

UFRRJ

INSTITUTO DE TECNOLOGIA

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

DISSERTAÇÃO

**Avaliação da Qualidade e Autenticidade de Derivados de Leite de
Búfala Encontrados no Varejo do Rio de Janeiro**

Sabrina da Silva Dias

2009



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

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE E AUTENCIDADE DE DERIVADOS DE LEITE DE
BÚFALA ENCONTRADOS NO VAREJO DO RIO DE JANEIRO**

SABRINA DA SILVA DIAS

Sob orientação da professora
DSc. Verônica Lobato

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

Seropédica, RJ
Novembro de 2009

636.293098

153

D541a

T

Dias, Sabrina da Silva, 1984-
Avaliação da qualidade de
derivados de leite de Búfala
encontrados no varejo do Rio de
Janeiro / Sabrina da Silva Dias -
2009.

58 f. : il.

Orientador: Verônica Lobato.

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

Bibliografia: f. 34-43.

1. Búfalo - Criação - Brasil -
Teses. 2. Queijo mussarela -
Processamento - Rio de Janeiro (RJ)
- Teses. 3. Leite - Produção - Rio
de Janeiro (RJ) - Teses. 4. Leite -
Legislação - Rio de Janeiro (RJ) -
Teses. 5. Alimentos - Adulteração e
inspeção - Rio de Janeiro (RJ) -
Teses. 6. derivados do leite -
Avaliação - Rio de Janeiro (RJ) -
Teses. I. Lobato, Verônica. II.
Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro. Programa de Pós-
Graduação em Ciência e Tecnologia
de Alimentos. III. Título.

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

SABRINA DA SILVA DIAS

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 19/11/2009

Verônica Lobato DSc. UFRRJ
(Orientadora)

Marisa Helena Cardoso DSc. UNIRIO
(Membro)

Rosana Colatino Soares Reis DSc. UFRRJ
(Membro)

Nancy dos Santos Dorna DSc. UFRRJ
(Suplente)

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por me conceder a graça de alcançar mais este degrau.

Aos meus **pais** – Dina e Jorge Dias– e **irmão** – Leonardo Dias - pelo amor e confiança dedicados todo o sempre. Obrigada por cada dia em que vocês acreditaram que eu conseguiria chegar ao final.

Ao meu noivo e amigo de todas as horas – **André Mendes**– pela paciência nas horas de ausência, por todo carinho e por me incentivar sempre.

A minha orientadora – **Verônica Lobato** - pela confiança e orientação

A meu amigo- **Juarez Vicente** – pela contínua ajuda e atenção em cada etapa da dissertação.

Aos meus amigos, **Fernanda Castro, Lucilla Imbroinise, Livia Nolasco, Tatiana Amaral, Diego Carneiro** pela amizade e pela contribuição em cada ano deste mestrado.

Aos funcionários e colegas do LAAB e UFRRJ, **Luciana, Gabriela, Tatiane, Luciana (loira), Mariano, e Fernando** pela paciência e colaboração na parte prática da dissertação.

Ao professor **Rômulo Valadão**, pela ajuda, colaboração e paciência na parte prática.

À Professora, **Arlene Gaspar**, pelo incentivo e confiança;

A todos os amigos que conquistei nessa fase da minha jornada, que nossa amizade dure para sempre.

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

“O que importa não é a vitória, mas o esforço, Não é o talento, mas a vontade, Não é quem você é, mas quem quer ser “.

Willian Douglas

RESUMO

DIAS, Sabrina da Silva. **Avaliação da autenticidade de derivados de leite de búfala encontrados no varejo do Rio de Janeiro**. 2009. 58p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Tecnologia). Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

A criação de búfalos vem aumentando significativamente no país, devido, principalmente, as excelentes características produtivas destes animais. Inúmeros produtos são obtidos a partir do seu leite, com rentabilidade muito boa, como o queijo *mozzarella*. O objetivo deste estudo consistiu em avaliar a eficiência de uma metodologia simples e rápida de controle rotineiro para verificação de mistura de leite bovino ao bubalino em queijos do tipo *mozzarella*, configurando como fraude a venda do queijo processado com essa mistura de leites e rotulado como queijo de búfala. Com essa determinação, pretendeu-se obter dados de qualidade e autenticidade dos alimentos expostos ao consumidor, permitindo a atuação da vigilância dos órgãos de fiscalização, ainda mais quando a legislação brasileira em vigor não especifica métodos com essa finalidade. O método escolhido para esta avaliação e quantificação foi análise imunológica pelo Kit Elisa que utiliza a técnica de sanduíche com anticorpos contra caseína bovina, avaliando a sua presença e a quantificação encontrada. Foram analisadas 13 amostras de queijo *mozzarella* das três principais marcas disponíveis no varejo da região metropolitana do Rio de Janeiro. As amostras foram comparadas com os modelos de referência preparados com leite bubalino e bovino proveniente de rebanhos encontrados no Rio de Janeiro segundo técnica tradicional de elaboração de queijo *mozzarella*. A avaliação da eficiência do Kit foi obtida pela análise qualitativa e quantitativa com aplicação do teste de normalidade, Ryan-Joiner, da pesquisa de autocorrelação dos resíduos, Durbin-watson, do teste de homogeneidade, Brown-Forsythe, além do estabelecimento do limite de detecção e quantificação para avaliar a menor quantidade de analito que o método pode detectar com confiança de 95%. Pela análise estatística dos resultados, a técnica se mostrou viável, apresentando boa eficiência, atingindo os objetivos com limite de quantificação de 1,15% quando em mistura dos leites das duas espécies, além de homogeneidade e normalidade entre os dados. Avaliando as amostras adquiridas no comércio, do total de 14 amostras, 3 (três), ou seja 23,07% apresentavam mistura de bovino acima de 50% em relação ao leite bubalino, configurando adulteração destes produtos. Com auxílio do Kit foi possível observar que alguns produtos oferecidos no varejo da cidade do Rio de Janeiro apresentavam adulteração por mistura de leite das espécies bubalina e bovina acima de 50%, sem que essa informação constasse no rótulo do produto.

Palavras-chave: *Mozzarella*; Adulteração; Legislação.

ABSTRACT

DIAS, Sabrina da Silva. **Evaluation of the authenticity of dairy buffaloes found in the retail trade of Rio de Janeiro.** 2009. 58p. Dissertation (Master in Food Science and Technology). Institute of Technology, Department of food Technology, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

The buffalos creation comes growing strongly, due to the excellent productive characteristics of this animal. Most products are obtained from its milk, with very good profitability, for example the cheese *mozzarella*. The aim of this present study was to evaluate the efficiency of a simple and fast methodology of routine control for verification of bovine milk added to the buffalo milk in cheeses of the type, being a fraud the sale of the cheese processed with this milk mixture and labeled as a buffalo cheese. With this determination the quality and authenticity data of the exposed foods to the consumer it was intended obtain, allowing the performance of the vigilance of the organs of inspection, even though the Brazilian Legislation comes into force does not specify the method with that purpose. The chosen method for evaluation was immunological analysis by Kit Elisa which utilizes to technical of sandwich with antibodies against bovine casein, evaluating its presence and the quantity found. A total of 13 samples found in the market were analyzed, three of them are marks main available in the retail trade of the region metropolitan of Rio de Janeiro. The samples acquired in the commerce were compared with model of reference prepared with buffaloes and bovine milk coming from herds found in Rio de Janeiro, based on the traditional technical of elaboration of cheese *mozzarella*. The evaluation of the efficiency of the Kit was obtained by the quantitative and qualitative analysis with normality tests application, Ryan-Joiner, of the research of auto-correlation of the residues, Durbin-watson, of the test of homogeneity, Brown-Forsythe, beyond of the establishment of the the limit of detection and quantification, evaluating the smallest quantity of sample of interest which the method can detect with 95% confidence. Based on the statistical analysis of the results the technical was shown viable, presenting good efficiency, reaching the objectives with limit of quantification of 1.15% when added to milk of these two species, beyond homogeneity and normality between the data. Evaluating the samples acquired in the commerce, a total of 14 samples, 3 (three) of them which is 23.07% presented mixture of bovine milk more than 50% regarding the buffalo milk, showing adulteration of these products. With the Kit was possible observe that some products offered in the retail trade of the city of Rio de Janeiro presented adulteration because of the mixture of milk coming from buffalo and bovine more than 50%, without that information consisted in the label.

Key-words: *Mozzarella*; Adulteration; Legislation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Valores efetivos para população bubalina no Brasil	3
Figura 2	Distribuição regional do rebanho bubalino, em 2003	4
Figura 3	Exemplos de formatos de ELISA	15
Figura 4	Fluxograma de elaboração da <i>mozzarella</i>	17
Figura 5	<i>Mozzarella</i> de referência elaborada com leite de búfala	18
Figura 6	Marcas principais encontradas no varejo do Rio de Janeiro	18
Figura 7	Agitador de tubos AP560-Phoenix	20
Figura 8	Centrifuga de 6 amostras	20
Figura 9	Amostras padrão-solução estoque 50 ppm de matriz bovina	20
Figura 10	Mistura dos percentuais de queijos de referência	20
Figura 11	Esquema da reação ocorrida no biokit casein assay	21
Figura 12	Biokit casein assay kit cat. nº902062w® TEPNEL	22
Figura 13	Microtubos provenientes do biokit casein assay	22
Figura 14	Curva analítica do leite em pó	25
Figura 15	Curva analítica do queijo de vaca	25
Figura 16	Curva analítica dos percentuais queijos em relação à caseína bovina	27
Figura 17	“Carta controle” da quantidade de caseína nas amostras adquiridas	28
Figura 18	Teste qualitativo ELISA amostras de referência	29
Figura 19	Diferentes tonalidades observadas nos queijos de referência pelo teste qualitativo ELISA	30
Figura 20	Embalagens de amostras adquiridas no comércio	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Principais espécies bubalinas encontradas no Brasil	5
Tabela 2	Variações dos componentes do leite de búfala segundo diferentes autores	7
Tabela 3	Conteúdo de aminoácidos nos leites das duas espécies	7
Tabela 4	Conteúdo de ácidos graxos do leite de búfala	8
Tabela 5	Características físicas do leite de búfala	9
Tabela 6	Quantidade necessária de amostra para preparação da solução estoque	24
Tabela 7	Análise de ANOVA Fator único em relação aos valores de absorvância a 450 nm	26
Tabela 8	Quantidade de Caseína das amostras adquiridas no comércio varejista	27
Tabela 9	ANOVA Fator único em relação aos valores de caseína das amostras comerciais	29

LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

®	Marca Registrada
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ABCB	Associação Brasileira dos Criadores de Búfalo
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SIF	Serviço de Inspeção Federal
IN	Instrução Normativa
RPM	Rotação por minuto
LQ	Limite de Quantificação
LD	Limite de Detecção
PPM	Parte por milhão
DMS	Diferença Mínima Significativa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVO	2
2.1 Objetivo Geral	2
2.2 Objetivo Específico	2
3 REVISÃO DE LITERATURA	3
3.1 Produtividade Bupalina	3
3.2 Leite de Búfala	6
3.3 Queijo <i>Mozzarella</i>	10
3.4 Rotulagem	11
3.5 Adulteração	12
3.6 Métodos Imunológicos	14
4 MATERIAIS E MÉTODOS	17
4.1 Matéria-prima	17
4.2 Amostragem	18
4.3 Preparo das Amostras	19
4.4 Preparo das Amostras para determinação de proteína por método ELISA	19
4.5 Preparo das Amostras para determinação de proteína por método Kjeldahl	19
4.6 Preparo das soluções estoque padrão	19
4.7 Percentuais de Mistura dos Queijos	20
4.8 Método ELISA	21
4.9 Análise Estatística	22
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5.1 Avaliação da eficiência do Kit	24
5.2 Testes Quantitativos	24
5.2.1 Solução Estoque Padrão	24
5.2.2 Avaliação das amostras adquiridas no comércio varejista	26
5.3 Teste Qualitativo	29
5.4 Recomendações	32
6 CONCLUSÃO	33
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
ANEXOS	42
A – Planilha de Avaliação de Linearidade de Curva Analítica – Leite em pó	43
B - Planilha de Avaliação de Linearidade de Curva Analítica – Queijo de vaca	44
C - Planilha de Avaliação de Linearidade de Curva Analítica – Percentuais de queijos em relação à caseína bovina	46
D – Teste qualitativo, realizado a 450 nm de absorvância	44

1 INTRODUÇÃO

A criação de búfalos no país, mesmo em menor quantidade que a pecuária bovina, vem se desenvolvendo em larga escala, uma vez que o leite de búfala apresenta características tecnológicas, com elaboração de produtos com maior rendimento industrial, e nutricionais superiores ao leite bovino.

Atualmente o Brasil possui o maior rebanho da América Latina, concentrada na região Norte, que apresenta condições climáticas favoráveis à criação com grande potencial de crescimento devido às características de resistência, produtividade, longevidade e pela qualidade de seus produtos.

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 tanto interesse na sua comercialização na forma de derivados de vários tipos encontrados no varejo das cidades brasileiras, acarretando preços diferenciados de venda desses alimentos, e estimulando a produção de produtos diversificados em seus laticínios.

O derivado mais comum e tradicional é o queijo *Mozzarella*, queijo de origem italiana de massa filada, cujas características de cor, maciez, paladar suave e derretibilidade em produtos como pizza, levam a uma procura dos consumidores por produtos derivados dessa espécie e aumentam a produtividade e rentabilidade desses derivados.

A adulteração desses alimentos, pela adição de outras matérias primas como o leite bovino, que apresentam valor comercial mais baixo e maior facilidade de obtenção, afetam a Legislação e ferem o Código de Defesa do consumidor vigentes em nosso país. A substituição de ingredientes nos produtos sem sua especificação no rótulo interfere no livre arbítrio do consumidor na hora de eleger seu objeto de compra, podendo comprometer sua saúde, com alergias, ao consumir um ingrediente desconhecido uma vez que a composição do alimento não está correspondendo ao rótulo.

Nesse sentido, o controle da autenticidade dos produtos consumidos e a obtenção de uma análise marcadora para produtos de leite de búfala torna -se necessária para assegurar a qualidade e autenticidade dos produtos consumidos evitando fraudes e dúvidas quanto aos produtos comercializados. Para este fim, esta pesquisa objetivou avaliar um critério de rotina para determinação de adulteração simples, rápido e confiável para este fim, uma vez que a legislação nacional não apresenta nenhuma forma para tal.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Contribuir com a inspeção e controle da autenticidade de alimentos derivados do leite de búfala, produtos estes que apresentam custos elevados para o consumidor e que freqüentemente são alvos de falsificação.

2.2 Objetivo Específico

- a) Avaliar a utilização do teste ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent assay) como método auxiliar para controle da qualidade de derivados de leite de búfala;
- b) Utilizar a presença e quantificação da caseína bovina como meio de comparação entre os queijos bovino e bubalino e a determinação de fraude;
- c) Obter dados da qualidade e autenticidade dos alimentos disponíveis ao consumidor;
- d) Auxiliar a Inspeção Sanitária e a Defesa do Consumidor no combate à fraude monetária contra o consumidor;

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Produtividade Bubalina

A introdução de búfalos no Brasil data do fim do século XIX, onde a raça Carabao foi introduzida na Ilha de Marajó (PA), seguida dos búfalos de origem italiana, e desse cruzamento surgiram os búfalos pretos de Marajó, raça semelhante ao búfalo mediterrâneo italiano (ZAVA, 1984).

Embora o gado bovino seja o mais representativo na pecuária nacional, tanto para corte como para produção de leite, a bubalinocultura vem rapidamente se difundindo em diversas regiões do país (OLIVERI, 2004). De acordo com estimativas da Associação Brasileira de Criadores de Búfalos (ABCB), o rebanho bubalino brasileiro atinge cerca de 3,5 milhões de animais com crescimento anual de 3,5% (BERNARDES, 2007). O sistema estatístico oficial relata a quantidade em 1.175 milhões animais no ano de 2005 e 1.132 milhões no ano de 2007 (IBGE, 2009). Segundo esses dados, do total de 1.132 milhões, a região Norte concentra 62,9%, a região Nordeste 9,2%, a região sudeste 9,1 %, região sul 13,2%, e Centro-oeste 5,6%, conforme apresentado na figura 1 e 2.

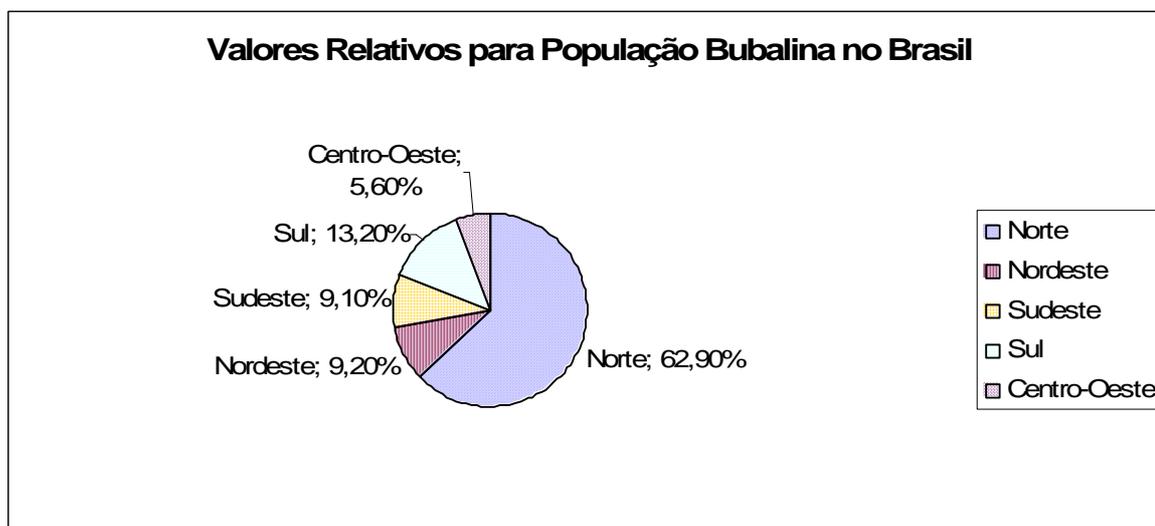


Figura 1. Valores efetivos para população bubalina no Brasil. Fonte: Adaptada de IBGE, 2009.

Os búfalos pertencem à família Bovidae, subfamília Bovinae, espécie *Bubalus bubalis*, variedade *bubalis*, vulgarmente chamados búfalos de rio, ou variedade *kerebau*, os búfalos de pântano, onde as principais raças encontradas no país são Carabao ou Rosilho, Mediterrâneo, Jafarabadi e Murrah (EMBRAPA, 2000).

O melhoramento genético em bubalinos teve início em 2005, com o desenvolvimento do Programa de melhoramento genético dos bubalinos- (PROMEBUL), com a colaboração da FMVZ-UNESP-Botucatu, ABCB e EMBRAPA – Amazônia Oriental implementando a cartilha sobre o melhoramento genético dos bubalinos (PROMEBUL, 2005). Essa cartilha objetiva-se a melhorar geneticamente os bubalinos para produção de carne e leite, identificando indivíduos

geneticamente mais produtivos. O serviço de registro genealógico da ABCB realiza este registro dos animais de criadores associados, comprova filiação, linhagem e grau de sangue para facilitar o melhoramento da produtividade do rebanho nacional valorizando os indivíduos superiores no mercado externo e interno, beneficiando todos os segmentos envolvidos com a produção de bubalinos (ABCB, 2009).

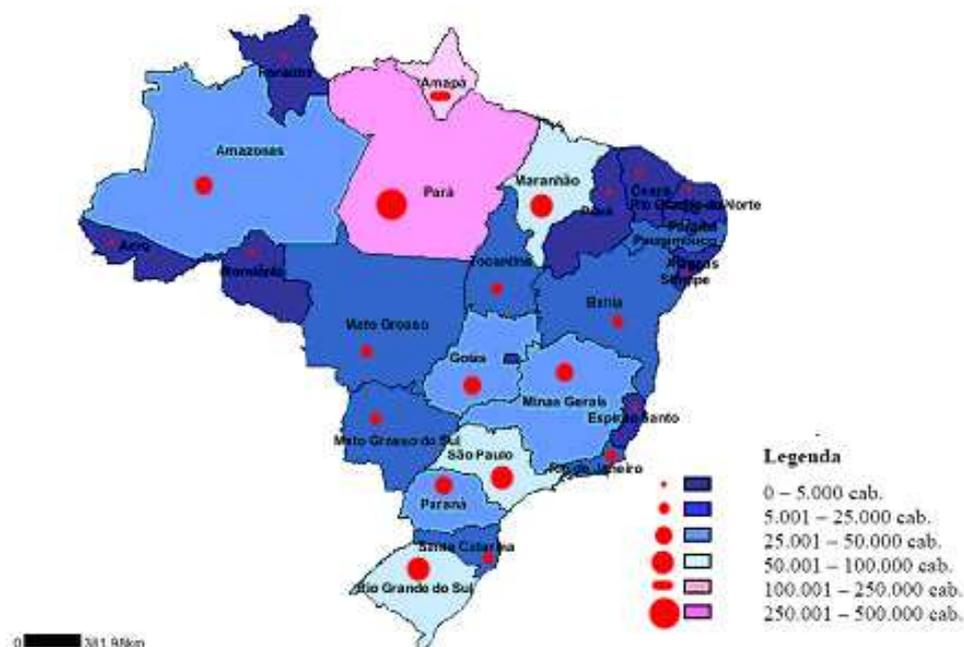


Figura 2. Distribuição regional do rebanho bubalino, em 2003. Fonte: GARCIA et al, 2005.

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).

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 da 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; TEIXEIRA et al, 2005).

Tabela 1. Principais espécies bubalinas encontradas no Brasil.

Espécie	Raças			
	Jafarabadi	Murrah	Mediterrâneo	Carabao
Animais				
Nome comum		Búfalo de rio		Búfalo de pântano
Cariótipo		<i>bubalis</i> 2n=50		<i>kerebau</i> = 2n =48
País	Índia, Paquistão,	Itália, Bulgária, Egito, Argentina, Venezuela, Brasil.		Brasil, Indonésia, Filipinas, Malásia, China.
Aptidão	Leite e Carne	Leite	Leite e Carne	Trabalho e Carne
Características físicas	Pelagem e pele pretas em todo o corpo, incluindo chifres, cascos. Corpo simétrico e equilibrado, com conformação própria do tipo misto. Altura média de 140 cm nas fêmeas. Porte médio a grande.	Pelagem e pele pretas, assim como os chifres, cascos. Corpo curto, reto e profundo. Altura média de 132 cm nas fêmeas. Porte médio a grande.	Pelagem e pele totalmente pretas, também chifres e cascos. Corpo simétrico e equilibrado, compacto, musculoso, profundo e de comprimento médio. Altura média de 140 cm nas fêmeas. Porte médio a grande.	Pelagem e pele cinza escura ou rosilha, sendo portadores de manchas de tonalidade clara ou branca nas Patas, Corpo musculoso e um tanto cilíndrico, sem depressões, simétrico e equilibrado. Altura média de 132 cm nas fêmeas. Porte médio a grande.

Bubalus bubalis

Fonte: Adaptado de ANDRADE, GARCIA (2005).

Estudos de Seno et al (2007) sobre valores econômicos da produção leiteira de búfalas em São Paulo concluíram que para os produtores é mais vantajosa a criação de búfalos com a finalidade de produzir derivados do que apenas a venda do leite à laticínios que irão manufaturar esta matéria-prima, já que a diferença do lucro entre os dois sistemas de produção se mostra bem elevada.

Outro empecilho ao desenvolvimento da atividade leiteira está relacionado à demanda de leite bubalino e a seus preços diferenciados. Muitos laticínios misturam leite de búfala com leite bovino na intenção de minimizar os custos ou suprir a baixa oferta de leite bubalino, o que

ocasiona diminuição da demanda de leite de búfala, reduzindo seus preços e desestimulando os investimentos (MADELLA-OLIVEIRA et al, 2005).

Na tentativa de minimizar ou acabar com esses problemas, a ABCB fundada em 1960, defende os direitos dos criadores de búfala.. Identifica os produtores conveniados à associação garantindo aos consumidores produtos seguros e sem mistura, protegendo os consumidores de adquirirem produtos fraudados.

3.2 Leite de Búfala

O leite de búfala possui um alto valor nutritivo e é uma excelente matéria-prima para o preparo de produtos lácteos. É também valioso na dieta de povos de muitos países onde a deficiência de proteínas na dieta tem tendência a ocorrer (FAO, 1991).

O produto apresenta maiores teores de gordura, proteína, extrato seco total e alguns minerais, em relação ao leite bovino. Por essa razão, a grande importância desse alimento está na sua transformação em derivados, uma vez que a sua composição peculiar possibilita um alto rendimento industrial (OLIVERI, 2004).

As proteínas do leite de búfala são similares às do leite bovino, porém não são idênticas nem estão nas mesmas proporções. O leite de búfala apresenta uma variação de 3,63 a 5,26%, enquanto que, para o leite bovino, a variação é de 3,25 a 3,90% (FAO, 1991). Albonico e Mincione (1974) relataram que a proteína do leite de búfala está presente em teores variáveis, com uma média de 4%. Estudos relatados sobre aminoácidos mostram que a caseína do leite de búfala possui 25,5% de aminoácidos essenciais a mais que o leite bovino (VERRUMA, SALGADO, 1994).

Em relação a percentuais, segundo Tonhati et al (2004), 100g de nitrogênio do leite equivalem a 89 – 96% de nitrogênio protéico, caseína e proteínas do soro, e 4 – 11% de nitrogênio não-proteico, representado por aminoácidos livres, uréia, ácido úrico e produtos do metabolismo do animal. Do total de 100 mL do leite 77-79% são de caseínas e 21-23% de proteínas do soro, onde as frações α_1 , α_2 , β e κ correspondem a 4%, 6,3%, 35% e 4% do total dos diferentes tipos de caseínas (AMARAL et al, 2005).

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). Em exame ao microscópio eletrônico, o autor demonstrou que as micelas de caseína do leite de búfala possuem maior tamanho, susceptibilidade, 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).

Em relação ao valor nutricional do leite de búfala, Verruma e Salgado (1993) encontraram níveis altamente satisfatórios como 91,86% de digestibilidade, 62,77% de NPU (“Net Protein Utilization”) e 68,33% de valor biológico. Já para a digestibilidade *in vitro* do queijo de búfala, esse mesmo estudo encontrou 93,70% em relação ao extrato seco. Essa alteração na digestibilidade, segundo os autores referidos, pode ser devido a alterações realizadas na produção do queijo, melhorando sua digestibilidade.

Tabela 2. Variações dos componentes do leite de búfala segundo diferentes autores

Componentes	Leite Búfala %	Leite Vaca %
Gordura	7.10 ¹	3.80 ¹
	8.16 ²	3.68 ²
	6.85 ³	4.77 ³
Proteína	4.50 ¹	3.80 ¹
Cálcio	1.88 ²	1.30 ²
Fósforo	0.90 ²	0.90 ²
Vitamina A	204,27 UI ²	185,49UI ²
Lactose	4.83 ³	4.74 ³

Fonte: Adaptada de Verruma, 1993¹; Verruma, 1994²; Amaral, 2005³.

Tabela 3. Conteúdo de aminoácidos essenciais nos leites das duas espécies.

Aminoácidos (g/g prot.)	Leite	
	Búfala	Vaca
Lisina	10,30	8,22
Triptofano	1,11	1,48
Treonina	5,66	3,97
Cistina	0,42	0,91
Valina	8,40	5,29
Metionina	3,52	3,02
Isoleucina	7,36	4,50
Leucina	12,61	8,84
Tirosina	4,71	4,44
Fenilalina	6,22	4,25

Fonte: Verruma, Salgado, 1994.

O leite de búfala é mais rico em certos minerais do que o leite bovino especialmente em cálcio. Os teores médios de cálcio apresentados pelo leite de búfala e bovino são 1,88 e 1,30g por 100g de extrato seco, respectivamente (VERRUMA, SALGADO, 1993), sendo que este conteúdo está na sua maior parte na forma coloidal.

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 refere ao leite, devido à ausência de pigmentos carotenóides que são responsáveis pela coloração amarela nos produtos elaborados com o leite de bovino (FAO, 1991; VERRUMA, SALGADO, 1994; AMARAL et al, 2005). De acordo com Fonseca (1986), mesmo que as búfalas consumam altas doses de caroteno, não ocorrem mudanças na cor do leite, embora os valores de vitamina A no leite de búfala possam ser iguais ou levemente superiores aos encontrados no leite bovino.

O teor de sólidos totais do leite de búfala é bem maior do que o de bovino, com uma média de 16% para o leite de búfala e por volta de 12% para o leite de bovino (SHALASH, 1988). Para Neves (1985), houve uma variação de 18 a 20% que se deve principalmente ao elevado teor de gordura no leite de búfala. Devido à elevada quantidade de gordura e de sólidos totais no leite de búfala em relação ao de bovino, o valor calórico daquele é superior ao deste, variando de 100 a 114,4 Kcal para 100g (FERRARA, INTRIERI, 1975), possuindo em média 30 a 40% a mais de calorias (VERRUMA, 1990).

Esses valores são importantes para a indústria láctea, pois afetam diretamente o rendimento do produto, significando lucro para empresa ou produtor (COELHO, 2004).

Em função do teor de extrato seco total do leite, para a elaboração do queijo *Mozzarella* são necessários 5,5 litros de leite para a obtenção de um quilo de queijo (CITRO, 1981; NEVES, 1985). Em trabalhos citados por Bonassi *et al.* (1982), o queijo *Mozzarella* de leite de búfala obteve rendimento superior em relação ao elaborado com leite de bovino. Da mesma forma, Rossi (1977) mostrou que o rendimento do queijo com este leite foi de 13 a 15% e com leite de búfala de 20 a 25%, devido ao elevado teor de sólidos totais e de gordura.

Entre os componentes do leite de búfala, a gordura é a que apresenta maior variação percentual. Os valores mais freqüentemente encontrados oscilam entre 5,5-8,5% (FERRARA, INTRIERI, 1975, VERRUMA, SALGADO, 1994), valores altos quando comparados com a média para o leite bovino integral de 3,4% (SILVEIRA *et al.*, 1989). Para Ferrara e Intriери (1975), o tamanho do glóbulo de gordura do leite de búfala oscilou entre 3,5 e 7,5 nm e adquire maiores dimensões nos estágios mais avançados de lactação. Já Neves (1985) relata uma variação entre 4,1 a 4,8 nm, enquanto que o leite bovino fica entre 3,6 e 4,0 nm.

O colesterol está presente em quantidades pequenas e variáveis nos leites bovino e de búfala, havendo aumento marcante no final da lactação. Segundo estudos realizados por Prasad e Pandita (1990), os resultados apresentados foram 16 e 20 mg de colesterol em 100 mL de leite de búfala e bovino, respectivamente.

A gordura do leite de búfala apresenta teores de ácidos graxos saturados ao redor de 64% (TONHATI *et al.*, 2004), com maiores concentrações de ácido palmítico (C16:0) e esteárico (C18:0) (VERRUMA, SALGADO, 1994), sendo uma vantagem para saúde, já que o ácido graxo C18:0 considerado um ácido graxo neutro, não afeta os níveis séricos de colesterol em humanos. Os ácidos graxos insaturados constituem 36% do total, como exemplo, o ácido oléico (C18:1), linoléico e palmitoléico (TONHATI *et al.*, 2004; VERRUMA, SALGADO, 1994).

Tabela 4. Conteúdo de ácidos graxos do leite de búfala.

Ácidos Graxos	%
C6:0 capríco	0,99
C8:0 caprílico	0,55
C10:0 cáprico	1,06
C12:0 laurico	1,74
C14:0 mirístico	8,66
C15:0 pentadecanoico	1,25
C16:0 palmítico	32,58
C18:0 esteárico	16,67
C20:0 araquídico	0,30
C14:1 miristoleico	0,38
C16:1 palmitoleico	1,82
C18:1n9 oleico	29,97
C18:2n6 linoleico	2,30
C18:n3 □ linoleico	0,32
C20:1n9 cis-11 eicosenoico	0,31
Ácidos graxos insaturados (AGI)	35,69
Ácidos graxos saturados (AGS)	64,35
Colesterol	0,026mg.g-1

Fonte: Tonhati *et al.*, 2004.

Segundo a FAO (1991), o teor de lactose no leite bubalino pode variar de 4,40 a 5,07%, sendo que Rossi (1977), em estudos feitos na Itália, apresentou valores similares em torno de 4,60%. Neves (1985) afirma que o teor de lactose do leite de búfala é de 5,66%, semelhante a Coelho (2004) com valor médio para a Bacia Leiteira do Estado de São Paulo, de 5,02%. Essas variações poderiam ser explicadas da mesma forma que a variação encontrada no teor de gordura: devido a raça, o tipo de manejo, estágio de lactação, o clima e a alimentação.

Segundo estudos de Cunha Neto (2003) e Teixeira et al (2005), a densidade do leite de búfala varia conforme os meses de lactação, com níveis entre 1,025 e 1,047 g/mL, sendo para o leite bovino os valores de 1,028 a 1,034 g/mL, segundo a Instrução Normativa (IN) 51 (BRASIL, 2002). Ainda, segundo Cunha Neto (2003) o pH variou de 6,41 a 6,97, com acidez entre 20° a 22,3°D. Já para Teixeira et al (2005) os valores de acidez encontrados são menores, com valores de 14° a 20°D, devido ao elevado teor de caseína. Para o leite bovino, os valores encontrados por González (2001) estão na faixa de 10-17°D e o pH entre 6,6 – 6,9. O Índice Crioscópico (IC) oscila entre -0,531 e -0,548°c (CUNHA NETO, 2003) e o bovino é de -0,512°c (BRASIL, 2002).

Segundo a Resolução SAA - 3, de 10-1-2008 (SÃO PAULO, 2008) que regulamenta as normas técnicas sobre as condições higiênico-sanitárias mínimas necessárias para aprovação, funcionamento e reaparelhamento dos estabelecimentos destinados a leite e produtos lácteos considera-se impróprio para consumo *in natura* o leite de búfala que:

- revele níveis de acidez inferiores a 14°D e superiores a 23°D;
- contenha colostro ou elementos figurados em excesso;
- não satisfaça ao padrão bacteriológico para produção de contagem global de 500.000 col/ml para o leite cru e de contagem global de 40.000 col/ml e 2 coliformes/ml e ausência de coliformes fecais, para o leite pasteurizado;
- apresente modificações de suas propriedades organolépticas normais;
- apresente elementos estranhos à sua composição normal;
- revele quaisquer alterações que o tornem impróprio ao consumo, inclusive corpos estranhos de qualquer natureza.

Tabela 5. Características físicas do leite de búfala

Características Físicas	Valores
Teor de Gordura Mínimo	4,5%
Acidez (°D)	14-23°D
pH	6,40 e 6,90
Extrato Seco Desengordurado (E.S.D.) Mínimo	8.57%
Densidade a 15°C	1,028 e 1,034
Índice Crioscópico	-0,520 e -0,570

Fonte: Adaptado de SÃO PAULO, 2008.

Os valores encontrados sobre a composição do leite de búfala são variados, pois condições de clima, estação do ano, alimentação, raça, manejo, número de lactações, época do parto, e quantidade de leite produzido influenciam na obtenção do produto final (TONHATI et al, 2004; VERRUMA, SALGADO, 1994; AMARAL et al, 2005). Por exemplo, o comportamento reprodutivo sazonal das búfalas reserva para o outono a época de monta e conseqüentemente o

verão para estação de parição, alterando a composição e quantidade de leite produzido nestas distintas épocas do ano (AMARAL et al, 2005).

Essas características do leite de búfala comprovam sua potencialidade na utilização tanto para o consumo *in natura* quanto para matéria-prima na elaboração de produtos lácteos que podem variar conforme a cultura de cada região. No Brasil são produzidos queijos tradicionalmente feitos com o leite de búfala, como o queijo *Mozzarella*, queijos nacionais como o Marajoara, o Provolone, a Ricota, Coalho e o Mascarpone. Cada tipo de queijo requer uma técnica de produção específica sendo que, quando processados a partir do leite de búfala, geralmente apresentam maior rendimento. Além dos queijos, também são elaborados outros produtos lácteos com o leite bubalino, como o iogurte e o doce de leite (TEIXEIRA et al, 2005).

3.3 Queijo *Mozzarella*

O queijo *Mozzarella* é um produto de origem italiana que apresenta formatos irregulares, retangulares, esféricos, periformes ou ovóides, com pesos variáveis de poucos gramas até vários quilogramas; de coloração branca, não maturado, consumido puro ou fazendo parte de inúmeros pratos quentes e frios, sanduíches, pizzas e saladas (VALLE et al, 2004). Segundo Fox e Guinee (1987), a produção inicial de queijos de massa filada era concentrada no sul da Itália, região da Campana – perto de Nápoles e na Sicília, utilizando-se freqüentemente o leite da espécie bubalina como matéria-prima.

A *Mozzarella* é um queijo do grupo de massa filada, apresentando a propriedade de formar fios, em determinadas condições de pH e acidez, quando parte do cálcio é eliminada do complexo fosfocaseinato, caracterizando o processo de desmineralização da coalhada. Segundo o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), o queijo tipo *Mozzarella* 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 paralelepípedo, peso de 15g a 4 kg, crosta fina, consistência de massa semi-dura, textura compacta e fechada, cor branco-creme e homogênea (BRASIL, 1952).

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 κ -caseína provocando a coagulação do leite (MONTEIRO et al, 2007). Esta coagulação se origina de modificações físico-químicas da κ -caseína como liberação da fração terminal da κ -caseína, o glicomacropéptido, redução da carga superficial da micela o que irá diminuir o grau de hidratação das micelas, diminuindo a repulsão entre micelas e a interação caseína-água, com o correspondente aumento da atração entre micelas, aumentado assim a sensibilidade de agregação da para- κ -caseína, formando então a coalhada (VARNAM e SUTHERLAND, 1995).

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 e RAMOS 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 à 10 °C. As salgas dos queijos são realizadas em salmoura à 17% por 30 minutos e após secagem, acondicionados em embalagens plásticas e mantidos sob refrigeração à temperatura de $\pm 8^{\circ}\text{C}$ (VERRUMA-BERNARDI et al, 2000).

O queijo *Mozzarella* feito com leite de búfala que tenha, por exemplo, 3% de gordura apresentará cerca de 18% de gordura, 53,6% de umidade, 22,1% de proteína total e 0,3% de lactose em sua composição, ao passo que a *Mozzarella* produzida com leite de búfala integral apresenta umidade entre 55-60%; 23 a 27% de gordura e 19 a 20 % de proteína total (TEIXEIRA et al, 2005).

Autores como Ferrara e Intrieri (1975), Bonassi et al (1982) e Verruma et al (1993) mencionam que o percentual de umidade nesse tipo de queijo oscila entre 38 e 45%, 48,12 e 48%, respectivamente. Para Castaldo (1960), a *Mozzarella* da Itália possui umidade em torno de 57%. A legislação do estado de São Paulo estabelece um valor máximo de umidade de 58% para esse produto (SÃO PAULO, 1992).

O queijo *Mozzarella* pode ser encontrado 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).

3.4 Rotulagem

A busca pela melhor qualidade de vida e a diversidade de alimentos industrializados no mercado tem tornado o consumidor cada vez mais exigente e preocupado com a segurança dos alimentos (YOSHIZAWA et al, 2003). O conjunto de informações que são expressas nas embalagens pode ser útil instrumento para prevenir problemas de saúde e, ao mesmo tempo, exercer papel educativo na definição de hábitos alimentares (MARINS, JACOB E PERES, 2008).

Para manter a veracidade dos dados apresentados nos rótulos existem legislações em vigor determinando as informações indispensáveis ao produto como, denominação de venda, lista de ingredientes, conteúdo líquido, identificação de origem, nome ou razão social, lote, validade e preparo, quando necessário (BRASIL, 2002). Atualmente, Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), assim como, a Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) fiscalizam nacionalmente os processos de rotulagem utilizando Decreto-Lei nº 986, de 21 de outubro de 1969, RDC nº 259, de 20 de setembro de 2002, e Portaria 371, de 04 de setembro de 1997, que instituem normas básicas para alimentos, normatizando aspectos gerais da rotulagem. Porém, devido ao intercâmbio comercial entre as nações, o *CODEX Alimentarius* estabelece padrões de qualidade e normas técnicas comuns, visando harmonizar o fluxo de mercadorias, assegurando não só a livre movimentação de bens, mas a garantia de proteção da saúde do consumidor (MARINS, JACOB E PERES, 2008).

Essas legislações visam assegurar a segurança alimentar e os direitos do consumidor, não permitindo o uso de vocábulos, sinais, denominações, símbolos, emblemas, ou ilustrações que

levem o consumidor a informações falsas ou engano, em relação à verdadeira natureza, procedência, tipo, qualidade, quantidade, rendimento ou forma de uso do alimento (YOSHIZAWA et al, 2003). Contudo, uma das estratégias lingüísticas mais utilizada decorre da construção de jogos de palavras. No rótulo, o discurso que é vinculado serve para vender o produto por meio de *slogans*, que persuadem o consumidor a comprar. Em consequência disso, verificamos que o texto publicitário não possui uma linguagem neutra. Nesse contexto, o rótulo se encaixa como uma forma de propaganda organizada e formada por um texto cuidadosamente elaborado em seus componentes lingüísticos e visuais, servindo como meio de comunicação entre o consumidor e o produto, apresentando características e vantagens, para finalmente, o consumidor decidir sobre a compra ou não do produto (SILVEIRA, 2006).

Existem diversos fatores a serem levados em consideração até a decisão de compra. As estratégias de marketing avaliam o tipo de comportamento de compra, e os fatores que influenciam na decisão, para determinar as técnicas a utilizar. Existem quatro tipos de consumidor: consumidor com comportamento de compra complexa – conhece o produto e sabe as diferenças entre as marcas; comportamento de interesse reduzido – consumidor conhece, mas não percebe bem as diferenças implícitas; comportamento de compra habitual – consumidor pouco envolvido, não sabe diferença entre as marcas, nem procura saber sobre suas características; comportamento de busca por variedade – não percebe diferença entre as marcas, apenas escolhe as marcas com maior variedade (MENDES, 1998). Além de conhecer o consumidor, fatores culturais, classe social, idade, ocupação, estilo de vida, instrução, personalidade, motivação e percepção podem influenciar o consumidor (MEDEIROS, CRUZ, 2006).

Assim, conhecer o nível de compreensão que o consumidor tem sobre os rótulos dos produtos disponíveis no mercado permite analisar o hábito de leitura de rótulos, o entendimento em relação às informações contidas nestes e a maneira de identificação visual do produto, já que em meio a uma enorme quantidade de produtos, o consumidor somente visualiza o produto que chama a atenção em relação ao preço ou a aparência (GREPALDI, 2006, MARINS, JABOC E PERES, 2008).

Conhecendo estas características do consumidor, alguns produtores comercializam seus produtos com ausência de declarações, informações incorretas ou imprecisas com emprego de expressões confusas, levando o consumidor a equívocos na escolha e aquisição dos produtos, obtendo espaço para as adulterações no comércio varejista (FERRAREZI, 2008).

Para garantir os direitos do consumidor, a ABCB lançou em 2000, o selo de Pureza 100% Búfalo. Esse selo identifica produtores conveniados à associação garantindo aos consumidores produtos seguros e sem mistura, protegendo os bubalinocultores de possíveis fraudes. 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 européias para detecção de caseína de leite de vaca, encontrado na Commission Regulation (EC) No 213/2001, artigo 10 e anexo XV.

3.5 Adulteração

Estudos têm demonstrado que produtos lácteos durante décadas vem sofrendo adulterações de diferentes formas: adição de água, soro, retirada de componentes, mistura de leite de diferentes espécies, adição de conservantes, neutralizantes, espessantes e etc. O mercado oferece uma infinidade de produtos atendendo aos interesses específicos de cada consumidor,

com preços variados. Este consumidor busca qualidade e produtos mais saudáveis e prezam pela confiança de que estão levando o que é especificado no rótulo. Nas embalagens, a origem dos ingredientes utilizados para a fabricação deve ser relatada, pois a adição não mencionada de ingredientes fere o direito do consumidor e a legislação vigente.

São considerados matérias-primas ou produtos fraudados aqueles que apresentem “modificações espontâneas ou propositais de natureza física, química ou biológica que alterem características sensoriais, 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”(BRASIL, 1952).

A garantia de que o consumidor está comprando o que descreve o rótulo do produto em termos de qualidade microbiológica, química, física e econômica, está sendo desempenhado pelo Código de Defesa do Consumidor. Com esse código o consumidor ganha proteção à vida e à saúde, proteção contra a publicidade enganosa e abusiva, garantia de indenização, acesso à justiça e à informação (BRASIL, 1990).

O que define uma fraude, segundo Oetterer (2008), são as atuações de fatores circunstanciais ou deliberadamente provocados que incidindo sobre os alimentos isoladamente ou em combinação, desmerecem os alimentos comercialmente e provocam prejuízos ao consumidor de ordem biológica e econômica, além de serem antiéticos e conflitam com a legislação bromatológica. Existem vários tipos de fraudes: Fraude por alteração, onde fatores ocasionais, como luz, umidade, temperatura extrema, levam a modificações organolépticas ou no estado sanitário do produto. Podem surgir por erro na obtenção da matéria prima, processamento, preservação, e embalagem. Fraudes por falsificação, quando se induz o consumidor ao erro de forma direta e capciosa na sua comercialização. As fraudes sofisticadas, que exigem técnica especializada para sua determinação, e as grosseiras também podem ser citadas.

Segundo o autor, outro tipo de fraude, a por adulteração, que será considerada neste estudo, onde modificações intencionais com a finalidade de lucro, afetam as características organolépticas e o valor nutritivo do alimento.

Essa adulteração pode ser por subtração de algum componente, ou pela adição de outro ingrediente semelhante, ou com a mesma função que o produto original. Essas alterações são ocasionadas muitas vezes pelo valor agregado de algum dos componentes do alimento, ou até do produto na íntegra. A adulteração de produtos lácteos com diferentes componentes do leite, ou a adição de leite de espécies diferentes são encontradas com frequência.

As flutuações na disponibilidade de leite de espécies diferentes da bovina, e o preço mais elevado em comparação ao leite bovino, fazem surgir o incentivo para a adulteração de queijos tradicionais. A adição fraudulenta de leite bovino em queijos que deveriam apenas conter leite de búfala 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, temos apenas há pouco mais de 10 anos uma portaria que determina as características e identidade do queijo *Mozzarella*, *Mussarella* ou *Muzzarella*, porém sem relacionar adulterações. A Portaria nº 366, de 04 de setembro de 1997, estabelece leite bovino como utilizado para matéria prima e identifica os requisitos mínimos de qualidade que deverá cumprir a massa para elaborar queijo *Mozzarella*: “Entende-se por Queijo *Mozzarella* o queijo que se obtém por filagem de uma massa acidificada, (produto intermediário obtido por coagulação de leite por meio de coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas), complementada ou não pela ação de bactérias lácticas específicas. O Queijo *Mozzarella* é um queijo de média, alta ou muito alta

umidade e extragordo, gordo a semigordo segundo a classificação estabelecida no "Regulamento Técnico Geral para fixação de Identidade e Qualidade de Queijos". (BRASIL,1997).

O Código Penal Brasileiro especifica a definição de adulteração no capítulo III "Dos crimes contra a saúde pública", no artigo 272, "Corromper, adulterar, falsificar ou alterar substâncias de produtos alimentícios destinados ao consumo, tornando-o nocivo a saúde ou reduzindo-lhe o valor nutritivo", com pena de reclusão, de 4 a 8 anos e multa.

O Ministério da Agricultura (MAPA), Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Código de Defesa do Consumidor respaldam o consumidor na hora de exigir as características dos produtos oferecidos no comércio do país. A RDC (Resolução da Diretoria Colegiada) nº 259, de 20 de setembro de 2002, o Decreto-lei nº 986, de 21 de outubro de 1969, e Portaria nº 157, de 19 de agosto de 2002, determinam os 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, denominação de venda, sendo obrigatórios a lista de ingredientes, a validade e o lote. Dessa forma a lei nº 8078, de 11 de setembro de 1990, que se refere ao código de defesa do consumidor, ampara o consumidor de possíveis alterações provocadas pelo produtor na rotulagem, levando a interpretações duvidosas quanto aos componentes originais, sendo um direito básico do consumidor, a informação clara, adequada, com especificações corretas da quantidade e qualidade do produto, além da proteção contra a publicidade enganosa no produto final.

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.

Há a necessidade de se desenvolver métodos rápidos e eficazes de detectar misturas de leites de diferentes espécies na composição dos queijos *Mozzarella* encontrados no varejo do país

3.6 Métodos Imunológicos

Métodos imunológicos representam uma classe de técnicas de dosagem de proteínas, principalmente proteínas do sistema imune, com alta especificidade e confiabilidade. Essa técnica imunológica utiliza anticorpos específicos para proteína de interesse com formação de complexo protéico rapidamente detectável. Anticorpos são proteínas que reconhecem um determinado antígeno específico com alta afinidade. No organismo, os anticorpos são produzidos na medula pelos linfócitos B. A formação ocorre após um contato inicial do organismo com um antígeno que reage ao sistema imunológico, assim, após uma futura interação do antígeno com o anticorpo haverá a formação de complexo protéico que retirará o antígeno da circulação. Um antígeno pode ser reconhecido por vários anticorpos levando à ativação de vários clones de linfócito B. Cada clone reconhece uma parte diferente da proteína em questão através de uma parte denominada *epitopo*, que interagirá efetivamente formando o complexo antígeno-anticorpo (LENZ, 2004).

Existem dois tipos de anticorpos: os anticorpos monoclonais, (células homogêneas derivadas de uma célula produtora de anticorpos, onde todos os anticorpos possuem a mesma especificidade precisa para um antígeno), e os policlonais, (vários clones de diferentes linfócitos B que reagirão com diferentes antígenos), altamente específicos, que ao reagirem formam um complexo antígeno-anticorpo precipitado (BENJAMINI, 2002).

Para teste imunológicos são produzidos anticorpos contra o antígeno em estudo, neste caso proteína do leite bovino, iniciando pela purificação do antígeno. A purificação pode ser realizada por cromatografia ou eletroforese, ou produzindo o peptídeo de interesse ligado a uma

proteína carreadora. Em estudos de imunização, os anticorpos são produzidos, após a purificação do antígeno, através de imunização de animais como coelhos, camundongo, cabra, etc. Após alguns dias, o sangue do animal é recolhido separando-se o plasma por centrifugação (LENZ, 2004).

A estrutura dos anticorpos assemelha-se a um “Y”. Esta característica está relacionada às quatro subunidades formadoras da proteína, duas “leves” e duas “pesadas, ligadas entre si por pontes dissulfeto. As duas partes de “cima” da estrutura são formadas pelas duas subunidades leves onde estão os sítios de ligação do antígeno, o que possibilita uma ligação cruzada entre eles podendo produzir uma malha de antígeno-anticorpo. A modificação de apenas uma destas subunidades diferencia o antígeno que se ligará a este anticorpo, produzindo assim a infinidade de anticorpos no organismo (LENZ, 2004).

Para a utilização destes anticorpos nas técnicas de detecção estas proteínas devem estar conjugadas, ligadas de forma covalente a compostos que permitam a separação ou detecção. Para detecção são utilizados diversos métodos dependendo da técnica utilizada (LENZ, 2004).

Para o método ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent assay ou Ensaio de Imunoabsorção Ligado à Enzima), o diferencial está na forma de ligação do antígeno que se encontra preso a uma superfície (geralmente de poliestireno) através de um anticorpo. Já que esta reação é basicamente enzimática, torna-se possível a detecção de quantidades muito reduzidas de antígeno, aumentando a sensibilidade da técnica.

Existem quatro tipos principais de ELISA: ELISA direto, ELISA competitivo, ELISA indireto e ELISA sanduíche, podendo haver interação entre as diferentes técnicas.

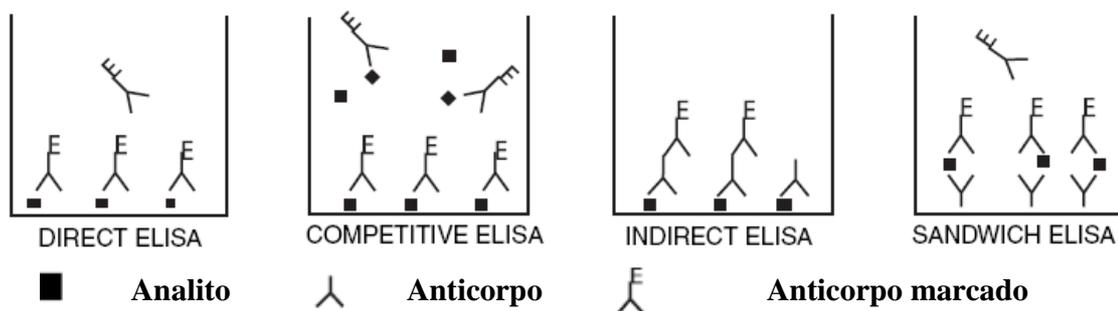


Figura 3. Exemplos de formatos de ELISA. Adaptado de HURLEY et al, 2004.

Segundo Hurley et al (2004), estes métodos diferenciam-se pela presença de anticorpos marcados, como ELISA direto, indireto e sanduíche, ou por antígeno marcado, como ELISA competitivo, demonstrado na figura 3.

ELISA direto: os antígenos específicos “forram” o interior do suporte, depois adicionam anticorpos marcados com enzimas. Se o anticorpo reage com antígeno, o complexo ficará solubilizado. Depois se adiciona substrato que seja capaz de atuar na enzima marcador.

ELISA competitivo: anticorpos específicos “forram” o suporte, adiciona-se concentração conhecida de uma mistura de antígeno do anticorpo anterior, ligados a uma enzima e antígenos sem enzima. Depois se adiciona substrato. Prepara-se uma leitura colorimétrica comparativa de ambas as provas. Se a leitura for análoga, o antígeno estudado não apresenta relação com os anticorpos empregados. Se há diferença nas leituras, o antígeno objeto de estudo está relacionado sorologicamente ao anticorpo empregado e a diferença na densidade ótica é proporcional à concentração do antígeno problema.

ELISA indireto: antígenos específicos “forram” o suporte. Adiciona-se solução com antígeno de forma que os anticorpos pesquisados reajam especificamente com os antígenos do suporte. Adiciona-se o anti-anticorpo conjugado com uma enzima, os quais vão reagir com anticorpos específicos adicionados na etapa anterior e que se encontram fixados aos antígenos. Após, adiciona-se um substrato capaz de atuar na enzima marcadora

ELISA sanduíche (dois anticorpos): o suporte é “forrado” com anticorpos específicos para o que se deseja analisar. Adiciona-se a amostra contendo substância de interesse, se o antígeno que se quer detectar estiver presente, reagirá com o anticorpo. Adicionam-se anticorpos específicos ao antígeno que se deseja detectar, porém sendo diferente dos anticorpos que se colocou para forrar, conjugado com uma enzima. Adiciona-se substrato para determinar a cor.

ELISA sanduíche (três anticorpos): o suporte é “forrado” com anticorpo específico ao antígeno. Adiciona-se a amostra com antígeno em questão, após anticorpo específico ao antígeno, e diferente do anticorpo que forrou. Depois, o terceiro anticorpo ligado a enzima, um anti-anticorpo ao processo anterior. Depois adiciona-se o substrato.

Embora hajam outras técnicas para análise de adulteração baseada na determinação de proteínas, o método imunológico ELISA se mantém como alternativa viável devido a sua simplicidade, curto tempo de elaboração, especificidade e sensibilidade (BORKOVÁ e SNÁSELOVÁ, 2005), além de não requerer equipamentos especializados (ASENSIO et al, 2008). Para Richter et al (1997), o ELISA indireto apresenta sensibilidade de 1 – 10% em leite ou queijo, e o ELISA sanduíche apresenta limite de detecção de 0,5% na mistura desses mesmos produtos.

O teste ELISA está caracterizado como imunoensaio de fase sólida. Esses testes aproveitam a propriedade dos plásticos de adsorver proteínas na superfície em forma de camada única, permitindo que a maioria do antígeno possa reagir com anticorpos correspondentes, marcados com uma enzima que poderá ser detectada por colorimetria quando adicionado substrato (BENJAMINI, 2002).

Existem duas variações para o teste ELISA, segundo Asensio et al (2008): O ELISA indireto, utilizando dois anticorpos, um específico ao antígeno e outro conjugado à enzima, este segundo anticorpo dará a reação enzimática, que quando presente poderá ser observada e quantificada por diferentes técnicas. A segunda forma mais utilizada é o ELISA sanduíche, onde o antígeno é colocado ente dois anticorpos. Para detecção e captura do anticorpo, um dos anticorpos estará conjugado com a enzima, para que possa ser analisada a formação do complexo, por técnicas como cromatografia, fluorescência e densidade. Dessa forma, os testes ELISA podem apresentar resultados de forma qualitativa e quantitativa.

Os testes imunológicos são, principalmente, baseados na caseína como antígeno, devido a sua estabilidade a tratamentos térmicos (DOUGLAS et al, 1981; PINTADO, MALCATA, 1995), podendo ser utilizados em análises de produtos lácteos pasteurizados (HURLEY et al, 2004). As principais frações da caseína analisadas são as β - caseína, γ - caseína, α_{s2} - caseína, κ - caseína e IgG (RICHESTER et al, 1997; HURLEY et al, 2004; HAZA et al, 1999; HAASNOOT et al, 2004) sendo a IgG uma exceção às caseínas, onde se pode analisar até 0,1% de IgG bovino em leite de outras espécies (HURLEY et al, 2004).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Matéria-prima

Amostras de queijo *mozzarella* elaborado com leite de búfala pasteurizado de três marcas encontradas no comércio varejista da região metropolitana do Rio de Janeiro foram analisadas e adquiridas no período de seis meses, a partir de janeiro de 2009.

Dois amostras de queijo *mozzarella* de referência foram preparadas, sendo uma delas com leite bubalino e a outra com leite bovino, segundo a tecnologia padrão de fabricação. Os leites das duas espécies foram adquiridos de fornecedores locais, no mês de janeiro de 2009, sendo o leite de búfala proveniente do Sítio São Judas Tadeu, localizado no município de Itaguaí - RJ, e o leite bovino do Instituto de Zootecnia da Universidade Federal do Rural do Rio de Janeiro - RJ. Vinte litros de leite de cada espécie foram adquiridos para fabricação dos queijos em dias alternados, para evitar contaminação cruzada entre as espécies.

O fermento láctico adquirido na cidade de Juiz de Fora (MG) foi do tipo termofílico TCC 20® (Chr Hansen), contendo *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. O coalho líquido (força: 1:3.000), fornecido pela HA-LA do Brasil, CHR. HANSEN IND. e COMÉRCIO LTDA® foi utilizado nas proporções indicadas pelo fabricante.

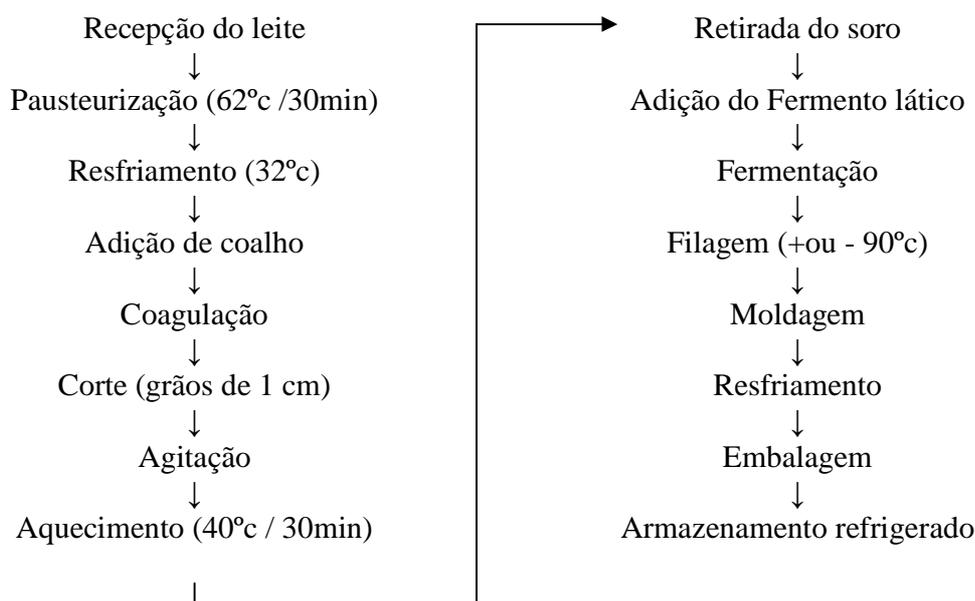


Figura 4. Fluxograma de elaboração da *mozzarella*.

(Adaptado de VERRUMA, SALGADO, 1993.)

Após a fabricação, as amostras foram individualizadas em embalagens plásticas apropriadas e rotuladas.



Figura 5. *Mozzarella* de referência elaborada com leite de búfala.

As amostras encontradas no comércio varejista da cidade do Rio de Janeiro foram adquiridas em lotes distintos de três principais marcas (1, 2 e 3) e apenas a marca 3 apresentava no rótulo que o queijo era elaborado com leites misturados, sendo 78% leite bovino e 22% leite bubalino. Os queijos das outras marcas não informaram misturas de leite das duas espécies. Todos os queijos estavam embalados a vácuo e apresentavam registro no Serviço de Inspeção Federal (SIF).



Figura 6. Marcas principais encontradas no varejo do Rio de Janeiro

4.2 Amostragem

A amostragem foi realizada durante seis meses, onde foram coletadas 13 amostras, com duas coletas, as quais pertenciam a lotes de produção diferentes, adquiridas em suas embalagens originais, que eram mantidas sob refrigeração em câmaras frigoríficas a temperatura de 4 a 8°C. Todas as análises foram realizadas no Laboratório Analítico de Alimentos e Bebidas – LAAB, o Instituto de Tecnologia da UFRRJ.

4.3 Preparo das Amostras

Cada amostra, de referência e comerciais, foi triturada e preparada conforme a análise realizada, sendo todas conduzidas em triplicata.

4.4 Preparo das Amostras para Determinação de Proteína pelo Método Elisa

As amostras foram trituradas, coletando-se 2 (dois)g de pontos alternados da embalagem de armazenagem. Foram preparados 3 litros de solução de bicarbonato de sódio 0,05M para adição de 20 mL a cada amostra. A resultante foi colocada em tubos de polietileno tampados e homogeneizados em agitador de tubos AP56-Phoenix em agitação periódica com velocidade máxima por 2 minutos. A porção extraída foi removida com micropipeta de 100µL para tubos de eppendorf, seguida de centrifugação em centrífuga de 6 amostras EBAlII, modelo CN-02, em velocidade máxima à temperatura ambiente. O líquido sobrenadante foi colhido com micropipeta de 100µL e transferido para tubo eppendorf limpo para posterior etapa de determinação de proteína.

4.5 Preparo das Amostras para Determinação de Proteína por Método Kjeldahl

Após elaboração das amostras de referência, estas foram avaliadas tomando-se cinco amostras de cada referência – queijo de búfala, queijo bovino e leite em pó bovino desnatado - em relação ao seu conteúdo protéico através de método tradicional, Kjeldahl, para determinação de nitrogênio total, pela fórmula, segundo IN 68 (BRASIL, 2006).

$$\% \text{ nitrogênio total} = \frac{V \times N \times f \times 0,014 \times 100}{m}$$

$$\% \text{ protídios} = \% \text{ nitrogênio total} \times F$$

Onde: V= volume gasto de ácido clorídrico; N= normalidade do ácido clorídrico; f= fator de correção; m= massa da amostra em gramas; F= fator de conversão da proteína.

4.6 Preparo das Soluções Estoque Padrão

Após determinação de proteína pelo método de Kjeldahl e mensuração dos conteúdos de proteína dos padrões queijo de búfala, queijo bovino e leite em pó bovino, foi preparada uma solução estoque de queijo bovino e leite em pó bovino para determinação da menor concentração de caseína bovina lida pelo Kit ELISA, verificando o comportamento do Kit em relação a diferentes matrizes e teores de caseína bovina.

A solução estoque continha 50 ppm de cada matriz e originou sete concentrações de diferentes de caseína bovina: 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 ppm para determinação da quantidade mínima de caseína bovina determinada pelo Kit Elisa. Esta solução de 50 ppm foi feita com solução de bicarbonato de sódio 0,05M e foi distribuída em 7 balões volumétricos de 100 mL, utilizando a mesma bureta de 25mL em todas as diluições, para garantir o mesmo erro analítico, na quantidade de 1mL, 2 mL, 4 mL, 6 mL, 8 mL, 10 mL e 12 mL



Figura 7. Agitador de tubo AP56-Phoenix

Figura 8: Centrifuga de 6 amostras



Figura 9. Amostra padrão – Solução estoque 50 ppm de matriz bovina

4.7 Percentuais de Mistura dos Queijos

Para determinação da quantidade de caseína na mistura dos queijos em diferentes percentuais, as amostras de referência foram trituradas e misturadas na proporções de 0% de queijo bovino ou 100% de queijo bubalino, 25% de queijo bovino, 50% de queijo bovino, 75% de queijo bovino e 100% de queijo bovino.



Figura 10. Mistura dos percentuais de queijos de referência

4.8 Método ELISA

Nas análises de detecção de caseína bovina foi utilizado o método imunológico de teste Elisa indireto competitivo (Casein Assay Kit Cat. No. 902062w®Tepnel Research Products e Services), onde anticorpos para caseína bovina foram adicionados a um microtubo, em reação indireta. A caseína foi extraída das amostras determinadas com biotina, que se liga a sítios de ação presentes na caseína. A presença de biotina pode ser determinada usando-se avidina peroxidase (HRP) e substrato TMB. As amostras de queijos foram extraídas usando solução básica e diluição. Esse extrato diluído foi adicionado a microtubos e cobertos com anticorpos anti-caseína bovina e reagindo com caseína-biotina, TMB e HRP sob incubação. Os resultados foram determinados pelo desenvolvimento de uma coloração azul proporcional à quantidade de caseína presente na amostra.

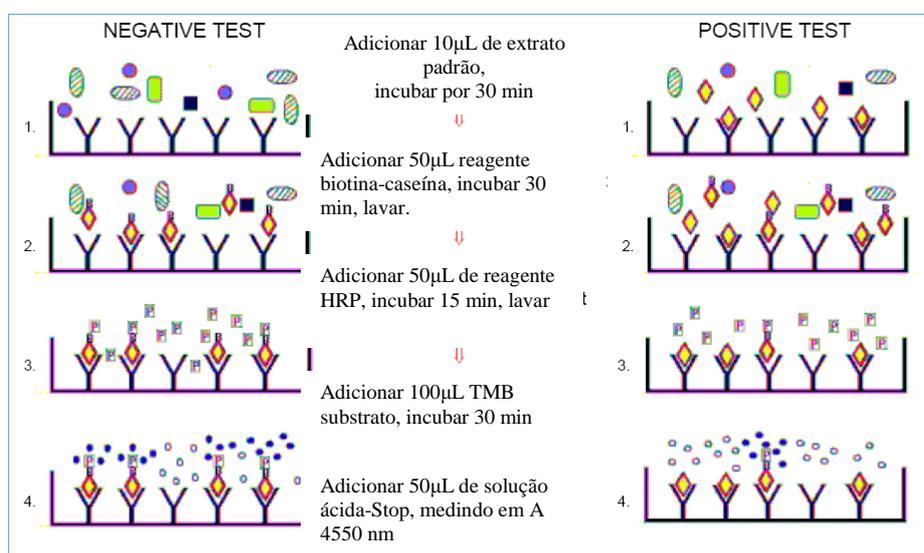


Figura 11. Esquema da reação ocorrida no biokit casein assay

A determinação de proteína utilizando Biokit Casein Assay Kit seguiu as seguintes etapas:

1. Adicionar 100 µL de substância de interesse extraída por processo de preparação da amostra aos micro tubos presentes no Kit, como representado na figura X ;
2. Colocar os microtubos em homogeneizador – marca utilizada Certomat® BS-1, B.Braun Blotech International – a 100 rpm por 30 minutos.
3. Imediatamente após, acrescentar 50 µL de Caseína Biotina a todos os tubos. Incubar por 30 minutos.
4. Descartar o líquido dos microtubos completando com solução de lavagem. Descartar o líquido e repetir mais quatro vezes, totalizando cinco lavagens. Após descarte final, secar todo o resíduo da solução de lavagem com papel absorvente.
5. Adicionar 50 µL de Avidina peroxidase em todos os tubos. Incubar por 15 minutos no homogeneizador.
6. Repetir a lavagem.

7. Adicionar 100 μL de TMB substrato a todos os tubos. Misturar gentilmente em superfície plana e incubar por 30 minutos, mantendo a superfície estática.
8. Verificar alteração de cor nos tubos, indicando presença ou ausência de caseína bovina.
9. Adicionar 50 μL de solução Stop a todos os tubos.
10. Ler no espectrofotômetro a 450 nm, em no máximo 10 minutos, a intensidade da cor correspondente à quantidade de caseína presente.



Figura 12. Biokit Casein Assay Kit Cat. No. 902062w © TEPNEL



Figura 13. Microtubos provenientes do Biokit Casein Assay

4.9 Análise Estatística

Os dados de absorvância para avaliação dos Limites de Quantificação (LQ) e Determinação (LD) com intervalo de confiança de 95% foram obtidos utilizando o método de valores extremos (outliers) com aplicação do teste de Jack-Knife. A linearidade dos resíduos, isto

é, a avaliação se o método pode dar respostas proporcionais à quantidade de analito a ser determinada na amostra, foi medido por diversos testes, a saber: teste de Ryan-Joiner-normalidade dos resíduos; teste de Durbin-Watson - Autocorrelação dos resíduos; teste de Brown-Forsythe - Homogeneidade da variância dos resíduos; ANOVA da regressão e Teste de Desvio de Linearidade. Para estas determinações utilizou-se a planilha de Avaliação da Linearidade de Curva Analítica do Instituto Nacional de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (BASÍLIO, 2008). Para Análise de diferença estatística entre as amostras adquiridas no comércio foi utilizado Teste de Tukey, com auxílio de planilha *Microsoft Excel*.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação da Eficiência do Kit ELISA

Com a finalidade de aferir a eficiência do Kit, foi quantificado o teor de proteína das amostras do queijo de búfala, queijo bovino e leite em pó comercial. Esta quantificação foi feita em nitrogênio total, conforme método oficial de determinação de nitrogênio total (BRASIL, 2006). Os resultados para queijo de búfala, queijo bovino e leite em pó comercial foram de $26,13 \pm 0,64$, $22,85 \pm 0,78$ e $32,12 \pm 0,94$ com intervalo de confiança de 95,45%, respectivamente, seguindo o cálculo de % de protídeo = % Nitrogênio total x Fator de Conversão para laticínios de 6,38. A partir destes valores foi possível determinar a proporção necessária de queijo bovino e leite em pó para determinação das concentrações em mg/L ou ppm para preparação das soluções estoque, seguindo os cálculos.

Tabela 6: Quantidade necessária de amostra para preparação da solução estoque

Quantidade de Caseína por 100 mg	Quantidade necessária para preparar solução de 50 ppm
32,12 mg	0.1562g de leite em pó bovino
22,85 mg	0.2273g de queijo bovino

5.2 Testes Quantitativos

5.2.1 Soluções estoque padrão

Após diluições das amostras de referência, as diferentes concentrações de caseína (0, 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0 e 6,0) foram analisadas pela metodologia ELISA. A leitura do branco, no caso, 0% de Caseína bovina ou 100% caseína bubalina, apresentou absorvância de 0.332 a 450 nm, que foi descontada das outras leituras a 450 nm. Os valores integrais com suas respectivas curvas analíticas serão apresentados nos anexos A, B e C.

As soluções de queijo de vaca e leite em pó apresentaram os resultados de concentração de caseína a 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0 e 6,0 ppm com valores de absorvância de 0.05, 0.088, 0.129, 0.146, 0.179, 0.241, 0.305 e 0.306 respectivamente para o queijo bovino, e, 0.05, 0.100, 0.101, 0.124, 0.146, 0.185, 0.190, 0.218, 0.240, respectivamente para o leite em pó bovino, descontados os valores de zero, amostra com 100% queijo de búfala e curvas analíticas da concentração de caseína bovina (ppm) x absorvância a 450 nm conforme a figura 14 e 15.

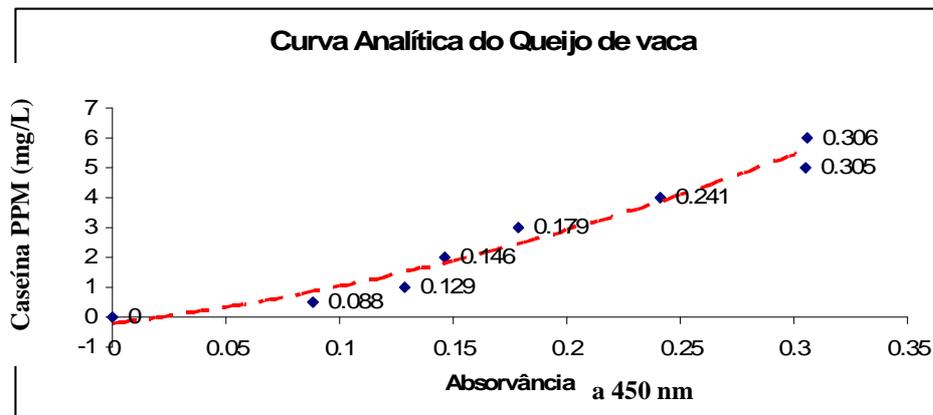


Figura 14: Curva analítica do Queijo de Vaca

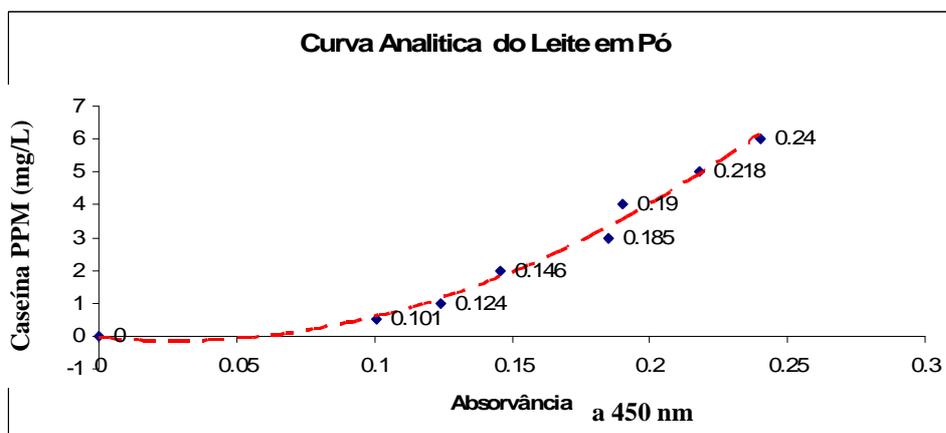


Figura 15: Curva analítica do Leite em pó

Conforme calculados, os resultados encontrados pela curva padrão utilizando o kit ELISA para as amostras de referência foram: Limite de detecção e quantificação para o leite em pó de 1.34 e 3.84, respectivamente, e Limite de detecção de 1.15 e quantificação de 3.31 para queijo de vaca.

A equação da reta apresentava valores de $a = 4.04 \times 10^1$ e $b = 4.15 \times 10^{-2}$, com $r = 0.9828$ e $R^2 = 0.9658$ para queijo de vaca e $a = 4.31 \times 10^{-1}$ e $b = 2.40 \times 10^{-2}$, com $r = 0.9872$ e $R^2 = 0.9745$ para leite em pó. As análises de ANOVA Fator único, utilizando planilha de Excel, com $P > 0.05$ mostraram que não houve diferença significativa entre as curvas analíticas, como apresentado na tabela 7. Porém, a partir dos resultados de limite de detecção e quantificação é possível observar que neste trabalho houve interferência do tipo de matriz nos resultados de eficiência do kit.

Tabela 7: Análise de ANOVA Fator único em relação aos valores de Absorvância a 450 nm

Anova: fator único

RESUMO

Grupo	Contagem	Soma	Média	Variância
Leite em pó	7	3.536	0.505143	0.002482
Queijo de vaca	7	3.718	0.531143	0.00748

ANOVA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0.002366	1	0.002366	0.475007	0.503802	4.747221
Dentro dos grupos	0.05977171	12	0.004981			
Total	0.06213771	13				

Fujii et al (2002) e Nunes (2005) também relataram a observação de efeito matriz na utilização de teste ELISA, devido à interferência nas reações imunológicas, por interações inespecíficas de anticorpos a componentes alimentares, uma característica intrínseca ao ensaio. Esse efeito pode ser observado neste estudo em relação aos valores apresentados para curva de leite em pó e queijo de vaca preparadas com solução estoque padrão. Estas soluções apresentavam valores diferentes, mas sem afetar as análises.

Outro fator observado por Haza (1999) que poderia causar alteração nos dados com apresentação de falso-positivo nos ensaios imunológicos seria o tratamento térmico utilizado na preparação dos derivados de leite. A identificação das espécies poderia ser influenciada por uma substituição de aminoácidos na estrutura de proteínas afetando o reconhecimento desta pelo Kit. Porém, isto só pode ser observado em tratamentos térmicos à temperatura de 110°C por 5 minutos. Calvo et al (1989) estudando o efeito térmico na determinação de adição de leite bovino em leite caprino e ovino relatou que o tratamento térmico a 74°C /15s não influenciaria na determinação do percentual da mistura. Já o tratamento a 90°C /30s poderia afetar ensaios imunológicos. Douglas et al (1981), afirmou que proteínas do soro poderiam ser afetadas pelo tratamento térmico, porém as frações da caseína não teriam sua função afetada, podendo ser detectada, no caso do estudo, por eletroforese em gel. Desta forma, mesmo sendo um fator influenciador na análise pelo método ELISA, o tratamento térmico não influenciou o estudo desenvolvido, pois foi analisada como antígeno a caseína bovina.

5.2.2 Avaliação das amostras adquiridas no comércio varejista

As amostras adquiridas no comércio varejista, em relação à quantidade de caseína bovina presente, apresentaram os valores encontrados na tabela 8, onde as letras de A a N representavam as diferentes amostras de queijo *mozzarella*, totalizando número de 13 e os números de 1 a 3 correspondendo as três principais marcas dos produtos:

Tabela 8. Quantidade de caseína das amostras adquiridas no comércio varejista

Amostras Comerciais	Absorvância a 450 nm (média da triplicata)	Quantidade de Caseína Bovina (média da triplicata)
A3	0.553	1.70
B3	0.579	1.78
C3	0.372	1.14
D3	0.665	2.04
E1	0.366	1.12
F1	0.326	1.00
G1	0.339	1.04
H1	0.387	1.19
I1	0.324	0.99
J1	0.351	1.07
K2	0.330	1.01
L2	0.338	1.03
M1	0.360	1.10

Estas quantidades de caseína foram obtidas através do cálculo da equação da reta com valores de $a = 3.24 \times 10^{-1}$ e $b = 3.36 \times 10^{-3}$, com $r = 0.9844$ e $R^2 = 0.9691$. Através do teste de Ryan-Joiner- normalidade dos resíduos, os dados apresentavam R_{crit} ($\alpha=0.05$) de 0.93, sendo R_{eq} 0.96, significando que os dados seguem a normal. O teste de Brow-Forstythe relata valores de t_L de -6.58×10^{-1} e t_{calc} ($\alpha=0.05$) de 2,2 apresentando homogeneidade das variâncias. ANOVA da regressão e Teste de Desvio de Linearidade classificaram a regressão como significativa, com desvio de linearidade.

A figura 16 apresenta a curva analítica dos percentuais de queijos em relação à concentração (mg/g) de caseína bovina na absorvância de 450 nm, com valores de 0, 0.054, 0.160, 0.222 e 0.359 de absorvância, descontado o valor do branco (0% caseína bubalina).

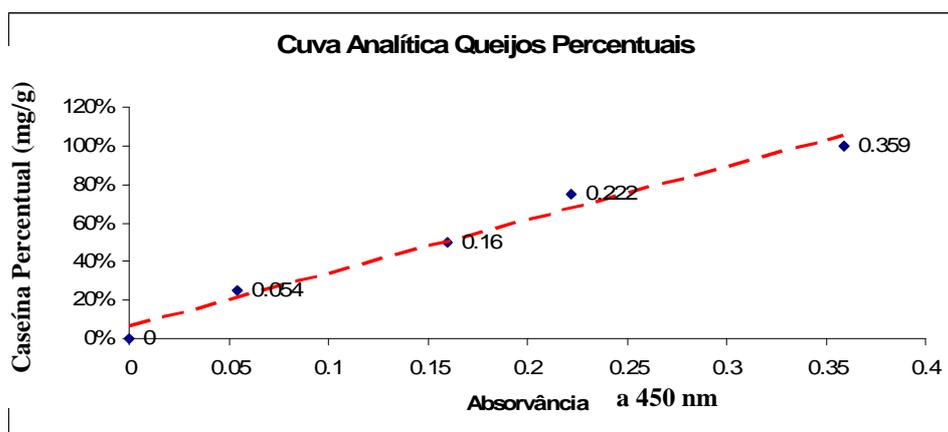


Figura 16. Curva analítica dos percentuais de queijos em relação à caseína bovina.

No determinação da curva de referência final (curva do kit) estabeleceu-se que as amostras de referência com 100% de leite bovino representaram limite máximo de 2,13mg/g de caseína bovina, e a com 100% de leite bubalino, limite mínimo de 1,04,mg/g. A amostra feita com 50% leite bovino e 50% leite bubalino apresentou limite médio de 1,51mg/g. O Limite de 30%, valor permitido pela legislação na mistura do leite bovino com outras espécies foi de 1,41mg/g, e com Limite de Detecção de 3,84% e Limite de Quantificação de 1,15%. Os valores dos queijos adquiridos estão representados por losango, como demonstrado na figura 17.

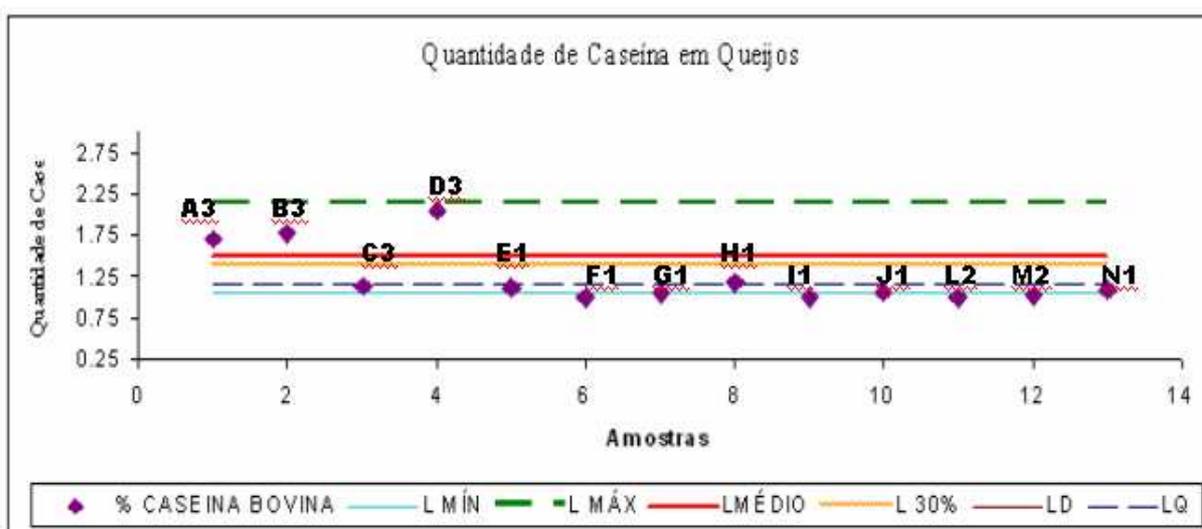


Figura 17. “Carta controle” da quantidade de caseína das amostras adquiridas.

Estudos de Haza (1999) utilizando ELISA indireto e indireto competitivo para análise de α_{s1} - caseína, β e κ -caseína apresentaram limite de detecção de 0,5% e 0,25% de leite bovino em leite de cabra e ovelha. Richeter et al (1997) analisando γ -caseína com ELISA indireto competitivo obteve limite de detecção de 0,1%, ou 0,5 $\mu\text{g/mL}$. Hurley et al (2004) utilizou Ig – G por ELISA competitivo indireto apresentou limite de detecção de 0,1%. Em estudo no mesmo ano, Hurley et al (2004) relatou que os diferentes tipos de ELISA, como mencionados anteriormente, apresentavam limite de detecção de 0,1 a 1% e Borková e Snáselová (2005) obtiveram limite de detecção de 0,5%. Mesmo todos estes estudos indicando que o teste ELISA detecta valores de adição de leite bovino na faixa de 0,1%, estas quantidades não teriam valor prático, pois valores tão baixos poderiam ser mais uma contaminação cruzada involuntária do que uma adulteração deliberada, sendo improvável economicamente (FELIGINI et al, 2005; BOTTERO et al, 2003). Devido a este pensamento a União Européia (EC No 213/2002) especifica para método de análise de adulteração o limite de detecção de 1% como faixa suficiente para validação metodológica. No presente estudo o limite de quantificação, a menor concentração do analito detectável, foi de 1,15%.

Análise Estatística utilizando Teste de Tukey para comparação das médias com $\alpha=0,05$, os resultados constataram haver diferença estatística entre os valores de absorvância e conseqüentemente entre as quantidades de caseína apresentadas nas amostras adquiridas no comércio, como representado na tabela 9 a seguir.

Tabela 9: ANOVA Fator único em relação aos valores de caseína das amostras comerciais.

Anova: fator único
ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0.464687	12	0.038724	186.4946	4.91E-22	2.147928
Dentro dos grupos	0.005399	26	0.000208			
Total	0.470086	38				

DMS (diferença mínima significativa) - o valor mínimo para existir diferença entre uma MÉDIA e outra

DMS = 0.0212147

Do total de treze amostras comerciais analisadas 23.07% (n=3) estavam em desacordo, apresentando valores de caseína bovina acima do percentual aceitável para estas misturas (adição de leite bovino até 30%) conforme convenção – Portaria nº 236, da Secretaria de Inspeção de Produtos de Origem animal (SIPA) (MANDELLA-OLVEIRA, 2005). A aplicação do teste de Tukey mostrou que houve diferença estatística entre as amostras adquiridas no comércio, sendo as amostras A3 e B3 semelhantes entre si, com diferença estatística entre as demais, e D3 apresentando diferença entre todas as outras amostras. Esses resultados foram semelhantes ao apresentado por Buzi et al (2009), onde analisando as marcas comerciais por eletroforese, foi observada adição de leite bovino em queijos caracterizados como 100% bubalino em 22% das amostras analisadas.

5.3 Teste Qualitativo

A análise de ELISA apresenta como determinação inicial o teste qualitativo, onde alterações de cores representam resultados positivos ou negativos nas amostras testadas. Neste contexto, as amostras adquiridas no comércio varejista (anexo D) e as amostras de referência foram analisadas conforme tonalidade aparente, seguida da leitura na absorvância de 450 nm em espectrofotômetro.

Na figura 18, as tonalidades de azul, mais escuras, demonstravam as variações nos valores de caseína bovina, como demonstrado por suas respectivas absorvâncias.

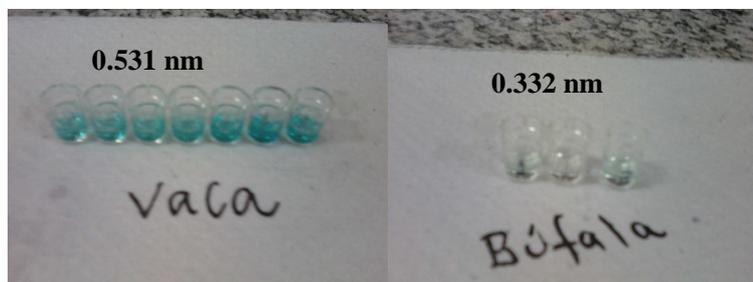


Figura 18: Teste qualitativo ELISA amostras de referência

A figura 19, representa as alterações na tonalidade, e corresponde às diferentes respostas observadas para as diversas quantidades de caseína nos queijos.

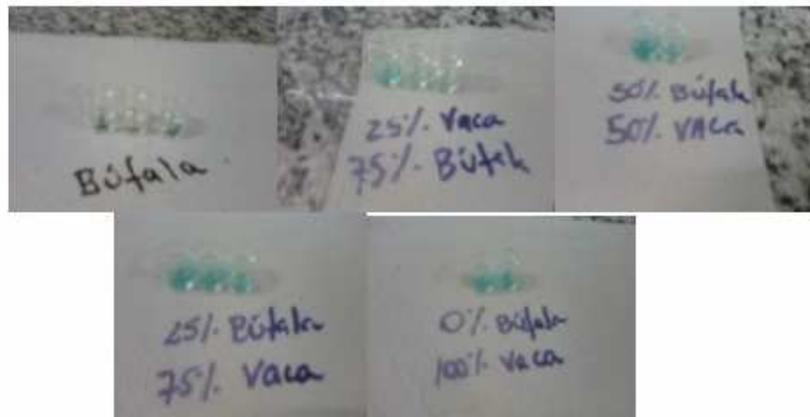


Figura 19: Diferentes tonalidades observadas nos queijos de referência pelo teste qualitativo ELISA

Em relação ao teste qualitativo, Fujii et al (2004) utilizando ELISA competitivo indireto para detecção de micotoxinas, afirmaram o potencial da técnica imunológica, principalmente, pela facilidade na operação e na utilização na prática de “campo” já que o teste qualitativo, uma vez padronizado, compensa o custo inicial pela praticidade em uma triagem rápida. Ono et al (2004) relataram que consideram desvantagem o tempo necessário para completar o teste, aproximadamente duas horas. Porém o teste qualitativo pode ser observado em uma hora.



Figura 20: Embalagens de amostras adquiridas no comércio

Em relação aos valores de queijos bubalinos adulterados com adição de leite de bovino acima de 30% na mistura, diversas reportagens relatam a situação da “pirataria” no mercado varejista. A revista Dinheiro Rural, de 11 de junho de 2008 apresenta reportagem com título “A mussarela contra – ataca” mencionando que há no mercado queijos com 80% de leite de vaca sendo vendidos como *mozzarella* de búfala. Outra reportagem, apresentada no JB *online* de 5 de maio de 2008, com título “Associação intensifica ação em leite de búfalo” anuncia que a Associação Brasileira dos Criadores de Búfalos (ABCB) intensificou a campanha do Selo de Pureza 100% búfalo até o fim de 2008 promovendo ações de conscientização do público e formadores de opinião na tentativa de proteger o consumidor da falta de informação que os leva a consumir produtos adulterados com até 75% de leite de vaca. O jornal Estado de São Paulo, de 30 de abril de 2008, apresenta como reportagem de capa, com título “Pureza garantida”, uma discussão sobre a bubalinocultura no país, afirmando que constataram a presença de queijos com até 70% de leite de vaca sendo vendido como queijo bubalino, e que para o consumidor é difícil detectar, pois alguns produtores misturam produtos branqueadores para branquear o queijo. E o que favorece a adulteração é o fato dos produtos misturados custarem mais caro que a *mozzarella* bovina e mais barato que os queijos fabricados com 100% leite bubalino. O mesmo foi observado

por este estudo. As amostras adquiridas no comércio apresentando 100% leite bubalino eram vendidas com valores de R\$ 29,96 a R\$ 32,49 o quilo, em comparação ao valor de R\$ 20,00 dos produtos com mistura dos diferentes leites. Outra reportagem, no jornal Folha de São Paulo, de 23 de agosto de 2007, com título “Mussarela de búfala x Mussarela de búfala com leite bovino” menciona a dificuldade dos consumidores em diferenciar os produtos nas gôndolas da seção de laticínios, pois os produtos misturados são encontrados lado a lado com os produtos 100% bubalinos, acondicionados em embalagens idênticas, com mesma cor e formato, com inscrição “*mozzarella*” sem especificar a espécie de origem. No texto informam que na Itália é proibido o uso do nome “*Mozzarella*” em produtos que não forem elaborados apenas com leite bubalino, o que não é observado em nosso país, como pode ser observado na Portaria nº366 do MAPA. Em estudo de Yoshizawa et al (2003) observou-se que 19,9% dos rótulos continham informações que poderiam induzir o consumidor ao erro, em relação a RDC nº 259 da ANVISA. Marins et al (2008) constaram que 24% dos consumidores no município de Niterói não confiavam no conteúdo dos rótulos por acreditarem que as informações eram manipuladas, e segundo Crepaldi (2006), 82% dos consumidores adquiriam produtos devido ao visual que este apresentava. Esses estudos confirmam que o incentivo e a conscientização dos consumidores quanto à leitura dos rótulos deve ser desenvolvida.

5.4 Recomendações

O teste ELISA indireto utilizando Kit Casein Assay apresentou resultados satisfatórios com respeito à determinação da autenticidade de derivados de leite de búfala, porém algumas observações são necessárias quanto ao seu manejo:

- O Kit apresentou necessidade de preparo das amostras das amostras, sendo necessário o emprego de centrifuga, e homogeneizador, e *shaker*;
- As quantidades de amostras necessárias para realização do teste eram pequenas, porém isso representava uma dificuldade na etapa de leitura em espectrofotômetro, onde foi imperativo o emprego de cubeta com volumes abaixo de 1mL;

Em relação aos produtos vendidos no comércio varejista da cidade do Rio de Janeiro:

- O ato de avaliar os rótulos dos produtos adquiridos no comércio deve ser estimulado entre os consumidores, para que estes possam aprimorar o processo de compra não só baseando-se no preço atrativo, mas também evitando lesar seus direitos e garantindo boa qualidade nutricional;
- Os produtos comerciais deveriam ser apresentados com nomenclatura ou apresentação diferenciada evitando confundir o consumidor.

6 CONCLUSÃO

O teste imunológico ELISA, desde que feito com testes prévios com amostras conhecidas, apresentou-se como instrumento para de uso no controle de adulteração em derivados do leite de búfala, conforme apresentado nos resultados estatísticos. Através deste método foi possível a utilização da caseína bovina como determinante de fraudes em derivados de leite bubalino. Com seu auxílio foi possível observar que alguns queijos *mozzarella* oferecidos no varejo da cidade do Rio de Janeiro apresentavam adulteração e não conformidade dos rótulos, por não especificar em proporção a mistura de leite das espécies bovina e bubalina, contribuindo no combate à fraude monetária sobre os consumidores.

7 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABCB - Associação Brasileira dos Criadores de Búfalos. **Padrão racial**. Disponível em <www.bufalo.com.br>. Acessado em: 15/07/2009.

ABCB - Associação Brasileira dos Criadores de Búfalos. **Manual do criador**. Disponível em <www.bufalo.com.br>. Acessado em: 15/07/2009.

ABCB - Associação Brasileira dos Criadores de Búfalos. **Regulamento do SRG**. Disponível em <www.bufalo.com.br>. Acessado em: 15/07/2009.

ALBONICO, F. e MINCIONE, B. **Recenti progressi nella conoscenza delle proteine del latte di bufala**. In: COVEGNO INTERNAZIONALE SULL'ALLEVAMENTO BUFALINO NEL MONDO, 1, Caserta, 1974. P. 189- 201

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

ANDRADE, V.J.de; GARCIA, S.K. Padrões raciais e registro de bubalinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. V.29, n. 1, 2005.p.39-45.

ASENSIO, L., GONZÁLEZ, I., GARCÍA, T., MARTÍN, R. Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Food Control**, Vol.19, No1, pp. 1-8, 2008.

BASÍLIO,F. **Planilha de avaliação da Linearidade de curva analítica** do Instituto Nacional de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz. 2008.

BASTINETTO, E. **Aspectos Econômicos as Criação de bubalinos em Minas Gerais**. II Simpósio Mineiro de Buiatria, Belo Horizonte, MG, Brasil, 2005.

BENJAMINI, E. **Imunologia**. Editora Guanabara Koogan S.A. 4 Edição, pp 288, 2002.

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

BONASSI, I. A.; CARVALHO, J.B.C.; VILLARES, J.B. Utilização do leite de búfala como matéria-prima para a elaboração do queijo *Mozzarella*. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.32, n.4. 1982. p.903-912.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento-MAPA. Instrução Normativa Nº 51, Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite tipo B, do Leite tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta, **Diário Oficial da União**, Brasília, DE 18 DE SETEMBRO DE 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. Decreto-Lei n. 986. Normas Básicas sobre Alimentos, de 21 de outubro de 1969. **Diário Oficial da União**. Poder Executivo. 1969.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. Portaria n.371. Regulamento Técnico para Rotulagem de Alimentos Embalados. **Diário Oficial da União**. Poder Executivo, de 08 de setembro de 1997.

BRASIL. Agência de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução RDC n. 259. Regulamento Técnico para Rotulagem de Alimentos Embalados. **Diário Oficial da União**. Poder Executivo, 23 de setembro de 2002.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria n. 366, de 04 de setembro de 1997b. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Massa para elaborar Queijo *Mozzarella* (Muzzarella ou Mussarela). **Diário Oficial da União**, Brasília, DF. Disponível em http://www.agais.com/normas/leite/queijo_mussarela_massa.htm.

BRASIL. **CONGRESSO NACIONAL**. Código de Defesa do Consumidor. Lei nº 8078, de 11 de setembro de 1990.

BRASIL. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial – INMETRO. Regulamento Técnico Metrológico estabelecendo a forma de expressar o conteúdo líquido a ser utilizado nos produtos pré-medidos. **Diário Oficial da União**. Poder Executivo, 20 de agosto de 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Instrução Normativa n.68. Oficializa os métodos Físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 12 de dezembro de 2006.

BORKOVÁ, M.; SNÁSELOVÁ, J. Possibilities of different animal milk detection in milk and dairy products – a review. **Czech Journal Food Science**, Vol. 23, No 2, pp. 41-50, 2005.

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

BUZI, K.A.; PINTO, J.P. de 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, 2009.

CALVO, M.M.; AMIGO, L.; OLANO, P.J.; MARTIN e M.RAMOS. Effect of thermal treatments on the determination of bovine milk added to ovine or caprine milk. **Food Chemistry**, n. 32, p. 99-108, 1989.

CASTALDO, M.C., La bufala ed el suo tipico prodoto: “La *Mozzarella*”, **Revista di Zootecnia**, v. 32, n. 7/8,. p.203-208. 1960.

CITRO, V. Del latte di bufala un tipico prodotto locale “la *Mozzarella*”. **Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia**, v.32, n.4. p.263-270.1981.

COELHO, K.O.; MACHADO, P.F.; COLDEBELLA, A.;CASSOLI, L.D. E CORASSIN, C.H. Determinação do perfil físico-químico de amostras de leite de búfalas por meio de analisadores automatizados, **Ciência Animal Brasileira** v. 5, n. 3, jul./set. p. 167-170. 2004.

COMMISSION REGULATION (EC) No **213/2001 Normas de execução no que respeita aos métodos a utilizar para a análise e a avaliação da qualidade do leite e dos produtos lácteos**. Disponível em: www.legaltext.ee/text/en/U60803.htm. Acessado em 17/10/2008.

CONSTITUIÇÃO FEDERAL. **Código Penal. Código de Processo Penal**. Organização Luiz Flávio Gomes, 9 Ed. Ver., ampl., e atual. SP. Editora Revista dos Tribunais,RT minicódigos, 2007.

CREPALDI, L. **A influência das cores na decisão de comprar: Um estudo do comportamento do consumidor no ABC paulista**. Intercom – XXIX Congresso Brasileiro de Ciências da Comunicação – UnB, 2006.

CUNHA NETO, O.C.da. **Avaliação do iogurte natural produzido com leite de búfala contendo diferentes níveis de gordura**. Dissertação (mestrado)- faculdade de Zootecnia e Engenharia de alimentos, USP, Pirassununga, SP, p.71, 2003.

DOUGLAS, F.W.; GREENBERG, R.; FARRELL, JR, H.M.; EDMONDSON, L.F. Effects of ultra-high-temperature pasteurization on milk proteins. **Food Agriculture Food Chemistry**, Vol. 29, No 1, pp.11-15,1981.

EMBRAPA. **Búfalos: O produtor pergunta e a EMBRAPA responde**. Editor – técnico: José Ribamar Felipe Marques. EMBRAPA Amazônia Oriental, Belém – Pará. Coleção 500 perguntas, 500 repostas, 176p. 2000.

ESTADO DE SÃO PAULO. Reportagem de capa: **Bubalinocultura**, 30 de abril de 2008.

FAO. **O búfalo**. Brasília: Ministério da Agricultura; São Paulo: Associação Brasileira dos Criadores de Búfalos, 1991. 320p. (FAO, Produção Animal e Saúde, 4).

FELLIGINI, 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 Biomarkes. **Food Techonology Biotechnology**, Vol. 43, No 1, pag 91-95, 2005.

FERRAREZI, A.C. **Interpretação do consumidor, avaliação da intenção de compra e das características físico-químicas do néctar e do suco de laranja pronto para beber**. Dissertação

(mestrado). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Araraquara, SO, 104p., 2008.

FERRARA, B.; INTRIERI, F. Características e emprego do leite de búfala. **Zootecnia**, v.13, n.1. 1975. p.25-50.

FOLHA DE SÃO PAULO. **Mussarela de búfala x mussarela de búfala com leite bovino**, 23 de agosto de 2007.

FONSECA, W. **O búfalo: sinônimo de carne, leite manteiga e trabalho**, 4. ed. São Paulo: Ícone, 1986. 84p.

FOX, P.F.; GUINEE, T.P. Italian Cheeses. In : FOX, P.F. (Ed) **Cheese : Chemistry, physics and microbiology**. New York: Elsevier Applied Science, 1987. V.2, cap 7, p 221-255.

FUJII,S.; GARCIA,L.B.; HIROOKA, E.Y.; Metodologia analítica imunoquímica com ênfase na detecção de micotoxinas-ficotoxinas no sistema agroalimentar. **Alim. Nutr. Araraquara**, v.15, n.3, p.273-284, 2004.

FUJII, S.; ONO, E.Y.S.; HIROOKA, E.Y. Ocratoxina A em café: Controle e Metodologia analítica com ênfase na inovação no contexto de segurança alimentar. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina,v.23, n.2, p.273-292, 2005.

GARCIA, S.K.; AMARAL, A.; SALVADOR, D.F. Situação da bubalinocultura mineira. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.29, n.1, p.19-27, 2005.

GONZÁLEZ, F.H.D. Composição Bioquímica do Leite e Hormônios da Lactação. In: **Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras**. GONZÁLEZ, F.H.D.; DÜRR, J.W.; FONTANELI, R.S. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre – RS. P.72. 2001.

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

HAASNOOT, W., SMITS, N.G.E., KEMMERS-VONCKEN, A.E.M., BREMER, M.G.E.G. Fast Biosensor immunoassays for the detection of cow’s milk in the milk of ewes and goats. **Journal of Dairy Research**, vol 71, pp. 322-329, 2004.

HAZA, A.I., MORALES, P., MARTÍN, R., GARCÍA, T., ANGUITA, G., SANZ, B., HERNÁNDEZ, P.E. Detection and Quantification of goat’s cheese in ewe’s cheese using a monoclonal antibody and two ELISA formats. **Journal of the Science of food and agriculture**, vol.79, pp. 1043-1047, 1999.

HURLEY, I.P.,COLEMAN, R.C., IRELAND, H.E., WILLIAMS, H.H. Measurement of bovine igG by indirect Competitive ELISA as a means of detection milk adulteration. **Journal Dairy Science**, Vol. 87, pag 543-549, 2004.

IBGE – **Pesquisa Agropecuária Municipal**. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pecua/default.asp?t=2&z=t&o=22&u1=1&u2=1&u3=1&u4=1&u5=1&u6=1&u7=1>. Acessado em 25/05/09.

JB ONLINE. Economia – **Associação Intensificadora em leite de búfala**. Redação Investnews, 5 de maio de 2008.

LENZ, G. **Métodos Imunológicos**. Biofísica, 14p., 2004. Disponível em: www.ufgs.br/biofis/bio10003/mimuno.pdf, acessado em 15 de julho de 2009.

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

MARINS, B.R.; JACOB, S.do C.; PERES, F. Avaliação Qualitativa do hábito de leitura e entendimento: recepção das informações de produtos alimentícios. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.28, n.3, p. 279-585, 2008.

MENDES, M.E.P. **Processo de Decisão de Compra e Estratégia de publicidade**. REAd. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Ed. 8,v.4, n.1, 17p.Porto Alegre – RS. 1998.

MEDEIROS, J.F.; CRUZ, C.M.L. Comportamento do consumidor: Fatores que influenciam no processo de decisão de comprar dos consumidores. **Teoria e Evidência Econômica**, v. 14, Ed. Especial, p. 167-190. Passo Fundo –RS, 2006.

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

NEVES, N.L.B. Caracterização e implantação de uma política para o leite. In: PEIXOTO, A.M.; MOURA, J.C.; FARIA, V.P. **Contribuição da bubalinocultura para a produção leiteira**. Piracicaba: FEALQ, 1985. p.37-46.

NUNES, G.S. Métodos Imunoquímicos para análise de contaminantes ambientais: conceitos, estado da arte e perspectivas. **Química Nova**, v.28, n.3, p.462-471, 2005.

OETTERER, M. Aula: Alimentos: **Leis, Definições e Composição**. Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição. São Paulo. 2008. <http://www.esalq.usp.br/departamentos/lan/pdf/Legislacao%20Alimentos.pdf>

OLIVIERI, D. de A. **Avaliação de qualidade microbiológica de amostras de mercado de queijo mussarela, elaborado a partir de leite de búfala (*bubalus bubalis*)**. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiros”, Universidade de São Paulo, Abril, 2004. 71pag. Dissertação para obtenção do título de mestre em Ciências e Tecnologia de Alimentos.

ONO, E.Y.S.; MENDES, A.M.; MEIRELLES, P.G.; HIROOKA, E.Y.; ONO, M.A. Micotoxina em alimentos – Progressos na imunodeteção. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, n.32, p. 69-80,2004.

PRASAD, R.; PANDITA, N.N. Cholesterol content of milk and it fractionation during processing. **Indian Journal Dairy Science**, v.43, n.2.1990. p.190-193.

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

PROMEMBUL. **Programa de Melhoramento Genético dos Bubalinos – Manual do usuário**. Programa da FMVZ-UNESP-BOTUCATU/ABCB/EMBRAPA. Botucatu, SP, p.27, 2005.

PINTADO, M.E.; MALCATA, F.X. Effect of thermal treatment on the protein profile of whey from ovine and caprine milk throughout lactation. **International Dairy Journal**, Vol. 6, pp. 497-518, 1996.

REVISTA DINHEIRO RURAL. Agronegócios – **Mussarela contra-ataca**, p. 70-71, 11 de junho de 2008.

RICHTER, W., KRAUSE, I., GRAF, C., SPERRER, I., SCHWARZER, C., KLOSTERMEYER, H. An indirect competitive ELISA for the detection of cow's milk and caseinate in goat's and ewes' milk and cheese using polyclonal antibodies against bovine γ – caseins. **Z Lebensm Unters Forsch A**, vol. 204, pag 21-26, 1997.

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

ROSSI, G. **Manuale di tecnologia casearia**. Bologna: Agricole, 684p. 1977.

SÃO PAULO (Estado). Código Sanitário: Decreto nº 12342, de 27 de setembro de 1978: Regulamento da promoção, preservação e recuperação da saúde no campo de competência da Secretaria de Estado de Saúde (revisto e atualizado até dezembro de 1990). 5 ed. São Paulo: **Imprensa Oficial do Estado**, 1992 Decreto nº 12486, de 20 de outubro de 1978: aprova normas técnicas especiais relativas a alimentos e bebidas.

SÃO PAULO (Estado). Código Sanitário: Resolução SAA - 3, de 10-1-2008. Normas técnicas sobre as condições higiênico-sanitárias mínimas necessárias para aprovação, funcionamento e reaparelhamento dos estabelecimentos destinados a leite e produtos lácteos. **Diário Oficial**, Poder Executivo, Estado de São Paulo, Seção I.

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**, v.36,n.6, p.2016-2022, , suplemento. 2007.

SILVA e RAMOS, E.O.T.; PANETTA,J.C.; ISHIZUKA,M.M. Efeito microbocida da fase de filagem, durante a fabricação de “*Mozzarella*” elaborado com leite de búfala. **Higiene Alimentar**, 13(59). jan/fev.. p.28-34. 1999.

SILVEIRA, N.V.V.; SAKUMA,H.;DUARTE,M.; RODAS,M.A.B.; SARUWTARI, J.H.; CHICOUREL,E.L. Avaliação das condições físico-químicas e microbiológicas do leite pausterizado consumido na cidade de São Paulo. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, 49(1). 1989. p.19-25.

SILVEIRA, L.M. de B. **Ambigüidade como recurso semântico em slogans de rótulos**. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Luterana do Brasil – ULBRA. Curso de Letras. Cachoeiro do Sul, 44p. 2006.

SHALASH, M.R. The water buffalo of Egypt. **Acta Veterinaria**, Belgrade, v.83. 1988. p.66-79.

TEIXEIRA, L.V.; BASTINETTO, E.; OLIVEIRA, D.A.A. Leite de búfala na indústria de produtos lácteos. **Rev. bras. reprod. animal**, Belo Horizonte, MG, 29(2)., abril/jun. 2005. p.96-100.

TONHATI, H.; CANAES, T.de S.; LIMA, A.L.F. **Fatores que afetam a contagem de células somáticas e suas relações com a composição e produção de leite de búfalas**. Disponível em: <http://www.spmv.org.br/compavet2004/palestras%20%20resumos/palestra%20buiatria%20Tonhati-celula%20somatica%20leite.doc>. Acessado em 26/05/2009.

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. **Cienc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 24(4). out./dez. 2004. p.669-673.

VARNAM, A.H.; SUTHERLAND, J.P. **Leche y productos lácteos:Tecnología, Química y Microbiología**. Editora Acribia. Serie 1, Alimentos básicos, p.291-363, 1995.

VERRUMA, M.R.; SALGADO, J.M. Avaliação química do leite de búfala em comparação ao leite de vaca. **Scientia Agricola**, v.51, n.1. 1994. p.131-137

VERRUMA, M.R. Avaliação Nutricional do leite de búfala - Seminários em ciências e tecnologia de alimentos. **Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroes”** - Piracicaba - SP, p.35-41. 1990.

VERRUMA, M.R.; OLIVEIRA, A.J.; SALGADO, J.M. Avaliação química e nutricional do queijo *Mozzarella* leite de búfala. **Scientia Agricola**, v.50, n.3. 1993. p.444-450.

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**, v.20, n.2, Campinas, maio/ago, 2000.

YOSHIZAWA, N.; POSPISSIL, R.T.; VALENTIM, A.G.; SEIXAS, D.; ALVES, F.S. et al. Rotulagem de Alimentos como veículo de informação ao consumidor: Adequação e Irregularidades. **B.CEPPA**, Curitiba, V.21, n.1, p. 169-180, 2003.

ZAVA, M.A. **Produção de búfalos**. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1984. 245p.

ANEXOS

Anexo A	Planilha de Avaliação de Linearidade de curva analítica – Leite em pó
Anexo B	Planilha de Avaliação de Linearidade de curva analítica – Queijo de vaca
Anexo C	Planilha de Avaliação de Linearidade de curva analítica – Percentuais de queijos em relação à caseína bovina
Anexo D	Figura do Teste qualitativo, realizado a 450 nm de absorvância.

ANEXO D: Teste qualitativo correspondendo com absorvância a 450 nm.

Marca	Figura	Absorvância a 450 nm
<u>A3</u>		0.553
<u>B3</u>		0.579
<u>C3</u>		0.372
<u>D3</u>		0.665
<u>E1</u>		0.366
<u>F1</u>		0.326
<u>G1</u>		0.339

Anexo D. (continuação)

Marca	Figura	Absorvância a 450 nm
<u>H1</u>		0.387
<u>I1</u>		0.324
<u>J1</u>		0.351
<u>K2</u>		0.330
<u>L2</u>		0.338
<u>M1</u>		0.360