GISELE OLIVEIRA DE SOUZA

**Mozzarella de búfala no mercado varejista de São Paulo:
avaliação da qualidade sanitária e da autenticidade do queijo**

**São Paulo
2015**

GISELE OLIVEIRA DE SOUZA

Mozzarella de búfala no mercado varejista de São Paulo: avaliação
da qualidade sanitária e da autenticidade do queijo

São Paulo
2015

GISELE OLIVEIRA DE SOUZA

Mozzarella de búfala no mercado varejista de São Paulo: avaliação da qualidade sanitária e da autenticidade do queijo

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Profa. Dra. Evelise Oliveira Telles

De acordo: _____

Orientadora

São Paulo
2015

Nº CLASSIFICAÇÃO
Nº TOMBO 034112

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.3167
FMVZ

Souza, Gisele Oliveira de
Mozzarella de búfala no mercado varejista de São Paulo: avaliação da qualidade
sanitária e da autenticidade do queijo / Gisele Oliveira de Souza. -- 2015.
57 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo,
2015.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Profa. Dra. Evelise Oliveira Telles.

1 Muçarela. 2. Leite de búfala. 3. Leite de vaca. 4. Fraude. 5. Microbiologia. I. Título.

São Paulo, 24 de abril de 2014

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Mozzarella de búfala no mercado varejista de São Paulo: avaliação da qualidade sanitária e da autenticidade do queijo", protocolado sob o CEUA nº 1207170214, sob a responsabilidade de Evelise Oliveira De Telles, foi aprovado na reunião de 23/04/2014, e está de acordo com os princípios éticos da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research "Buffalo mozzarella in the retail market of São Paulo: evaluation of cheese health quality and authenticity cheese.", protocol number CEUA 1207170214, under the responsibility Evelise Oliveira De Telles, was approved in the meeting of day 04/23/2014, and agree with Ethical Principles adopted by Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of the University of São Paulo.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SOUZA, Gisele Oliveira de

Título: **Mozzarella de búfala no mercado varejista de São Paulo:** avaliação da qualidade sanitária e da autenticidade do queijo

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

*À Jesus Eucarístico fonte de luz em minha Vida e a Virgem Maria que passa na frente
de todos os meus projetos de Vida.*

*Aos meus Pais (Orlando e Nalva) por tudo que sou razão da vida e por terem feito esse
projeto maravilhoso (Eu).*

*As minhas irmãs Kátia e Sheila sem vocês eu não sei o que seria da minha vida somos
além de irmãs, amigas, companheiras daquelas que choram e sorri sem motivo, com
motivo e de nós mesmas.*

Aos meus sobrinhos (Leonardo e Larissa) pelas alegrias e companheirismo.

Ao meu esposo (Fábio) pela paciência principalmente na fase de produção da tese.

Aos meus cunhados (José e Ricardo) pela amizade e força.

*A Eduarda razão de tudo, pois tudo gira em torno dela deste o seu nascimento filha
perdão por muitas vezes deslocar você para que eu conseguisse escrever (nas casas
das tias (Sheila e Kátia), nas casas das avós (Nalva e Edileuza). Te Amo.*

AGRADECIMENTOS

Ao Departamento Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (**VPS**) pela oportunidade.

A minha orientadora e colega profissional Prof. Dra. Evelise Oliveira Telles, pela disponibilidade, atenção dispensada, paciência, dedicação e profissionalismo. Obrigada.

Aos Professores: José Soares Ferreira Neto, Marcos Bryan Heinemann e Silvio Arruda Vasconcellos pelo incentivo no meu crescimento profissional.

Aos funcionários do VPS (Sheila, Sandra, Alexandre, Renato, Pedrinho, Marcio, Eveline, Biga, Sueli, Jucélia, Paulinha, Cristina, Danival, Vanessa, Washington, Carol, Rose, Antonio, Priscila e Hilda que me incentivaram de forma direta ou indireta.

Aos ex-companheiros de trabalho (Bispo, Zenaide, Liliana, Rosana, Virginia) pela força e incentivo saudade imensa desta galerinha.

Aos Pós-graduando do VPS (Laila, Nara, Mariana, Gisele, Juliana, Léia, Cassia, Marquinhos, Jonas) pelos momentos de descontração.

Aos meus meninos e menina (Antonio, Osvaldo, Nicolas, Juliana e Israel) enviados para o Laboratório de Zoonoses Bacterianas pela motivação, incentivo, ajuda e alegria.....um muito obrigada.

À Elza da Biblioteca, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, pela atenção e colaboração para finalizar da tese.

Aos secretários da Pós por todo apoio e auxílio.

À comissão de Bioética e Roseli da Costa Gomes, Secretaria da Comissão.

A todos os Mestres do Programa de Pós-Graduação do VPS pelos ensinamentos adquiridos nas disciplinas.

O Coordenador do programa de Pós-Graduação Prof. Dr. Fernando Ferreira, e ao chefe de Departamento por todo apoio e incentivo para o meu crescimento profissional.

*“O único lugar onde o sucesso vem antes
do trabalho é no dicionário”.*

Albert Einstein

RESUMO

SOUZA, G. O. **Mozzarella de búfala no mercado varejista de São Paulo: avaliação da qualidade sanitária e da autenticidade do queijo.** [Buffalo mozzarella in the retail market of São Paulo: evaluation of sanitary quality and authenticity of the cheese]. 2015. 57 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Muçarela de búfala é um queijo fresco, de massa filada, que apresenta características como coloração branca, sabor adocicado e alto valor nutricional e que tem grande aceitação pelos consumidores, dispostos a pagar preços diferenciados pela peculiaridade do produto. No entanto, o queijo está sujeito à violação de autenticidade, tanto pela sazonalidade da produção do leite da búfala quanto pelo alto preço do leite e do queijo, quando comparado aos similares oriundos da vaca, bem como à contaminação microbiana. Assim, este trabalho teve por objetivos avaliar a ocorrência de fraude na muçarela de búfala por adição de leite de vaca, e a influência da sazonalidade da produção do leite de búfala na frequência desta adulteração, bem como avaliar a presença de alguns patógenos no queijo comercializado no município de São Paulo. Amostras de muçarela de bolinha cujo rótulo identificava o uso exclusivo de leite de búfala foram submetidas à pesquisa de DNA bubalino e bovino, usando primers para detecção do gene citocromo b (cytb), e à análise microbiológica. A fraude foi detectada em 73% das amostras (77/106), não havendo influência da sazonalidade; em duas amostras (2/106) apenas o DNA bovino foi detectado. Do ponto de vista microbiológico, todas as amostras apresentaram ausência de *Listeria monocytogenes* e de *Salmonella* spp. em 25 gramas, mas 7% (10/138) foram consideradas impróprias para o consumo humano por apresentar Coliformes termotolerantes e/ou *Staphylococcus* coagulase positiva acima dos limites estabelecidos pela legislação vigente. Conclui-se que a fraude por adição de leite de vaca é muito frequente e não é motivada apenas pela redução sazonal da oferta do leite bubalino. Além disso os problemas microbiológicos detectados estão associados às inadequadas condições de higiene da matéria prima e/ou do processo de fabricação e/ou abuso de temperatura de armazenamento do queijo.

Palavras-chave: Muçarela. Leite de búfala. Leite de vaca. Fraude. Microbiologia.

ABSTRACT

SOUZA, G. O. **Buffalo mozzarella in the retail market of São Paulo:** evaluation of sanitary quality and authenticity of the cheese. [Mozzarella de búfala no mercado varejista de São Paulo: avaliação da qualidade sanitária e da autenticidade do queijo]. 2015. 57 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Buffalo mozzarella is a fresh cheese, filada mass, with characteristics such as white color, sweet taste and high nutritional value and has great acceptance by consumers willing to pay different prices for the uniqueness of the product. However, the cheese is subject to violation of authenticity, both the seasonality of production of milk the buffalo as by the high price of milk and cheese when compared to similar coming from the cow as well as to microbial contamination. This work aimed to evaluate the occurrence of fraud in buffalo mozzarella by adding cow's milk, and the influence of the seasonality of production of buffalo milk in the frequency of this tampering and evaluate the presence of some pathogens in cheese marketed in São Paulo. Mozzarella samples of marble whose label identified the exclusive use of buffalo milk were subjected to DNA research buffalo and cattle, using primer for detection of cytochrome b gene (cytb), and microbiological analysis. The fraud was detected in 73% of samples (77/106), with no influence of seasonality; in two samples (2/106) only the bovine DNA was detected. From a microbiological point of view, all samples showed no *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. 25 grams but 7% (10/138) were considered unfit for human consumption by presenting thermotolerant coliforms and / or coagulase positive *Staphylococcus* above the limits established by law. It is concluded that fraud by adding cow's milk is very common and is not motivated only by the seasonal reduction in supply of buffalo milk; microbiological problems encountered are related to inadequate hygiene conditions of raw materials and / or fabrication process and / or storage temperature abuse cheese.

Keywords: Mozzarella. Buffalo milk. Cow milk. Fraud. Microbiology.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Resultado da detecção de DNA bovino e bubalino em amostras de muçarela de búfala (cujo rótulo informa ter apenas leite de búfala) provenientes do comércio varejista de São Paulo, período de abril de 2013 a março de 2014	41
Tabela 2 -	Resultados de coliformes termotolerantes e de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva das amostras muçarela de bola consideradas impróprias para o consumo, segundo RDC 12. São Paulo, período de abril de 2013 a março de 2014	45
Tabela 3 -	Distribuição dos resultados de Coliformes Termotolerantes e <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva em amostras de muçarela de bola comercializadas em São Paulo, período de Abril de 2013 a março de 2014.....	46

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 –	Composição do leite de búfala e de vaca	22
Quadro 2 -	Sequência dos primers utilizados para a detecção de Bos taurus e Bos indicus	33
Quadro 3 -	Sequência dos primers utilizados para a detecção de Bubalus bubalis	34

LISTA DE FIGURA

Figura 1 – Raças de búfalos.....	21
----------------------------------	----

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcento
°C	graus Celsius
®	marca registrada

LISTA DE ABREVIATURAS

ABCB	Associação Brasileira de Criadores de Búfalos
BHI	Caldo infusão cérebro coração
BLEB	Caldo de enriquecimento para listeria tamponado
BVB	Bile verde brilhante
<i>Cytb</i>	Citocromo b
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desorribonucleotídeo trifosfatado
et al.	Colaboradores
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
g	Gramas
HCl	Ácido clorídrico
LABMAS	Laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia
LST	Caldo lauril sulfato triptose
M	Molar
mg	Miligrama
Mgcl ₂	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de sódio
NMP	Número mais provável
Pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia pela polimerase

pH	Concentração de hidrogênio iônico
Pk	Proteinase K
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SS	Ágar salmonella/shigella
TBE	Tris borato EDTA
TE	Tris EDTA
TRIS	Hidroximetil aminometanos
U	Unidades
UFC	Unidade formadora de colônia
μL	Microlitros
μg	Microgramas
Xg	Veze aceleração da gravidade terrestre (9,8m s ²)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	211
2.1	BUBALINOCULTURA.....	21
2.2	LEITE.....	22
2.3	MUÇARELA DE BÚFALA.....	23
2.4	MÉTODO PARA AVALIAR A AUTENTICIDADE DA MUÇARELA DE BÚFALA.....	25
2.5	MICROORGANISMOS NA MUÇARELA.....	27
3	OBJETIVOS	29
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1	AMOSTRAGEM.....	30
4.1.1	Preparos das amostras.....	31
4.1.2	Protocolo de extração e purificação de DNA das amostras de muçarelas de búfala.....	31
4.1.3	Amplificação de DNA.....	33
5	ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	35
5.1	DETERMINAÇÃO DO NMP DE COLIFORMES TERMOTOLERANTES.....	35
5.1.1	Teste presuntivo	36
5.1.2	Teste confirmatório para coliformes termotolerantes.....	36
5.1.3	Contagem de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva.....	36
5.1.4	Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.....	38
5.1.5	Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i>	38
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
6.1	AUTENTICIDADE DAS MUÇARELAS PELA TÉCNICA DA PCR.....	40
7	MICROBIOLÓGICO.....	44
8	CONCLUSÕES.....	48
	REFERÊNCIAS.....	49

1 INTRODUÇÃO

A bubalinocultura no Brasil vêm crescendo ao longo dos anos devido às características dos búfalos, sendo estes animais de tração, produtores de carne e principalmente de leite. Os consumos de leite de búfalo vêm aumentando devido a demanda por alimentos como queijos e manteiga (BASTIANETTO, 2009).

De acordo com IBGE, 2011 o rebanho brasileiro concentra-se na região Norte, a maior produtora do Brasil, seguida pelo Nordeste.

O leite bubalino possui características de maior interesse para a indústria láctea que o leite de vaca, apresentando na sua composição maior concentração de proteína e lipídeos, que conferem maior rendimento de fabricação (para produzir um quilo de muçarela são necessários 5 litros de leite de búfala ou 10 litros de leite de vaca) e menos colesterol (VERRUMA, 1994; SILVA et al., 2003). Apesar da muçarela ser o principal produto de leite de búfala, outros produtos como requeijão, manteiga, iogurte, doce de leite também têm grande interesse de mercado (BUZI et al, 2009). Essas características fazem que o valor pago pelo litro de leite de búfala chegue a ser até quatro vezes maior que o valor do leite de vaca (BUZI et al., 2009).

Os fatos apresentados estimulam a fraude pela adição de leite de vaca. Ao produtor de leite de búfala interessa aumentar o volume de “leite de búfala” produzido e, conseqüentemente o lucro. Ao laticínio, a fraude interessa por aumentar o volume de queijo produzido, auferindo maior lucro devido ao maior preço de mercado dos queijos de búfala. Ao consumidor, no entanto, a fraude representa perda econômica e nutricional (CZERWENKA et al., 2010).

Mussarela ou muçarela existe uma explicação o duplo “Z” de palavras italianas vira em português “ç”, na Itália escreve-se “mozzarella”, haja vista que os principais dicionários e o vocabulário ortográfico da Língua Portuguesa prescrevem a grafia muçarela (portuguesnarede, 2015).

Por isso é de grande importância o desenvolvimento e aprimoramento de técnicas laboratoriais para avaliar a autenticidade da muçarela de búfala.

Algumas técnicas estão disponíveis para identificar esse tipo de adulteração em queijos. A avaliação dos perfis eletroforéticos das proteínas do leite, em especial a fração correspondente à caseína, é eficiente, mas é um método complexo,

demorado, que exige elevada habilidade e sofisticação laboratorial e que tem aplicação limitada em produtos tratados por altas temperaturas devido à desnaturação protéica (DIAS et al., 2009). Já a PCR (Reação em cadeia pela polimerase) é simples, rápida e aplica-se também para produtos lácteos processados, por serem menos afetados pelos processos industriais como aquecimento e fermentação (BOTTERO et al., 2002.; VELOSO, 2002; REA et al., 2001).

Além da muçarela ser uma excelente fonte nutricional para o ser humano, também o é para microrganismos deteriorantes ou patogênicos. Assim o produto está sujeito às condições higiênico-sanitárias de fabricação (FRANCO; LANDGRAF, 2002).

Pelos motivos expostos, o presente projeto tem como objetivo avaliar a autenticidade e a condição higiênico-sanitária de muçarela comercializada no Município de São Paulo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BUBALINOCULTURA

Búfalos são animais domésticos que pertencem a família dos bovídeos, sub-família Bovinae, gênero *Bubalus*, espécie *Bubalus bubalis*. A espécie teve origem na Ásia, tendo sido levada para África, Europa e mais recentemente para o continente americano. A história do rebanho bubalino no Brasil teve seu início aproximadamente em 1895 de forma desordenada, na Ilha de Marajó, no estado do Pará (SILVA, et al., 2003; BASTIANETTO, 2009).

Atualmente, quatro raças são reconhecidas pela Associação Brasileira de Criadores de Búfalos (ABCB) como demonstra a figura 1.

Figura 1 – Raças de búfalos

Fonte: (ABCB, 2015)

Os búfalos são utilizados na tração animal, na produção de leite e de carne. A maior parte destes animais é criado em área tropical com períodos secos e chuvosos (BASTIANETTO, 2009).

Em 2011 o Brasil concentrava 1,277 milhão de cabeças, com um aumento de 7,8% em relação ao ano anterior, as regiões Norte e Nordeste do País concentram o maior número de cabeças, sendo o Pará (38,0%), do Amapá (18,4%) e do Maranhão (6,5%) (IBGE, 2011).

2.2 LEITE

Segundo Associação Brasileira dos Criadores de Búfalos (ABCB, 2001) a produção mundial de leite de búfala cresce 12% ao ano.

No ano de 2009 a produção mundial foi de 92.138.146 mil toneladas, enquanto o Brasil foi responsável pela produção de 29.112.000 mil toneladas nesse mesmo período, o que o coloca na 5ª posição no ranking mundial (FAO, 2009).

Quanto à composição, o leite de búfala apresenta mais proteína, mais lipídeos e menos colesterol que o leite de vaca, conforme pode ser observado no quadro 1 (VERRUMA, 1994; ABCB, 2010). Essas características são de grande valor nutricional e econômico.

Quadro 1 – Composição do leite de búfala e de vaca

COMPONENTES DO LEITE	BÚFALA (%)	VACA (%)
Proteínas	4	3,5
Lipídios	8	3,5
Lactose	4,9	4,7
Água	82	87,8
Colesterol Total	214 mg	319 mg

Fonte: (ABCB, 2015).

A coloração branca é uma das características marcantes do leite de búfala e se deve à presença de vitamina A e ausência de pigmentos carotenoides, precursores da vitamina A e responsáveis pela coloração amarelada do leite bovino e de sabor levemente adocicado (SILVA, et al., 2003; AMARAL;ESCRIVÃO, 2005; MADELLA OLIVEIRA et al., 2005; TEIXEIRA et al., 2005).

A búfala apresenta bons índices de conversão da matéria-seca produzindo um leite de elevado teor de sólidos totais, o que propicia alto rendimento na fabricação de queijos finos, com alto valor agregado (SILVA et al., 2003). Para se produzir um quilo de queijo muçarela são necessários 5 litros de leite de búfala e para muçarela bovina são 10 litros de leite de vaca.

O valor pago pelo litro de leite de vaca, no mês de outubro 2013 foi de R\$ 0,79, sendo bem inferior ao valor pago pelo litro de leite de búfala que, no mesmo período, variou de R\$1,10 até R\$1,25. De fato, dependendo da região, o preço pago pelo leite bubalino chega a ser quatro vezes maior que o valor pago pelo leite bovino, o que é um estímulo à fraude por parte dos produtores, misturando leite de vaca ao de búfala, para aumentar o volume entregue ao laticínio (BERNARDES, 2007).

2.3 MUÇARELA DE BÚFALA

O queijo que utiliza apenas leite de búfala em sua fabricação pode ser denominado como mozzarella, é um queijo tradicional e foi criado no Sul da Itália (MOZZARELLA, 2015).

Muçarela é um queijo obtido pela filagem da massa acidificada (produto intermediário obtido por coagulação do leite por meio de coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas) complementada ou não pela ação de bactérias lácteas específicas segundo a definição do Regulamento (BRASIL, 1997).

Atualmente no mercado varejista o valor pago em média pelo quilo da muçarela de vaca é de aproximadamente R\$50,92 e o da muçarela de búfala R\$90,00 (PAO DE AÇÚCAR, 2015), havendo assim um estímulo à fraude dos produtos pelas indústrias, aumentando o volume produzido à custa de leite de vaca para vendê-los pelo preço referente ao produto bubalino (VERRUMA, 1993;

VERRUMA, 1994; TONHATI et al., 1999; BASTIANETTO, 2005; TEIXEIRA et al., 2005).

Outro estímulo à fraudeção é a sazonalidade da produção do leite de búfala, com o pico de produção nos meses de Março, Abril e Maio e grande redução nos meses de Dezembro, Janeiro, Fevereiro. Nesse período de entressafra tanto o produtor de leite quanto o laticínio podem ser tentados a adulterar o seu produto para manter o mercado (ABCB, 2009).

De acordo com Carvalho (2011), para as criações de produção de leite e para os laticínios, a concentração das parições não é favorável, pois no final do ano ocorre redução na produção de leite levando a diminuição de queijo no mercado.

Sabendo-se que existe um interesse econômico na fraude de produtos derivados do leite de búfala, a possibilidade de identificar a espécie que deu origem ao leite empregado é de extrema importância (BOTTERO et al., 2002).

A participação da muçarela de búfala no mercado brasileiro tende a crescer, uma vez que, nos últimos anos, várias receitas com ingredientes mais sofisticados, típicos da Itália, conquistaram o gosto do grande público e se popularizaram nos restaurantes especializados (VIEIRA et al., 2009).

A pressão da demanda é mais um incentivo à fraudeção com leite bovino (EGITO et al., 2006). Em 2001, estimava-se que a produção diária de muçarela de búfala para o mercado paulistano fosse de 3 mil quilos sendo que a demanda era de 30 mil quilos, em média, considerando apenas as pizzarias, excluindo-se outros estabelecimentos que também consomem esse produto (Glass et al., 2001). Esses dados sugerem que o consumo é maior que a produção, evidenciando a grandeza da ocorrência de fraude.

De acordo com o Regulamento Técnico específico, a rotulagem de alimentos embalados deve apresentar, obrigatoriamente: Denominação de venda do alimento, Lista de ingredientes, Conteúdos líquidos, Identificação da origem, Nome ou razão social e endereço do importador (no caso de alimentos importados), Identificação do lote, Prazo de validade e Instruções sobre o preparo e uso do alimento, quando necessário (BRASIL, 2002).

A ordem dos ingredientes, segundo Brasil (2002), devem constar em ordem decrescente da respectiva proporção.

Assim a Associação Brasileira dos Criadores de Búfalo (ABCB) com o intuito de defender os interesses do segmento, garantindo reconhecimento ao produtor honesto e proteção ao consumidor contra fraude econômica, criou no ano de 2000 um selo com a identificação nas embalagens que garantem a pureza da muçarela: “Selo de Pureza 100% búfalo” a ser concedido àqueles laticínios que comprovem o uso exclusivo de leite de búfala em seus produtos.

Os últimos dados de produção dos laticínios fiscalizados pela ABCB são de 2008 e marcaram a produção de 31 milhões de litros de leite e 5,2 milhões de quilos de muçarela de acordo com (ABCB, 2015).

2.4 MÉTODOS PARA AVALIAR A AUTENTICIDADE DA MUÇARELA DE BÚFALA

Dentro do contexto anteriormente discutido, métodos laboratoriais para identificar num produto a espécie animal de origem já são conhecidos e tem grande aplicabilidade, tanto para o serviço oficial de fiscalização, quanto para entidades que certificam a origem do produto para benefício do consumidor: perfis eletroforéticos de proteínas do leite, em especial a fração correspondente à caseína. Embora seja um método eficiente e empregado com sucesso, é de alta sensibilidade de acordo com cada método empregado haja vista Ureia-PAGE que detecta 2,5% de adição de leite bovino e outros métodos Egito et al. (2006) complexo por exigir elevada habilidade e sofisticação laboratorial e dependendo (DIAS et al., 2009).

Já a PCR (Reação em cadeia pela polimerase) tem demonstrado viabilidade para identificação da espécie por produtos lácteos processados, além de apresentar baixa taxa de resultado falso-positivo e falso-negativo, utilizando primers que irão amplificar a sequencia do gene codificador do *cytB* que serão identificados pela eletroforese (REA et al., 2001.; BOTTERO et al., 2002.; VELOSO, 2002).

De acordo com Herman (2001), a PCR pode ser aplicada em alimentos submetidos a tratamento térmico que produz a desnaturação protéica.

As espécies de mamíferos, mesmos as mais estreitamente correlacionadas, podem ser diferenciadas pela PCR (Reação em cadeia pela polimerase) desde que marcadores moleculares adequados sejam utilizados.

Dentre os marcadores utilizados para este fim, destacam-se aqueles que identificam polimorfismos no genoma mitocondrial (AVISE, 1994; MATIOLI, 2001).

O DNA mitocondrial (DNAm_t) animal é uma molécula de fita dupla circular que codifica cerca de 5% de toda a maquinaria necessária para o funcionamento da mitocôndria. Uma característica relevante do DNAm_t é a sua alta taxa de evolução, quando comparada às taxas de evolução do DNA nuclear, fazendo do DNAm_t um importante marcador para estudos de elucidação da relação evolutiva entre indivíduos, espécies e populações (AVISE, 1994; MATIOLI, 2001).

Um grande número de seqüências parciais do genoma mitocondrial, em especial às do gene codificador da citocromo b oxidase (*cytB*) e da região controladora (*D-loop*) estão disponíveis em bancos de dados moleculares (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Trabalhos realizados com a técnica da PCR detectaram a presença de leite bovino em queijos de búfala, cabra ou ovelha variando entre 0,01 e 1,5% (MAUDET; TABERLET, 2001; REA et al., 2001; DI PINTO et al., 2004; FELIGINI et al., 2005; LÓPEZ-CALLEJA, 2005; MASKOVA; PAULICKOVA, 2006; OTAVIANO, 2008; SOUZA, 2010; ABRANTES, 2014).

Teixeira et al. (2012) utilizaram amostras de queijos obtidos no mercado varejista da cidade de Belo Horizonte perfazendo um total de 30 amostras, sendo sete rotuladas como leite puro de búfalo (23,3%) e 23 sem a identificação da espécie no rótulo (76,7%). Detectaram a presença de leite de vaca em apenas 1/7 das muçarelas de búfala.

A detecção de DNA bovino e bubalino nas muçarelas fabricadas com diferentes porcentagens de adição de leite bovino (0,01, 0, 025, 0,05, 0,1, 0,75, 0,50, 1, 1,5, 2, 4, 6, 8, 10 e 100% de leite de vaca e búfala) foram submetidos à dois protocolos de extração (kit NucleoSpin e fenol/clorofórmio), utilizando primers descrito por Bottero et al. (2002), e detectaram a presença de 0,01% de DNA bovino com o protocolo artesanal e 0,05% com kit segundo Souza (2010).

Atualmente a detecção de fraude em outros produtos alimentícios também tem sido estudada pela técnica da PCR com base na detecção de genes mitocondriais para diferenciar a origem de diversos alimentos disponíveis no mercado inclusive as carnes de galinha, peru, suínos, bovinos e ovinos (HERMAN, 2001; BRUGNAMO, 2010).

2.5 MICRORGANISMOS NA MUÇARELA

Além de representar uma importante fonte de nutrientes para o consumidor, o leite e o queijo também consistem em substrato nutritivo para microrganismos que podem tanto reduzir a vida útil do produto (deteriorantes) quanto causar danos à saúde pública (patogênicos). A contaminação por esses agentes pode ocorrer na ordenha, transporte, processamento e/ou armazenamento do leite e derivados (FRANCO; LANDGRAF, 2002; GERMANO, 2008).

Segundo Germano (2003), o alimento com qualidade é o produto que satisfaça as necessidades do consumidor sem causar agravos a saúde definindo assim um alimento seguro.

A Resolução (BRASIL, 2001) que estabelece parâmetros microbiológicos para alimentos no comércio varejista, define os seguintes critérios máximos de aceitação para os queijos de “muito alta umidade”, que é o caso da muçarela: 5×10^2 UFC/g de coliformes a 45°C, 5×10^2 UFC/g de *Staphylococcus* coagulase positivo, ausência de *Salmonella* spp. e de *Listeria monocytogenes* spp. em 25 g de queijo.

Os coliformes são bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos, em forma de bastonete e que compõem dois grupos: os coliformes totais e os termotolerantes ou a 45°C. No primeiro grupo incluem-se espécies dos gêneros *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* e *Klebsiella* que têm em comum a característica de utilizarem a lactose com produção de gás a 37°C em 48 h. A detecção nos alimentos em número superior ao aceitável indica falha de higiene na produção, uma vez que a maioria dos coliformes é encontrada no ambiente. Já os coliformes termotolerantes representam um grupo formado principalmente pela *Escherichia coli*, mas também por algumas cepas dos outros gêneros do grupo coliformes totais. Esse grupo tem em comum o fato de utilizarem a lactose com produção de gás em 48 h a 45°C (além de o fazerem a 35°C). Como a *E. coli* habita exclusivamente o trato gastrointestinal de animais de sangue quente, inclusive de humanos, e tem cepas que são patogênicas para o homem, sua detecção em alimentos está relacionada à má condição sanitária do produto (FRANCO; LANDGRAF, 1996; FORSYTHE, 2002; JAY et al., 2005).

A *Salmonella* é um bacilo Gram-negativo, não formador de esporo, cujo reservatório é o trato intestinal do homem e de animais, especialmente as aves, mas

também pode ser de suínos, bovinos, equinos e animais silvestres (FRANCO; LANDGRAF, 1996; JAY et al., 2005). São mais de 2.000 sorovares, divididos em duas espécies *S. enterica* e *S. bongori*, sendo todos patogênicos para homem (JAY et al., 2005).

O *Staphylococcus aureus* é um coco Gram-positivo, sendo que algumas estirpes podem produzir enterotoxina termoestável, e causadora da estafilococose, uma intoxicação transmitida por alimento que tende ser auto-limitante, mas bastante frequente. O gênero *Staphylococcus* podem ser detectado na pele, pêlos e nas mucosas oral e nasal, de humanos (JAY et al., 2005), o que torna a contaminação de alimentos muito fácil de ocorrer, em especial dos que são bastante manipulados.

Pesquisa realizada por Xavier (2007), com 65 manipuladores de alimentos das creches municipais da cidade do Natal/RN, com objetivo de investigar a incidência de *Staphylococcus aureus* nas secreções de nasofaringe e orofaringe, apresentaram 35,4% dos manipuladores de alimentos eram portadores desta bactéria. Isso evidencia a importância dos manipuladores como fonte de contaminação para a muçarela, tendo em vista que muitas fabricas usam o sistema manual para dar o formato de bolinhas ao queijo.

A *Listeria monocytogenes* é um bacilo Gram-positivo, não formador de esporo, catalase-positivo, anaeróbio facultativo e psicrotrófico. É ubiqüitário e assim pode facilmente contaminar diversos alimentos já tendo sido detectado em leite cru, queijo, carnes frescas ou congeladas, aves, produtos do mar, frutas e vegetais etc. É um competidor fraco, mas quando a microbiota acompanhante é reduzida ou eliminada, um baixo nível de contaminação inicial pode rapidamente aumentar e representar risco ao consumidor (JAY et al., 2005).

3 OBJETIVOS

- Avaliar a presença de DNA bovino em queijo muçarela de búfala comercializada no município de São Paulo.
- Avaliar a influência da sazonalidade na frequência da detecção de DNA bovino na muçarela de búfala comercializada no município de São Paulo.
- Avaliar a qualidade microbiológica dessas amostras.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi conduzido no Laboratório de Higiene Alimentar, com colaboração do Laboratório de Biologia Molecular e Sorologia Aplicada (LABMAS) e o Laboratório de Zoonoses Bacterianas (LZB) do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, FMVZ-USP.

4.1 AMOSTRAGEM

Nove marcas de muçarela de bolinha em soro comercializadas nos mercados varejistas no município de São Paulo foram analisadas e foram identificadas como (**A, B, C, D, E, F, G, H e I**). Foram analisadas quatro amostras de cada marca por trimestre: Abr-Mai-Jun, Jul-Ago-Set, Out-Nov-Dez (2013) e Jan-Fev-Mar (2014) agrupados de acordo com o período de safra e entressafra.

Os meses foram agrupados de acordo com o período de safra, representado por março, abril, maio e junho e a partir de julho começa diminuir a produção de leite até outubro e novembro, dezembro e janeiro a produção chega à entressafra (ABCB, 2015).

Foram observadas nas embalagens a declaração das espécies de origem do leite, declaração de pureza (apenas leite de búfala) ou de adição de leite de outra espécie ou, ainda, uma eventual omissão dessas informações.

As amostras foram transportadas para laboratório de higiene alimentar em recipiente isotérmico com gelo e armazenadas em refrigerador, processadas em 24 horas pós-colheita.

4.1.1 Preparo das amostras

Foram retiradas uma alíquota de um grama das amostras para análise da autenticidade e três alíquotas de 25 gramas para as análises microbiológicas (contemplando todas as unidades de queijo da embalagem).

4.1.2 Protocolo de extração e purificação de DNA das amostras de muçarela de búfala (SOUZA, 2010) para teste de autenticidade do queijo.

- ✓ Para cada colheita foram adicionados um controle negativo a cada quatro amostras e dois controles sabidamente positivos para detecção de DNA bovino e bubalino;
- ✓ Pesou-se 1 grama de queijo;
- ✓ Adicionou-se 9 mL de TE (10 mM de Tris HCL, pH 8,0 e 1 mM de EDTA, pH 8,0);
- ✓ Transferiu-se 500 µL da amostra homogeneizada para um microtubo livre de DNase e RNase de 1500 µL;
- ✓ Adicionou-se 50 µL de Tween 20% para retirar gordura;
- ✓ Homogeneizou-se por 10 segundos em agitador orbital (vortex);
- ✓ Centrifugou-se a 24°C por dez minutos a 14000xg;
- ✓ Descartou-se o sobrenadante por inversão;
- ✓ Adicionou-se 500µL de TE (10 mM de Tris HCL, pH 8,0 e 1 mM de EDTA, pH 8,0);
- ✓ Centrifugou-se a 24°C por 10 minutos a 14000xg;
- ✓ Descartou-se o sobrenadante por inversão;
- ✓ Repetiu-se este processo de adição de TE, centrifugação e descarte do sobrenadante obtido esteja claro;

- ✓ Adicionou-se solução de lise composta de:
 - ✓ 4 μL de Tris HCl, pH 8,0 a 1 M;
 - ✓ 20 μL de EDTA 0,5 M;
 - ✓ 8 μL de NaCl 5M;
 - ✓ 40 μL SDS 10%;
 - ✓ 10 μL de proteinase K a 20 mg/mL;
 - ✓ 418 μL de água deionizada;
- ✓ Homogeneizou-se por 10 segundos em agitador orbital (vórtex);
- ✓ Incubou-se *overnight* a 37°C em termobloco sob agitação a 14000 xg por 15 segundos a cada 15 minutos;
- ✓ Adicionou-se 500 μL de fenol tamponado (UBS);
- ✓ Homogeneizou-se por dez segundos em agitador orbital (vórtex);
- ✓ Centrifugou-se a 24 °C por cinco minutos a 14000xg;
- ✓ Transferiu-se 400 μL da fase aquosa para um novo microtubo de 1500 μL ;
- ✓ Adicionou-se 200 μL de fenol tamponado e 200 μL de clorofórmio;
- ✓ Homogeneizou-se por dez segundos em agitador orbital (vórtex);
- ✓ Centrifugou-se a 24 °C por cinco minutos a 14000xg;
- ✓ Transferiu-se 300 μL da fase aquosa para um novo microtubo de 1500 μL ;
- ✓ Adicionou-se 300 μL de propanol;
- ✓ Homogeneizou-se por dez segundos em agitador orbital (vórtex);
- ✓ Colocou-se a -20 °C por duas horas;
- ✓ Centrifugou-se 24 °C por 20 minutos a 14000xg;
- ✓ Desprezou-se o sobrenadante por inversão;
- ✓ Adicionou-se 500 μL de etanol a70%;
- ✓ Centrifugou-se 24 °C por 20 minutos a 14000xg;
- ✓ Desprezou-se o sobrenadante por inversão;
- ✓ Secou-se o sedimento em termobloco com as tampas dos microtubos abertos sem agitação a 56 °C por dez minutos;
- ✓ Ressuspendeu-se com 30 μL de TE (10 mM de TrisHCl, pH 8,0 e 1 mM de EDTA, pH 8,0);
- ✓ Homogeneizou-se por 10 segundos em agitador orbital (vortex);

- ✓ Incubou-se a 56 °C por 30 minutos;
- ✓ Armazenou-se o produto extraído (DNA) a -20 °C até o momento da amplificação (EMBRAPA, 2007).

4.1.3 Amplificação do DNA

A partir do DNA extraído das amostras de queijo, foram realizadas as reações de PCRs.

Utilizou-se os *primers* descritos no quadro 2, para a detecção do gene citocromo b (*cytb*) de *Bos taurus* e *Bos indicus*, e no quadro 3, detecção do gene citocromo b (*cytb*) de *Bubalus bubalis* descrito por Bottero et al. (2002), os mesmos encontram-se no banco de dados do GenBank (n. acesso J01394 e n. acesso D82894).

Quadro 2 - Sequência dos *primers* utilizados para a detecção de *Bos taurus* e *Bos indicus*

Primer	Sequencia 5' – 3'(nt)	Fragmento (pb)
Senso	GGCTTATATTACGGGTCTTACACT	279
Antisenso	GGCAATTGCTATGATGATAAATGGA	

Quadro 3 - Sequência dos *primers* utilizados para a detecção de *Bubalus bubalis*

Primer	Sequencia 5' – 3'(nt)	Fragmento (pb)
Senso	GGCATATACTACGGATCATATACC	192
Antisenso	AATTCATTCAACCAGACTTGTACCA	

A PCR foi realizada em um volume final de 25 µL contendo, 2 µL do DNA extraído, 2,5 µL de tampão 10x PCR Buffer (KCl 50 mM; Tris-HCl 10 mM; (pH 9,0), 200 µM dNTP's, 1,5 mM MgCl₂, 0,4 µM e de cada *primer*, 1,25 unidades de Taq DNA polimerase platinum e de água ultra pura.

As condições utilizadas para a amplificação pela PCR foram: 95°C por 3 minutos, seguida por 39 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, e 72°C por 45 segundos por uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese, utilizou-se cuba horizontal com gel de agarose a 1,5% (p/v) imerso em tampão Tris-Borato-EDTA (0,04M Tris-Borato 0,5 mM EDTA). Uma alíquota de 10 µL de cada amostra amplificada foi homogeneizada com 2 µL de corante (30% de glicerol : 0,25% de azul bromofenol). A corrida foi realizada em voltagem adequada às dimensões de cada gel (1 a 10V/cm²).

Após a corrida eletroforética o gel foi imerso numa solução de GelRed Nucleic Acid Stain, 10.000 vezes em água e a visualização dos fragmentos foram realizadas em transluminador ultravioleta (UV) e fotografada pelo sistema foto-documentação (Syngene Ingenius®), para análise.

A avaliação comparativa dos fragmentos foi feita com um padrão de marcador molecular de 100 pares de bases, disposto no gel juntamente com todas as amostras analisadas em cada eletroforese.

5 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

As amostras foram analisadas segundo a metodologia oficial do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2003).

Para a determinação do NMP de coliformes termotolerantes e contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva as amostras foram preparadas conforme descrito a seguir:

- ✓ Pesou-se 25 gramas da amostra em saco estéril;
- ✓ Adicionou-se 225 mL de solução salina peptonada 0,1% - correspondendo à diluição 10^{-1} ;
- ✓ Homogeneizou-se em stomacher® 400 Lab System por um minuto em velocidade alta.
- ✓ Foram realizadas diluições decimais e seriada em Caldo Lauril sulfato Triptose até a diluição 10^{-7} em triplicata.

Para análise qualitativa de *Salmonella* spp e *Listeria monocytogenes*, foram colhidas 2 alíquotas de 25 gramas para enriquecimento da amostra, conforme descrito mais adiante.

5.1 DETERMINAÇÃO DO NMP DE COLIFORMES TERMOTOLERANTES

Para determinar o NMP de coliformes termotolerantes foram utilizados o método dos tubos múltiplos. Esse método compreende duas fases distintas (teste presuntivo e teste confirmatório).

Em todas as análises foram utilizado controle positivo com *Escherichia. coli* – ATCC-25922.

5.1.1 Teste presuntivo

- ✓ De cada diluição semeou-se 1 mL em três tubos contendo o caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) com tubo de Durham invertido;
- ✓ Homogeneizou-se manualmente;
- ✓ Incubou-se a 37°C durante 48 horas;
- ✓ Separou-se os tubos positivos que apresentaram turvação do meio e formação de gás no interior do tubo Durham.

5.1.2 Teste confirmatório para coliformes termotolerantes

- ✓ Transferiu-se com o auxílio de alça descartável, um inóculo de cada tubo positivo de LST para outro contendo tubo invertido de Durham em caldo EC;
- ✓ Incubou-se em banho-maria a 45°C durante 48 horas;
- ✓ Selecionou-se os tubos positivos que apresentaram turvação do meio e formação de gás no interior do tubo de Durham;
- ✓ Utilizou-se a tabela de NMP adequada para calcular o “número mais provável” de coliformes a 45 °C por grama de alimento.

5.1.3 Contagem de *Staphylococcus coagulase positiva*

Em todas as análises foram utilizado controle positivo com *Staphylococcus aureus* ATCC - 29213.

- ✓ Transferiu-se 0,1 mL de cada diluição do alimento para a superfície do meio de cultivo Ágar Baird-Parker, em placa de petri em duplicata;

- ✓ Espalhou-se o inóculo com alça de Drigalski;
- ✓ Após secagem da superfície do ágar, inverteu-se as placas;
- ✓ Incubou-se a 37°C durante 48 horas;
- ✓ Selecionou-se a diluição que apresentou entre 20-200 colônias;
- ✓ Contou-se e anotou-se o número de colônias Típicas (negras brilhantes com anel opaco, rodeadas por um halo claro, transparente e destacado sobre a opacidade do meio) e Atípicas (acinzentadas ou negras brilhantes, sem halo ou com apenas um dos halos) presentes em cada placa da diluição;
- ✓ Selecionou-se 3 a 5 colônias de cada tipo: Típicas e Atípicas.
- ✓ Semeou-se as colônias suspeitas em caldo BHI (Caldo Infusão Cérebro Coração), para confirmação.
- ✓ Incubou-se a 37°C durante 24 horas.
- ✓ Prova da coagulase
- ✓ Transferiu-se 0,3 mL de cada tubo de cultivo em BHI para tubos estéreis contendo 0,3 mL de plasma de coelho.
- ✓ Incubou-se a 37°C durante seis horas
- ✓ Verificou-se a presença de coágulos
- ✓ Calculou-se o número de colônias coagulase positiva na amostra, considerando o número de colônias testadas positivas e o número de colônias registradas, para cada tipo (Típica e Atípica) multiplicou-se pelo inverso da diluição e também por 10 (correção da alíquota de semeadura)
- ✓ Expressou-se os resultados UFC/g de queijo.
- ✓ Se houvesse reação duvidosa repicar do mesmo caldo de cultura para um tubo contendo caldo BHI.
- ✓ Incubar a 37°C por 24 horas para realizar testes complementares.

5.1.4 Pesquisa de *Salmonella* spp.

Em todas as análises foram utilizados controle positivo com *Salmonella* Tiphymurium – ATCC-14028.

- ✓ Para o pré-enriquecimento adicionou-se 225 mL de solução salina peptonada tamponada a 1% à uma das alíquotas de 25 gramas de queijo anteriormente citada;
- ✓ Homogeneizou-se em stomacher por um minuto;
- ✓ Incubou-se a 37°C durante 16 a 20 horas;
- ✓ Para o enriquecimento seletivo semeou-se 1 mL do homogeneizado em 10 mL de Caldo Selenito Cistina e 0,1 mL em 10 mL de Caldo Rappaport-Vassiliadis;
- ✓ Incubou-se a 41°C em banho-maria durante 24 horas;
- ✓ Para o isolamento de colônias semeou-se por esgotamento os caldos de enriquecimento em BVB (bile verde brilhante) e SS (ágar *Salmonella/Shigella*);
- ✓ Se houvesse crescimento de colônias suspeitas;
- ✓ Expressaria os resultados como “ausência” ou “presença” de *Salmonella* spp. 25 gramas de queijo;
- ✓ Submeter à confirmação com testes bioquímicos e teste de aglutinação usando anti-soro polivalente (anti-O e anti-H);
- ✓ Recomenda-se enviar todas as Cepas positivas para sorotipificação para o Instituto Adolpho Lutz.

5.1.5 Pesquisa de *Listeria monocytogenes*

Em todas as análises foram utilizado controle positivo com *Listeria monocytogenes* – ATCC-19111.

- ✓ Para o enriquecimento seletivo inicial adicionou-se 225 mL de caldo de enriquecimento para listeria tamponado (BLEB) à uma das alíquotas de 25 gramas de queijo anteriormente citada;
- ✓ Homogeneizou-se em stomacher por 1 minuto em velocidade alta;
- ✓ Incubou-se a 30°C durante 24 horas;
- ✓ Para o segundo enriquecimento semeou-se 0,1 mL do caldo BLEB em 10 mL de caldo frazer com 0,1 mL de suplemento Frazer;
- ✓ Incubou-se a 30°C durante 24 horas;
- ✓ Para o isolamento semeou-se os tubos positivos de Fraser (com coloração negra), por esgotamento no Ágar ALOA listeria.
- ✓ Incubou-se a 30°C durante 48 horas;
- ✓ Se houvesse colônias suspeitas (pretas, rodeadas por halo negro devido à hidrólise da esculina);
- ✓ Confirmação com testes complementares;
- ✓ Testes bioquímicos;

Expressaria os resultados como “ausência” ou “presença” de *Listeria monocytogenes* em 25 gramas de queijo.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 AUTENTICIDADE DAS MUÇARELAS PELA TÉCNICA DA PCR

Foram analisadas 106 amostras de muçarela que alegavam no rótulo o uso exclusivo de leite de búfala em sua fabricação. Salienta-se que algumas marcas não foram encontradas no varejo em alguns momentos de coleta e por isso o número de amostras por marca pode variar.

Três das sete marcas analisadas tinham o selo de pureza da ABCB (marcas A, B e C).

Os resultados do DNA encontrado nas amostras estão apresentados na tabela 1. Apesar de ser comercializado como queijo puro de leite de búfala o leite bovino foi detectado em 73% (77/106) das amostras, abrangendo todas as marcas, e não houve influência da sazonalidade na frequência de ocorrência desse resultado Epi info 7 ($p < 0,3131$), sendo que a distribuição por marca foi: 93,75% (15/16) das amostras da marca D; 86% (12/14) da marca I; 87,50% (14/16) da marca F; 86% (12/14) das marcas A e C; 56,25% (9/16) da marca B; e 18,75% (3/16) da marca E.

As marcas (A, B e C) que apresentam o selo de pureza como referência para o consumidor que acredita estar comprando um produto certificado e com o valor maior que as que não apresentam o selo também apresentaram DNA bovino.

A marca E não apresenta selo de pureza e foi a que menos apresentou frequência de DNA bovino em sua fabricação e quando detectou DNA bovino a presença ocorreu no período de entressafra do leite bubalino.

O que chamou mais atenção, no entanto, foi a ausência de leite bubalino em duas amostras, uma da marca D e outra da marca I. Assim o DNA bubalino foi detectado em 98,11% (2/106) das amostras como mostra a tabela 1.

Tabela 1 - Resultado da detecção de DNA bovino e bubalino em amostras de muçarela de búfala (cujo rótulo informa ter apenas leite de búfala) provenientes do comércio varejista de São Paulo, período de Abril de 2013 a março de 2014

Trimestre	Marca	Número de amostras	Presença de DNA bovino	Presença de DNA bubalino
Abr, Mai, Jun 2013	A	3	2	3
	B	4	2	4
	C	4	4	4
	D	4	4	4
	E	4	0	4
	F	4	4	4
	I	2	2	2
Jul, Ago, Set 2013	A	3	2	3
	B	4	3	4
	C	4	3	4
	D	4	3	4
	E	4	0	4
	F	4	4	4
	I	4	4	4
Out, Nov, Dez 2013	A	4	4	4
	B	4	3	4
	C	3	3	3
	D	4	4	3
	E	4	0	4
	F	4	4	4
	I	4	2	3
Jan, Fev, Mar 2014	A	4	4	4
	B	4	1	4
	C	3	2	3
	D	4	4	4
	E	4	3	4
	F	4	2	4
	I	4	4	4

A maioria dos trabalhos que investigaram a presença de leite bovino em queijos de búfala, cabra ou ovelha, utilizando a técnica de PCR com primers que amplificam regiões específicas do gene mitocondrial citocromo b específico para mamíferos, relatam limite de detecção variando entre 0,1 e 1,5% (MAUDET; TABERLET, 2001; REA et al., 2001; DI PINTO et al., 2004; FELIGINI et al., 2005; LÓPEZ-CALLEJA, 2005; MASKOVA; PAULICKOVA, 2006; ABRANTES, 2014).

Mas a presente autora obteve resultados mais sensíveis utilizando dois protocolos de extração de DNA, feno/clorofórmio e Kit Nucleo Spin detectando, 0,01% e 0,05% de adição de leite bovino, respectivamente em 2010.

A alta sensibilidade da PCR tem sido reforçada por alguns autores como um fator limitante para determinar que a detecção do DNA bovino seja devido à fraude, podendo ser proveniente de falha de higienização em galões, tanques etc de produtores de leite ou laticínios que trabalhem também com leite bovino (MAUDET; TABERLET, 2001; REA et al., 2001; DI PINTO et al., 2004; FELIGINI et al., 2005; LÓPEZ-CALLEJA, 2005; MASKOVA; PAULICKOVA, 2006).

No entanto considerando um laticínio que trabalhe com 10.000 mil litros por dia dados disponíveis (bufalodourado.com.br), a presença de 0,01% de leite bovino, corresponde a 10 litros. É pouco provável que esse volume seja oriundo de falha de higienização de equipamentos ou utensílios sendo, portanto, bastante razoável assumir que seja fraude.

Foram encontradas duas marcas (G e H) que, à despeito de parecer ser búfala descreviam no item ingredientes com a presença de leite bovino e bubalino. Foram analisadas 16 amostras de cada marca. Como era esperado, o DNA bovino foi detectado em todas as colheitas, mas o DNA bubalino estava ausente em 81,25% das amostras (13/16) da marca G e 37% (6/16) da marca H.

A fraude de mistura de leite bovino aos queijos finos elaborados com leite de búfala tem suscitado algumas investigações no país e no exterior.

Teixeira et al. (2012), utilizaram 30 amostras, dentre as quais sete rotuladas como pura de búfala e 23 rotuladas como produzidas a partir de leite sem identificação da espécie. Utilizaram a PCR, empregando três métodos de extração de DNA: Tiocianato de guanidina, Fenol: clorofórmio e Kit comercial, a PCR obteve melhores resultados com o método que utiliza guanidina, e detectaram a presença de DNA bovino em uma das amostras.

Buzi et al. (2009) analisaram um total de 50 amostras de muçarela que alegavam na embalagem uso exclusivo do leite de búfala, e apenas uma amostra não apresentava no rótulo o uso exclusivo do leite de búfala, utilizaram eletroforese em gel de poliacrilamida de mobilidade das frações homólogas das caseínas de origem bovina e bubalina comprovaram a presença do leite de vaca em 22% das amostras.

Faleiro (2013) utilizou cinco marcas de muçarela comercializadas no varejo no Estado da Bahia totalizando 18 amostras sendo apenas uma com o rótulo selo de pureza, a caracterização eletroforética dos queijos foi realizada, em duplicata por meio do método de gel de poliacrilamida em condições desnaturantes, observou adulteração em sete amostras.

Os laticínios precisam estabelecer metas e procedimentos para detectar a presença de leite bovino de forma intencional durante a fase de recebimento do leite e se comprometer a oferecer um produto de fato como está declarado na embalagem com a finalidade de garantir ao consumidor um produto nutritivo e de qualidade.

7 MICROBIOLÓGICO

No presente trabalho todas as amostras foram negativas para *Listeria monocytogenes* e para *Salmonella* spp. em 25 gramas de queijo estando, esses parâmetros, em conformidade com a legislação vigente (BRASIL, 2001).

No entanto 7% das amostras (10/138) foram consideradas impróprias para o consumo humano por apresentar resultados analíticos para Coliformes termotolerantes e/ou *Staphylococcus* coagulase positiva acima dos limites estabelecidos pela RDC 12 (BRASIL, 2001), como mostra tabela 2.

Nota-se que houve maior frequência de desacordo com os padrões legais no parâmetro *Staphylococcus* coagulase positiva. Isso pode ser decorrente do fato desse queijo ser manipulado após a filagem da massa, que têm efeito micobiocida (RAMOS; SILVA, 1997).

Tabela 2 - Resultados de coliformes termotolerantes e de *Staphylococcus coagulase positiva* das amostras muçarela de bola consideradas impróprias para o consumo, segundo RDC 12. São Paulo, período de Abril de 2013 a março de 2014

Trimestre	Marca	Coliforme Termotolerante	<i>Staphylococcus coagulase positiva</i>
Abr, Mai, Jun 2013	B	$7,5 \times 10^4$	-
	C	-	$5,5 \times 10^2$
	D	-	$6,9 \times 10^5$
	D	-	$8,3 \times 10^4$
	F	$9,3 \times 10$	-
	F	$9,3 \times 10$	
	F	-	$8,0 \times 10^2$
	E	-	$6,6 \times 10^2$
	F	$7,5 \times 10^4$	-
	G	-	$13,5 \times 10^2$

(-) Não houve detecção

Na tabela 3 observa-se a distribuição dos resultados de Coliformes Termotolerantes e *Staphylococcus* coagulase positiva de todas as amostras analisadas.

Tabela 3 - Distribuição dos resultados de Coliformes Termotolerantes e *Staphylococcus* coagulase positiva em amostras de muçarela de bola comercializadas em São Paulo, período de Abril de 2013 a março de 2014

Parâmetro	Valores	abaixo do limite de quantificação da técnica	dentro do limite legal* aceitável para amostra indicativa	acima do limite legal* aceitável para amostra indicativa
	referência legal	<3 NMP/g	>4 e ≤5x10² NMP/g	>5x10³ NMP/g
Coliformes termotolerantes	frequência do resultado (amostra/total amostras)	89,10% (123/138)	8% (11/138)	2,89% (4/138)
	referência legal	<10² UFC/g	5x10² UFC/g	>5x10³ UFC/g
<i>Staphylococcus</i> coagulase +	frequência do resultado (amostra/total amostras)	96% (134/138)	-	4% (6/138)

*RDC n. 12, de 2 de janeiro de 2001, para queijos de Muito Alta Umidade

A baixa frequência de amostras em desacordo com os critérios microbiológicos legais, observada neste estudo, deve estar relacionada aos fatos de serem produtos Inspeccionados e, portanto, usarem leite pasteurizado e observarem as Boas Práticas de Fabricação, bem como ao efeito microbiocida da filagem, conforme alguns autores já comprovaram (RAMOS; SILVA, 1997; RAIMUNDO et al., 2013).

Outro fator que pode estar associado é que muitos laticínios trocaram o sistema manual para o sistema mecanizado na produção da muçarela dados estes disponíveis em seus próprios sites.

Filagem é uma etapa de fusão da massa da coalhada esmiuçada, em água quente 80°C a 90°C sob tração, até obter uma massa homogênea, lisa e brilhante, que não se rompe (BRASIL, 1997).

Alguns trabalhos publicados tem atestado a variabilidade da qualidade microbiológica da muçarela. Buzi et al. (2009), analisaram 50 amostras do queijo elaborado exclusivamente com leite de búfala comercializadas em São Paulo apresentaram 2% das amostras com o valor acima de 5x10² UFC/g de coliformes a

45°C estando em desacordo com a legislação. Os resultados de *Staphylococcus coagulase-positiva* e *Salmonella* spp atenderam a legislação vigente.

Já Pitrowski et al. (2008), analisaram 16 amostras de queijo tipo muçarela fatiado, de diferentes marcas comercializado na cidade de Ponta grossa, Paraná detectaram *Salmonella* spp em 1 amostra de muçarela bovina e três com *Staphylococcus coagulase positiva* com do padrão exigidos.

Outros autores também relatam baixa frequência de amostras de muçarela fora do padrão legal para os parâmetros microbiológicos aqui analisados (RAMOS; SILVA, 1997; OLIVIERI, 2004; PIETROWISKI et al., 2008; SANTOS-KOELLN et al., 2009; FIGUEIREDO et al., 2010; BARROS, 2011).

Os laticínios devem tomar algumas precauções efetivas de higiene desde a obtenção do leite até o processo de fabricação das muçarelas, para obter produtos com qualidade e segurança para o consumidor.

8 CONCLUSÕES

Com o presente estudo foram possíveis a obtenção das seguintes conclusões:

- 73% das amostras de muçarelas apresentaram DNA bovino porcentagem considerável uma vez que nas embalagens declararam o uso exclusivo de leite de búfala como matéria prima.
- Não houve relação na influência da sazonalidade com a frequência da detecção de DNA bovino na muçarela, mostrando que existe a fraude durante todo o período do ano.
- 7% das amostras apresentaram resultados considerados impróprios para o consumo humano por apresentar resultados analíticos para *Coliformes* termotolerantes e/ou *Staphylococcus* coagulase positiva acima dos limites estabelecidos indicando, provavelmente, inadequadas condições de higiene durante o seu processo de fabricação.

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE BÚFALOS. (ABCB). **Búfalos participam pela primeira vez da Feileite. 2010.** Disponível em: <<http://www.bufalo.com.br/not00108.html>>. Acesso em: 22 jun. 2015.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE BÚFALOS. (ABCB). **Búfalos participam pela primeira vez da feileite.** Disponível em: <<http://WWW.bufalo.com.br/not00108.html>> Acesso em: 22 jun. 2015.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE BÚFALOS. (ABCB). Criação de búfalos em expansão. Disponível em: <http://www.bufalo.com.br/not00091.html>. Acesso em 22 jun. 2015.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE BÚFALOS. (ABCB) **Desempenho da produção dos laticínios com selo de pureza 100% búfalo.** Disponível em: <<http://www.bufalo.com.br/not00097.html>>. Acesso em: 22 jun. 2015.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE BÚFALOS. (ABCB). **Produção leite de búfalas – Manejo para obter leite melhor e por mais tempo.** Disponível em: <[HTTP://www.bufalo.com.br/not00094.html](http://www.bufalo.com.br/not00094.html)>. Acesso em: 24 jun. 2015.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE BÚFALOS. (ABCB). **Raças.** Disponível em: <[HTTP://www.bufalo.com.br/racas.html](http://www.bufalo.com.br/racas.html)>. Acesso em: 26 maio 2015.

ABRANTES, M. R.; OLIVEIRA, A. R. M.; ROCHA, M. O. C.; SOUZA, G. O.; TELLES, O. E.; SAKAMOTO, S. M.; SILVA, J. B. A. Detecção de fraude em leite e queijo de coalho caprino por adição de leite bovino. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 42, p. 1-6, 2014.

AMARAL, F. R.; ESCRIVÃO, S. C. Aspectos relacionados à búfala leiteira. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 29, n. 2, p. 11-117, 2005.

AVISE, J. C. **Molecular markers, natural history and evolution**. New York: Chapman & Hall, 1994.

BASTIANETTO, E. Aspectos econômicos da criação de bubalinos em Minas Gerais. In: SIMPÓSIO MINEIRO DE BUIATRIA, 2., 2005, Belo Horizonte. **Anais...** Minas Gerais: Associação de Buiatria de Minas Gerais (ABMG), 2005. p. 1-14.

BASTIANETTO, E. Criação de búfalos no Brasil: situação e perspectiva. **Revista Brasileira Reprodução Animal Suplemento**, Belo Horizonte, n. 6, p. 98-103, 2009.

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

BOTTERO, M. T.; CIVERA, T.; ANASTASIO, A.; TURI, R. M.; ROSATI, S. Identification of cow's milk in buffalo cheese by duplex polymerase chain reaction. **Journal of Food Protection**, v. 65, p. 362-366, 2002.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. (DIPOA). Portaria 364. Data de publicação 08 de setembro de 1997. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de queijo Mozzarella (Muzzarella ou Mussarella) 1997. **Diário Oficial [da] União**, 8 set. 1997.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (ANVISA). **Resolução RDC nº12, de 02 de janeiro de 2001**. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. 2001. **Diário Oficial [da] União**, 10 jan. 2001.

BRASIL. Agência de Vigilância Sanitária. (ANVISA). Resolução RDC n. 259. Regulamento Técnico para Rotulagem de Alimentos Embalados. **Diário Oficial da União**. Poder Executivo, Brasília, DF, 23 set 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº62, 26 de agosto de 2003. Métodos analíticos para análises microbiológicas para o controle de produtos de origem animal e água**. Brasília: Ministério da Agricultura, 2003.

BRUGNANO, F. M. L. **Identificação da espécie animal em amostras de carne através da reação em cadeia pela polimerase: o método de controle de fraudes em alimentos**. 2010. 113 f. (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

CARVALHO, N. A. T.; BERNARDES, O.; BARUSELLI, P. S. Desestacionalização dos partos para a produção de leite de búfalas a pasto no centro sul do Brasil. **Pesquisa & Tecnologia**, v. 8, n. 2, p. falta n. de página, 2011.

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

DIAS, S. S.; LOBATO, V.; VERRUMA-BERNARDI, M. R. Metodologias para identificar adulteração em queijos produzidos com leite de diferentes espécies de animais. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 68, n. 3, p. 327-333, 2009.

DI PINTO, A.; CONVERSANO, M. C.; FORTE, V. T.; NOVELLO, L.; TANTILLO, G. M. Detection of cow Milk in buffalo "MOZZARELLA" by polymerase chain reaction (PCR) assay. **Journal of Food Quality**, v. 27, p. 428-435, 2004.

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

EMBRAPA. **Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio de reação em cadeia da polimerase**. 2007.

Disponível em:

<<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/48295/1/LivroProtMolecular.pdf>> Acesso em: 22 jun.2015.

FALEIRO, A. S. **Caracterização eletroforética, composição centesimal e propriedades físicas para verificação da autenticidade da muçarela de búfala comercializada no Estado da Bahia**. 2013. 71 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB , Itapetinga, Bahia, 2013.

FELIGINI, M.; BONIZZI, I.; CURIK, V. C.; PARMA, P.; GREPPI, G. F.; ENNE, G. Detection of adulteration in Italian mozzarella cheese using mitochondrial DNA templates as biomarkers. **Food Technology and Biotechnology**, v. 43, n. 1, p. 91-95, 2005.

FIGUEIREDO, E. L.; JUNIOR, J. B. L.; TORO, M. J. U. Caracterização físico – química e microbiológica do leite de búfala “In Natura” produzido no Estado do Pará. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 4, n. 1, p. 19-28, 2010.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2002.

GERMANO, M. I. S. **Treinamento de manipuladores de alimentos: fator de segurança alimentar e promoção da saúde**. São Paulo: Livraria Varela, 2003. (Higiene Alimentar, 2003).

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos; qualidade das matérias-primas, doenças transmitidas por alimentos, treinamento de recursos humanos**. 3. ed.rev. e ampl. São Paulo: Manole, 2008.

GUIDO, M. C. **Deteccção de DNA de Brucella abortus pela PCR em leite bubalino experimentalmente contaminado pela amostra 1119-3**. 2003. 46 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

GLASS, V. Pureza garantida: criação de um certificado para a mussarela de búfala busca combater as falsificações feitas de leite bovino, além de incentivar a bubalinocultura. São Paulo, **Globo Rural**, v. 16, n. 191, p. 62-64, 2001. Ed. 191. Disponível em: <<http://globorural.globo.com/barra.asp?d=/edic/191/sumario.htm>>. Acesso em: 29 set. 2009.

HERMAN, L. Determination of the animal origin of raw food by species-specific PCR. **Journal of Dairy Research**, v. 68, p. 429-436, 2001.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. (IBGE). **Produção da Pecuária Municipal. 2011**. Disponível em: ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2011/ppm2011.pdf. Acesso em: 28 jun. 2015.

JAY, J. M. Microbiologia de Alimentos. 6. e.d. Porto Alegre: Artmed, 2005.

LÓPEZ-CALLEJA, I.; ALONSO, I. G.; FAJARDO, V.; RODRÍGUEZ, M. A.; HERNÁNDEZ, P. E.; MARTÍN, R. PCR detection of cow's milk in water buffalo milk and mozzarella cheese, **International Dairy Journal**, v. 15, p. 1122-1129, 2005.

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

MASKOVÁ, E.; PAULICKOVÁ, I. PCR-Based detection of cow's milk in goat and sheep cheeses marketed in the Czech Republic. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 24, n. 3, p. 127–132, 2006.

MATIOLI, S. R. **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. p. 202.

MAUDET, C.; TABERLET, P. Detection of cows' milk in goats' cheeses inferred from mitochondrial DNA polymorphism. **Journal of Dairy Research**, v. 68, p. 229-235, 2001.

MOZZARELLA. **Mozzarella di bufala campana**. Disponível em: <<http://www.mozzarelladibufala.org>>. Acesso em: 17 jun. 2015.

OLIVIERI, D. A. Avaliação da qualidade microbiológica de amostras de mercado de queijo Mussarela, elaborado a partir de leite de búfala (*Bubalus bubalis*). 2004. 61 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP, Piracicaba, 2004.

OTAVIANO, A. R.; LIMA, A. L. F.; LAURIANO, M. M. M.; SENA, J. A. D.; ALBUQUERQUE, L. G.; TONHATI, H. β – casein gene polymorphism permits identification of bovine milk mixed with bubaline milk in mozzarella cheese. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 4, p. 902-905, 2008.

PÃO DE AÇUCAR. Busca por mussarela. 2013 Disponível em: <<http://www.paodeacucar.com.br/busca/mussarela.html>>. Acesso em: 20 jun. 2015.

PIETROWSKI, G. A. M.; RANTHUM, M.; CROZETA, T.; JONGE, V. Avaliação da qualidade microbiológica de queijo tipo mussarela comercializado na cidade de ponta grossa, paran. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v.2, n. 2, p. 25-31, 2008.

Portugus na rede. **Mussarela ou muarela. 2015**. Disponvel em: <http://www.portuguesnarede.com/2008/11/mussarela-ou-muarela.html>. Acesso em: 21 set. 2015.

RAMOS E SILVA, E. O. T. Fabricao artesanal de *Mozzarella* elaborada com leite cru de bfala. Estudo da contaminao microbiolgica associada manipulao, em produo manual ou parcialmente mecanizada. 1997. 47 f. Dissertao (Mestrado em Epidemiologia experimental e Aplicada s Zoonoses) - Faculdade de Medicina Veterinria e Zootecnia, Universidade de So Paulo, So Paulo, 1997.

RAIMUNDO, D. C.; TRAVAGLINI, R. G.; SOUZA, G. O.; STARIKOFF, K. R.; SANCHES, S. A.; SOUZA, O. B.; BALIAN, S. C.; TELLES, E. O. Methods for thermal inactivation of pathogens in mozzarella: a comparison between stretching and pasteurization. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinria e Zootecnia**, v. 65, n. 2, p. 582-588, 2013.

REA, S.; CHIKUNI, K.; BRANCHIARI, R.; SANGAMAYYA, R. S.; RANUCCI, D.; AVELLINI, P. Use of duplex polymerase chain reaction (duplex-PCR) technique to identify bovine and water buffalo milk used in making mozzarella cheese. **Journal of Dairy Research**, v. 68, p. 689-698, 2001.

SANTOS-KOELLN, F. T.; MATTANA, A.; HERMES, E. Avaliao microbiolgica do queijo tipo mussarela e queijo colonial comercializado na regio oeste do Paran. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, Paran, v. 3, n. 2, p. 66-74, 2009.

SILVA, M. S. T.; JUNIOR, J. B. L.; GONALVES, I. A.; MIRANDA, H. A.; ERCHSEN, R.; FONSECA, R. F. S. R.; MELO, J. A.; COSTA, J. M. **Par**: programa de incentivo a criao de bfalos por pequenos produtores. Par: PRONAF, 2003.

SOUZA, G. O. Mozzarella de búfala: avaliação da reação em cadeia pela polimerase (PCR) para detectar fraude devido à adição de leite de vaca ao de búfala. 2010. 72 f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

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

TEIXEIRA, L. V.; TEIXEIRA, C. S.; CALDEIRA, L. G. M. Extração de DNA e avaliação da composição espécie-específica de queijos. **Revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 3, p. 721-726, 2012.

TONHATI, H. Resultados do controle leiteiro em bubalinos. In: TONHATI, H.; BARNABE, V. H.; BARUSELLI, P. S. **Bubalinos**: sanidade, reprodução e produção. Jaboticabal: FUNEP; UNESP, 1999.

VELOSO, A. C.; TEIXEIRA, N.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O.; FERREIRA, M. A. Detecção de adulterações em produtos alimentares contendo leite e/ou proteínas lácteas. **Revista Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 4, p.609-615, 2002.

VERRUMA, M. R.; OLIVEIRA, A. J. Avaliação química e nutricional do queijo mozzarella e iogurte de leite de búfala. **Scientia Agricola**, v. 50, p. 438-443, 1993.

VERRUMA, M. R. Avaliação nutricional do leite de búfala em comparação ao leite de vaca. **Scientia Agricola**, v. 50, p. 444-450, 1993.

VERRUMA, M. R. Análise química do leite de búfala em comparação ao leite de vaca. **Scientia Agricola**, v. 51, p. 131-137, 1994.

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

XAVIER, C. A. C.; OPORTO, C. F. O.; SILVA, M. P.; SILVEIRA, I. A.; ABRANTES, M. R. Prevalência de *Staphylococcus aureus* em manipuladores de alimentos das creches municipais da cidade do Natal/RN. **RBAC**, v. 39, p. 165-168, 2007.