior concentração de criadores (normalmente pequenos), nas regiões em que se implantam atividades de industrialização de derivados lácteos de búfalas (BERNARDES, 2007).

A sazonalidade reprodutiva da espécie se reflete na distribuição da oferta de leite de búfalas à indústria, verificando-se que a produção no pico da safra representa cerca do triplo da observada no mês de janeiro daquele ano. No mercado brasileiro, a demanda por derivados é relativamente constante durante o ano daí, alguns estabelecimentos, particularmente os que possuem rebanhos próprios, vêm buscando desestacionalizar às parições a fim de atingir uma maior regularidade na oferta de matéria prima durante todo o ano, através do uso de biotecnologias adequadas de reprodução (BERNARDES, 2007).

## **2.2. Características do leite de búfala x vaca**

O leite de búfala possui coloração branco opaca, sabor adocicado, maiores teores de proteína, gordura e minerais como cálcio e fósforo, em relação ao leite bovino. Entretanto, a concentração total do colesterol do leite de búfala é menor do que a encontrada no leite de

vaca (275 mg/100 g contra 330 mg/100 g de gordura) (AMARAL et al., 2005). Segundo Nascimento & Moura Carvalho (1993), algumas características fazem desse leite um produto típico e diferente quando comparado com leites de outras espécies. Ele apresenta micelas de caseína grandes, proporcionando rápida coagulação no processamento, com menos água e, conseqüentemente, produtos de corpo firme. Sua gordura é constituída de glóbulos maiores e de coloração clara, e os ácidos caprónico, caprílico e cáprico são encontrados em menor quantidade quando comparado com o leite de vaca e, quando liberados nos derivados lácteos, contribuem com o sabor e aroma característicos.

O leite de búfala é importante tanto para o consumo in natura como matéria-prima para elaboração de produtos lácteos. Um dos principais produtos é o queijo muçarela, oriundo da Itália, elaborado originalmente com leite de búfala. A utilização deste leite em seu estado natural ainda não é bem difundida no Brasil. Entretanto, a grande importância desse alimento está na sua transformação em derivados, uma vez que seu elevado teor em extrato seco, incluindo gordura e proteína, possibilita um alto rendimento industrial (RAMOS et al., 2003).

A gordura é o mais variável e um dos mais importantes componentes do leite. Em bubalinos, o teor de gordura no leite se mantém sempre acima de 5,5%, sendo esta uma característica particular da espécie, independente das condições experimentais. No Brasil, autores como Faria et al. (2002), Fernandes et al. (2005), Melício et al. (2005) e Rangel et al. (2011) encontraram teores médios de gordura no leite de búfalas variando de 5,5% a 10,4%. O leite de búfalas pode ser considerado bastante rico em proteína, com valor médio de 4,2% (MATTOS, 2007). Rangel et al. (2011) encontraram média de 4,18% no início da lactação, 4,24% no terço médio, atingindo 4,51% ao final da lactação. Bovera et al. (2001), na Itália, determinaram teor médio de proteína bruta no leite de búfalas de 4,3% no início da lactação atingindo 4,9% no final da mesma.

A caseína solúvel encontrada no leite bovino quase não existe no leite de búfala. Neste, a caseína se encontra principalmente na forma micelar (GANGULI, 1979). Por microscopia eletrônica, foi observada que as micelas de caseína do leite de búfala possuem maior tamanho, heterogeneidade de composição e componentes minerais contendo mais cálcio e fósforo em relação às da espécie bovina, sendo as micelas de caseína desta última mais opaca. Essa característica da caseína pode estar relacionada com alguma dificuldade de ação das enzimas digestivas, atrapalhando um pouco sua utilização (ROMAN & SGARBIERI, 2004).

A porção protéica do leite de búfalas é constituída por cerca de 77% a 79% de caseína e de 21% a 23% de soroproteínas. A caseína está presente principalmente na forma de micelas

com as frações  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - e k-CN, constituindo, respectivamente, 4%, 6,3%, 35% e 4% do total (DE FRANCIS & DI PALO, 1994). Em leite bovino a fração  $\alpha_{s1}$ -CN constitui 40%,  $\alpha_{s2}$ -CN 10%,  $\beta$ -CN 45% e a k-CN representada por 5% (GROSCLAUDE et al., 1973). A Tabela 1 apresenta um resumo das principais frações protéicas do leite, massas molares no leite bovino e bubalino, indicando inclusive a abreviatura sugerida para cada fração. A heterogeneidade das proteínas tem sido relatada desde 1963, em que as proporções relativas de  $\alpha$ -,  $\beta$ - e k-CN são diferentes do leite de búfala e de vaca (FELIGINI et al., 2009).

**Tabela 1.** Resumo das principais frações protéicas do leite bovino e bubalino

<b>Proteína e sua abreviatura sugerida</b>	<b>Massa molar (kDa) do leite bovino</b>	<b>Massa molar (kDa) do leite bubalino</b>
$\alpha_{s1}$ -caseína ( $\alpha_{s1}$ -CN)	22,068 a 23,724	23,490 a 23,516
$\alpha_{s2}$ -caseína ( $\alpha_{s2}$ -CN)	25,230	22,741
$\beta$ -caseína ( $\beta$ -CN)	23,944 a 24,092	24,033
k-caseína (k-CN)	18,363 a 19,039	19,165 a 19,247
para- k-caseína	13,000	-
$\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -LG)	18,205 a 18,286	18,287
$\alpha$ -lactoglobulina ( $\alpha$ -La)	14,147 a 14,175	14,244
Soroalbumina (AS)	66,267	69,293

Fonte: Kim et al. (1968); Eigel et al.(1984); D'Ambrosio et al. (2008); Feligini et al. (2009)

Estudos relatados sobre aminoácidos mostram que a caseína do leite de búfala possui 25,5% de aminoácidos essenciais a mais que o leite bovino (AMARAL et al., 2005). Em relação a percentuais, segundo Tonhati et al. (2004), 100 g de nitrogênio do leite equivalem a 89% a 96% de nitrogênio protéico, caseína e proteínas do soro, e 4% a 11% de nitrogênio não-protéico, representado por aminoácidos livres, uréia, ácido úrico e produtos do metabolismo do animal.

A lactose é um carboidrato encontrado somente no leite, sendo um dissacarídeo composto por glicose e galactose com fórmula molecular  $C_{12}H_{22}O_{11}H_2O$ . O referido açúcar tem importância tecnológica em todos os processos de acidificação do leite ou fermentação láctica, que é à base da fabricação de iogurtes, manteigas, queijos, sendo o constituinte mais estável do leite. Em bubalinos, os teores de lactose apresentam valores entre 4,83% e 5,48% (TONHATI et al., 2005).

O extrato seco total (EST) e o extrato seco desengordurado (ESD) estão relacionados com as quantidades de nutrientes totais do leite. O EST constitui todos os componentes do leite com exceção da água. Já o ESD é representado pelos mesmos componentes dos sólidos totais (ST), excluindo-se os teores de gordura, ou seja, são as proteínas, lactose, vitaminas e

minerais (TONHATI et al., 2005). Os ST são constituídos por todos os componentes com exceção da água, ou seja, abrange conjuntamente os teores de gordura, proteína, lactose, vitaminas e minerais presentes no leite. Ahmad et al. (2008) encontraram valores médios de 17,5% de ST, sendo maior que o encontrado para leite bovino, o qual se situa em cerca de 14%. Rangel et al. (2011) encontraram média de 16,72% no início da lactação, 16,18% no terço médio, atingindo 17,15% ao final da lactação. Os teores de ESD, carboidratos (lactose) e cinzas, assim como a produção de leite, variam em função dos meses de lactação (MELÍCIO, 2004).

Das vitaminas presentes no leite de búfala, a vitamina A é a que apresenta maior destaque, não só pela quantidade, mas pela coloração acentuadamente branca que confere ao leite, devido à ausência de pigmentos carotenóides que são responsáveis pela coloração amarela nos produtos elaborados com o leite de bovino (AMARAL et al., 2005).

O leite de búfala, quando comparado ao leite de outras espécies apresenta valores mais elevados de macro constituintes. Apresenta densidade entre 1,025 g/L e 1,047 g/L; pH entre 6,41 e 6,47; acidez entre 0,14 e 0,20 gramas de ácido láctico por 100 mL de leite (alta acidez justificada pelo elevado teor de proteínas, em especial a caseína); índice crioscópico entre -0,531 °H e -0,548 °H; minerais entre 0,79% e 0,83%, sendo que, desse total, até 25% é de cálcio (BASTIANETTO et al., 2005).

A industrialização do leite de búfalas no Brasil é uma realidade e o mercado de muçarela de búfala desponta como muito promissor, devido à ótima aceitação no mercado de um produto de alta qualidade e sabor. (VIEIRA, 2009).

### **2.3. Muçarela de búfala**

O queijo é um concentrado lácteo constituído de proteínas, lipídios, carboidratos, cálcio, fósforo e vitaminas. Os minerais participam do processo de coagulação do leite, influenciando a textura do queijo. O líquido residual, cujo teor varia com o tipo de queijo, é chamado lactosoro; boa parte dele é eliminado durante o processo de fabricação e aproveitada como matéria-prima na produção de bebidas lácteas, ricota e outros produtos (PERRY, 2004).

No Brasil, a muçarela se destaca como um dos principais queijos elaborados com leite de búfala, sendo fabricado de acordo com a tecnologia da produção tradicional italiana, e já possui alta aceitação pelos consumidores e excelentes perspectivas no mercado (OLIVIERI, 2004). Esse queijo possui sabor e textura inigualáveis, podendo ser moldado em diversos formatos tais como bolas, nós, tranças ou barras, sendo embalados em soro ou não, e

consumidos como entrada, aperitivo ou componente na elaboração de diversos pratos (SILVA et al., 2006). Devido às peculiaridades da tecnologia de preparo, é produzido no Brasil, principalmente, por pequenas indústrias e em âmbito artesanal, sendo distribuído por quase todo o país (OLIVIERI, 2004).

Na tecnologia tradicional, o leite cru integral é inoculado com coalho e cultura *starter* natural para alcançar pH de 5,3 a 5,4 para que a massa possa ser filada (MONTEIRO et al., 2007). Para este tipo de produto utilizam-se culturas termófilas contendo *Streptococcus thermophilus* e bacilos lácticos como *Lactobacillus delbrueckii ssp. delbrueckii*, *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus*, *Lb. delbrueckii ssp. lactis* ou *Lb. helveticus* (PERRY, 2004).

Outros ingredientes indispensáveis são o cloreto de cálcio, utilizado em leite pasteurizado, com objetivo de repor parte do cálcio precipitado pelo tratamento térmico da pasteurização, sendo imprescindível para que ocorra a coagulação, aumentando sua firmeza e consequentemente facilitando a filagem. O coalho adicionado pode ser de origem animal, proveniente do estômago de alguns mamíferos ou sintetizado por alguns microrganismos, cuja função é hidrolisar a ligação phe105-met106 da k-CN provocando a coagulação do leite (MONTEIRO et al., 2007).

A acidificação da massa é uma etapa muito importante e deve ser cuidadosamente controlada, pois a conversão da dicálcio-paracaseína em monocálcio-paracaseína, realizada pelo ácido láctico durante a exposição à alta temperatura da água, é que dará a elasticidade adequada ao queijo. A filagem consiste em tratar amostras da coalhada já madura com água quente, alongando e moldando repetidamente a massa (SILVA et al., 1999). Após a filagem moldam-se os queijos na forma de bolas ou outra forma desejada e, em seguida, são colocados em água a 10 °C. As salgas dos queijos são realizadas em salmoura a 17% por 30 minutos e após secagem, acondicionados em embalagens plásticas e mantidos sob refrigeração à temperatura de  $\pm 8$  °C (VERRUMA-BERNARDI et al., 2000).

A muçarela é fabricada também com leite de vaca, porém a muçarela típica e original é preparada com leite de búfala integral. O Sul da Itália apresenta o maior consumo médio per capita deste queijo, estimado em 7,4 kg/ano, entretanto, a manufatura e o consumo desse queijo não estão mais restritos ao seu local de origem (OLIVIERI, 2004).

De acordo com Jumah et al. (2001), a muçarela autêntica de búfala apresenta uma superfície branco porcelana, crosta muito delgada (menos de 1 mm), forma esférica, estruturada em camadas finas, superpostas, tendendo a decomporem-se na parte mais interna. O sabor é “sui generis” e a consistência é levemente elástica nas primeiras 9-12 horas de fabricação.

O consumo de produtos lácteos de caprinos, ovinos e bubalinos, além de representarem uma iguaria especial, em relação às características sensoriais, como aroma e sabor, apresentam relação com razões nutricionais, econômicas e religiosas (DIAS, 2009). A muçarela de leite de búfala é um produto bem aceito e bem remunerado pelo consumidor, o que torna a criação de búfalos leiteiros uma boa fonte de renda para o produtor (MACEDO et al., 2001). A Região Sudeste constitui o mercado de queijo de búfala mais competitivo do Brasil. Nesta região, a Bubalinocultura é voltada quase que totalmente para a produção de leite, destinada ao processamento de derivados, principalmente muçarela (SENO, 2007).

#### **2.4. Adulteração**

São considerados matérias-primas ou produtos adulterados aqueles que apresentem modificações espontâneas ou propositais de natureza física, química ou biológica que alterem características sensoriais, ou sua composição intrínseca, comprometendo seu valor nutritivo. Assim, o produto pode ser considerado adulterado quando tenha sido empregada substância de qualquer qualidade, tipo ou espécie diferente das expressas na formulação original. Dentre os tipos de fraude, tem-se a fraude por adulteração, onde modificações intencionais com a finalidade de lucro afetam as características sensoriais e o valor nutritivo do alimento (BRASIL, 2007).

As flutuações na disponibilidade de leite de espécies diferentes da bovina, e o preço mais elevado oferecido a estas, incentivam a adulteração de queijos tradicionais. A adição fraudulenta de leite bovino em queijos que deveriam apenas conter leite de búfala, por exemplo, poderá levar a uma perda nutricional e a uma perda econômica para o consumidor. Para garantir a autenticidade desses produtos, há necessidade de métodos que possibilitem o controle desse tipo de adulteração. Esses métodos não estão discriminados pela legislação atual do país, existindo apenas há pouco mais de 10 anos uma portaria que determina as características e identidade do queijo muçarela, porém sem relacionar adulterações (DIAS, 2009).

Atualmente existem legislações vigentes que determinam a obrigatoriedade de informação dos componentes presentes nos rótulos das embalagens de produtos de origem animal e lácteos. A rotulagem deve estar de acordo com a elaboração do produto, sua origem, peso, marca e denominação de venda, sendo obrigatória a lista de ingredientes, a validade e o lote. Dessa forma, as leis em vigor amparam o consumidor de possíveis alterações provocadas

pelo fabricante na rotulagem, mas escasso ainda é o conhecimento do mesmo sobre a real formulação de produtos e suas possíveis possibilidades de adulteração (DIAS, 2009).

Alguns laticínios especializados na fabricação da muçarela de búfala, durante a entressafra, misturam leite de vaca ao leite de búfala obtendo queijos mistos com características impróprias e que, muitas vezes, são vendidos como queijos 100% puros (VIEIRA et al., 2009). Para garantir os direitos do consumidor, a ABCB lançou em 2000 o selo de Pureza 100% Búfalo. Esse selo identifica no rótulo produtores conveniados à associação garantindo aos consumidores produtos seguros e sem mistura, protegendo os Bubalinocultores e os consumidores de possíveis fraudes.

A ocorrência de adulterações de qualquer natureza implica, além de abuso contra a economia do consumidor, em danos significativos à saúde pública, contrariando o Código de Defesa do Consumidor e a legislação brasileira vigente (ALMEIDA, 2001).

## **2.5. Métodos aplicáveis à detecção de misturas de leites de diferentes espécies**

Vários métodos analíticos foram propostos para a identificação de misturas de leite de diferentes espécies na fabricação de produtos lácteos. Entre esses métodos destacam-se os baseados na análise das frações protéicas, dos quais os principais são os métodos imunológicos, eletroforéticos e cromatográficos. No entanto, o método de controle oficial para detectar proteínas bovinas em produtos lácteos é o utilizado pela União Europeia, método chamado Isoelectric Focusing ou Focalização Isoelétrica (IEF), que identifica adulteração através das  $\gamma$ -CNs após plasminólise (SAKARIDIS 2013).

Essas técnicas foram otimizadas e o leite bovino também foi detectado em queijo muçarela de búfala por espectrometria de massa (COZZOLINO et al., 2002). Todas essas técnicas foram baseadas em estratégias adequadas para avaliar os padrões de proteínas provenientes das principais proteínas do soro ou a fração de caseína, sendo capaz de detectar as proteínas de leite bovino no queijo muçarela de búfala (FELIGINI et al., 2005).

A técnica imunológica está baseada na presença de antígenos e anticorpos em uma amostra, no caso, frações específicas de proteínas do leite bovino. Como anticorpos, são utilizados os monoclonais ou policlonais, altamente específicos, que ao reagirem formam um complexo antígeno-anticorpo precipitado (BENJAMINI et al., 2002). Através desta técnica, Dias (2009) observou que alguns queijos muçarelas oferecidos no varejo da cidade do Rio de Janeiro apresentavam adulteração, identificando a presença de caseína bovina em 23,07% do total de 13 amostras analisadas, com limite mínimo de detecção do método de 1,15%.

A técnica de eletroforese se baseia na migração das proteínas quando submetidas a um campo elétrico, onde as cargas positivas e negativas são atraídas para seus pólos contrários correspondentes sendo possível sua separação e identificação, além de que sua carga, forma, tamanho e associação com outros íons podem alterar sua mobilidade (SILVA, 2002). Essa técnica apresenta alta sensibilidade, porém, com percentuais distintos conforme o tipo, o método Uréia-PAGE (Eletroforese em Gel de Poliacrilamina contendo Uréia) pode detectar em torno de 2,5% de adição de leite bovino em outras espécies, e 1% de leite misturado por meio do método de IEF (EGITO et al., 2006).

Dennis (1998), utilizando Eletroforese Capilar (EC) relatou limite de detecção de fraude ao redor de 2,5%, empregando o modo de separação Uréia-PAGE, e Borková & Snaselová (2005), por meio de IEF, relataram a possibilidade de detecção de 0,5% e 1% de adição de leite por fraude. Esta diferença de sensibilidade está no tipo de separação das proteínas nos diferentes meios, e assim o objetivo da separação indicará o tipo de eletroforese selecionado. Na IEF, os diferentes pontos isoelétricos, onde a carga dos compostos é nula, determinam a individualidade das caseínas em gradiente de pH desejado.

A detecção de leite de vaca e de caseinatos provenientes de leite de vaca em queijos produzidos com leite de ovelha, cabra, búfala ou com misturas de leites de diferentes espécies é realizada por IEF das  $\gamma$ -CNs após plasminólise. Este método possui como princípio o isolamento das caseínas do queijo e dos padrões de referência, ocorrendo à dissolução das caseínas isoladas e a clivagem pela ação da plasmina. Após a realização da eletroforese das caseínas tratadas com plasmina na presença de uréia, é realizada a coloração das proteínas. Em seguida é feita a avaliação das bandas coradas e a presença das  $\gamma_2$ - e  $\gamma_3$ -CN indica a presença de leite de vaca, essa avaliação ocorre por comparação entre as bandas correspondentes à amostra e as bandas dos padrões de referência com 0% e 1% de leite de vaca, obtidas no mesmo gel.

Na eletroforese bidimensional, há separação das proteínas de idêntica massa molar, porém com diferentes pontos isoelétricos, e vice-versa, pois soma a separação pelo método SDS-PAGE (Eletroforese em Gel de Poliacrilamida contendo Dodecilsulfato de Sódio) com a IEF (SILVA, 2002).

Outra técnica utilizada para detecção de fraude é a de Polymerase chain Reaction ou Reação em cadeia da polimerase (PCR) que se baseia na análise de DNA, amplificando fragmentos de DNA mitocondrial de células somáticas, leucócitos, células mamárias e  $\beta$ -CN (REALE et al., 2008). É possível extrair DNA de produtos lácteos processados utilizando

*primers* (Oligonucléicos específicos), codificando a sequência do gene desejado, amplificando e identificando por eletroforese (VELOSO, 2002).

Técnicas de cromatografia líquida (HPLC) também estão entre as técnicas para separação de proteínas. Sendo que as mais utilizadas são Reverse-phase High Pressure Liquid Chromatography ou Cromatografia de fase reversa (RP-HPLC), onde as substâncias são separadas devido à diferença de hidrofobicidade; e Íon Exchange HPLC ou Cromatografia de troca iônica (IE-HPLC), onde a separação se baseia na diferença de afinidade dos íons com a coluna, ou outro componente, como pH, força iônica da coluna, que podem variar dependendo das proteínas analisadas (BORKOVÁ & SNASELOVÁ, 2005; MAYER, 2005).

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

A composição protéica do leite pode ser determinada por eletroforese, a qual é uma técnica bioquímica versátil, relativamente simples, rápida e de grande poder informativo. Esta técnica consiste na migração de moléculas ionizadas na mesma direção, as quais se repelem mutuamente mantendo sua estrutura e propriedades intactas, possibilitando assim a separação em várias frações (BRAMMER, 2001).

A migração de uma proteína em um gel durante a eletroforese se dá, portanto, em função de seu tamanho e sua forma. Um método eletroforético comumente empregado para a estimativa de pureza e massa molar é o SDS-PAGE com o emprego do detergente Dodecilsulfato de Sódio (SDS). SDS vincula-se à maioria das proteínas em quantidades mais ou menos proporcionais a massa molar da proteína, sendo uma molécula de SDS para cada dois resíduos de aminoácidos. Assim, a eletroforese na presença de SDS separa as proteínas quase que exclusivamente com base na massa molar, com polipeptídeos menores migrando mais rapidamente. Essa técnica é realizada em géis constituídos de poliacrilamida, este gel atua como uma peneira molecular, retardando a migração das proteínas aproximadamente na proporção de sua carga. O gel é uma matriz constituída de um polímero de acrilamida com ligações cruzadas de N, N-metil-bis-acrilamida, cuja porosidade da malha pode ser escolhida. Quanto maior a concentração de acrilamida, menores serão os poros da malha formada (WHITFORD, 2005).

Após a eletroforese, as proteínas são visualizadas pela adição de um corante como o Azul de Coomassie, que se liga às proteínas, mas não ao gel, monitorando-se o progresso de um processo de purificação de proteínas com o número de bandas de proteínas visíveis sobre o gel. A mobilidade eletroforética de uma proteína em um gel de poliacrilamida na presença

de SDS está relacionada à sua massa molar. Quando comparado com as posições que as proteínas de massa molar conhecido migram no gel, a posição de uma proteína não identificada pode fornecer uma excelente medida de sua massa molar, e um padrão de massa molar pode ser usado para estimar a massa molar de uma proteína desconhecida (WHITFORD, 2005).

Esta técnica se baseia em diferenças de mobilidade das frações de  $\alpha$ - e  $\beta$ -CN, na qual detecta a mistura de leites de diferentes espécies, funcionando como ferramenta para a identificação de fraudes. Possui uma elevada sensibilidade, não requer reagentes especiais, nem equipamentos muito dispendiosos. Além disso, permite a separação das diferentes frações da caseína ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , k) e também a identificação das proteínas do soro  $\alpha$ -lactoalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina (VELOSO et al., 2002). O método de Uréia-PAGE separa por diferença na carga elétrica e o SDS- PAGE por tamanho da molécula, e esses dois tipos podem separar por grupos de proteínas e variações genéticas (AMIGO et al., 1991; EGITO et al., 2006).

### 3. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AHMAD, S.; GAUCHER, I.; ROUSSEAU, F.; BEAUCHER, E.; PIOT, M.; GRONGNET, J. F.; GAUCHERRON, F. Effects of acidification physico-chemical characteristics of buffalo milk: A comparison with cow's milk. **Food chemistry**, California, v.1, n.106, p.11-17, jan., 2008.

ALMEIDA, A. L. et al. Avaliação do método de determinação da enzima xantino oxidase para identificação da adulteração de leite de cabra por adição de leite de vaca. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.56, n.321, p.55-62, jul., 2001.

AMARAL, F. R.; ESCRIVÃO, S. C. Aspectos relacionados à búfala leiteira. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.29, n.2, p.111-117, 2005.

AMARAL, F. R.; DE CARVALHO, L. B.; DA SILVA, N.; BRITO, J. R. F. Qualidade do leite de búfalas: composição. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.29, n.2, p.106-110, abril/jun., 2005.

AMIGO, L.; RAMOS, M.; MARTIN-ALVAREZ, P.J. Effect of technology parameters on electrophoretic detection of cow's milk in ewe's milk cheeses. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.74, p.1482-90, 1991.

BASTIANETTO, E. Aspectos Econômicos da Criação de Bubalinos em Minas Gerais. In: II Simpósio Mineiro de Buiatria. Belo Horizonte. **Anais...** Minas Gerais: Associação de Buiatria de Minas Gerais (ABMG), p.1-14, 2005.

BENJAMINI, E.; COICO, R.; SUNSHINE, G. Interações Antígeno-Anticorpo, Imunoensaios e Sistemas Experimentais. **In: Imunologia**. 4ª ed. São Paulo: Ed Guanabara Koogan S.A, p.51-68, 2002.

BERNARDES, O. Os Búfalos no Brasil. In: II SIMPÓSIO DE BÚFALO DE LAS AMÉRICAS E, II SIMPÓSIO EUROPA-AMERICA, 2006, Medellín, **Proceedings**. Medellín/Colombia, v.3, p.18-23, CD ROM, 2006.

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

BORKOVÁ, M.; SNÁSELOVÁ, J. Possibilities of different animal milk detection in milk and dairy products - a review. **Journal Food Science**, Czech, v.23, n.2, p.41-50, 2005.

BOVERA, F.; CUTRIGNELLI, M. I.; CALABRÒ, S.; MARCHIELLO, M.; PICCOLO, V. Influence of diet characteristics and productions levels on blood and milk urea concentrations in buffalo. In: World Buffalo Congress, 6, Venezuela, 2001. **Proceedings**. Maracaibo: Zulia University Tech Park, p.506-511, 2001.

BRAMMER, S.P. **A técnica de eletroforese: importância e aplicações em análises genéticas**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 13p, 2001. Disponível em: <[http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p\\_do06.htm](http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_do06.htm)>. Acessado em: 26 jan. 2013.

BRASIL. Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952. Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 07 jul. 2007, Seção 1.

CAMPANILE, G.; BERNADES, O.; BASTINETTO, E.; BARUSELLI, P. S.; ZICARELLI, L.; VECCHIO, D. **Manejo de búfalas leiteiras**. Associação Brasileira de Criadores de Búfalas (ABCB). *Buffalotec*. São Paulo, p.1-92, 2007. Disponível em: <[http://paineirasdaingai.bufalos.org/manejo\\_buf\\_leite.pdf](http://paineirasdaingai.bufalos.org/manejo_buf_leite.pdf)>. Acesso em: 23 jan. 2013.

CARMO, C. M. Obtenção do shelf life em queijo mozzarella baseado na avaliação quantitativa e qualitativa dos grupos coliformes e estafilococos. 108f, 2006. **Dissertação** (Mestre em Ciências Veterinárias), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

COZZOLINO, R.; PASSALACQUA, S.; SALEMI, S.; GAROZZO, G. Identification of adulteration in water buffalo mozzarella and in ewe cheese by using whey proteins as biomarkers and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, Catania/Italy, v.37, p.985-991, 2002.

CUNHA NETO, O. C.; OLIVEIRA C. A. F; HOTTA, R. M.; SOBRAL, P. J. A. Avaliação físico-química e sensorial do iogurte natural produzido com leite de búfala contendo diferentes níveis de gordura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.25, n.3, p.448-453, jul./set., 2005.

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: 16 jan. 2013.

D'Ambrosio C, Arena S, Salzano AM, Renzone G, Ledda L, Scaloni A (2008) A proteomic characterization of water buffalo milk fractions describing PTM of major species and the identification of minor components involved in nutrient delivery and defense against pathogens. **Proteomics** 8:3657–3666. doi:10.1002/pmic.200701148.

DE FRANCIS, G.; DI PALO R. Buffalo milk production. In: World Buffalo Congress, São Paulo, SP. **Proceedings**. São Paulo: Associação Brasileira de Criadores de Búfalos, v.4, p.137-145, 1994.

DENNIS, M. J. Recent developments in food authentication. **The Analyst Critical Review**, Colney/Norwich, 123: 151R-156R, 1998.

DIAS, S. S. Avaliação da qualidade e autenticidade de derivados de leite de búfala encontrados no varejo do Rio de Janeiro. 59f, 2009. **Dissertação** (Mestre em Ciência de Alimentos) – Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2009.

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**, Belo Horizonte, v.58, n.5, p.932-939, 2006.

EIGEL, W. N. et al. Nomenclature of proteins of cow's milk: fifth revision. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.67, n.8, p.1599-1631, 1984.

FARIA, M. H.; TONHATI, H.; CERÓN MUÑOZ, M.; DUARTE, J. M.C. Características físico-químicas do leite de búfalas ao longo da lactação. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.57, n.324, p.3-7, mai./jun., 2002.

FELIGINI, M.; BONIZZI, I.; CURIK, V. C.; PARMA, P.; GREPPI G. F.; ENNE G. Detection of Adulteration in Italian Mozzarella Cheese Using Mitochondrial DNA Templates as Biomarkers. **Food Technology and Biotechnology**, v.43, p.91-95, 2005.

FELIGINI, M.; BONIZZI, I.; BUFFONI, J. N.; COSENZA, G.; RAMUNNO, L. Identification and Quantification of  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - e  $\kappa$ -Caseins in Water Buffalo Milk by Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography and Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v.57, p.2988-2992, 2009.

FERNANDES, S. A. A.; MATTOS, W. R.; MATARAZZO, S. V.; ROSETO, C. V.; MACHADO, P. H. Componentes do leite de bubalinos ao longo da lactação no Estado de São Paulo. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.60, n.346/347, p. 71-78, 2005.

GANGULI, N.C. Tecnologia de la leche de búfala. **Revista Mundial de Zootecnia**, Roma, v.30, p.2-10, 1979.

GROSCLAUDE, F.; MAHÉ, M. F.; RIBADEAU-DUMAS, B. Structure primaire de la caseine  $\alpha_{s1}$ -et de la caseine  $\beta$ -bovine. **European Journal of Biochemistry**, Jouy-en-Josas/France, v.40, p.323-324, 1973.

GUERRA, R. B.; NEVES, E. C. A.; PENA, R. S. Caracterização e processamento de leite bubalino em pó em secador por nebulização. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, SP, v.25, n.3, p.443-447, jul./set., 2005.

IDF (2010) The World Dairy Situation 2010. Bulletin of the IDF No. 446/2010. **International Dairy Federation**, Brussels, Belgium.

JUMAH, R. Y.; SHAKER, R. R.; ABU-JDAYIL, B. Effect of milk source on the rheological properties of yogurt during the gelation process. **International Journal of Dairy Technology**, Oxford, v.54, n.3, p.89-93, 2001.

KIM, Y. K.; YAGUCHI, M.; ROSE D. Isolation and Amino Acid Composition of *Para-Kappa-Casein*. **Division of Biology, National Research Council of Canada**, Ottawa, Ontário, p.1966-68, 1968.

MACEDO, M. P. et al. Composição físico-química e produção do leite de búfalas da raça Mediterrâneo no oeste do Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.30, n.3, p.1084-1088, 2001.

MATTOS, B. C. Aspectos qualitativos do leite bubalino. **PUBVET**, v.1, n.9, 9 ed., 2007. Disponível em: <[http://www.pubvet.com.br/artigos\\_det.asp?artigo=166](http://www.pubvet.com.br/artigos_det.asp?artigo=166)> Acesso em: 28 jan. 2013.

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

MELÍCIO, S. P. L. Avaliação das características físico-químicas e composição em ácidos graxos e colesterol do leite de búfalas na região de São Carlos, SP. **Dissertação (Mestrado)** Universidade Estadual Paulista. Julho de 2004.

MELÍCIO, S. P.; CARVALHO, M. R. B.; TONHATI, H.; MUNARI, D. P.; PESCE DE RUIZ HOLGADO, A.; LAROSA, G.; AIURA, F. S. Composição química do leite de búfala da raça Murrah na região de São Carlos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.60, n.346-347, p.7-12, set./dez., 2005.

MESQUITA, A. J.; TANEZINI, C. A.; FONTES, I. F.; PONTES, I. S.; ROCHA, J. de M.; SOUZA, J. T.; D'ALESSANDRO, W. T. **Qualidade físico-química e microbiológica do leite cru bubalino**. Goiânia: UFGO, 77p, 2001.

MONTEIRO, A. A.; PIRES, A. C. dos S.; ARAÚJO, E. A. **Tecnologia de Produção de Derivados de Leite**. Viçosa: UFV, 81p, 2007.

MOURA CARVALHO, L.O.D., LOURENÇO JÚNIOR, J.B. Produção leiteira de bubalinos como opção para a Amazônia. In: **Seminário de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias do Pará, 1**. Belém, Set. 2001.

NASCIMENTO, C. N. B., MOURA CARVALHO, L. O. D. **Criação de búfalos: alimentação, manejo, melhoramento e instalações**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 403p, 1993.

OLIVIERI, D. de A. Avaliação da qualidade microbiológica de amostras de mercado de queijo mussarela, elaborado a partir de leite de búfala (*Bubalis bubalis*). **Dissertação** (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba (SP), 61f, 2004.

PATIÑO, E. M.; GUANZIROLI STEFANI, M. C. Composición de Leche de Búfala (*Bubalus bubalis*) de Raza Jafarabadi en Corrientes, Argentina. **Revista Electrónica de Veterinaria REDVET**. v.6, n.5, 2005.

PERRY, K. S. P. Queijos: Aspectos Químicos, Bioquímicos e Microbiológicos. **Química Nova**, São Paulo, v.27, n.2, p.293-300, 2004.

RAMOS, M., JUAREZ, M. Sheep milk. In: ROGINSKI, H., FUQUAY, J.W., FOX, P.F. (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Amsterdam: Academic Press, v.4, p.2539-2545, 2003.

RANGEL, A. H. do N.; OLIVEIRA, J. P. F. de; ARAÚJO, V. M. de; BEZERRA, K. C.; MEDEIROS, H. R. de; LIMA JÚNIOR, D. M. de; ARAÚJO, C. G. F. de. Influência do estágio de lactação sobre a composição do leite de búfalas. **Acta Veterinaria Brasilica**, UFERSA, Mossoró, v.5, n.3, p.306-310, 2011.

REALE, S.; CAMPANELLA, A.; MERGIOLI, A.; PILLA, F. A novel method for species identification in milk and milk-based products. **Journal of Dairy Research**, Champaign, v.75, p.107-12, 2008.

REGGETI, J.G., TERECAI, H.C.A. Buffalo development in América. **In: ASIAN BUFFALO CONGRESS ON SOCIAL ECONOMIC CONTRIBUTION OF BUFFALO TO RURAL AREAS**, 5., 2006, Naning. **Proceedings**. Naning: ASIAN BUFFALO ASSOCIATION, v.1. p.45-52, 2006.

ROMAN, J. A.; SGARBIERI, V. C. Obtenção e caracterização química e nutricional de diferentes concentrados de caseína. **Revista de Nutrição**, Campinas – SP, 2004.

SAKARIDIS, I.; GANOPOULOS, I.; ARGIRIOU, A.; TSAFTARIS, A. High resolution melting analysis for quantitative detection of bovine milk in pure water buffalo mozzarella and other buffalo dairy products **International Dairy Journal**, England, v.28, p.32-35, 2013.

SENO, L. O. CARDOSO, V. L.; TONHATI, H. Valores econômicos para as características de produção de leite de búfalas no estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.36, n.6, p.2016-2022 (supl.), 2007.

SILVA, E. O. T. R.; PANETTA, J. C.; ISHIZUKA, M. M. Efeito microbicida da fase de filagem, durante a fabricação de “*Mozzarella*” elaborado com leite de búfala. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.13, n.59, p.28-34, jan./fev., 1999.

SILVA, C. L. S. P. **Eletroforese Bidimensional: Princípios e Aplicações**. Ciências Agrárias e Saúde, v.2, n.1, p.74-8, 2002.

SILVA, M. S. T. et al. Programa de incentivo a criação de búfalos por pequenos produtores. **PRONAF**, Pará, agosto, 2003.

TONHATI, H.; LIMA, A. L. F.; DUARTE, J. M. C.; MUNOZ, M. F. C. Factors Affecting Milk Yield and Milk Constituents in Brazilian Buffaloes. **Buffalo Newsletter**, n.20, p.15, 2004.

TONHATI, H.; MENDONZA-SANCHEZ, G.; SENO, L. O. Qualidade do leite de búfalas e correlações entre a produção e seus principais constituintes. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.60, n.346/347, p.61-64, set./dez., 2005.

VELOSO, A. C. A. Detecção de Adulteração em produtos alimentares contendo leite e/ou proteínas lácteas. **Química Nova**, São Paulo; v.25, n.4, p.609-15, 2002.

VERRUMA-BERNARDI; DAMÁSIO, M. H.; VALLE, J. L. E.; OLIVEIRA, A. J. de. Elaboração do queijo Mozzarella de leite de búfala pelos métodos tradicional e da acidificação direta. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.20, n.2, p.138-144, maio/ago., 2000.

VIEIRA, M. C.; CAVICHIOLO, J. R.; FACHINI, C.; LISERRE, A. M.; DE SOUZA, K. B.; RODRIGUES, C. F. C.; VAN DENDER, A. G. F. Viabilidade econômica da implantação de uma unidade industrial para a produção de mozzarella e de massa coagulada, fermentada e congelada de leite de búfala. **Informações Econômicas**, São Paulo, v.39, n.10, p.32-42, out., 2009.

WHITFORD, D. **Proteins: Structure and Function**. John Wiley & Sons Ltd, The Atrium, Siurthern Gate, Chichester, West Sussex PO19 85Q, England. 511p, 2005.

## CAPÍTULO I

FALEIRO, A. dos S. **Aplicação de eletroforese para identificação da  $\gamma_1$ -caseína em muçarela de búfala.** Itapetinga – BA: UESB, 2013. p.70 (Dissertação – Mestrado em Engenharia de Alimentos).\*

## RESUMO

Objetivou-se desenvolver e avaliar o método de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) em condições desnaturantes (SDS-PAGE), empregando duas metodologias de coloração (Azul de Coomassie e Nitrato de Prata), para detectar a adição fraudulenta do leite bovino em queijos muçarelas de búfala comercializadas no Estado da Bahia. Previamente, para auxiliar na identificação, queijos muçarela foram processados com quantidades variáveis e crescentes de leite de vaca em adição ao leite de búfala (10; 20; 30; 40 e 50%), assim como amostras de referências processadas exclusivamente com leite de búfala (tratamento referência búfala - TRB) e de vaca (tratamento referência vaca - TRV), segundo tecnologia padrão de fabricação. Amostras comerciais foram adquiridas de cinco marcas em diferentes cidades do Estado da Bahia. A técnica de SDS-PAGE foi realizada mediante géis de poliacrilamida com concentração de 5% em 125 mmol/L de tampão Tris-HCl, pH 6,8 e com géis de separação com 15% de poliacrilamida em 380 mmol/L de tampão Tris-HCl, pH 8,8, contendo 0,1% de SDS. Utilizando-se a coloração de Azul de Coomassie as  $\gamma_2$ - e  $\gamma_3$ -CNs foram detectadas nas amostras TRB e TRV, já a  $\gamma_1$ - CN foi identificada no espectro das amostras de queijo muçarela de vaca. De acordo com os dados eletroforéticos,  $\gamma_1$ -CN foi observada de maneira mais clara no queijo muçarela de vaca em comparação com o queijo muçarela elaborado com leite de búfala. Com o incremento da adulteração (> 20%) do leite de vaca nas formulações de queijo muçarela de búfala, ocorreu o aparecimento da banda  $\gamma_1$ -CN com mobilidade eletroforética similar à bovina. Quando as amostras foram coradas com Nitrato de Prata, além das  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$  e  $\gamma_3$ -CNs serem visualizadas de forma mais nítida, outros peptídeos também foram identificados, revelando a adulteração do leite de búfala com leite de vaca com maior clareza e mostrando a maior eficiência da utilização desta coloração. Dessa forma, o método desenvolvido foi eficiente para detectar a presença de leite de vaca no queijo muçarela de búfala, utilizando-se Azul de Coomassie e de forma mais nítida quando corado com Nitrato de Prata, podendo esta técnica ser utilizada para identificação de fraudes de queijos, auxiliando na verificação da autenticidade de muçarelas de búfala comercializadas no Estado da Bahia.

**Palavra-chave:** SDS-PAGE, fraude, autenticidade

---

\*Orientadora: Sibelli Passini Barbosa Ferrão, *D.Sc.*, UESB e Co-orientadores:, Antonio Silvio do Egito Vasconcelos, *D.Sc.*, EMBRAPA; Sérgio Augusto de Albuquerque Fernandes *D.Sc.*, UESB.

## CHAPTER I

FALEIRO, A. dos S. Application of electrophoresis for identification of  $\gamma$ 1-casein in Buffalo mozzarella.Itapetinga – BA: UESB, 2013. p.70 (Dissertation-master's degree in food engineering).\*

### ABSTRACT

Objective develop and evaluate the method of polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) denaturing conditions (SDS-PAGE), employing two methodologies of coloring (Coomassie brilliant blue and Silver Nitrate), to detect the fraudulent addition of bovine milk in Buffalo muçarelas cheese sold in the State of Bahia. Previously, to assist in the identification, were processed mozzarella cheeses with varying amounts of cow's milk and growing in addition to buffalo milk (10; 20; 30; 40 and 50%), as well as reference samples processed exclusively with milk of Buffalo (Buffalo-TRB reference treatment) and cow (cow-TRV reference treatment), according to standard manufacturing technology. Commercial samples of five brands were acquired in different cities in the State of Bahia. The SDS-PAGE technique was performed on polyacrylamide gels with 5% concentration in 125 mmol/L Tris-HCl buffer, pH 6.8 and separation gels with 15% polyacrylamide in 380 mmol/L Tris-HCl buffer, pH 8.8, containing 0.1% SDS. Using Coomassie blue staining the  $\gamma$ 2-and  $\gamma$ 3-CNs were detected in samples TRB and TRV,  $\gamma$ 1-CN was identified in the spectrum of samples of mozzarella cheese. According to the data, old biomarker with  $\gamma$ 1-CN was observed more clearly in mozzarella cheese of cow in comparison with mozzarella cheese made with buffalo milk. With the increased Adulteration (20%) > of cow's milk mozzarella cheese in the formulations of Buffalo, the appearance of the band  $\gamma$ 1-CN with electrophoretic mobility similar to bovine. When the samples were stained with silver nitrate  $\gamma$ 1,  $\gamma$ 2,  $\gamma$ 3-CNs and be displayed in an sharper, other peptides have also been identified, revealing the tampering of buffalo milk with cow's milk with greater clarity and showing the greater efficiency of the use of this colouring. In this way, the method developed was efficient to detect the presence of cow's milk mozzarella cheese of buffalo milk, using Coomassie blue and more clear when stained with Silver Nitrate, and this technique be used to ID fraud cheeses, assisting in the verification of the authenticity of Buffalo muçarelas marketed in the State of Bahia.

**Keyword:** SDS-PAGE, fraud, authenticity

---

\* Advisor: Sibelli Passini Barbosa Ferrão, *D.Sc.*, UESB e Co-advisors:, Antonio Silvio do Egito Vasconcelos , *D.Sc.*, EMBRAPA; Sérgio Augusto de Albuquerque Fernandes *D.Sc.*, UESB.

## 1. INTRODUÇÃO

A autenticidade dos alimentos tornou-se um problema global. É cada vez mais importante detectar a introdução de produtos fraudados no mercado e de produtos de qualidade inferior, quer por razões econômicas, quer por razões de saúde pública. O mercado oferece uma infinidade de produtos atendendo aos interesses específicos de cada consumidor, com preços variados. Esses consumidores buscam qualidade e produtos mais saudáveis e prezam pela confiança de que estão levando o que é especificado no rótulo.

A origem dos ingredientes utilizados para a fabricação deve ser relatada, uma vez que a adição não mencionada de ingredientes fere o direito do consumidor e a legislação vigente.

As adulterações em produtos alimentares contendo leite e/ou proteínas lácteas são relativamente frequentes e diversificadas, incluindo: (1) adição de leite de vaca ao leite de búfala e/ou cabra para a preparação de queijos; (2) a incorporação de proteínas do soro na produção de queijos; (3) a adição de caseínas, ou proteínas do soro a produtos alimentares.

As flutuações na disponibilidade do leite de outras espécies e o preço mais elevado em comparação ao leite bovino incentivam os produtores a fraudarem produtos como queijos (VELOSO, 2002). Para detectar as possíveis fraudes, métodos de referência podem ser utilizados se baseando na análise das diferentes proteínas do leite (caseínas e proteínas do soro). São mencionados na literatura diversos métodos, tais como: eletroforese, imunologia, cromatografia e espectroscopia de infravermelho que, muitas vezes, além de identificarem a diferença entre os produtos, quantificam a mistura de forma confiável e sensível.

O método oficial da Comunidade Europeia detecta a presença de leite de vaca em muçarela de búfala com base na diferença de mobilidade eletroforética das  $\gamma_2$ - e  $\gamma_3$ -CNs de origem bovina e bubalina, originada por hidrólise da caseína e controlada pela ação da plasmina, extraída do queijo (ADDEO et al., 1990). Em pesquisa realizada na região da Caserta na Itália com mais de 50 pizzas declarando no rótulo conter apenas queijo muçarela de búfala como ingrediente mostrou a utilização fraudulenta de muçarela mista em 10% das amostras estudadas. Este estudo mostrou que o método oficial Europeu é uma ferramenta eficaz para demonstrar este tipo de fraude, proteger os consumidores contra práticas impróprias e garantir o comércio justo (LOCCI et al., 2008).

O controle da autenticidade dos produtos consumidos e a obtenção de uma análise marcadora para produtos de leite de búfala tornam-se necessários para assegurar a qualidade e autenticidade dos produtos consumidos evitando fraudes e dúvidas quanto aos produtos comercializados (DIAS, 2009). No entanto, poucos estudos examinaram a adulteração em queijos pelo método SDS-PAGE. Objetivou-se desenvolver e avaliar o método de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) em condições desnaturantes (SDS-PAGE), empregando

duas metodologias de coloração (Azul de Coomassie e Nitrato de Prata), para detectar a adição fraudulenta do leite bovino em queijos muçarelas de búfala comercializadas no Estado da Bahia.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

## **2.1. Obtenção de queijos para desenvolvimento da metodologia de eletroforese**

### **2.1.1. Matéria-prima**

O leite de búfala foi obtido por meio de ordenha manual de búfalas mestiças, Murrah x Jafarabadi, em condições sanitárias adequadas por meio de ordenha higiênica, provenientes do município de Maiquinique, BA. O leite de vaca foi coletado no setor de Bovinocultura de Leite – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), proveniente de vacas mestiças Holandês x Zebu, obtido por meio de ordenha mecânica em condições higiênico-sanitárias adequadas. Os leites foram envasados em recipientes adequadamente higienizados e imediatamente transportados para o Laticínio, onde foram processados.

### **2.1.2. Percentuais de mistura dos queijos**

Amostras experimentais de queijo muçarela foram processadas utilizando-se leite de búfala e de vaca para auxiliar na identificação da adulteração. O processamento foi conduzido em um Laticínio na cidade de Itapetinga – BA, no período de abril a junho de 2012. Os queijos muçarela foram processados com quantidades variáveis e crescentes de leite de vaca em adição ao leite de búfala (10; 20; 30; 40 e 50%), assim como amostras de referências processadas exclusivamente com leite de búfala (tratamento referência búfala - TRB) e de vaca (tratamento referência vaca - TRV), segundo a tecnologia padrão de fabricação.

### **2.1.3. Processamentos dos queijos**

Os queijos foram fabricados no mesmo dia da coleta do leite e para cada processamento utilizou-se 30 litros de leite in natura, sendo que para cada tratamento realizou-se três repetições. Para a fabricação dos queijos, foi realizada a retirada parcial da gordura do leite de búfala para aproximadamente 4%. Para a fabricação do queijo, o leite foi pasteurizado a 65 °C/30 minutos, sob agitação constante, em um tanque de dupla parede, e em seguida resfriado a 35 °C. Após adição dos ingredientes (fermento lácteo tipo termofílico, cloreto de cálcio e coalho) e repouso de 40 minutos ocorreu à formação do coalho (massa) e com o auxílio de uma lira efetuou-se o corte deste no sentido vertical e depois horizontal. Posteriormente, procedeu-se lentamente a 1ª mexedura da massa durante 20 minutos e depois uma 2ª mexedura a 42 °C até se obter uma massa cozida e firme. Em seguida, empurrou-se a

massa para uma das extremidades do tanque para remoção do soro, com posterior prensagem da massa durante 15 minutos. Após este tempo, a massa foi dividida em blocos, os quais ficaram descansando até atingir fermentação adequada para filagem (pH 4,9-5,1). Atingindo-se o ponto, a massa foi fatiada, filada em água quente a 80 °C, cortada e moldada em fôrmas próprias para queijo muçarela até total remoção do soro. Em seguida, procedeu-se a salga dos queijos em salmoura a 20% com temperatura de 12 °C durante 30 minutos com posterior secagem em câmara fria, com boa ventilação, por um período de 12 horas. Após este tempo, os queijos foram embalados a vácuo em embalagens de polietileno e armazenados a 4 °C. Depois de embalados, os mesmos foram transportados para o Laboratório de Processamento de Leite e Derivados – UESB e preservados sob refrigeração (4 °C) por 24 horas e posteriormente congelados a -20 °C para interromper processos enzimáticos.

## **2.2. Obtenção das amostras comerciais**

As amostras de cinco marcas comercializadas no comércio varejista do Estado da Bahia foram adquiridas em lotes distintos totalizando 18 amostras analisadas, sendo que apenas uma marca apresentava no rótulo o selo de pureza adquirido pela ABCB, que certifica conter apenas leite de búfala. Em todas as amostras o rótulo continha informações de que o produto era elaborado apenas com leite de búfala. Todos os queijos estavam embalados a vácuo e apresentavam registro no Serviço de Inspeção Estadual (SIE). As coletas ocorreram em diferentes cidades do Estado da Bahia no período de dezembro de 2011 a agosto de 2012, todas as amostras foram adquiridas em suas embalagens originais, sob refrigeração em câmaras frigoríficas a temperatura de 4 °C a 8 °C, transportadas no mesmo dia para o Laboratório de Processamento de Leite e Derivados da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) e posteriormente congeladas a -20 °C para interromper processos enzimáticos, até o momento de análise.

## **2.3. Preparo das amostras**

As amostras de referência (TRB e TRV), as misturas com diferentes concentrações e as amostras comerciais foram transferidas (aproximadamente 20 g) para frascos plásticos higienizados e congeladas a -80 °C e posteriormente liofilizadas por 72 horas em liofilizador de bancada FreeZone 4,5 L da marca LABCONCO no Laboratório de Processamento de Leite e Derivados-UESB. Depois de liofilizadas, foram estocadas a -20 °C. As amostras foram

descongeladas e pesou-se 2 mg de cada, que foram então dissolvidas em 800 µL de tampão Tris-HCl, pH 6,8, na presença de 0,1% de SDS e 5% de β-mercaptoetanol. Em seguida foram aquecidas a 100 °C por 3 minutos e acrescidas de 200 µL de 10% de glicerol e 0,01% de azul de bromofenol. Sendo congeladas até o momento da aplicação no gel (EGITO et al., 2006).

## **2.4. Análise eletroforética**

A caracterização eletroforética dos queijos muçarela foi realizada, em duplicata, no Laboratório de Processamento de Leite e Derivados-UESB, segundo metodologia recomendada por Egito et al. (2006), por meio do método de gel de poliacrilamida em condições desnaturantes, ou seja, com adição de SDS (Dodecilsulfato de sódio, detergente aniônico – SDS-PAGE), em aparelho para eletroforese vertical da marca Apelex.

### **2.4.1. Método SDS-PAGE**

A técnica de SDS-PAGE foi realizada mediante géis de poliacrilamida com concentração de 5% em 125 mmol/L de tampão Tris-HCl, pH 6,8 e com géis de separação com 15% de poliacrilamida em 380 mmol/L de tampão Tris-HCl, pH 8,8, contendo 0,1% de SDS.

### **2.4.2. Preparação das placas**

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

### **2.4.3. Preparação dos géis**

A preparação do gel de separação e do gel de concentração/empilhamento seguiram a metodologia de Egito et al. (2006) com modificações, pois foram utilizadas placas de mini-géis. Os reagentes foram adicionados, totalizando 10 mL de solução, conforme Tabela 2.

**Tabela 2.** Componentes do gel de separação a 15% de poli(acrilamida)

Reagentes	Molaridade (mol/ L)	Teor (%)	Volume utilizado (µL)
Acrilamida	5,16	99,9	4110
Tampão de separação	1,50	99,8	2510
SDS a 10%	0,35	90	100
Temed	-	99	10
Persulfato de amônio	0,22	98	67

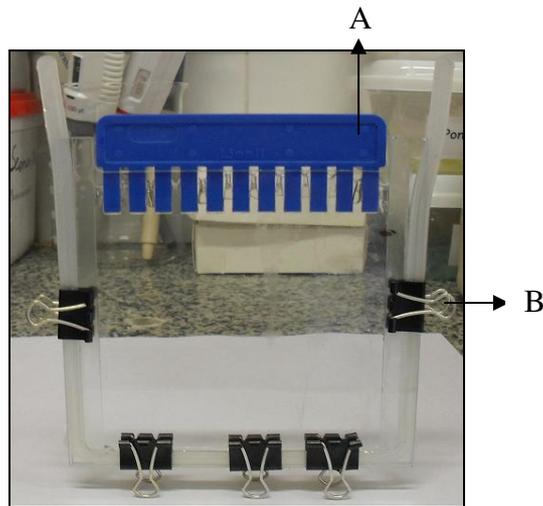
Após a preparação da solução de separação, a mesma foi vertida entre as placas de vidro e em seguida acrescentou-se água destilada, para ajudar na polimerização. Aguardou-se a polimerização do gel por, aproximadamente 30 minutos, para dar início ao preparo da solução de concentração/empilhamento. Após a polimerização do gel, o molde foi inclinado cuidadosamente para a remoção da água destilada. A solução de concentração/empilhamento a 5% foi preparada, totalizando 4 mL de solução, conforme descrito na Tabela 3. Em seguida, adicionou-se a solução de concentração 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 permitiriam a aplicação das amostras. Aguardou-se a polimerização do gel por aproximadamente 30 minutos (Figura 1).

**Tabela 3.** Componentes do gel de concentração/empilhamento a 5% de poli(acrilamida)

Reagentes	Molaridade (mol/ L)	Teor (%)	Volume utilizado (µL)
Acrilamida	5,16	99,9	520
Tampão de concentração	0,50	99,8	1010
SDS a 10%	0,35	90	40
Temed	-	99	4
Persulfato de amônio	0,22	98	80

No momento em que o gel de concentração/empilhamento polimerizava, as amostras eram descongeladas e preparadas, através da homogeneização utilizando-se vórtex por alguns minutos para a caracterização eletroforética. Após a polimerização do gel de concentração, retirou-se o pente e com a ajuda de uma micropipeta aplicou-se 10 µL das amostras de referências processadas exclusivamente com leite de búfala (TRB) e de vaca (TRV) e de cada amostra, de modo que a quantidade de proteína aplicada em cada canaleta/poço foi de 20 µG.

As canaletas/poços das extremidades eram descartadas, e as primeiras destinadas ao padrão e aos controles de búfala e vaca, enquanto que as canaletas intermediárias utilizadas para as amostras. No segundo poço do gel foi depositado o volume de 10  $\mu$ L do marcador 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).



**Figura 1.** Montagem do gel. A – pente de 1,5 mm; B – presilha.

#### **2.4.4. Corrida eletroforética**

A caracterização eletroforética de cada amostra foi realizada em duplicata. A migração das proteínas teve duração de aproximadamente 1 hora e 30 minutos. Foi realizada com uma corrente elétrica constante de 250 V, amperagem de 30 mA e temperatura controlada entre 4 °C e 8 °C.

#### **2.4.5. Fixação das proteínas**

Terminada a corrida eletroforética, o gel foi retirado das placas de vidro e as proteínas foram fixadas no gel com 12% de ácido tricloroacético (TCA) durante 30 min e, em seguida, imersas em solução corante com 0,1% de Azul de Coomassie R250, dissolvido em uma mistura de 50% de etanol e 2% de TCA, durante 120 min. A descoloração foi realizada durante uma noite com uma solução a 30% de etanol e 7,5% de ácido acético.

A seguir o gel foi escaneado e posteriormente submetidos a uma nova coloração por Nitrato de Prata, segundo protocolo adaptado de Bloom et al. (1987). Para este procedimento

o gel de poliacrilamida, corado com Azul de Coomassie R250, foi descorado e submetido a um processo de lavagem com água destilada em 3 incubações de 20 minutos, sob agitação lenta. Após a última incubação, o gel foi incubado em uma solução de Thioissulfato de sódio por 1 minuto. Posteriormente, o gel foi submetido a uma solução de Nitrato de Prata por 30 minutos sob agitação lenta. Após a incubação, adicionou-se no gel a solução reveladora até o aparecimento das bandas coradas. A reação foi interrompida com adição de ácido acético a 1%.

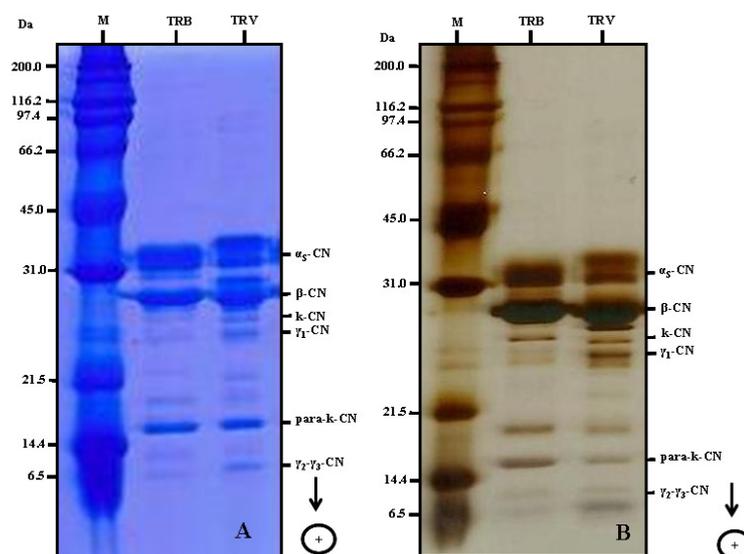
#### **2.4.6. Análise dos géis**

Todos os géis foram digitalizados e suas imagens foram armazenadas para posteriormente passarem por formatação no programa Microsoft Office PowerPoint 2003 para identificação de cada banda protéica.

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### 3.1. Análise eletroforética (SDS-PAGE) das caseínas ( $\alpha_s$ , $\beta$ e $k$ ) do queijo muçarela de búfala, de vaca e misturas

Primeiramente foi desenvolvida a técnica de gel de poliacrilamida na presença de Dodecilsulfato de Sódio (SDS-PAGE) para comparação do perfil eletroforético dos queijos fabricados com leite das espécies bubalina e bovina. As amostras elaboradas e controladas (TRB e TRV) foram usadas como amostras de referência de queijo de búfala e queijo de vaca, ao longo do estudo. Os géis de SDS-PAGE do TRB e TRV apresentaram um padrão eletroforético único para cada espécie. Hinz et al. (2012) detectaram diferenças significativas no perfil das proteínas do leite de cinco espécies (bovino, camelo, caprinos, equinos e búfalo). Estudos realizados por Chianese et al. (2009) revelaram que o perfil da  $\alpha_{s1}$ -CN do leite de búfala possui mobilidade eletroforética menor em comparação ao leite bovino por meio da técnica Uréia-PAGE. Os perfis obtidos podem ser avaliados levando-se em conta os dados da literatura sobre as massas molares e proporções médias de frações protéicas características do leite de búfala e do leite de vaca. As principais proteínas nas amostras estudadas corresponderam a  $\alpha_{s1}$ -,  $\beta$ - e  $k$ -CN em gel de poliacrilamida na presença de SDS quando foram corados com Azul de Coomassie (Figura 2A) e Nitrato de Prata (Figura 2B).



**Figura 2.** Comparação eletroforética das caseínas de queijo muçarela de búfala e de vaca, em gel de poliacrilamida na presença de SDS. Depositaram-se 20  $\mu$ G de proteínas em cada poço, revelado com azul de Coomassie (A) e Nitrato de Prata (B). M, Marcador de massa molar; TRB, tratamento referência búfala; TRV, tratamento referência vaca;  $\alpha_s$ -CN,  $\alpha_s$ -caseína;  $\beta$ -CN,  $\beta$ -caseína;  $k$ -CN,  $k$ -caseína;  $\gamma$ -CN, gamas-caseínas.

A proteólise no leite ocorre principalmente pela ação da plasmina, que é uma enzima do sangue transportada do plasma para as células epiteliais mamárias; sua atividade é

determinada por interações entre o precursor inativo plasminogênio e ativadores do plasminogênio, associados com micelas de caseína ou de células somáticas (Politis et al., 1992), apresentando-se em maior concentração na coalhada do queijo (KELLY & MCSWEENEY, 2003).

A plasmina cliva preferencialmente ligações peptídicas de Lys-X, hidrolisando principalmente  $\beta$ -CN a  $\gamma$ -CNs. Estes fragmentos de  $\beta$ -CN são uma fração heterogênea (Eigel, 1977), composta de peptídeos (segmento 29–209), (segmento 106–209) e (segmento 108–209), designados como  $\gamma_1$ -,  $\gamma_2$ - e  $\gamma_3$ -CN, respectivamente.

A análise dos principais produtos da atividade da plasmina (por ex.  $\gamma$ -CNs) também é uma importante ferramenta para a detecção de adulteração de leite de cabra, ovelha e búfala adicionado de leite de vaca, pois a adição do mesmo não é permitida na fabricação de diversos produtos lácteos (SOMMA et al., 2008). Baseado nestes conhecimentos, a Comunidade Europeia adota como método oficial para detecção da presença de leite de vaca em muçarela de búfala a diferença de mobilidade eletroforética das  $\gamma_2$ - e  $\gamma_3$ -CNs de origem bovina e bubalina, originada por hidrólise da caseína (ADDEO et al., 1990).

De acordo com Ahmad et al. (2008), a k-CN do leite de vaca possui um conteúdo de ácido siálico maior do que a k-CN do leite de búfala, o que pode modificar a estrutura da mesma. Além disso, segundo os autores, o glicomacropéptido liberado da k-CN de vaca tem massa molar maior do que a k-CN de búfala. Tal fato pode explicar, no presente estudo, a migração diferenciada das frações protéicas das diferentes espécies.

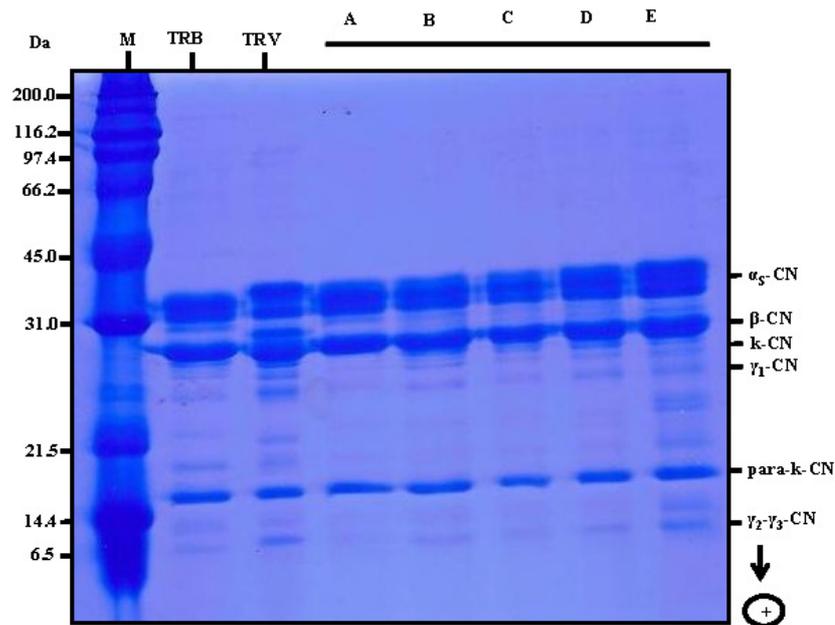
Balestrieri et al. (2002) ao avaliarem as mudanças oxidativas da muçarela produzida com leite bovino e bubalino, concluíram que a proteína e a gordura da muçarela de leite de búfala são mais protegidas contra alterações oxidativas do que a de leite bovino. Assim, é provável que as diferenças entre os perfis eletroforéticos de hidrolisados de caseína de búfala e de vaca são devido às diferentes suscetibilidades das caseínas da ação da protease de leite.

Trabalhos (Somma et al., 2008; Di Luccia et al., 2008; Locci et al., 2008; Addeo et al., 2009; Chianese et al., 2009; Feligini et al., 2009; Hinz et al., 2012) demonstram que no leite da espécie bubalina a quebra da k-CN no processamento do queijo e durante a proteólise pela ação da plasmina são gerados resíduos de  $\beta$ -CN como  $\gamma$ -CNs ( $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$  e  $\gamma_3$ ), proteases e peptonas, de forma diferenciada do que ocorre no leite da espécie bovina. Assim, a presença de resíduos próximo ao de massa molar de 31,0 kDa podem indicar a presença de  $\gamma_1$ -CN, que se manifesta de forma distinta nas diferentes espécies (Figura 2; A e B).

As  $\gamma_2$ - e  $\gamma_3$ -CNs foram detectadas nas amostras TRB e TRV, já a  $\gamma_1$ -CN apresentou-se de forma mais significativa no espectro das amostras de queijo muçarela de vaca. De acordo

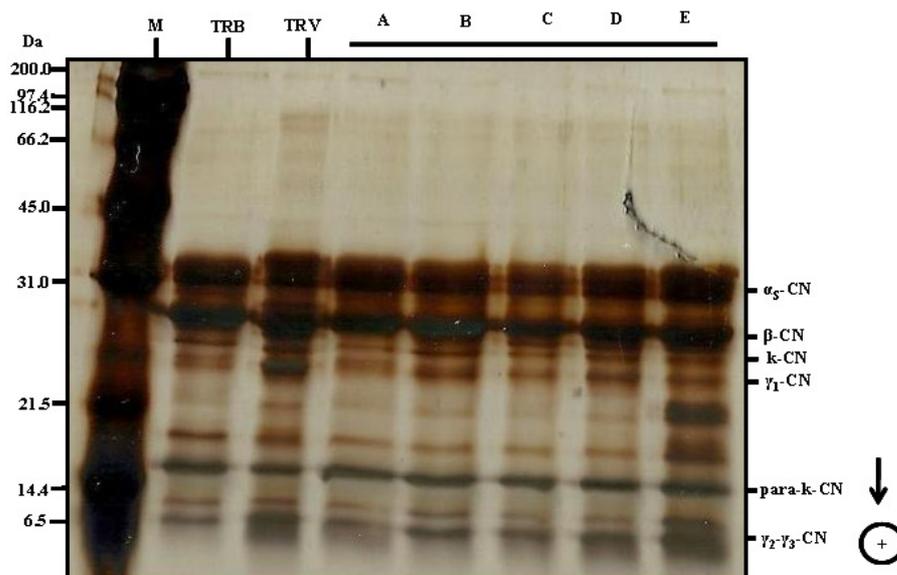
com os dados eletroforéticos, acredita-se que  $\gamma_1$ -CN foi produzida em quantidades menores no queijo muçarela de búfala em comparação com o queijo muçarela elaborado com leite de vaca.

As amostras de muçarela elaboradas com leite de búfala, vaca e as misturas com diferentes concentrações (10 a 50% v/v de leite de vaca) foram separadas por gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) e os perfis de proteína foram corados com Azul de Coomassie (Figura 3) e Nitrato de prata (Figura 4).



**Figura 3.** Perfil eletroforético (SDS-PAGE) da simulação de adulteração de queijo muçarela de búfala com leite de vaca, revelado com Azul de Coomassie. Depositaram-se 20  $\mu$ G de proteínas em cada poço. M, Marcador de massa molar; TRB, tratamento referência búfala; TRV, tratamento referência vaca e misturas contendo 10% (A), 20% (B), 30% (C), 40% (D) e 50% (E) de leite bovino;  $\alpha_s$ -CN,  $\alpha_s$ -caseína;  $\beta$ -CN,  $\beta$ -caseína; k-CN, k-caseína;  $\gamma$ -CN, gamas-caseínas.

A presença da  $\gamma_1$ -CN pode ser observada de maneira mais significativa a partir de 20% de adição de leite de vaca no processamento de queijo muçarela de búfala, servindo como parâmetro para indicar, por meio de análise eletroforética (SDS-PAGE), a mistura de leites (Figura 4) quando corados com Azul de Coomassie e mais proeminente quando corados com Nitrato de Prata (Figura 5). Di Luccia et al. (2008) citam que a maioria dos estudos existentes sobre o mecanismo de ativação do plasminogênio e da plasmina, possíveis agentes clivantes da  $\beta$ -CN e liberação de  $\gamma$ -CNs, foram realizados no leite bovino, e as informações obtidas são insuficientes para aplicação ao leite de outras espécies.

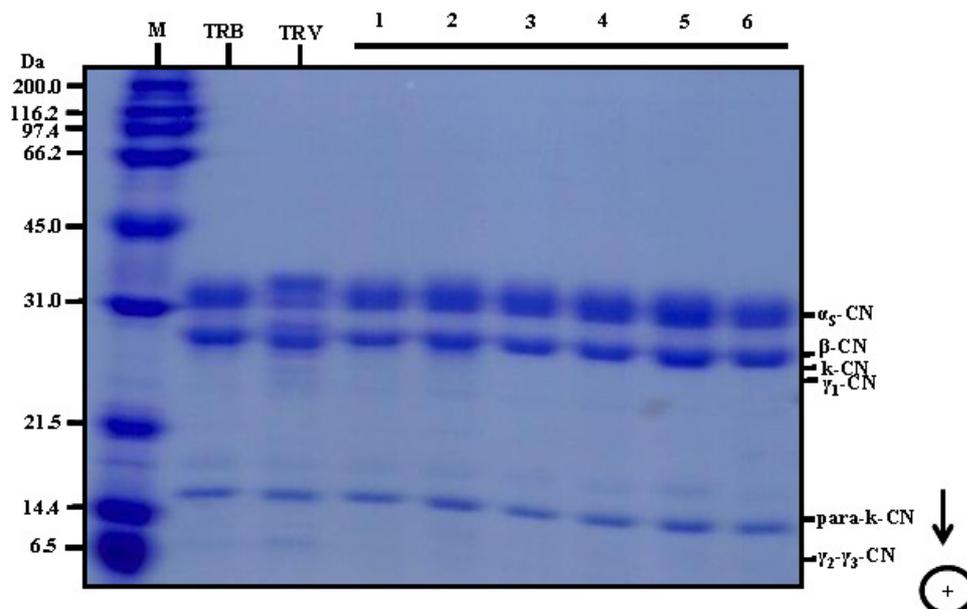


**Figura 4.** Perfil eletroforético (SDS-PAGE) da simulação de adulteração de queijo muçarela de búfala com leite de vaca, revelado com Nitrato de prata. Depositaram-se 20  $\mu$ G de proteínas em cada poço. M, Marcador de massa molar; TRB, tratamento referência búfala; TRV, tratamento referência vaca e misturas contendo 10% (A), 20% (B), 30% (C), 40% (D) e 50% (E) de leite bovino;  $\alpha_s$ -CN,  $\alpha_s$ -caseína;  $\beta$ -CN,  $\beta$ -caseína; k-CN, k-caseína;  $\gamma$ -CN, gamas-caseínas.

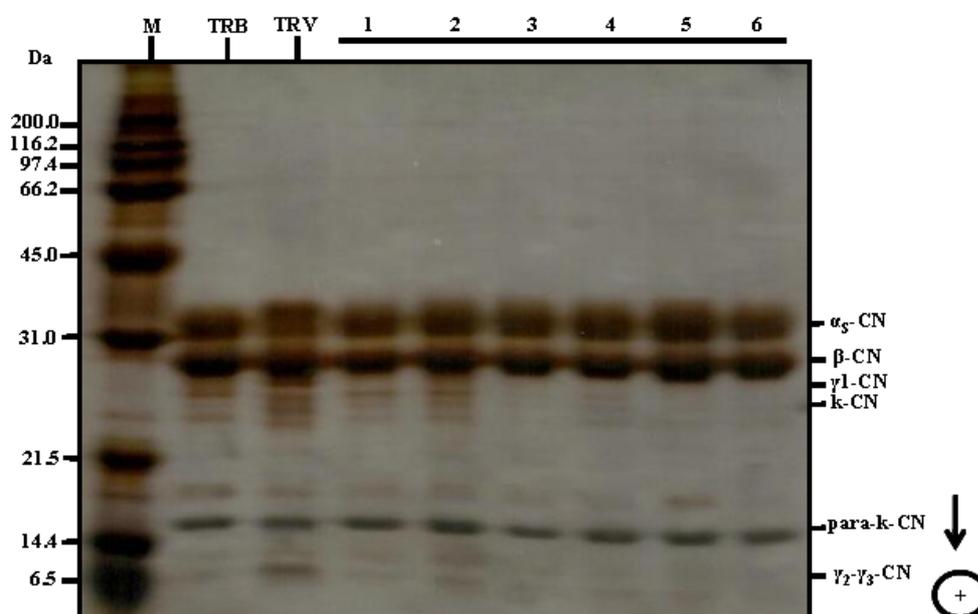
### 3.2. Análise eletroforética (SDS-PAGE) da caseína de amostras comerciais de queijo muçarela de búfala

Das cinco marcas adquiridas no comércio varejista do Estado da Bahia, um total de dezoito amostras foram analisadas e comparadas com os tratamentos de referência preparados com leite de búfala (TRB) e leite de vaca (TRV). Quanto à pureza das muçarelas de búfala, por meio da técnica SDS-PAGE, observou-se adulteração em 7 amostras. A identificação da fraude cometida nestas amostras ocorreu de acordo com a presença da  $\gamma_1$ -CN, semelhante ao perfil eletroforético do TRV.

A Figura 5 e a Figura 6 demonstram o perfil eletroforético de seis amostras comerciais de muçarela de búfala e também TRB e TRV, foram analisadas em gel de poliacrilamida na presença de SDS e os perfis de proteínas foram corados com Azul de Coomassie (Figura 5) e Nitrato de Prata (Figura 6). De acordo com as análises realizadas, não foi detectada adulteração. A  $\gamma_1$ -CN observada no espectro da amostra TRV não foi observada no perfil eletroforético dessas amostras, o que leva à conclusão, baseada no método eletroforético utilizado, de que os fabricantes utilizam apenas leite de búfala na composição das muçarelas produzidas.



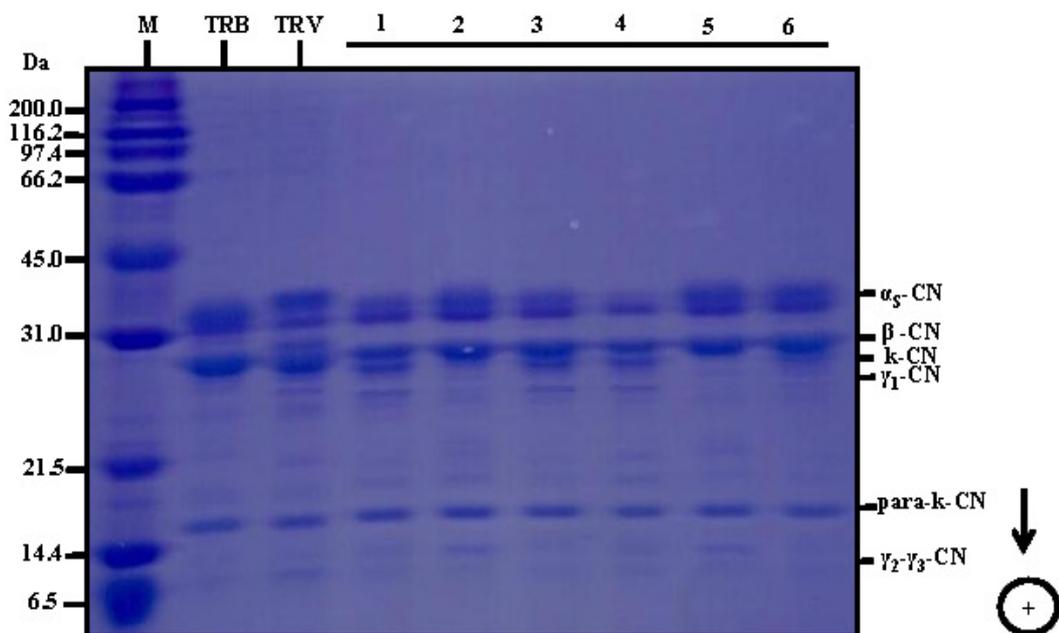
**Figura 5.** Perfil eletroforético (SDS-PAGE) de amostras comerciais de queijo muçarela, revelado com Azul de Coomassie. Depositaram-se 20  $\mu$ G de proteínas em cada poço. M, Marcador de massa molar; TRB, tratamento referência búfala; TRV, tratamento referência vaca; 1 – 6, amostras;  $\alpha_s$ -CN,  $\alpha_s$ -caseína;  $\beta$ -CN,  $\beta$ -caseína; k-CN, k-caseína;  $\gamma$ -CN, gamas-caseínas.



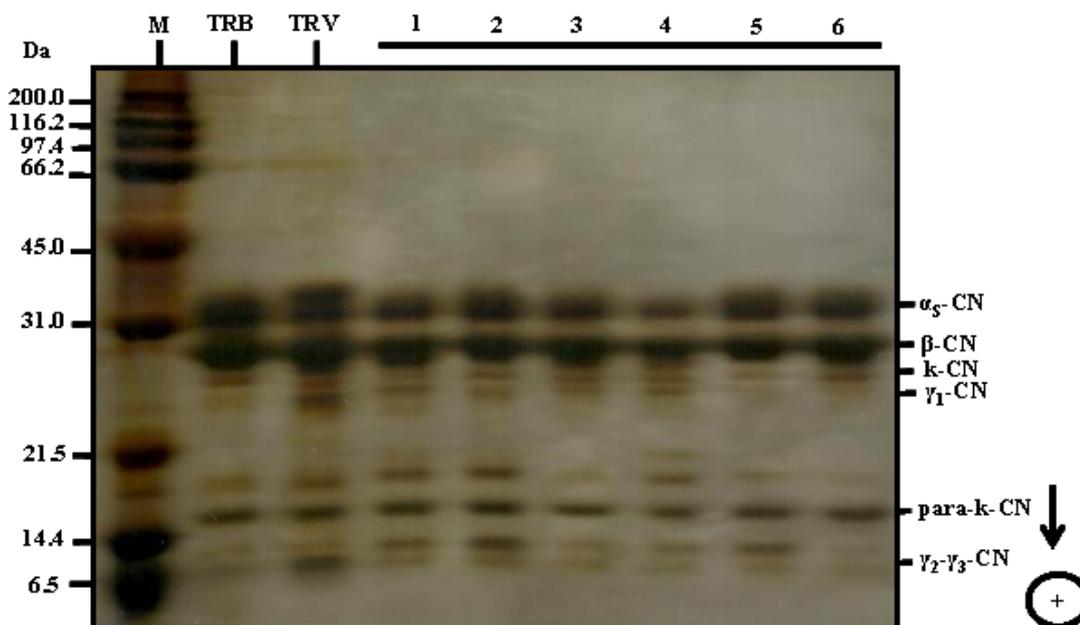
**Figura 6.** Perfil eletroforético (SDS-PAGE) de amostras comerciais de queijo muçarela, revelado com Nitrato de Prata. Depositaram-se 20  $\mu$ G de proteínas em cada poço. M, Marcador de massa molar; TRB, tratamento referência búfala; TRV, tratamento referência vaca; 1 – 6, amostras;  $\alpha_s$ -CN,  $\alpha_s$ -caseína;  $\beta$ -CN,  $\beta$ -caseína; k-CN, k-caseína;  $\gamma$ -CN, gamas-caseínas.

A Figura 7 e a Figura 8 demonstram o perfil eletroforético de seis amostras comerciais de muçarela de búfala e também TRB e TRV. De acordo com as análises realizadas, em apenas uma amostra comercial, não foi detectada adulteração. A  $\gamma_1$ -CN observada no espectro da amostra TRV foi observada no perfil eletroforético em cinco das seis amostras analisadas, o que leva à conclusão, baseada no método utilizado, de que os fabricantes não cumpriram o que está descrito na embalagem das muçarelas produzidas.

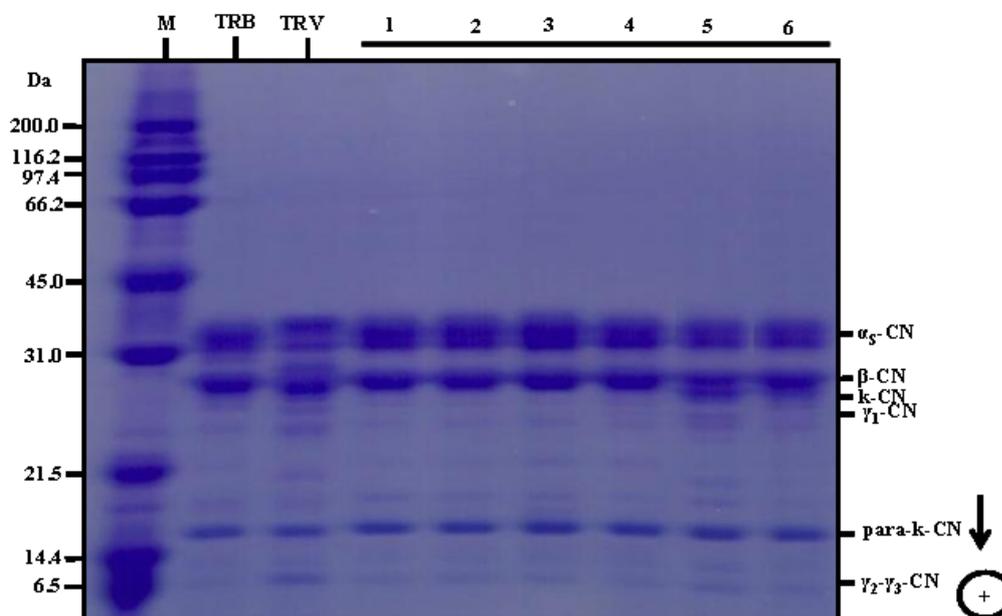
Seis amostras comerciais de muçarela de búfala e também TRB e TRV, foram analisadas em gel de poliacrilamida na presença de SDS e os perfis de proteínas foram corados com Azul de Coomassie (Figura 9) e Nitrato de Prata (Figura 10). De acordo com as análises realizadas, em duas amostras comerciais analisadas foram detectadas adulterações. A  $\gamma_1$ -CN observada no espectro da amostra TRV foi observada no perfil eletroforético dessas amostras, o que leva à conclusão, baseada no método utilizado, de que os fabricantes não cumpriram o que este descrito na embalagem das muçarelas produzidas.



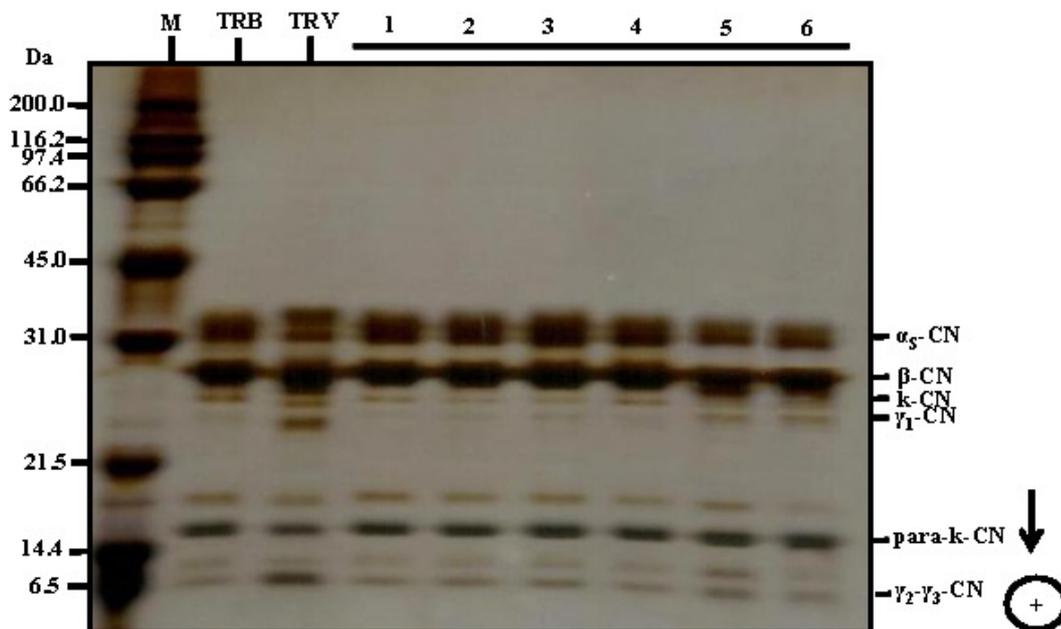
**Figura 7.** Perfil eletroforético (SDS-PAGE) de amostras comerciais de queijo muçarela, revelado com Azul de Coomassie. Depositaram-se 20  $\mu$ G de proteínas em cada poço. M, Marcador de massa molar; TRB, tratamento referência búfala; TRV, tratamento referência vaca; 1 – 6, amostras;  $\alpha_s$ -CN,  $\alpha_s$ -caseína;  $\beta$ -CN,  $\beta$ -caseína; k-CN, k-caseína;  $\gamma$ -CN, gamas-caseínas.



**Figura 8.** Perfil eletroforético (SDS-PAGE) de amostras comerciais de queijo muçarela, revelado com Nitrato de Prata. Depositaram-se 20  $\mu$ G de proteínas em cada poço. M, Marcador de massa molar; TRB, tratamento referência búfala; TRV, tratamento referência vaca; 1 – 6, amostras;  $\alpha_s$ -CN,  $\alpha_s$ -caseína;  $\beta$ -CN,  $\beta$ -caseína; k-CN, k-caseína;  $\gamma$ -CN, gamas-caseínas.



**Figura 9.** Perfil eletroforético (SDS-PAGE) de amostras comerciais de queijo muçarela, revelado com Azul de Coomassie. Depositaram-se 20  $\mu$ G de proteínas em cada poço. M, Marcador de massa molar; TRB, tratamento referência búfala; TRV, tratamento referência vaca; 1 – 6, amostras;  $\alpha_s$ -CN,  $\alpha_s$ -caseína;  $\beta$ -CN,  $\beta$ -caseína; k-CN, k-caseína;  $\gamma$ -CN, gamas-caseínas.



**Figura 10.** Perfil eletroforético (SDS-PAGE) de amostras comerciais de queijo muçarela, revelado com Nitrato de Prata. Depositaram-se 20  $\mu$ G de proteínas em cada poço. M, Marcador de massa molar; TRB, tratamento referência búfala; TRV, tratamento referência vaca; 1 – 6, amostras;  $\alpha_s$ -CN,  $\alpha_s$ -caseína;  $\beta$ -CN,  $\beta$ -caseína; k-CN, k-caseína;  $\gamma$ -CN, gamas-caseínas.

Baseado nos resultados referentes à presença da  $\gamma_1$ -CN, das dezoito amostras analisadas, sete (38,9%) apresentaram perfis eletroforéticos compatíveis com adulteração por leite de vaca. Em todas as amostras observou-se que, após coloração dos géis com Nitrato de Prata, novos peptídeos apareceram de forma mais clara, quando comparados com a coloração Azul de Coomassie. Isto ocorre em decorrência da sensibilidade da coloração de Nitrato de Prata, que detecta nanogramas de proteínas.

Buzi et al. (2009) por meio da eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de uréia (Uréia-PAGE), observaram a diferença de mobilidade das frações homólogas das caseínas de origem bovina e bubalina, e baseado nos resultados referentes às mobilidades relativas (RF) de cada banda comprovaram a presença do leite de vaca em 22% das amostras de muçarela de búfala, comercializadas como 100% bubalino em diferentes cidades do Estado de São Paulo.

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 eletroforética das amostras comerciais de queijo muçarela de búfala, nem todas estão em conformidade com as especificações do rótulo. A amostra que continha o Selo de Pureza 100% búfalo concedida pela ABCB impresso na embalagem, segundo a análise eletroforética empregada, continha apenas leite

bubalino na sua composição, comprovando, assim, a sua veracidade. O selo de pureza, além de proporcionar um produto diferenciado no mercado, atua como chancela importante, dando ao consumidor a garantia de comprar uma mercadoria legítima. A indústria visando um maior lucro ou a escassez do leite em algum período do ano pode adicionar intencionalmente leite de vaca, uma vez que o leite de búfala tem um valor comercial mais alto.

Prado (2010) relata que quando um laticínio quer adquirir o do Selo de Pureza 100% búfalo concedido pela ABCB, ele paga uma taxa e assina um contrato no qual se compromete a trabalhar somente com leite de búfala. O laticínio passa por uma avaliação técnica e seus produtos por análise laboratorial e somente depois é concedida a permissão de uso do selo. Quatro vezes ao ano são recolhidos produtos derivados de leite de búfala no mercado e encaminhados para análise eletroforética, e as amostras passam por um teste de pureza que detecta se há ou não presença de leite de vaca.

#### **4. CONCLUSÃO**

A técnica desenvolvida foi capaz de identificar a presença de leite bovino em sete (38,9%) amostras de muçarelas de búfala comercializadas no Estado da Bahia. A partir da fração de  $\gamma 1$ -CN foi possível identificar a presença de leite de vaca no queijo muçarela de búfala pela técnica de eletroforese por SDS-PAGE utilizando-se a coloração de Azul de Coomassie, e de forma mais nítida com a coloração de Nitrato de Prata, podendo esta técnica ser utilizada para identificação de fraudes de queijos, auxiliando na verificação da autenticidade de muçarelas de búfala comercializadas no Estado da Bahia.

## 5. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ADDEO, F.; MOIO, L.; CHIANESE, L. et al. Use of plasmin to increase the sensitivity of the detection of bovine milk in cheese by gel isoelectric focusing of  $\gamma$ 2-caseins. **Milchwissenschaft**, v.45, p.708-711, 1990.

ADDEO, F.; PIZZANO, R.; NICOLAI, M. A.; CAIRA, S.; CHIANESE, L. Fast Isoelectric Focusing and Antipeptide Antibodies for Detecting Bovine Casein in Adulterated Water Buffalo Milk and Derived Mozzarella Cheese. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v.57, p.10063–10066, 2009.

AHMAD, S.; GAUCHER, I.; ROUSSEAU, F.; BEAUCHER, E.; PIOT, M.; GRONGNET, J. F.; GAUCHERRON, F. Effects of acidification physico-chemical characteristics of buffalo milk: A comparison with cow's milk. **Food chemistry**, California, v.1, n.106, p.11-17, jan., 2008.

BALESTRIERI, M.; SPAGNOLO, M. S.; CIGLIANO, L.; STORTI, G.; FERRARA, L.; ABRESCIA, P.; FEDELE E. et al. Evaluation of oxidative damage in mozzarella cheese produced from bovine or water buffalo milk. **Food Chemistry**, California, v.77, p.293-299. 2002.

BLOOM, H.; BEIER, H. S. Improved silver staining of plant protein, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Eletroforeses**, v.8, p.93-99, 1987.

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**, Campinas, v.29, n.1, p.7-11, jan./mar., 2009.

CHIANESE, L.; QUARTO, M.; PIZZOLONGO, F.; CALABRESE, M. G.; CAIRA, S.; MAURIELLO, R.; PASCALE, S. de; ADDEO, F. Occurrence of genetic polymorphism at the as1-casein locus in Mediterranean water buffalo milk. **International Dairy Journal**, England, v.19, p.181–189, 2009.

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**, Champaign, v.92, n.4, p.1319-1329, 2008.

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**, Belo Horizonte, v.58, n.5, p.932-939, 2006.

EIGEL, W. N. formation of  $\gamma$ 1-A2,  $\gamma$ 2-A2 and  $\gamma$ 3-A2 caseins by in vitro proteolysis of  $\beta$ -casein A2 with bovine plasmin. **Institute Journal Biochemistry**, v.8, p.187-192, 1977.

FELIGINI, M.; BONIZZI, I.; BUFFONI, J. N.; COSENZA, G.; RAMUNNO, L. Identification and Quantification of  $\alpha$ <sub>1</sub>-,  $\alpha$ <sub>2</sub>-,  $\beta$ - e  $\kappa$ -Caseins in Water Buffalo Milk by Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography and Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v.57, p.2988–2992, 2009.

HINZ, K.; CONNOR, P. M. O’.; 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.

KELLY, A. L.; MCSWEENEY, P. L. H. Indigenous proteolytic enzymes in milk. **Advanced Dairy Chemistry**, New York. Proteins, v.1, ed.3, p.495-544, 2003.

LOCCI, F.; GHIGLIETTI, R.; FRANCOLINO, S.; IEZZI, R.; OLIVIERO, V.; GAROFALO, A.; MUCCHETTI, G. Detection of cow milk in cooked buffalo mozzarella used as pizza topping. **Food chemistry**, California, v.107, p.1337-1341, out., 2008.

POLITIS, I.; BARBANO, D. M.; GOREWIT, R. C. Distribution of plasminogen and plasmin in fractions of bovine milk. **Journal Dairy Science**, Champaign, v.75, p.1402-1410, 1992.

PRADO, M. C. de A. Gato por lebre? **Revista Folha de São Paulo/Caderno Ilustrada**. 14 de janeiro de 2010. Disponível em: <http://selodabufala.com.br/2011/02/folha-sp-gato-por-lebre/>. Acesso em 18 de jan. 2013.

SOMMA, A., FERRANTI, P., ADDEO, F., MAURIELLO, R., CHIANESE, L. A peptidomic approach based on combined capillary isoelectric focusing and mass spectrometry analysis for the characterization of the plasmin primary products from bovine and water buffalo b-casein. **Journal of Chromatography**, v.1192, p.294–300, 2008.

VELOSO, A. C. A. Detecção de Adulteração em produtos alimentares contendo leite e/ou proteínas lácteas. **Química Nova**, São Paulo, v.25, n.4, p.609-15, 2002.

## CAPÍTULO II

FALEIRO, A. dos S. **Composição centesimal e propriedades físicas para verificação da qualidade de muçarelas de búfala comercializadas no Estado da Bahia.** Itapetinga – BA: UESB, 2013. p.70 (Dissertação – Mestrado em Engenharia de Alimentos).\*

### RESUMO

Objetivou-se com o presente estudo avaliar a composição centesimal e as propriedades físicas de muçarelas de búfala comercializadas no Estado da Bahia para verificação da qualidade e identificação de adulteração por adição de leite de vaca. As amostras comerciais foram adquiridas de cinco marcas (M1, M2, M3, M4 e M5), em diferentes cidades do Estado da Bahia. As análises de composição centesimal e propriedades físicas das amostras comerciais do queijo muçarela de búfala foram realizadas, em triplicata, para percentuais de umidade, cinzas, gordura no extrato seco (GES), proteína total, extrato seco total (EST), teores de acidez, pH e avaliação de cor. O delineamento experimental realizado foi o Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), analisado por meio de Análise de Variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey adotando-se a significância de 5% ( $\alpha = 0,05$ ). Os resultados de composição centesimal das muçarelas comerciais revelaram diferença estatística ( $p < 0,05$ ) apenas para o teor de cinzas. Com relação às propriedades físicas, foi observada diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) para o parâmetro acidez titulável e para os valores de cromaticidade  $a^*$  entre as muçarelas comerciais. A legislação vigente preconiza teores mínimos e máximos apenas para os parâmetros de % GES e umidade respectivamente, as muçarelas estudadas estão de acordo com a legislação. Apesar de alguns parâmetros estudados apresentarem diferenças estatísticas quando comparadas as muçarelas comerciais, não foi possível identificar diferenças de qualidade por meio de sua composição centesimal e suas propriedades físicas. Assim como, detectar autenticidade de muçarelas, sendo necessário o emprego de outras técnicas para verificação de adulterações em muçarelas elaboradas com leite de búfalas.

**Palavras-chave:** cor, fraude e queijo.

---

\*Orientadora: Sibelli Passini Barbosa Ferrão, *D.Sc.*, UESB e Co-orientadores:, Antonio Silvio do Egito Vasconcelos, *D.Sc.*, EMBRAPA; Sérgio Augusto de Albuquerque Fernandes *D.Sc.*, UESB.

## CHAPTER II

FALEIRO, A. dos S. Centesimal composition and physical properties for verifying the quality of Buffalo muçarelas marketed in the State of Bahia. Itapetinga – BA: UESB, 2013. p.70 (Dissertation-master's degree in food engineering).\*

### ABSTRACT

The aim with this study assess the centesimal composition and the physical properties of muçarelas buffalo milk sold in the State of Bahia to verify quality and identification of adulteration by addition of cow's milk. The commercial samples were acquired from five brands (M1, M2, M3, M4 and M5) in different cities in the State of Bahia. The centesimal composition analysis and physical properties of commercial samples of Buffalo mozzarella cheese were carried out in triplicate, for percentages of moisture, ash, fat in the dry extract (GES), total protein, total dry extract (EST), the levels of acidity, pH and color evaluation. The experimental design was the completely randomized design (DIC), analyzed by analysis of variance (ANOVA) and averages compared by Tukey test using the significance of 5% ( $\alpha = 0.05$ ). The results of centesimal composition of commercial muçarelas showed statistical difference ( $p < 0.05$ ) only for the ash content. With regard to physical properties, a statistically significant difference was observed ( $p < 0.05$ ) for the parameter titratable acidity and for the chromaticity values between the commercial muçarelas. The current legislation calls for minimum and maximum levels for the % moisture and the GES muçarelas studied in compliance with the legislation. Although some parameters studied showed statistical differences when compared to the commercial muçarelas, it has not been possible to identify differences in quality by means of centesimal composition and its physical properties. As well as detect the authenticity of muçarelas, being necessary the use of other techniques for verification of adulteration in milk with muçarelas of buffaloes.

**Keywords:** color, fraud and cheese.

---

\* Advisor: Sibelli Passini Barbosa Ferrão, *D.Sc.*, UESB e Co-advisors:, Antonio Silvio do Egito Vasconcelos, *D.Sc.*, EMBRAPA; Sérgio Augusto de Albuquerque Fernandes *D.Sc.*, UESB.

## 1. INTRODUÇÃO

As características do leite de búfala tais como a maior quantidade de extrato seco total, o maior conteúdo de vitamina A, gordura, proteína e alguns minerais em relação ao leite bovino refletem as peculiaridades que despertam interesse na sua comercialização na forma de derivados encontrados no comércio, acarretando preços diferenciados, além de estimular a produção de produtos diversificados em seus laticínios.

O derivado mais comum e tradicional é o queijo muçarela, de origem Italiana e massa filada, cujas características de cor, maciez e paladar suave, levam a uma procura dos consumidores por produtos derivados dessa espécie e aumentam a produtividade e rentabilidade desses derivados. Apesar de o queijo muçarela ser de origem Italiana, ele é conhecido, produzido, apreciado e consumido no mundo todo, e especialmente no Brasil, onde se destaca como sendo o queijo mais fabricado, representando cerca de 33% da produção total de queijos. A maior utilização e consumo do queijo muçarela são como ingrediente para a confecção de inúmeros pratos quentes, sanduíches, pizzas, entre outros alimentos, que visam explorar as suas propriedades para fatiamento e a sua facilidade de derretimento (VALLE et al., 2004).

A composição nutricional do queijo é determinada por diferentes parâmetros, incluindo o tipo de leite (espécie, tipo de alimentação, fase de lactação e teor de gordura), condições de manufatura e maturação. É um concentrado dos nutrientes que se encontram no leite. O próprio leite é um alimento quase completo, que faz parte da alimentação diária (PINHO & FERREIRA, 2006).

A muçarela pode ser encontrada em líquido de conservação (que contém sal e ácido cítrico), em embalagem plástica a vácuo, ou com atmosfera modificada (com nitrogênio e dióxido de carbono), sendo que essas duas últimas apresentações aumentam a vida de prateleira do produto (TEIXEIRA et al., 2005). Verruma-Bernardi & Damásio (2004) realizaram processamento de muçarela pelo método tradicional e por acidificação direta e observaram que o queijo muçarela elaborado pelo método tradicional apresentou cor mais branca, maior firmeza e fibrosidade enquanto o elaborado pela acidificação direta, apresentou-se mais macio, com maior umidade e coloração esverdeada.

O queijo muçarela brasileiro possui uma composição centesimal e propriedades físicas irregulares, devido à inexistência de padrões legais e grandes variações nos métodos de elaboração. Segundo o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), o queijo tipo muçarela é o produto obtido a partir do leite pasteurizado,

de massa filada e não prensada, entregue ao consumo até cinco dias após a fabricação, devendo apresentar-se com formato variável, entre cilíndrico chato e retangular, peso de 15 g a 4 kg, crosta fina, consistência de massa semi-dura, textura compacta e fechada, cor branco-creme e homogênea (BRASIL, 2007).

A autêntica muçarela preparada exclusivamente com leite de búfala, pelo aumento da procura e a escassez da matéria-prima, vem sofrendo algumas modificações, de forma que nos dias atuais é possível encontrar muçarelas elaboradas somente com leite de búfala, outras com uma mistura de leites de búfala e vaca, além daquelas produzidas somente com leite de vaca. Segundo Buzi (2006) e Dias (2009), a incorporação de leite de vaca à muçarela de búfala é permitida, contudo tal especificação deve estar contida no rótulo. Assim, objetivou-se com o presente estudo avaliar a composição centesimal e as propriedades físicas de muçarelas de búfala comercializadas no Estado da Bahia para verificação da qualidade e identificação de adulteração por adição de leite de vaca.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Obtenção das amostras**

As amostras de cinco marcas (M1, M2, M3, M4 e M5) comercializadas no comércio varejista do Estado da Bahia foram adquiridas em lotes distintos totalizando 18 amostras analisadas, sendo que apenas uma marca apresentava no rótulo o selo de pureza adquirido pela Associação Brasileira de Criadores de Búfala (ABCB), que certifica conter apenas leite de búfala. Em todas as amostras o rótulo continha informações de que o produto era elaborado apenas com leite de búfala. Todos os queijos estavam embalados a vácuo e apresentavam registro no Serviço de Inspeção Estadual (SIE). As coletas ocorreram em diferentes cidades do Estado da Bahia no período de dezembro de 2011 a agosto de 2012, todas as amostras foram adquiridas em suas embalagens originais, sob refrigeração em câmaras frigoríficas a temperatura de 4 °C a 8 °C, transportadas no mesmo dia para o Laboratório de Processamento de Leite e Derivados da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) – Itapetinga/BA e posteriormente congeladas a -20 °C para interromper processos enzimáticos, até o momento de análise.

### **2.2. Realização das análises**

As análises de composição centesimal e propriedades físicas das amostras comerciais do queijo muçarela de búfala foram realizadas, em triplicata, na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia UESB – Itapetinga/BA, nos Laboratórios de Processamento de Leite e Derivados, Nutrição, Engenharia e Processos e no Centro de Desenvolvimento e Difusão de Tecnologias. Foram determinados os percentuais de umidade, cinzas, gordura no extrato seco (GES), proteína total, extrato seco total (EST), e os teores de acidez, pH e cor.

#### **2.2.1. Composição centesimal**

O percentual de umidade foi determinado pelo método gravimétrico em estufa a 105 °C, durante um período de 24 horas, ou até obter massa constante. As cinzas foram determinadas pelo método gravimétrico, baseado na perda de massa por incineração em mufla a 550 °C. O percentual de gordura foi determinado pelo método de Gerber e para a obtenção da Gordura no Extrato Seco (GES), dividiu-se o teor de gordura pelo extrato seco,

multiplicado por 100. O teor de nitrogênio total (NT) foi obtido pelo método de Kjeldahl, usando o fator de conversão de 6,38 para o cálculo da proteína total. O percentual de Extrato Seco Total (EST) foi obtido por diferença de todos os componentes do queijo, com exceção da água, utilizando a fórmula:  $EST = 100 - \text{Umidade}$  (BRASIL, 2006).

### **2.2.2. Propriedades físicas**

A determinação do pH foi realizada pela leitura, por meio de pHmetro modelo QUIMIS, calibrado com soluções tampões pH 4,0 e pH 7,0. A acidez titulável (g/100g de ácido láctico) foi determinada por meio de titulação, sendo os resultados expressos em percentagem de ácido láctico (BRASIL, 2006). A cor foi avaliada por meio de um colorímetro modelo Colorquest XE (HunterLab) conectado a um computador provido de sistemas software universal. O sistema utilizado foi o CIEL\*a\*b\* (CIE, 1996), onde foram medidas as coordenadas: L\*, representando a luminosidade em uma escala de 0 (preto) a 100 (branco); coordenada de cromaticidade a\* que representa uma escala de tonalidade variando de vermelho (0+a) a verde (0-a) e coordenada de cromaticidade b\* que representa uma escala de amarelo (0+b) a azul (0-b).

### **2.3. Análises Estatísticas**

O delineamento experimental realizado foi o Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), analisados por meio de Análise de Variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey adotando-se a significância de 5% ( $\alpha = 0,05$ ). Utilizou-se o Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas (SAEG), versão 9.1. (RIBEIRO JÚNIOR, 2001).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Composição centesimal

Os resultados de composição centesimal estão ilustrados na Tabela 4. De acordo com a análise estatística utilizada, houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) apenas para o teor de cinzas entre as muçarelas comerciais.

**Tabela 4.** Médias e coeficiente de variação (CV), para composição centesimal de queijos comerciais de muçarela de búfala.

Parâmetros	Marcas					CV %
	M1	M2	M3	M4	M5	
% GES <sup>1</sup>	77,00 <sup>a*</sup>	68,57 <sup>a</sup>	59,73 <sup>a</sup>	71,47 <sup>a</sup>	64,38 <sup>a</sup>	<b>9,65</b>
% Umidade	42,20 <sup>a</sup>	44,58 <sup>a</sup>	45,66 <sup>a</sup>	41,53 <sup>a</sup>	43,72 <sup>a</sup>	<b>3,83</b>
% Cinzas	3,68 <sup>a</sup>	6,33 <sup>a,b</sup>	5,74 <sup>a</sup>	5,85 <sup>a</sup>	7,06 <sup>a</sup>	<b>7,09</b>
% Proteína	22,14 <sup>a</sup>	21,71 <sup>a</sup>	21,37 <sup>a</sup>	22,14 <sup>a</sup>	19,09 <sup>a</sup>	<b>9,67</b>
% EST <sup>2</sup>	57,81 <sup>a</sup>	55,42 <sup>a</sup>	54,34 <sup>a</sup>	58,47 <sup>a</sup>	56,29 <sup>a</sup>	<b>2,95</b>

\*Médias seguidas por letras minúsculas iguais na linha não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade; 1 – Gordura no Extrato Seco; 2 – Extrato Seco Total

Os valores médios obtidos para o parâmetro Gordura no Extrato Seco (GES), entre as diferentes marcas de muçarela variaram de 59,73% a 77,00%. Valores superiores ao encontrado por Marchiori (2006), que avaliando a qualidade nutricional do queijo muçarela convencional elaborado com leite de búfala encontrou valor médio de 38,92%. Os resultados encontrados estão de acordo com a legislação vigente para queijos, que determina um valor mínimo de 35% para a gordura expressa em base seca (BRASIL, 1997).

Os resultados encontrados para umidade também estão de acordo com a legislação vigente, que determina um valor máximo de 60%, e os queijos podem ser classificados como de média umidade (umidade entre 36% e 45,9%) (BRASIL, 1997). Verruma-Bernardi et al. (2000) ao compararem queijo muçarela obtida pelo método tradicional e por acidificação direta encontraram variação de umidade entre 44,50% a 47,22% e de 47,47% a 48,07%, respectivamente. Uma das etapas do processamento da muçarela é o corte da massa, que objetiva aumentar a área superficial das partículas de massa, o que por sua vez permite a expulsão do soro e um aquecimento mais uniforme de todas as partículas de massa no tanque. Quanto menor o tamanho das partículas, maior é a sinérese e, conseqüentemente, menor a

umidade do queijo (JUNIOR FURIGO et al., 2006), e tal fato pode justificar a umidade encontrada nas muçarelas comerciais, pois não se sabe qual o tipo de processamento foi seguido pelos laticínios. Segundo Munck (2004), a umidade do queijo não pode ser muita elevada, pois isso implica em grande separação de soro quando aquecidos.

Os valores obtidos para o teor de cinzas foram entre 3,68% a 7,06%, valores superiores ao encontrado por Verruma-Bernardi et al. (2000), que comparando queijo muçarela obtido pelo método tradicional e por acidificação direta encontraram variação de cinzas entre 2,66% a 2,76% para o método tradicional e de 2,56% a 2,58%, para a acidificação direta. Marchiori (2006) avaliando a qualidade nutricional do queijo muçarela convencional elaborado com leite de búfala encontrou um valor médio de 1,87%. Dentre as marcas analisadas verificou-se que a marca nomeada de M2 foi a que apresentou diferença estatística entre as demais, com valor médio de 6,33%. De acordo com a caracterização eletroforética, a mesma foi uma das marcas em que foi detectada adulteração por adição de leite de vaca.

Os teores de proteína das muçarelas comerciais variaram entre 19,09% e 22,14%, estes valores foram semelhantes ao encontrado por Teixeira et al. (2005) que obtiveram valores de proteína entre 19,0% e 20,0%. Os resultados desta pesquisa, para o teor de proteína, corroboram com os resultados de Verruma-Bernardi et al. (2000), que encontraram valor médio de proteína de 21,15%. Oliveira et al. (2009) avaliando a composição química e o perfil de ácidos graxos do leite e muçarela de búfalas alimentadas com diferentes fontes de lipídeos encontraram valor médio de proteína bruta de 42,59% para muçarelas elaboradas com leite de búfalas alimentadas sem adição de lipídios na dieta (tratamento controle), 45,41% para muçarelas elaboradas com leite de búfalas alimentadas com adição de grão de soja na dieta e 42,82% para muçarelas de búfalas alimentadas com adição de óleo de soja na dieta. De acordo, com os valores médios encontrados para o parâmetro proteína, não é possível verificar autenticidade das muçarelas comerciais, uma vez que não são os teores de proteína na muçarela que levam à diferenciação entre as espécies e sim as frações protéicas que são geradas durante o processamento e identificadas por análise de eletroforese, por exemplo.

Foi observado um elevado teor de EST para as muçarelas comerciais (entre 54,34% a 58,47%), quando comparados aos dados de alguns autores, o que pode estar relacionado ao elevado teor de sólidos totais (ST) presente no leite de búfalas. Friano et al. (2008) encontraram valores entre 49,31% e 52,90%, enquanto que Oliveira et al. (2009) encontraram valor médio de 42,38%. Segundo Valle (1991), o teor de ST dos queijos pode ser influenciado

por vários fatores como temperatura de coagulação, corte, temperatura e velocidade de aquecimento.

Os valores obtidos para GES, umidade, proteína e EST de muçarelas comerciais de búfala não foram influenciados pela adição ou não de leite de vaca.

### 3.2. Propriedades físicas

Os resultados dos parâmetros de acidez titulável, pH e avaliação de cor das muçarelas comerciais estão ilustrados na Tabela 5.

**Tabela 5.** Médias e coeficiente de variação (CV), para as propriedades físicas de queijos comerciais de muçarela de búfala.

Parâmetros	Marcas					CV
	M1	M2	M3	M4	M5	
Acid. Titul. <sup>1</sup>	1,78 <sup>a,b*</sup>	1,97 <sup>a</sup>	1,91 <sup>a,b</sup>	1,43 <sup>b</sup>	1,42 <sup>a,b</sup>	<b>13,07</b>
pH	5,83 <sup>a</sup>	5,97 <sup>a</sup>	5,81 <sup>a</sup>	5,93 <sup>a</sup>	5,90 <sup>a</sup>	<b>1,78</b>
L*	90,47 <sup>a</sup>	89,67 <sup>a</sup>	89,40 <sup>a</sup>	88,55 <sup>a</sup>	87,55 <sup>a</sup>	<b>2,01</b>
a*	-2,08 <sup>a,b</sup>	-2,71 <sup>b,c</sup>	-2,89 <sup>a,b,c</sup>	-1,95 <sup>a</sup>	-2,83 <sup>c</sup>	<b>-12,06</b>
b*	17,87 <sup>a</sup>	19,17 <sup>a</sup>	16,22 <sup>a</sup>	19,19 <sup>a</sup>	18,22 <sup>a</sup>	<b>8,57</b>

\*Médias seguidas por letras minúsculas iguais na linha não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade; 1 – Acidez titulável; L – Luminosidade; a\* - Cromaticidade a; b\* - Cromaticidade b

De acordo com as análises realizadas foi observada diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) para o parâmetro acidez titulável entre as muçarelas comerciais. Segundo Ferreira (2004), a acidez do queijo é decorrente da ação do fermento utilizado na fabricação, com produção de ácido lático a partir da degradação da lactose residual. Não se conhece o processamento e, conseqüentemente, o fermento utilizado na preparação da muçarela de cada marca, podendo este fato explicar a diferença encontrada neste atributo. A marca nomeada de M2 foi a que apresentou maior valor de acidez titulável, seguida da marca nomeada de M3 e M1. De acordo com o teste estatístico empregado essas três marcas não diferiram entre si para o parâmetro acidez titulável. Com relação à análise eletroforética, verificou-se que as muçarelas de búfalas comerciais das marcas M2 e M3 foram adulteradas por adição de leite de vaca. Assim, o parâmetro de acidez titulável não apresentou eficiência para detecção de

adulteração, pois de acordo com o teste estatístico as muçarelas comerciais das marcas M1, M2 e M3 são iguais.

Avaliando-se os dados da Tabela 5, verifica-se que não houve diferença ( $p > 0,05$ ) para os valores médios de pH das muçarelas comerciais. Os valores encontrados (entre 5,81 a 5,97) foram elevados e discordam dos dados de alguns autores, pois segundo Furtado & Lourenço Netto (1994) o valor de pH para queijo muçarela situa-se entre 5,1 e 5,3. Bomfim et al. (2005) avaliaram muçarela de leite de búfala armazenada no soro e os valores de pH estiveram entre 4,6 a 5,67. É provável que as amostras de muçarela avaliadas tenham sido produzidas por diferentes métodos de fermentação, pois a muçarela pode ser produzida com bactérias lácticas mesofílicas, termofílicas e alguns estabelecimentos utilizam a própria microbiota natural predominante e, dessa forma, o tipo de fermentação utilizada na elaboração da muçarela modifica o perfil de fermentação e, conseqüentemente, a acidificação. A concentração hidrogeniônica, que determina o pH dos alimentos, é um dos principais fatores que exercem influência sobre o crescimento, a sobrevivência ou a destruição dos microrganismos que nele se encontram presentes (SILVA, 2000). O aumento do pH pode estar associado com a formação de compostos nitrogenados como aminoácidos, aminas e/ou amônia, oriundos da proteólise que ocorre com o tempo (BARROS, 2005). Yunes & Benedet (2000) citaram que queijos frescos obtidos a partir do leite de búfala apresentaram valores de pH superiores aos obtidos a partir do leite de vaca, devido fundamentalmente pela tendência dos produtos fermentados de leite de búfala acidificarem-se mais lentamente.

A característica marcante do leite de búfala é a sua coloração totalmente branca, devido à ausência total de pigmentos carotenóides, que conferem coloração branca à manteiga e aos queijos produzidos (MADELLA-OLIVEIRA et al., 2005). Os carotenóides ocorrem em alimentos na forma de misturas simples de alguns compostos ou como misturas muito complexas. As misturas mais simples são encontradas em produtos de origem animal, devido à limitada habilidade desses organismos de absorver e depositar carotenóides (ARAÚJO, 2004).

O comportamento dos parâmetros luminosidade ( $L^*$ ) e coordenadas de cromaticidade ( $a^*$  e  $b^*$ ) utilizados para a determinação da cor nas muçarelas de diferentes marcas podem ser observados na Tabela 5. Para os parâmetros  $L^*$  e  $b^*$  não foram observadas diferenças estatísticas ( $p > 0,05$ ). Quanto aos valores de cromaticidade  $a^*$  foi observada significância ( $p < 0,05$ ). O parâmetro  $L^*$  indica a luminosidade e pode determinar valores entre zero (0) e cem (100), sendo denominado como preto e branco, respectivamente, sendo que quanto maior o valor de  $L^*$ , mais claro é o queijo (PADRE, 2007). Os elevados valores de  $L^*$  encontrados

são compatíveis com esta coloração mais clara nestes queijos quando comparados aos queijos elaborados com leite de vaca, pois o queijo muçarela de búfala é caracterizado por apresentar coloração esbranquiçada devido à ausência quase que total de  $\beta$ -caroteno. Verruma-Bernardi et al. (2007) ao avaliarem a muçarela de búfala elaborada pelo método tradicional encontraram o valor de 89,61 para o parâmetro de luminosidade. A variação no presente trabalho, para o parâmetro  $L^*$  foi entre 87,55 a 90,47, valores próximos ao que determina a cor branca dos alimentos.

As coordenadas de cromaticidade  $a^*$  e  $b^*$  indicam as direções das cores, desta forma,  $a^*$  maior que zero vai em direção ao vermelho,  $a^*$  menor que zero em direção ao verde,  $b^*$  maior que zero em direção ao amarelo e  $b^*$  menor que zero em direção ao azul.

Os valores de  $b^*$  foram positivos ( $+b^*$ ) em direção ao amarelo, sem diferença entre as amostras e de acordo com a legislação vigente para queijo muçarela, a cor poderá ser de branco a amarelo uniforme (BRASIL, 1997).

Já os valores de  $a^*$  foram negativos ( $-a^*$ ) em direção ao verde. Verruma-Bernardi & Damásio (2004) verificaram coloração esverdeada em queijo muçarela elaborado pela acidificação direta. Segundo Van Dender (1989), isto é devido à presença do pigmento biliverdina associado à  $\alpha$ -caseína do leite, que precipita juntamente com as proteínas, pela ação de ácido e calor, produzindo um precipitado esverdeado. Foram verificadas diferenças estatísticas entre as marcas, porém as marcas em que foram detectadas adulterações, por meio de análise eletroforética, (M2 e M3) são iguais estatisticamente à marca nomeada de M5 que não foi detectada adulteração por adição de leite de vaca durante o processamento, ou seja, o parâmetro de avaliação de cor em muçarelas não é o suficiente para identificar adulteração. Isto porque, há tratamentos químicos capazes de tornar mais brancos, queijos feitos de leite de vaca, para que estes possam ser comercializados como derivados de leite de búfala. Portanto, esta afirmação é uma hipótese para explicar o fato de queijos adulterados apresentarem coloração tendendo para o verde.

#### **4. CONCLUSÃO**

A legislação vigente preconiza teores mínimos e máximos apenas para os parâmetros de % GES e umidade respectivamente, as muçarelas estudadas estão de acordo com a legislação. Apesar de alguns parâmetros estudados apresentarem diferenças estatísticas quando comparadas as muçarelas comerciais, não foi possível identificar diferenças de qualidade por meio de sua composição centesimal e suas propriedades físicas. Assim como, detectar autenticidade de muçarelas, sendo necessário o emprego de outras técnicas para verificação de adulterações em muçarelas elaboradas com leite de búfalas.

## 5. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. 3ª edição. Viçosa: UFV, 478p 2004.

BARROS, C. M. V. Uso de culturas adjuntas e ultrafiltração para melhoria de sabor e textura de queijo Prato com reduzido teor de gordura. 2005. 211p. **Tese** (Doutorado em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP, Campinas. 2005.

BRASIL. Portaria nº 364, de 4 de setembro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Queijo Mozzarella (Muzzarella ou Mussarela). **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 8 set. 1997. Seção 1.

BRASIL. Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952. Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 07 jul. 2007, Seção 1.

BRASIL. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos para Controle de Leite e Produtos Lácteos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 14 dez. 2006. Seção 1.

BOMFIM, K. S.L.B.; CARVALHO, M.R.B.; TONHATI, H.; GAVIOLLI, V.R.N.; MODESTO, V.C.; CARDONA, H.C.; AIURA, F.S.; GREGGIO, J.M. Proteólise da mozzarella de leite de búfala armazenada em soro. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.60, n.346/347, p.47-52, 2005.

BUZI, K. A. Análise microbiológica e caracterização eletroforética do queijo mussarela, elaborado a partir de leite de búfala. 2006. 71f. **Dissertação** (Mestre em Medicina Veterinária (Área de concentração: Saúde Animal, Saúde Pública Veterinária e Segurança Alimentar). UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP, FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA, BOTUCATU, 2006.

CIE. **Commission Internationale de l'Éclairage**. Colorimetry. Vienna: CIE publication, 2 ed., 1996.

DIAS, S.S. Avaliação da qualidade e autenticidade de derivados de leite de búfala encontrados no varejo do Rio de Janeiro. 2009. 59f. **Dissertação** (Mestre em Ciência de Alimentos) – Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2009.

FERREIRA, D. N. Influência do uso de retentados de baixo fator de concentração no rendimento e na qualidade da mussarela de reduzido teor de gordura feita por acidificação direta. Campinas, 2004, 127p. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP, Campinas. 2004.

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. Trabalho número: 0801020. 29 e 30 de julho de 2008.

FURTADO, M. M.; LOURENÇO-NETTO, J. P. M. **Tecnologia de queijos: Manual técnico para a produção industrial de queijos**. São Paulo: Dipemar, 118p, 1994.

JUNIOR FURIGO, A.; VON HOHENDORFF, C. G.; SANTOS, D. Produção de Queijos. **Monografia** (Engenharia Bioquímica) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

MADELLA-OLIVEIRA, A. F.; QUIRINO, C. R.; ADONA, P. R.; PACHECO, A. Aspectos da comercialização de carne e leite de bubalinos na região Norte Fluminense. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.29, n.1, p.53-54, 2005.

MARCHIORI, J. M. G. Qualidade nutricional dos queijos mussarela orgânico e convencional elaborados com leite de búfala e de vaca. 2006. 57f. **Dissertação** (Mestre em Alimentos e Nutrição), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2006.

MUNCK, A. V. Queijo de Coalho – princípios básicos da fabricação. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.59, n.339, p.13-15, jul./ago., 2004.

OLIVEIRA R. L.; LADEIRA, M. M.; BARBOSA, M. A. A. F.; MATSUSHIT, A M.; SANTOS G. T.; BAGALDO A. R.; OLIVEIRA, R. L. Composição química e perfil de ácidos graxos do leite e muçarela de búfalas alimentadas com diferentes fontes de lipídeos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte v.61, n.3, p.736-744, 2009.

PADRE, J. C. O. Elaboração de queijo leite de cabra tipo mussarela pelo método da acidificação de direta. João Pessoa: UFPB, 2009. **Dissertação** (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal da Paraíba, 2007.

PINHO & FERREIRA, 2006: PINHO, O. & FERREIRA, I. M. P. L. V. O. **Queijo, um alimento para todas as idades**. Entre o queijo tradicional e os novos alimentos funcionais. Leite I + D + T, nº1, p.10-11, jun. de 2006.

RIBEIRO JUNIOR, J. J. **Análises Estatísticas no SAEG**. Viçosa: UFV, 301p, 2001.

SILVA, J. A. **Tópicos da Tecnologia de Alimentos**. São Paulo, SP. Livraria Varela, p.26-137, 2000.

TEIXEIRA, L. V.; BASTINETTO, E.; OLIVEIRA, D. A. A. Leite de búfala na indústria de produtos lácteos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, MG, v.29, n.2, p.96-100, abril/jun., 2005.

VALLE, J. L. E. do. Influência de parâmetros físico-químicos na fermentação e filagem do queijo Mozzarella. São Paulo, 88p, 1991. **Tese de Doutorado**, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, Universidade de São Paulo.

VALLE, J. L. E.; CAMPOS, S.D. da S.; YOTSUYANAGI, K. SOUZA, G. de, Influência do teor de gordura nas propriedades funcionais do queijo tipo Mozzarella. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, SP, v.24, n.4, p.669-673, out./dez., 2004.

VAN DENDER, A. G. F. Utilização artesanal de leite de búfala. **Manual Técnico do Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL**, Campinas. Manual Técnico nº 3, 60p, 1989.

VERRUMA-BERNARDI; DAMÁSIO, M. H.; VALLE, J. L. E.; OLIVEIRA, A. J. de. Elaboração do queijo Mozzarella de leite de búfala pelos métodos tradicional e da acidificação direta. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.20, n.2, p.138-144, maio/ago., 2000.

VERRUMA-BERNARDI, M. R.; DAMASIO, M. H. Análise descritiva de perfil livre em queijo mozzarella de leite de búfala, 7p. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.24, n.4, p.536-542, out./dez., 2004.

VERRUMA-BERNARDI, M. R.; DAMÁSIO, M. H.; CAMPOS, S.D.; FERREIRA, V. L. P. Análise instrumental de textura e cor do queijo mozzarella de leite de búfala elaborado pelos métodos tradicional e da acidificação direta. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.62, n.355, p.3-6, mar./abr., 2007.

YUNES, V. M.; BENEDET, H. D. Desenvolvimento experimental de queijo fresco de leite da espécie bubalina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.20, n.3, p.1-8, 2000.