

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

**ANÁLISE MICROBIOLÓGICA E CARACTERIZAÇÃO
ELETROFORÉTICA DO QUEIJO MUSSARELA,
ELABORADO A PARTIR DE LEITE DE BÚFALA**

KATE APARECIDA BUZI

Botucatu/SP
Novembro-2006

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

**ANÁLISE MICROBIOLÓGICA E CARACTERIZAÇÃO
ELETROFORÉTICA DO QUEIJO MUSSARELA,
ELABORADO A PARTIR DE LEITE DE BÚFALA**

KATE APARECIDA BUZI

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Área de concentração: Saúde Animal, Saúde Pública Veterinária e Segurança Alimentar).

Orientador: Prof. Dr. Germano Francisco Biondi

Botucatu/SP

Novembro-2006

Aos meus pais, Maria Luiza e
Valdemar,
a quem eu devo tudo na vida,
dedico esta obra.

Ao meu pai, por me entender e apoiar sempre, por ter me encorajado a seguir este caminho e por ser esse exemplo de força e determinação no qual eu me espelho a cada dia!

À minha mãe, por todo o amor, carinho e dedicação. Mas também pelo apoio nas horas difíceis e palavras de conforto e incentivo nos momentos de desânimo...

Aos meus familiares, em especial Marcos, Márcia e Luane por, mesmo de longe, estarem presentes na minha vida!

Ao meu orientador e amigo Prof. Dr. Germano Francisco Biondi, pelos ensinamentos, pela atenção dedicada a este trabalho, pela compreensão e por toda a paciência!

Ao Prof. Ass. Dr. José Paes de Almeida Nogueira Pinto, por todas as contribuições e considerações pertinentes para a realização deste trabalho!

Ao Prof. Ass. Dr. Paulo Roberto Rodrigues Ramos, pela ajuda e pelos ensinamentos compartilhados no decorrer da pesquisa!

Ao Prof. Ismael Antônio Bonassi pelo empréstimo de importante material bibliográfico.

Aos funcionários dos Laboratórios de Microbiologia e Físico-Química da Disciplina de Inspeção Sanitária de Alimentos de Origem Animal– FMVZ/UNESP – Botucatu, Gilda Pinto do Amaral e Otávio Augusto Martins, pela atenção dispensada em todos os momentos.

À funcionária do Laboratório de Fracionamento de Proteínas – IB/ UNESP – Botucatu, Cilene do Carmo Federici Padilha, pela ajuda e empenho no decorrer do trabalho.

A todos os colegas do curso de pós-graduação, pelo agradável convívio durante o curso e amizade construída, em especial Fábio, Loredana, Bianca, Camila, Daniela, Valéria, Patrícia, Charli, Ana Paula e Marli.

Aos funcionários da Disciplina de Inspeção Sanitária de Alimentos de Origem Animal, Luzia, Maria José, Luciane, Silvia, Karina Amaral, Karina Basso, e aos residentes Júlia, Eduardo, Ricardo e Luís, pela convivência e também pelos momentos de alegria.

Aos amigos André, Jeison e Paulo, pela contribuição durante a execução do trabalho prático.

À Sra. Terezinha e Natália Módulo, pelo convívio e amizade verdadeira.

À Dra. Glória Guilera, pela amizade e dedicada ajuda nos momentos difíceis.

Às bibliotecárias Luciana Pizzani e Selma Maria de Jesus, pelo auxílio nas correções das referências bibliográficas e elaboração da ficha catalográfica, respectivamente.

Aos funcionários da pós-graduação Denise Aparecida Fioravanti Garcia, Maria Aparecida Dias de Almeida Manoel e José Roberto de Lalla Júnior, pela atenção e paciência dispensadas durante esses anos.

À Capes, pela concessão da bolsa de estudo, viabilizando assim, a realização da pesquisa.

A Deus, pela saúde, força e perseverança presentes durante esses anos de estudo!

Às demais pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho!

FIGURA 1: Esquema do preparo das diluições em série.....	18
FIGURA 2: Esquema da contagem de coliformes totais e <i>E. coli</i> pelo Sistema de Placas Petrifilm.....	19
FIGURA 3: Colônias de coliformes e <i>E. coli</i> em placa Petrifilm.....	20
FIGURA 4: Esquema da contagem presuntiva de <i>Staphylococcus</i> coagulase-positiva.....	20
FIGURA 5: Esquema do teste de coagulase.....	21
FIGURA 6: Esquema geral da análise para detecção de <i>Salmonella</i> spp.....	22
FIGURA 7: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% das caseínas do queijo: (V) controle vaca; (B) controle búfala; (A a K) amostras de mussarela de búfala.....	32
FIGURA 8: Percentual de amostras de mussarela elaboradas exclusivamente com leite de búfala e acrescidas de leite de vaca.....	33

QUADRO 1: Determinação da caseína, acidez e pH dos leites de búfala e vaca..... 6

QUADRO 2: Padrão microbiológico para queijo tipo mussarela..... 23

QUADRO 3: Componentes do gel de separação a 10% de poliacrilamida para PAGE 24

QUADRO 4: Componentes do gel de empilhamento a 4% de poliacrilamida para PAGE 25

TABELA 1: Composição química de leites bovino e bubalino.....	5
TABELA 2: Distribuição de 50 amostras de mussarela de búfala analisadas de acordo com os valores referentes às contagens de coliformes totais e <i>E. coli</i>	27
TABELA 3: Resultados de coliformes totais, <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus</i> coagulase-positiva e <i>Salmonella</i> spp. obtidos das amostras de mussarela de búfala.....	48
TABELA 4: Mobilidades Relativas (RF) das amostras de mussarela de búfala submetidas ao teste de pureza eletroforética.....	50

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 A espécie bubalina	3
2.2 Características do leite de búfala	4
2.3 Obtenção higiênica do leite de búfala	7
2.4 Elaboração da mussarela de búfala	10
2.5 Adulteração da mussarela de búfala	13
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1 Obtenção das amostras	16
3.2 Transporte das amostras	16
3.3 Processamento das amostras	17
3.3.1 Análise microbiológica	17
3.3.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida	18
3.4 Análises Microbiológicas	19
3.4.1 Contagem de coliformes totais e <i>E. coli</i>	19
3.4.2 Contagem de <i>Staphylococcus</i> coagulase-positiva	20
3.4.3 Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.	21
3.4.4 Padrão microbiológico para mussarela	23
3.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE).	23
3.5.1 Obtenção dos controles	23
3.5.2 Preparação das placas	24
3.5.3 Preparação dos géis de separação e empilhamento	24
3.5.4 Preparação da cuba vertical	25
3.5.5 Corrida eletroforética	26
3.5.6 Coloração e descoloração.....	26
3.5.7 Análise dos géis	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
5. CONCLUSÕES.....	35
REFERÊNCIAS	36
APÊNDICES.....	45

BUZI, K.A. **Análise microbiológica e caracterização eletroforética do queijo mussarela, elaborado a partir de leite de búfala.** Botucatu, 2006. 51p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu.

O presente trabalho visou avaliar a qualidade microbiológica de queijos mussarela elaborados a partir de leite de búfala, adquiridos do comércio varejista, assim como, verificar a sua autenticidade, averiguando a possível presença de leite de vaca no produto. As análises microbiológicas compreenderam em contagem de coliformes totais e *E. coli*, contagem de *Staphylococcus* coagulase-positiva e pesquisa de *Salmonella* spp.; enquanto que, para a determinação da pureza das mussarelas, a técnica utilizada foi a eletroforese em gel de poliacrilamida. Com base nos resultados obtidos na avaliação microbiológica, pode-se afirmar que 98% das amostras estão dentro dos padrões microbiológicos legais vigentes, embora algumas delas tenham apresentado valores para coliformes totais entre 10^3 - 10^6 UFC/g, indicando provavelmente condições inadequadas de higiene durante a fabricação dos queijos. Entretanto, 2% das amostras encontram-se em desacordo com a legislação, uma vez que apresentaram populações de coliformes fecais acima do permitido, como resultado de uma alta contaminação por *E. coli*. Mediante a caracterização eletroforética, detectou-se a presença de leite de vaca em 22% das amostras, adicionado, provavelmente, de forma intencional.

Palavras-chaves: mussarela; búfalo; microbiologia; eletroforese; adulterações.

BUZI, K.A. **Microbiological analysis and electrophoretic characterization of mozzarella cheese made from buffalo milk.** Botucatu, 2006. 51p. Master's dissertation. School of Veterinary Medicine and Animal Husbandry, São Paulo State University, Botucatu, Brazil.

This study evaluated the microbiological of mozzarella cheese made from buffalo milk bought in retail outlets and validated their authenticity by checking the product for the possible presence of cow milk. Microbiological analysis included counts of *E. coli*, total coliform, positive coagulase *Staphylococcus*, and *Salmonella* spp. For the determination of mozzarella purity, we used polyacrylamide gel electrophoresis. Based on the results of the microbiological evaluation, we can state that 98% of samples are within the legal microbiological standards, although some have shown values of total coliforms between 10^3 - 10^6 UFC/g, which indicates poor conditions and hygiene during cheese manufacture. However 2% of samples showed fecal coliform populations outside the legal limits as a result of a high *E. coli* contamination. Electrophoresis detected cow milk in 22% of the samples which was probably added intentionally.

Keywords: mozzarella; buffalo; microbiology; electrophoresis; adulterations.

1. INTRODUÇÃO

O rebanho bubalino mundial vem aumentando a cada ano, refletindo o crescente interesse pela espécie. Além de apresentarem uma grande versatilidade, vivendo em rudes condições de clima e vegetação e mostrando ser uma ótima alternativa à pecuária tradicional, os búfalos são considerados uma importante fonte de proteína de alta qualidade, seja pela produção de carne como de leite.

No Brasil, a exploração leiteira bubalina teve um aumento considerável nas últimas décadas, em decorrência das características de composição e do excelente valor nutritivo de seu leite. Devido aos altos teores de proteína, gordura e minerais, o leite de búfala apresenta um elevado rendimento industrial, superando consideravelmente o rendimento do leite bovino.

A partir do leite de búfala pode-se elaborar diversos produtos, como os mais variados tipos de queijos, requeijão, manteiga, iogurte, entre outros. Entretanto, a mussarela é, sem dúvida, o produto principal, sendo a maior parte do leite bubalino destinada à sua fabricação.

A fim de se conseguir produtos lácteos de qualidade, práticas relacionadas com a melhoria do leite são necessárias, como a sua obtenção de forma higiênica, a sua conservação a baixas temperaturas além da utilização somente de leite pasteurizado.

Mesmo a pasteurização sendo uma etapa essencial durante a fabricação dos queijos por reduzir consideravelmente a carga microbiana, segundo a tradição italiana, a mussarela de búfala deve ser produzida a partir do leite cru, a fim de garantir as características organolépticas particulares e inerentes ao produto.

Apesar do processo de filagem utilizar água quente, esse processo não substitui a pasteurização, sendo que a utilização do leite cru pode diminuir a qualidade do produto final e por isso, os riscos à saúde pública devem ser considerados.

A autêntica mussarela preparada exclusivamente com leite de búfala, pelo aumento da procura e a escassez da matéria-prima, vem sofrendo algumas modificações, de forma que nos dias atuais, é possível encontrar mussarelas elaboradas somente com leite de búfala, outras com uma mistura de leites de búfala e vaca, além daquelas produzidas somente com leite de vaca. A sua incorporação na mussarela de búfala é permitida, contudo tal especificação deve estar contida no rótulo.

Tendo em vista o aumento do consumo deste produto, o presente trabalho teve como objetivos:

- 1) Avaliar a qualidade microbiológica das mussarelas de búfala distribuídas no comércio varejista, no sentido de verificar a sua inocuidade.
- 2) Averiguar a autenticidade de tais queijos, investigando, através da caracterização eletroforética, a possível adição de leite de vaca ao produto.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A espécie bubalina

O rebanho bubalino mundial é da ordem de 172,720 milhões de cabeças (FAO, 2006). Estima-se que, no mundo, o aumento desse rebanho seja de 10% ao ano, refletindo o crescente interesse pela espécie (SAMPAIO NETO et al., 2001).

O Brasil, maior produtor da América Latina, possui o décimo primeiro maior rebanho, com aproximadamente 1,2 milhões de cabeças (FAO, 2006). Segundo dados relativos ao ano de 2004, o estado do Pará possui o maior rebanho bubalino do país, com 463.754 cabeças (IBGE, 2006).

Metade da população de búfalos no Brasil está localizada na região norte, em um clima de umidade excessiva e altas temperaturas, onde ocorrem alagamentos e inundações periódicas, com os animais integrando-se naturalmente ao ecossistema da região amazônica. O restante dos animais distribui-se nas demais áreas do país juntamente à produção agropastoril pré-existente (BARUSELLI, 1995).

O búfalo foi introduzido no Brasil entre 1890 e 1895; a história conta que animais da raça Carabao vindos da Guiana Francesa naufragaram na costa sul da Ilha de Marajó, localizada na bacia amazônica. Alguns anos mais tarde, animais da raça Mediterrânea foram importados da Itália e a seguir, animais da raça Murrah e Jafarabadi foram trazidos de países asiáticos (BARUSELLI, 1995).

Entre as características da espécie, destacam-se a rusticidade, prolificidade, adaptabilidade, vida útil de até 15 anos, precocidade, docilidade, taxa de natalidade superior a 80% e de mortalidade inferior a 3% ao ano (MOREIRA et al., 1994).

Os búfalos são tradicionalmente considerados como animais de tração e produtores de carne, porém, com a escolha de animais selecionados e a obtenção de melhores níveis de desempenho dos rebanhos, os produtores têm demonstrado um crescente interesse pela produção leiteira, com vistas sobretudo, ao fornecimento de leite para a elaboração de derivados (CUNHA NETO & OLIVEIRA, 2003).

Os bubalinos produzem relativamente menos leite que os bovinos, porém, demonstram-se muito mais econômicos, pois têm maior capacidade de conversão de alimentos grosseiros e de baixo valor nutritivo, proporcionando melhor aproveitamento na sua transformação em leite (FERREIRA et al., 1995).

Por isso, os rebanhos leiteiros vêm aumentando e confirmando o crescente interesse pela exploração de seu potencial leiteiro (BERNARDES & BERNARDES, 1993), principalmente nos estados do sudeste.

2.2 Características do leite de búfala

A composição do leite é de fundamental importância para a obtenção do queijo, sendo a seleção da matéria prima determinada pelos teores de proteína e gordura, os quais condicionam o rendimento e a qualidade do produto final (WOLFSHOON-POMBO, 1978; FURTADO, 1992).

Hunh et al. (1980b, 1982) e Nader Filho (1984), citam que a maior vantagem do leite bubalino, em relação ao leite de outras espécies, é a qualidade nutricional, por possuir teores de proteínas, gorduras e minerais que superam consideravelmente os do leite de vaca (Tabela 1).

Devido à essa superioridade, a FAO reconhece a importância do leite da búfala (FAO, 2004). No Brasil, o seu consumo 'in natura' não é muito difundido, ao contrário do que ocorre na Índia e outros países asiáticos, onde constitui-se uma importante fonte de nutrientes (FERRARA & INTRIERE, 1975).

TABELA 1: Composição química de leites bovino e bubalino.

Parâmetros determinados	Leite	
	Vaca	Búfala
Umidade (%)	88,00	83,00
Gordura(%)	3,68	8,16
Proteína (%)	3,70	4,50
Cinzas (%)	0,70	0,70
Extrato seco total (%)	12,00	17,00
Vitamina A (U.I.)	185,49	204,27
Calorias (em 100mL)	62,83	104,29

Fonte: Verruma & Salgado (1994)

Em decorrência do leite de búfala ter um elevado teor de extrato seco, incluindo gordura e proteínas, o seu aproveitamento industrial se torna efetivamente extraordinário, chegando comparativamente a sobrepujar o rendimento do leite bovino em mais de 40% (Hunh et al. 1980b,1982), (NADER FILHO,1984). Silva et al. (2003), afirmam que com apenas 5 litros de leite de búfala consegue-se obter 1 Kg de queijo mussarela de alta qualidade, enquanto que com leite de vaca são necessários 8 litros. Por isso, a sua utilização na preparação de derivados vem aumentando.

No Brasil, alguns trabalhos têm sido publicados objetivando a elaboração de diversos produtos com o leite de búfala. Ferrara & Intriere (1975) descreveram a técnica de fabricação da mussarela e provolone a partir deste leite. Yunes & Benedet (2000) desenvolveram o queijo fresco e Furtado (1980a) comprovou a viabilidade da fabricação do queijo azul. Cabrera et al. (1995) utilizaram o soro na fabricação do requeijão cremoso enquanto que Van Dender et al. (1988) utilizaram o creme do leite para a fabricação do queijo tipo mascarpone. Queiroz et al. (2002) elaboraram o iogurte com frutas da região amazônica, na tentativa de introduzi-lo à merenda escolar, como fonte alternativa de proteína.

Por ter um alto teor de matéria gorda que lhe confere características organolépticas indesejáveis e dificulta a sua assimilação pelo organismo humano, desenvolveu-se um produto conhecido como 'toned milk' (leite cortado). Khurdy, precursor do produto, na Índia em 1946, misturou o leite de búfala com leite em pó desnatado e água, diminuindo assim, o teor de gordura, tornando-o mais digestivo e de fácil aceitação (FERREIRA, 1980; VIEIRA & NEVES, 1980).

O elevado teor de caseína do leite de búfala, faz com que este tenha uma acidez natural mais elevada que o leite de vaca. Apesar do pH de ambos serem bem próximos, como se observa no Quadro 1, a acidez titulável (°D) do leite de búfala é ligeiramente superior, pelo fato da caseína ser titulada como ácido na técnica de determinação de acidez Dornic (°D) (FERREIRA et al., 1995).

QUADRO 1: Determinação da caseína, acidez e pH dos leites de búfala e vaca.

Leite	Caseína	Acidez (°D)	pH
Búfala	3,8	19	6,65
Vaca	2,9	17	6,65

Fonte: Verruma (1993)

Por isso, este leite, muitas vezes, é rejeitado na plataforma de recepção. Uma vez que não há uma legislação específica para o leite de búfala, os parâmetros empregados são os mesmos utilizados para o leite de vaca, sendo que o Serviço de Inspeção Federal (S.I.F.) admite como acidez titulável máxima, o valor de 20° D para a recepção e aproveitamento do leite na industrialização. Por esse motivo, a Portaria nº 286, da Inspeção de Produtos de Origem Animal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) permite a mistura de até 30% de leite de vaca para que ocorra a normalização da acidez do leite bubalino (FURTADO, 1980b; FERREIRA et al., 1995; MESQUITA, 2002).

O leite de búfala apresenta-se ligeiramente adocicado e com uma coloração mais branca do que o leite bovino, em virtude da ausência total de caroteno, precursor da vitamina A, que confere à gordura a cor amarelada (CARVALHO & HÜNH, 1979; HÜNH & FERREIRO, 1980; MESQUITA, 2002). Apesar da ausência de caroteno, o teor de vitamina A no leite de búfala é tão elevado quanto no leite de vaca, pois aparentemente o búfalo converte o caroteno de sua dieta em vitamina A (ACARESC, 1984).

Além disso, o leite bubalino apresenta um pigmento azul-esverdeado associado à alfa-caseína, denominado biliverdina. Esta, precipita juntamente com as proteínas pela ação do ácido e do calor e, pode eventualmente conferir uma coloração ligeiramente esverdeada ao leite. Quando há acidificação do meio, o pigmento verde, naturalmente secretado com o leite, é reduzido pela ação de microrganismos, tornando-se amarelo, sendo então chamado de bilirrubina (FERREIRA, 1980).

2.3 Obtenção higiênica do leite de búfala

A carga microbiana do leite cru é de extrema importância na qualidade final dos produtos lácteos. É praticamente impossível melhorar as propriedades de um produto derivado, se o número de microrganismos inicialmente presente no leite 'in natura' é elevado (HUNH et al., 1980a).

A contaminação microbiológica do leite é extremamente variável, tanto qualitativa como quantitativamente, dependendo das condições de higiene dos animais e do local de ordenha, dos hábitos higiênicos do ordenhador, das condições de limpeza dos utensílios e equipamentos e, até mesmo, das variações de temperatura que ocorrem desde a ordenha até o seu processamento pela indústria (FONSECA & SANTOS, 2000).

O leite pode ser contaminado quando entra em contato com a superfície do equipamento e/ou utensílios de ordenha, assim como no próprio tanque de refrigeração. A contagem bacteriana total do leite pode aumentar significativamente quando em contato com equipamentos nos quais a limpeza e sanitização são deficientes, já que os microrganismos proliferam nos resíduos

de leite presentes em recipientes, borrachas, junções e qualquer outro local onde ocorra acúmulo de resíduos de leite (GUERREIRO et al., 2005).

A qualidade do leite de búfala está intimamente relacionada aos hábitos do animal e ao manejo de ordenha, uma vez que o comportamento do animal de imergir em coleções de água ou lama, à procura de conforto térmico, dificulta a obtenção higiênica do leite (TEIXEIRA et al., 2005).

A adoção de técnicas adequadas de limpeza e sanitização dos úberes dos animais, assim como das instalações do local de ordenha é essencial para a obtenção de um leite com alta qualidade higiênica, com reduzida contagem de microrganismos deteriorantes e ausência de espécies patogênicas (HEESCHEN, 1996).

A água utilizada na limpeza dos equipamentos e utensílios de ordenha e em outras tarefas constitui-se em uma importante fonte de contaminação ambiental. É de fundamental importância que esta seja potável, com baixa contaminação por coliformes e outras bactérias (COUSIN & BRAMLEY, 1981).

Sob condições adequadas de obtenção do leite, a contaminação microbiana é pequena, atingindo no máximo, valores em torno de $1,0 \times 10^3$ UFC/ mL (FONSECA & SANTOS, 2000). Para que o processo de fabricação atinja o seu ideal, a contagem total de bactérias do leite destinado a fabricação de mussarela, deve estar entre $5,0 \times 10^3$ a $5,0 \times 10^5$ UFC / mL. Se o leite apresentar alta contagem microbiana, resultará na alteração da coagulação da massa e conseqüentemente na textura do queijo, refletindo diretamente no rendimento da produção, que poderá apresentar uma significativa diminuição. As características organolépticas como sabor, odor e maciez, bem como a própria durabilidade do queijo, também poderão ficar prejudicadas (AMANTE et al., 2001).

Adicionalmente, a relação tempo-temperatura é extremamente importante para a conservação do leite recém ordenhado, uma vez que estes dois fatores estão diretamente ligados com a multiplicação dos microrganismos (FONSECA, 1998). Sabendo que o número de contaminantes do leite vai

aumentando gradativamente a partir do momento de sua obtenção, este deve ser submetido a baixas temperaturas imediatamente após a ordenha.

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), através da Instrução Normativa nº51, estabelece que o leite deve ser resfriado ainda na propriedade, devendo permanecer sob a temperatura de 4°C (tanque de expansão) ou 7°C (tanque de imersão), num período não superior a 3 horas após o término da ordenha (BRASIL, 2002).

Devido à alta incidência de bactérias do gênero *Staphylococcus* como causadoras de mastite bubalina, o resfriamento do leite evita a proliferação do agente no leite contaminado, proveniente de búfalas doentes, prevenindo a produção de enterotoxinas, uma vez que estas são produzidas a uma temperatura entre 10 e 40 °C (CAMARA et al., 2002).

Sabe-se que, uma vez presentes no leite cru, as enterotoxinas estafilocócicas não são destruídas pelos tratamentos térmicos comumente empregados ao leite, permanecendo assim nos produtos derivados e acarretando intoxicação pelo consumo dos mesmos (OLIVIERI, 2004).

Os microrganismos envolvidos com mastite bubalina são semelhantes aos causadores da infecção nas vacas (NAG, 1995), como mostra o estudo realizado no estado de São Paulo, onde 77% das amostras de leite de búfalas com a doença apresentaram o *Staphylococcus* spp. como agente responsável (GUIDO et al., 1994).

Entretanto, as búfalas são consideradas menos susceptíveis à mastite do que as vacas (SHUKLA & SUPEKAR, 1987; LAU, 1994), como se observa no trabalho de Vianni et al. (1990), onde a prevalência de mastites em búfalas foi de 8,81%. Segundo Coldebella (2003), no Brasil, a mastite bovina subclínica ocorre em muitos rebanhos leiteiros, com índices variando de 11,9% a 72,3% de vacas infectadas por rebanho.

Anatomicamente os bubalinos apresentam os tetos relativamente mais pendulosos e longos, portanto mais sujeitos às injúrias do que os dos bovinos; contudo, nos bubalinos o *ductus papilaris* é mais musculoso, com maior quantidade de fibras e vasos sanguíneos, funcionando como uma barreira mais eficiente contra as infecções (LAU, 1994).

Outro fator importante é a lactoferrina, uma substância antibacteriana presente no leite que compete com as bactérias pelo ferro, tornando-o indisponível e impedindo o crescimento bacteriano. O leite bubalino apresenta maior concentração de lactoferrina que o leite bovino (BATHIA & VALSA, 1994), favorecendo a menor incidência de mastite nessa espécie.

O leite bubalino 'in natura' apresenta alta perecibilidade e está sujeito às mesmas fontes de contaminação microbiana que podem existir na bovinocultura leiteira, principalmente na ordenha e no transporte do leite até a usina de processamento. Por isso, durante estas etapas é imprescindível o cumprimento de medidas relacionadas com a melhoria da qualidade do leite, como o manejo sanitário do rebanho, controle de mastites, higiene nos estábulos de ordenha, limpeza e sanitização adequadas de utensílios e equipamentos e a conservação do leite a baixas temperaturas (CUNHA NETO & OLIVEIRA, 2003).

2.4 Elaboração da mussarela de búfala

Na Itália, o leite de búfala é pouco utilizado para o consumo 'in natura', sendo a quase totalidade destinada para a fabricação de derivados, sobretudo a mussarela. O mesmo ocorre no Brasil, onde este também é o principal produto de laticínio desta espécie animal.

Segundo Ferrara & Intriere (1975) a autêntica mussarela de búfala é esférica, apresentando uma superfície branco-porcelana e áspera, com uma crosta tênue (menos de 1 mm) e uma estrutura em finas camadas sobrepostas, tendendo a decompor-se na sua parte mais interna.

Apresenta tecnologia semelhante à utilizada para o leite bovino, tendo como etapas de fabricação: a obtenção da coalhada, a sua acidificação, a filagem, o corte, a moldagem, o endurecimento e a salga em salmoura fria (VALLE, 1989).

A filagem, manual ou mecânica, consiste na imersão da massa picada em água quente, seguida de agitação própria, sendo que a medida que a massa se aquece, os pedaços da mesma se ligam formando um só bloco, o

qual vai se tornando cada vez mais plástico e ao ser esticado forma longos fios (KOSIKOWSKI, 1970; OLIVEIRA, 1982).

A temperatura da água da filagem varia de 75-85°C (OLIVEIRA, 1982; BEHMER, 1984), sendo que a temperatura da massa não deve ultrapassar 58-60° C, o que poderá provocar alterações na estrutura e composição do queijo (SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE PIZZA CHEESE, 1997). Temperaturas acima deste nível promovem a danificação celular no fermento, além da destruição quase total dos resíduos de coalho (McMAHON et al., 1993; FURTADO, 1997). Por outro lado, a temperaturas abaixo de 52°C, a massa torna-se de difícil manuseio, com defeitos internos e com a possibilidade de se apresentar contaminada por microrganismos indesejáveis (CASERIO et al., 1977).

A pasteurização, etapa importante na fabricação dos queijos, ao ser utilizada para eliminar os microrganismos patogênicos presentes no leite acaba se prestando também à redução da carga microbiana inicial, diminuindo a ocorrência de microrganismos deteriorantes e aumentando assim a vida útil do produto (RUIZ, 1992; VARNAM & SUTHERLAND, 1994).

Apesar da importância da pasteurização, na Itália, ainda hoje, a mussarela é elaborada a partir do leite cru de búfala com o propósito de não alterar o processo tecnológico, além de garantir as características próprias do produto. Pelo fato do nosso sistema de produção seguir o italiano, alguns laticínios brasileiros também trabalham com leite cru.

O Ministério da Saúde Pública Italiano, emitiu a Circular nº 88 de 15 de dezembro 1978, determinando como precaução a pasteurização de todo leite destinado à manufatura de queijos de massa filada (ADDEO & COPPOLA, 1983; COPPOLA et al., 1988). No entanto, segundo Copolla et al. (1988), esta medida não foi atendida, pela deficiência causada na recomposição da microbiota fermentadora que compromete as características organolépticas particulares e inerentes ao produto.

Conforme Citro (1992), a pasteurização traz ainda algumas alterações irreversíveis no leite de búfala, uma vez que as proteínas séricas que precipitam pelo calor se ligam à caseína durante a coagulação, e assim

comprometem a filabilidade e higroscopicidade. Para Thanker et al. (1991), a presença das proteínas do soro desnaturadas e a maior retenção de umidade no queijo, resultante do prévio tratamento térmico do leite, são os principais fatores que determinam a diferença estrutural da matriz protéica.

Para Del Prato (1998), a teoria de que o processo de filagem em água quente equivale à pasteurização, é errônea. Durante o processo de filagem as bactérias podem estar protegidas pelas caseínas e pelos glóbulos de gordura, uma vez que, estes possuem uma notável capacidade de isolamento térmico.

Segundo Busani (1989) a pasteurização, do ponto de vista técnico, é indispensável para que se mantenha o mesmo padrão de qualidade para todos os derivados do leite de búfala.

Silva (1997) afirmou que a eficiência da filagem é maior quanto menor a carga microbiana inicial do leite, enquanto que a pasteurização pode ter um efeito adicional sobre esse processo, conferindo uma redução significativa da contaminação a níveis aceitáveis.

A qualidade microbiológica da água, utilizada na salmoura durante o processo de salga, assume também um papel significativo, pois com a presença de microrganismos, esta se torna uma importante fonte de contaminação para os queijos.

Em um estudo com salmouras empregadas na salga de mussarelas, desde o dia 0 até o 21º dia de sua utilização, Amaral et al. (1992), verificaram que os valores médios de NMP para coliformes totais e fecais variaram de zero a $1,6 \times 10^5/100$ mL e de zero a $1,1 \times 10^5/100$ mL, respectivamente. Para *Staphylococcus* coagulase-positiva os valores médios encontrados foram de zero a $1,2 \times 10^1$ UFC/ mL. Segundo os autores, a presença dessas bactérias pode ser devida à transferência desses microrganismos dos queijos às salmouras e à contaminação decorrente da constante manipulação que os queijos são submetidos durante o processo de salga.

Apesar da importância que as salmouras utilizadas na salga de queijos podem representar para a qualidade do produto, o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) não

estabelece a quantidade de microrganismos que poderiam ser tolerados (BRASIL, 1980).

Pelo fato do processo de manufatura da mussarela de búfala muitas vezes ser artesanal, exigindo muita manipulação, o produto pode ser contaminado por microrganismos não oriundos do leite.

Grande parte das toxinfecções alimentares ocorre devido à contaminação dos alimentos através dos manipuladores, os quais podem estar eliminando microrganismos patogênicos, por hábitos inadequados de higiene pessoal ou até mesmo por desconhecimento das práticas sanitárias e assim, comprometendo os alimentos (GOES et al., 2001).

Por ser comumente encontrado na mucosa nasal, garganta, cabelo, pele e unha, a presença do *Staphylococcus aureus* nos alimentos é geralmente associada com as condições inadequadas de manipulação (MARTINS-VIEIRA et al., 1995).

Silva et al.(1999) verificaram a contaminação de algumas amostras de mussarela de búfala por *Staphylococcus* coagulase-positiva apenas após a filagem, indicando a provável contaminação pelo manipulador.

Analisando a fabricação da mussarela de búfala e comparando uma linha de produção manual e outra parcialmente mecanizada, Silva (1997), de acordo com os resultados obtidos das análises microbiológicas, pôde verificar que o processo parcialmente mecanizado foi mais eficiente na preservação da qualidade microbiológica, assegurando melhor qualidade higiênico-sanitária ao produto e, portanto, proporcionando-lhe maior vida de prateleira.

2.5 Adulteração da mussarela de búfala

A preocupação com a autenticidade dos alimentos tornou-se um problema global, sendo cada vez mais importante detectar a introdução de produtos fraudulentamente rotulados e com qualidade inferior no mercado, quer por razões econômicas, quer por razões de saúde pública (VELOSO et al., 2002).

É cada vez maior o número de consumidores exigentes que buscam produtos autênticos, como leites e derivados corretamente rotulados (MOATSOU & ANIFANTAKIS, 2003). A descrição contida no rótulo dos alimentos deve ser precisa, de modo que, o comprador possa fazer a escolha de acordo com a sua dieta, além de obter informações necessárias sobre o produto o qual está adquirindo (HERMAN, 2001; HERNÁNDEZ et al., 2003).

A possibilidade de determinar a matéria prima (tipo de leite) utilizada na produção de queijos tem grande importância, não só para garantir a genuinidade dos mesmos com relação à denominação de origem, mas também na determinação das percentagens dos leites, caso haja mistura (VELOSO et al., 2002).

As flutuações sazonais na disponibilidade do leite de búfala e o preço mais elevado comparado com o leite de vaca, são um incentivo para que os laticínios o adicionem durante a elaboração da mussarela de búfala. Por isso, atualmente, são aplicados diversos métodos laboratoriais a fim de se detectar tal adulteração.

A legislação atual da União Européia (EUROPEAN COMMUNITIES, 2001) e da Itália (ITALY, 1996) têm como métodos oficiais de controle, as técnicas de isoeletrofocalização (IEF) de γ -caseína após a plasminólise e HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Resolução) respectivamente. Tais métodos conseguem detectar a presença do leite de vaca na mussarela, quando presente em quantidades superiores a 1%.

Existem ainda, outras técnicas baseadas em proteínas, tais como: identificação de β -lactoglobulina (β -LG) e α -lactoalbumina (α -LA) bovinas através de eletroforese capilar (CARTONI et al., 1998), métodos imunológicos para detecção de γ -caseína bovina através de anticorpos policlonais anti- β -caseína (ADDEO et al., 1995), espectrometria de massa para determinação da massa molecular protéica (COZZOLINO et al., 2002), entre outras.

Entretanto, a fidelidade desses métodos pode ser prejudicada pela desnaturação das proteínas do leite, como resultado do tratamento térmico realizado durante a fabricação dos queijos (PLATH et al., 1997).

Métodos baseados em biologia molecular têm sido utilizados com sucesso na detecção de adulteração da mussarela de búfala. Na Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), o DNA das células somáticas do leite, ao persistir no queijo mesmo após o processamento térmico, é amplificado muitas vezes, possibilitando assim, a identificação da espécie animal (TARGOWSKI, 1983; BRANCIARI et al., 2000; FELIGINI et al., 2005). Tal método possui ainda uma sensibilidade maior quando comparado com os demais, sendo capaz de detectar quantidades mínimas (0,5%) de leite de vaca em mussarelas de búfala (FELIGINI et al., 2005).

Aqui no Brasil, similarmente como ocorreu na Itália, foi criado um selo de pureza. Elaborado pela Associação Brasileira de Criadores de Búfalos (ABCB), este é concedido ao laticínio que utiliza exclusivamente o leite bubalino em seus produtos (GLASS, 2006). Para tal comprovação, utiliza-se a eletroforese em gel de poliacrilamida, que além de possuir uma elevada sensibilidade, não requer reagentes especiais, nem equipamentos muito dispendiosos. Além disso, permite a separação das diferentes frações da caseína (α , β , γ , κ) e também a identificação das proteínas do soro α -lactoalbumina e β -lactoglobulina (VELOSO et al., 2001).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção das amostras

No período de julho a novembro de 2005 foram feitas colheitas semanais de queijo mussarela, elaborado com leite de búfala e comercializado em estabelecimentos varejistas de diferentes cidades do estado de São Paulo.

As 50 amostras totalizadas encontravam-se acondicionadas em diferentes tipos de embalagens, estando algumas contidas em soro.

Durante a escolha das amostras, houve uma atenção especial em relação aos ingredientes citados no rótulo, devendo conter somente leite de búfala como matéria-prima, sem adição de leite de vaca. Contudo, uma amostra, vendida a granel e embalada no próprio supermercado, apresentava apenas o nome do produto, sem citar os ingredientes utilizados.

O processo de fabricação desses queijos era bastante variado, sendo alguns elaborados em um sistema inteiramente manual e de forma artesanal, enquanto que outros, em um sistema parcialmente mecanizado em indústrias tecnificadas.

Todas as amostras eram procedentes de estabelecimentos sob inspeção oficial (federal ou estadual), portanto, acredita-se que para a fabricação dos queijos, utilizou-se somente leite pasteurizado.

Certas marcas de mussarelas apresentavam o selo de pureza na embalagem, a fim de garantir o uso exclusivo do leite de búfala na elaboração do produto.

3.2 Transporte das amostras

As amostras, em suas embalagens originais, foram acondicionadas em caixas isotérmicas com gelo reciclável, encaminhadas ao Laboratório de Análises Microbiológicas - Inspeção Sanitária de Alimentos de Origem Animal - Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, da Faculdade de

Medicina Veterinária e Zootecnia e ao Laboratório de Fracionamento de Proteínas - Departamento de Física e Biofísica, do Instituto de Biociências, ambos pertencentes à UNESP/ Botucatu, para que pudessem ser processadas e analisadas.

3.3 Processamento das amostras

3.3.1 Análises microbiológicas

As metodologias aplicadas para as análises microbiológicas foram realizadas segundo disposto na Instrução Normativa SDA nº 62, de 26 de agosto de 2003, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2003), que estabelece os “Métodos Microbiológicos para Análise de Alimentos de Origem Animal e Água”, combinada com a metodologia recomendada pelo “Bacteriological Analytical Manual” (ANDREWS et al., 1998).

O processamento das amostras foi realizado imediatamente após dar entrada ao Laboratório de Análises Microbiológicas. As embalagens dos queijos foram desinfetadas externamente com álcool, abertas com tesoura estéril e, a partir de cada amostra foram retirados 25 g representativos do produto.

Para as contagens de coliformes totais e *Escherichia coli* e de *Staphylococcus* coagulase-positiva, foram preparadas diluições em série (Figura 1). Para isso, 25 g da amostra foram homogeneizados em 225 mL de Solução Salina Peptonada 0,1% perfazendo assim a diluição 10^{-1} . A partir dessa solução, obtiveram-se as diluições em série até 10^{-5} , retirando sempre volumes de 1 mL da diluição anterior e transferindo-os para tubos contendo 9 mL de Solução Salina Peptonada 0,1%, previamente esterilizados.

Para a determinação de *Salmonella* spp., não foram realizadas diluições, já que esta deve estar ausente em 25 g de qualquer alimento segundo a legislação vigente (RDC nº 12, 02/01/2001- ANVISA). A amostra foi transferida diretamente para o meio de cultivo de pré-enriquecimento.

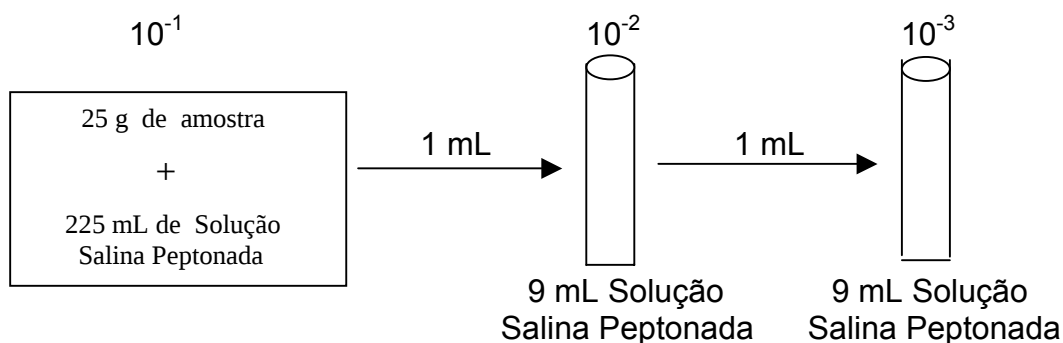


FIGURA 1: Esquema do preparo das diluições em série.

3.3.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida

A técnica de eletroforese foi realizada no Laboratório de Fracionamento de Proteínas numa segunda etapa do experimento. Para tanto, as mesmas estiveram estocadas em freezer a -20°C até o início dos procedimentos laboratoriais.

Das amostras descongeladas e trituradas, foi colhida uma alíquota de 5g e esta transferida para um béquer contendo 10 mL de etanol, onde permaneceu em repouso por 1 hora para que houvesse a perda de umidade.

Após esse período, o solvente foi desprezado e as amostras transferidas ao aparelho Soxhlet (TECNAL). Tal etapa teve como objetivo realizar o arraste de lipídios presentes na amostra, através de passagens sucessivas de éter etílico, em um período aproximado de 8 horas, a uma temperatura de 80°C .

No final do processo, os extratos obtidos a partir das amostras foram mantidos em estufa à 45°C , por 2 horas, para que se tornassem totalmente secos, após a evaporação do éter residual.

Adicionou-se 4 mL de uréia 8M a uma pequena quantidade do extrato dessecado (0,5g), permanecendo em repouso por 30 minutos, a fim de solubilizar as proteínas presentes. Posteriormente, tal solução foi submetida à centrifugação (Centrífuga Sorvall Superspeed RC2-B) a 2500 G, por 10

minutos, sob a temperatura de 0°C. Do sobrenadante retirado, transferiu-se 50 µL para um tubo tipo eppendorf acrescido de 200µL de tampão carreador (Apêndice B).

3.4 Análises microbiológicas

3.4.1 Contagem de coliformes totais e *E. coli*

Para a contagem de coliformes totais e *E. coli* utilizou-se o Sistema de Placas Petrifilm (3M), um método rápido, utilizado para análise quantitativa de produtos alimentícios e aprovado pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (991.14).

Conforme as recomendações do fabricante, realizou-se a semeadura de 1 mL das diluições 10^{-1} a 10^{-5} sobre a superfície da placa Petrifilm. Posteriormente, as placas permaneceram incubadas a 35°C por 48 horas (Figura 2).

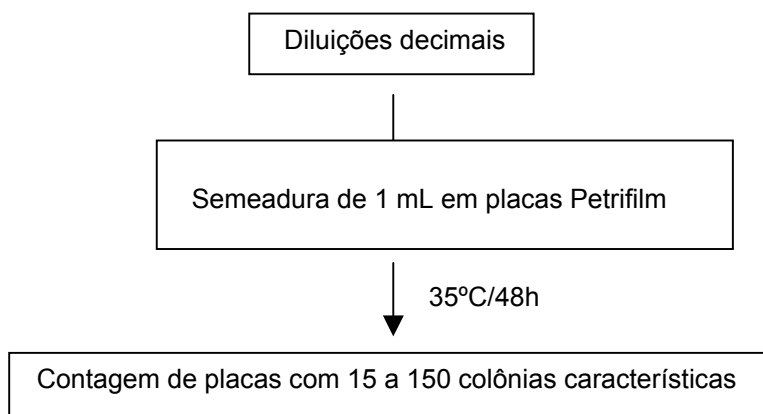


FIGURA 2: Esquema da contagem de coliformes totais e *E. coli* pelo Sistema de Placas Petrifilm.

As colônias azuis associadas a gás foram enumeradas como *E. coli* e as vermelhas como outros coliformes (Figura 3). Sendo assim, a contagem de coliformes totais correspondeu à totalidade de colônias vermelhas e azuis associadas a gás.

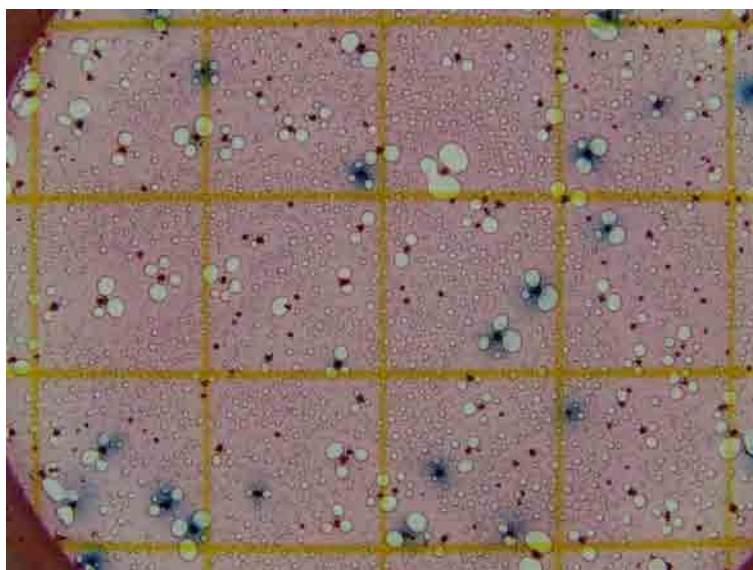


FIGURA 3: Colônias de coliformes e *E. coli* em placa Petrifilm.

3.4.2 Contagem de *Staphylococcus* coagulase-positiva

Alíquotas de 0,1 mL de cada diluição selecionada foram semeadas na superfície de placas contendo Ágar Baird-Parker (BP), previamente preparadas. Com o auxílio de um bastão de vidro em “L” esterilizado, o inóculo foi espalhado uniformemente por toda a superfície do meio, até ser totalmente absorvido. Em seguida, as placas foram incubadas invertidas a 35°C por 48 horas (Figura 4).

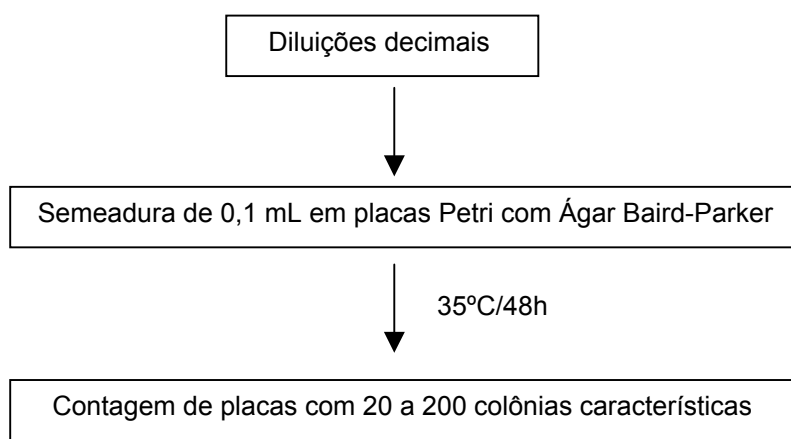


FIGURA 4: Esquema da contagem presuntiva de *Staphylococcus* coagulase-positiva.

Para a confirmação de cepas de *Staphylococcus* coagulase-positiva, das placas que apresentavam entre 20-200 colônias, selecionou-se algumas suspeitas, as quais foram submetidas ao teste de coagulase (Figura 5). Primeiramente as colônias foram inoculadas em tubos de ensaio contendo Caldo de Infusão Cérebro Coração (BHI) e incubadas a 35°C por 24 horas. Em seguida, transferiu-se 0,3 mL das culturas formadas, para tubos contendo a mesma quantidade de plasma de coelho, misturou-se com movimentos de rotação e incubou-se novamente a 35°C. As leituras foram efetuadas periodicamente até completar 24 horas, verificando-se a presença de coágulos evidentes nos tubos, para assim serem considerados positivos.

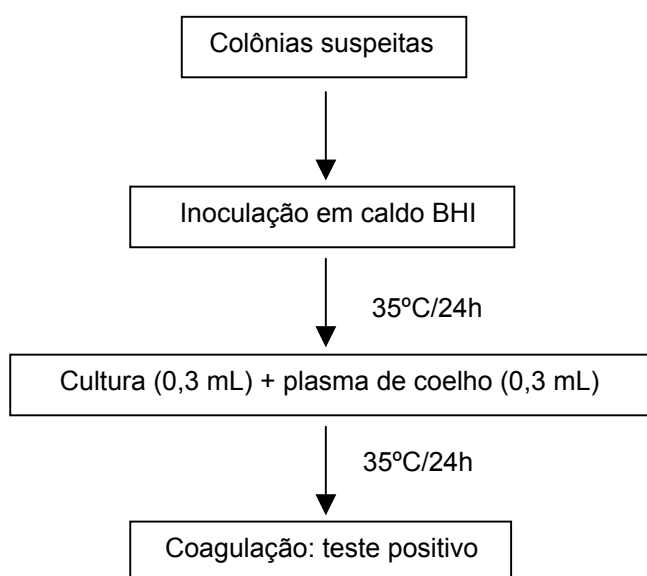


FIGURA 5: Esquema do teste de coagulase.

3.4.3 Pesquisa de *Salmonella* spp.

Para a pesquisa desse patógeno, utilizou-se a metodologia preconizada por Andrews et al. (1998), esquematizada na Figura 6 e descrita a seguir.

Para o pré-enriquecimento, 25 g de amostra foram homogeneizados em 225 mL de Água Peptonada Tamponada (APT) e incubados a 35° C por 18-24 horas.

Após a incubação, foi realizado um enriquecimento seletivo com a inoculação de 1,0 mL da amostra pré-enriquecida em tubos contendo 10 mL de Caldo Tetrationato (TT) e 0,1 mL da mesma em tubos com 10 mL de Caldo Rappaport-Vassiliadis (RV), sendo incubados a 35° C e 42° C respectivamente. Depois de 18-24 horas, estriou-se uma alçada do Caldo TT em placas de Petri contendo Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) e Ágar Bismuto Sulfito (BS). O mesmo procedimento foi realizado com o Caldo RV. Em seguida, as placas foram incubadas invertidas a 35° C por 18-24 horas.

As colônias consideradas características no Ágar XLD e Ágar BS foram selecionadas e semeadas em tubos contendo os meios TSI (Ágar Tríplice Açúcar Ferro) e LIA (Ágar Lisina Ferro). Após incubação a 35° C por 18-24 horas, os resultados positivos, por sua vez, foram confirmados através de testes sorológicos.

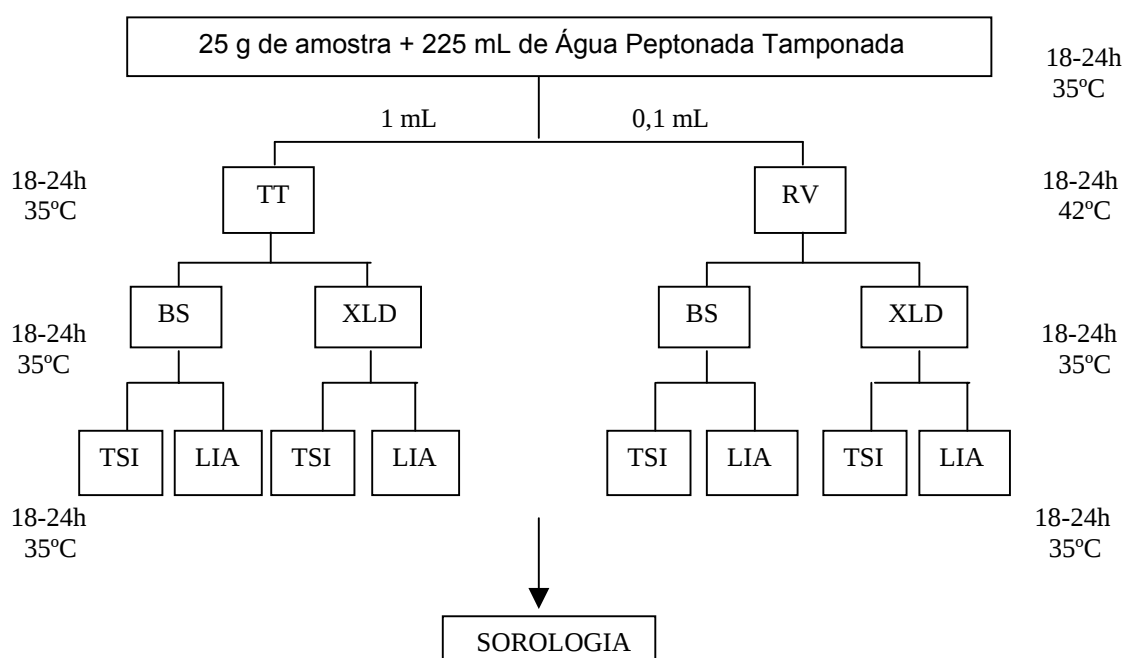


FIGURA 6: Esquema geral da análise para detecção de *Salmonella* spp.

3.4.4 Padrão microbiológico para mussarela

Os resultados obtidos foram comparados com o padrão microbiológico para queijo tipo mussarela, estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) através da Resolução RDC nº 12 de 02 de Janeiro de 2001, o qual encontra-se descrito no Quadro 2.

QUADRO 2: Padrão microbiológico para queijo tipo mussarela.

Microrganismos	Limite de tolerância
Coliformes fecais (45°C)	5×10^3 UFC/g
<i>Staphylococcus</i> coagulase-positiva	10^3 UFC/g
<i>Salmonella</i> spp.	Ausência em 25 g

3.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)

Para a análise das amostras foi utilizada a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida vertical, alcalina (pH 8,3), em sistema de tampões descontínuos, descrita por Hames & Rickwood (1990) com algumas modificações descritas por Ramos (1992).

Para a identificação das frações das caseínas, utilizou-se o gel de empilhamento na concentração de 4% e o gel de separação na concentração de 10%.

3.5.1 Obtenção dos controles

Os controles das caseínas de vaca e de búfala foram obtidos no Laboratório de Fracionamento de Proteínas, a partir de mussarelas sabidamente elaboradas com leite de vacas e búfalas, respectivamente.

3.5.2 Preparação das placas

Placas de vidro medindo 16 x 14 cm, foram lavadas com solução detergente, enxaguadas com água destilada e desengorduradas com etanol.

Em seguida, foram montadas aos pares, com a ajuda de espaçadores de acrílico de 0,1 cm de espessura, colocados entre as mesmas, e uma camada de fita adesiva aplicada nas laterais para vedá-las.

3.5.3 Preparação dos géis de separação e de empilhamento

O gel de separação a 10% foi preparado conforme o Quadro 3 e depois vertido cuidadosamente entre as placas de vidro, com uma seringa descartável. Uma pequena quantidade de água destilada foi colocada cuidadosamente sobre o gel, a fim de evitar o efeito provocado pela tensão superficial do líquido (menisco côncavo).

QUADRO 3: Componentes do gel de separação a 10% de poliacrilamida para PAGE.

COMPONENTES	QUANTIDADE
Solução A (30% de Acrilamida e 0,8% de Bis-acrilamida)	10 mL
Solução B (Tris 36,3g, HCl (1M) $\cong$ 48 mL, q.sp. 100 mL, pH 8.8)	3 mL
Persulfato de amônio 10%	200 μ L
TEMED	11 μ L
Uréia 6M	16,8 mL

Após a polimerização do gel, o molde foi inclinado cuidadosamente para a remoção da água e o resíduo foi retirado com um papel de filtro.

O gel de empilhamento a 4% foi preparado conforme descrito no Quadro 4 e transferido lentamente sobre o gel de separação polimerizado. Um molde em forma de pente, formado por 15 dentes, foi acomodado sobre o gel de empilhamento, com o objetivo de formar canaletas que permitiriam a aplicação das amostras.

QUADRO 4: Componentes do gel de empilhamento a 4% de poliacrilamida para PAGE.

COMPONENTES	QUANTIDADE
Solução A (30% de Acrilamida e 0,8% de Bis-acrilamida)	2,6 mL
Solução B (Tris 6g, HCl (1M) $\cong$ 48 mL, q.sp. 100 mL, pH 6.8)	5 mL
Riboflavina 0,004%	2,5 μ L
Água MilliQ	9,9 mL

3.5.4 Preparação da cuba vertical

Após a polimerização do gel de empilhamento, retirou-se o pente e os espaçadores e, o molde de vidro contendo o gel foi colocado na cuba vertical, sendo aderido com uma camada de vaselina sólida e com prendedores laterais.

Com a ajuda de uma micropipeta, aplicou-se 10 μ l dos controles e de cada amostra, de modo que a quantidade de proteína aplicada em cada canaleta foi de aproximadamente 300 μ g. As canaletas das extremidades

foram destinadas aos controles de búfala e vaca, enquanto que, as canaletas intermediárias utilizadas para as amostras.

Em cada reservatório da cuba, colocou-se o tampão de corrida (Apêndice B) já diluído em água destilada na proporção 1:10, a fim de promover o contato do gel com os eletrodos.

3.5.5 Corrida eletroforética

Com as amostras já aplicadas, a cuba foi ligada a uma fonte elétrica (Pharmacia – Electrophoresis Power Supply – EPS 600), sendo a eletroforese realizada em uma corrente elétrica constante de 200 V e amperagem de 10 mA, sob temperatura de refrigeração (4°C). O tempo total de corrida foi de aproximadamente 5 horas.

3.5.6 Coloração e descoloração

Terminada a corrida eletroforética, o gel foi retirado das placas de vidro e imerso em solução corante Comassie Blue R-250 (Apêndice B) durante 18 horas. Para a descoloração, o mesmo passou por uma solução descorante (Apêndice B) permanecendo por aproximadamente 4 horas. Posteriormente o gel foi transferido para água destilada.

3.5.7 Análise dos géis

Todos os géis foram salvos e suas imagens digitalizadas através do VDS (Pharmacia Biotech) e um software analisador de imagens (Image Master – Pharmacia Biotech), do Departamento de Física e Biofísica, Instituto de Biociências, UNESP – Botucatu/SP, foi utilizado para determinar a mobilidade eletroforética relativa (RF) de cada banda protéica.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores obtidos nas contagens de coliformes totais e *Escherichia coli* das amostras de mussarela de búfala se encontram na Tabela 2.

TABELA 2: Distribuição de 50 amostras de mussarela de búfala analisadas de acordo com os valores referentes às contagens de coliformes totais e *E. coli*.

Faixa de contagem em UFC/g* amostra	Coliformes totais		<i>E. coli</i>	
	nº	%	nº	%
0 – 10 ¹	37	74	48	96
10 ¹ – 10 ²	-	-	-	-
10 ² – 10 ³	5	10	-	-
10 ³ – 10 ⁴	4	8	1	2
10 ⁴ – 10 ⁵	2	4	1	2
10 ⁵ – 10 ⁶	2	4	-	-
TOTAL	50	100	50	100

* UFC/g: Unidade Formadora de Colônia/grama

No que se refere aos coliformes totais, observa-se que grande parte dos queijos analisados (74%) apresentou contagens menores que 10¹UFC/g. Entretanto, foram obtidos resultados elevados, indicando provavelmente condições inadequadas de higiene durante o processo de elaboração dos mesmos. Deve-se ressaltar que os valores mais elevados, encontrados na faixa de contagem entre 10⁵ e 10⁶UFC/g, correspondem às amostras contidas em embalagens com soro, o qual pode favorecer o crescimento dos microrganismos em função da sua atividade de água (A_w), considerada como um fator importante na multiplicação bacteriana.

Conforme Jay (1992), o crescimento microbiano depende de alguns fatores relacionados às características próprias do alimento, os chamados fatores intrínsecos, assim como aqueles referentes ao ambiente, chamados de fatores extrínsecos.

Olivieri (2004) comparou duas marcas diferentes de mussarela de búfala, ambas elaboradas com leite pasteurizado. Em relação aos coliformes totais, observou-se que populações maiores que 10^2 NMP/g estiveram presentes em 86,1% das amostras da marca A (com soro) e em 36,1% da marca B (sem soro).

Valores elevados para coliformes totais em mussarela de búfala elaborada com leite cru foram citados por Silva et al. (1999). Verificou-se que apesar do processo de filagem ter sido eficiente, permitindo a sobrevivência de apenas 0,04% desses microrganismos, a população média presente na massa pós-filagem ainda foi considerada alta ($3,49 \times 10^3$ NMP/g).

Ao analisar mussarelas elaboradas com leite cru de búfala, em diferentes fases do processamento, Silva (1997), em uma linha de produção manual, encontrou populações médias de $1,76 \times 10^3$ NMP/g de coliformes totais na massa após a filagem e $3,61 \times 10^3$ NMP/g no produto antes de ser embalado. Enquanto que no sistema mecanizado, as populações médias encontradas na massa foram de 22,8 NMP/g e no produto final 3,48 NMP/g.

Em um trabalho realizado com mussarelas produzidas exclusivamente com leite de vaca, verificou-se que os níveis de coliformes totais estiveram acima de 10^3 NMP/g em 15% das amostras (OLIVEIRA et al., 1998).

Apesar da legislação brasileira (Resolução RDC nº 12 de 02/01/01) não estabelecer limites de tolerância para os coliformes totais, torna-se necessária a sua contagem por serem indicadores das condições de higiene, sendo que altas contagens provavelmente significam contaminação pós-processamento, tratamentos térmicos ineficientes ou limpeza e sanitização deficientes (GUERREIRO, 1984).

Com relação aos coliformes fecais, o limite estabelecido pela Resolução RDC nº 12 de 02/01/01 para mussarela, é de 5×10^3 UFC/g. Considerado indicativo das condições higiênico-sanitárias, este grupo está relacionado com contaminação fecal de animais de sangue quente, inclusive o homem, mas pode originar-se também da sanitização deficiente das superfícies de trabalho na planta de processamento (SILVA et al., 1999).

A ocorrência de *Escherichia coli*, principal representante deste grupo, é a mais indicada para comprovar a contaminação fecal, uma vez que tem

como habitat exclusivo o trato intestinal do homem e animais. A importância da presença dessa bactéria no alimento está na patogenicidade de algumas linhagens e na possibilidade de haver outros microrganismos patogênicos, representando assim, um risco em potencial para a saúde dos consumidores.

Quanto aos valores da Tabela 2 referentes à contagem de *E. coli*, observa-se que apesar da maior parte das amostras ter apresentado populações menores que 10^1 UFC/g, 4% apresentaram valores entre 10^3 e 10^5 UFC/g. Entretanto, pode-se afirmar que apenas 2% delas encontram-se em desacordo com a legislação, uma vez que a contagem desse microrganismo ultrapassou os valores permitidos para coliformes fecais (Apêndice D *).

Cortesi et al. (1997) ao analisarem mussarelas elaboradas com leite cru de búfala, armazenada sob refrigeração (6°C) por 7 dias em salmoura, ao contrário, não encontraram *E. coli* em nenhuma das amostras analisadas.

Olivieri (2004) obteve valores de coliformes fecais acima de 10^2 UFC/g em 27,8% das amostras da marca A e em 8,3% das amostras da marca B, entretanto, todos os resultados estiveram abaixo do estabelecido pela legislação.

No trabalho de Silva et al. (1999), a permanência de coliformes fecais após a filagem foi de apenas 0,27%, sendo a população média sobrevivente de $1,06 \times 10^3$ NMP/g.

Silva (1997) obteve populações médias de coliformes fecais em massas, logo após as filagens manual e mecanizada, de 2,57 e 18,9 NMP/g respectivamente. Já no produto final, as populações médias encontradas antes de ser embalado com moldagens manual e mecanizada foram de 96,6 e 2,56 NMP/g respectivamente.

No entanto, Oliveira et al. (1998) verificaram que em nenhuma das amostras de mussarela de leite de vaca, os valores para coliformes fecais ultrapassaram o limite de 10^2 NMP/g.

Quanto aos resultados referentes à contagem de *Staphylococcus* coagulase-positiva, em todas as amostras os valores obtidos estiveram abaixo de 10^2 UFC/g (Apêndice D), enquadrando-se, portanto, no padrão microbiológico para mussarela estabelecido pela Resolução RDC nº 12 02/01/01, que tolera uma contagem de até 10^3 UFC/g para esse

microrganismo. Resultados semelhantes foram obtidos por Olivieri (2004) que detectaram somente contagens menores que 10^2 UFC/g para *Staphylococcus* coagulase-positiva neste tipo de queijo. Cortesi et al. (1997) também não detectaram tal bactéria em mussarela de búfala.

Silva (1997) obteve contagens médias de *Staphylococcus* coagulase-positiva de $2,2 \times 10^2$ e $4,3 \times 10^1$ UFC/g de amostras de mussarela de búfala, antes de serem embaladas, em processos de fabricação manual e parcialmente mecanizada, respectivamente.

Embora os resultados obtidos por Silva et al. (1999) tenham mostrado o potencial microbiocida da filagem empregada na elaboração da mussarela de búfala, o *Staphylococcus* coagulase-positiva não foi totalmente eliminado, estando presente em 11% das amostras colhidas após esta etapa tecnológica. Entretanto, antes do processo, 50% destas eram negativas, indicando uma provável contaminação pelo manipulador.

O trabalho apresentado por Nicolau et al. (2004) objetivou investigar a origem (humana ou bovina) das linhagens de *S. aureus* isoladas de amostras de queijo tipo mussarela, colhidas em diferentes etapas do processamento. O resultado dessa pesquisa mostrou que 62,1% das linhagens eram de origem humana, evidenciando a participação dos manipuladores na contaminação, desde a origem da matéria prima até a obtenção do produto final.

O homem e outros animais constituem o principal reservatório de *S. aureus*, estando presente na mucosa nasal, garganta, cabelo e pele de mais de 50% da população humana; por isso a sua presença nos alimentos processados é interpretada como indicativa de contaminação direta dos manipuladores. Porém, pode-se dever também à limpeza e sanitização inadequadas de superfície e utensílios, materiais e equipamentos (ICMSF, 1985; SIQUEIRA, 1995).

Além disso, o *Staphylococcus* spp. é considerado como um dos principais agentes etiológicos da mastite bubalina (BRINEZ et al., 2000), logo pode ser encontrado em leites que não foram submetidos ao processo de pasteurização.

De acordo com os resultados da pesquisa de *Salmonella* spp., todas as amostras analisadas foram negativas (Apêndice D), estando em conformidade com a Resolução RDC nº 12 02/01/01, a qual determina a

ausência deste microrganismo em 25 g do produto analisado. Coincidentemente, nos trabalhos relatados por Olivieri (2004) e Silva et al. (1999) todas as amostras de mussarela de búfala analisadas também mostraram-se negativas para *Salmonella* spp.

Entretanto, Silva (1997) verificou a presença de *Salmonella* spp. em 6,25% das amostras de mussarela elaboradas a partir de leite cru, no sistema de fabricação manual.

Com base nos resultados obtidos, pode-se afirmar que as amostras analisadas apresentaram, em geral, uma boa qualidade microbiológica, em relação aos microrganismos estudados. A contaminação, quando observada, provavelmente teve origem nas etapas pós-pasteurização, já que todas as amostras eram provenientes de estabelecimentos sob inspeção oficial (federal ou estadual), que exige que a elaboração de qualquer derivado lácteo seja realizada a partir de leite pasteurizado.

O fato de algumas amostras não terem atendido aos padrões microbiológicos se deve às condições inadequadas de higiene durante a elaboração de tais queijos, que permitiram a recontaminação do produto após a etapa de pasteurização do leite. Esta recontaminação, provavelmente, foi atenuada pelo efeito microbiocida da filagem, que apesar de não ser suficiente para garantir um padrão de qualidade microbiológica, auxiliou na redução dos microrganismos, como já verificado por outros autores (Silva et al., 1999).

Sendo o leite um alimento propício ao crescimento microbiano, a preocupação em se evitar a sua contaminação deve estar presente desde o momento da ordenha, uma vez que essa resulta da deficiência dos processos de higienização do ambiente, utensílios e equipamentos, além das doenças do rebanho e do homem. As dificuldades de transporte e as falhas durante o processo de beneficiamento e estocagem do leite também podem interferir na sua qualidade, que está intimamente relacionada com o grau de contaminação inicial e com o tempo e temperatura de armazenamento, desde a ordenha até o momento do processamento (SOUZA et al., 1996).

Por outro lado, as indústrias de laticínios devem cumprir as normas relativas às Boas Práticas de Fabricação e identificar os pontos críticos do processamento que possam comprometer a qualidade microbiológica do

produto, objetivando assim a melhoria das condições higiênico-sanitárias. Além disso, a pasteurização deve ser considerada uma etapa essencial durante a elaboração dos queijos, para que seja garantida a oferta de alimentos mais seguros ao consumidor.

Quanto à pureza das mussarelas de búfala, através da eletroforese em gel de poliacrilamida, observou-se a diferença de mobilidade das frações homólogas das caseínas de origem bovina e bubalina (Figura 7).



FIGURA 7: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% das caseínas do queijo: (V) controle vaca; (B) controle búfala; (A a K) amostras de mussarela de búfala.

Baseado nos resultados referentes às mobilidades relativas (RF) de cada banda (Apêndice E), comprovou-se a presença do leite de vaca em 22% das amostras analisadas (Figura 8).

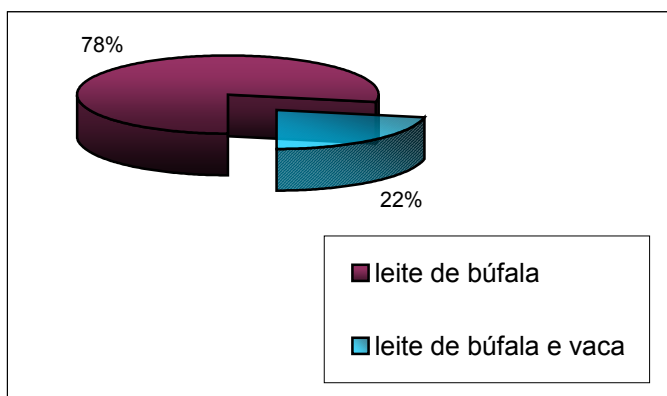


FIGURA 8: Percentual de amostras de mussarela elaboradas exclusivamente com leite de búfala e acrescidas de leite de vaca.

Com exceção de uma, todas essas amostras indicavam no rótulo, o leite de búfala como única matéria-prima utilizada. Vendida a granel, esta recebeu no supermercado uma embalagem sem informações referentes aos ingredientes.

Verificou-se ainda que aquelas amostras que apresentavam o selo de pureza impresso na embalagem continham apenas leite bubalino na sua composição, comprovando assim, a sua veracidade.

De acordo com as Normas Técnicas Especiais Relativas a Alimentos e Bebidas (N.T.A.) (SÃO PAULO, 1992), a mussarela é o queijo de massa filada, não prensada, obtido a partir de leite de vaca, de cabra, de ovelha, de búfala, ou com qualquer combinação de dois ou mais destes leites. Por não existir nenhuma legislação referente ao uso exclusivo de leite de búfala para a fabricação dessa mussarela, é permitida a adição do leite de vaca ao produto. Entretanto, tal informação deve estar contida no rótulo, caso contrário, constitui-se numa fraude.

Não se pode esquecer que a especificação da presença do leite de vaca no produto torna-se necessária, já que a ingestão do mesmo, muitas vezes, deve ser evitada seja por causar reações alérgicas, seja por razões éticas ou religiosas (VELOSO 2002).

Com base nos resultados obtidos através da eletroforese, pode-se afirmar que parte das amostras de mussarela de búfala não está em

conformidade com as especificações do rótulo, tendo sido detectado leite de vaca na sua composição.

A adição do mesmo pode ter ocorrido durante a fabricação da mussarela ou durante a obtenção do leite. A indústria visando um maior lucro, pode adicionar intencionalmente leite de vaca, uma vez que o leite de búfala tem um valor comercial mais alto. O produtor, por sua vez, tendo em vista uma maior rentabilidade, pode misturar os dois tipos de leites e fornecer à indústria uma matéria-prima adulterada. Por isso, é necessário que haja um gerenciamento em todas as etapas da cadeia produtiva, desde o fornecimento do leite na propriedade até a obtenção do produto final no laticínio.

Seria importante que tal produto, que vem ganhando espaço a cada dia, fosse submetido, periodicamente, a testes comprobatórios por parte dos órgãos de fiscalização, uma vez que a sua composição é duvidosa.

O selo de pureza, além de proporcionar um produto diferenciado no mercado, atua como chancela importante, dando ao consumidor a garantia de comprar uma mercadoria legítima e à indústria a certeza de estar recebendo de seus fornecedores, o puro leite de búfala.

Diante da literatura compulsada, observou-se que até o presente momento, a disponibilidade de dados referentes à eletroforese em gel de poliacrilamida para detecção de fraudes em mussarela de búfala é bastante escassa. Existem alguns trabalhos que utilizam outros métodos para a mesma finalidade, mas têm como objetivo comprovar a viabilidade dos mesmos e não avaliar a pureza das mussarelas.

5. CONCLUSÕES

- 1) A maior parte (98%) das amostras de mussarela de búfala analisadas está em conformidade com os padrões microbiológicos legais vigentes.
- 2) Uma parcela destas amostras apresentou resultados elevados para coliformes totais, indicando possivelmente, as inadequadas condições de higiene durante o seu processo de fabricação.
- 3) Uma pequena porcentagem encontra-se em desacordo com a legislação vigente por ter apresentado populações elevadas de coliformes fecais, devido às altas contagens de *E. coli*, que evidencia uma contaminação fecal do alimento.
- 4) Como todas as amostras eram provenientes de estabelecimentos sob inspeção oficial, que exige que a elaboração de qualquer derivado lácteo seja realizada a partir de leite pasteurizado, provavelmente, a recontaminação dos queijos teve origem nas etapas pós-pasteurização.
- 5) Medidas mais efetivas de higiene devem ser implantadas desde a obtenção do leite até as diferentes fases de elaboração dos queijos, como forma de poder oferecer aos consumidores, produtos com melhor qualidade e segurança.
- 6) Algumas (22%) amostras de mussarela mostraram em sua composição a presença do leite de vaca, sugerindo uma adição de forma intencional. Tal fato pode ter ocorrido durante a fase de elaboração do produto ou durante o fornecimento do leite.

REFERÊNCIAS*

ADDEO, F.; COPPOLA, S. Aspectti tecnologici e microbiologici della trasformazione del latte di bufala in mozzarella e ricotta. **Latte**, n.8, p.706-722, 1983

ADDEO, F.; NICOLAI, M.A.; CHIANESE, L.; MOIO, L.; SPAGNA MUSSO, S.; BOCCA, A.; GIOVINE, L. A control method to detect bovine milk in ewe and water buffalo cheese using immunoblotting. **Milchwissenschaft**, n. 50, p. 83-85, 1995.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Resolução RDC nº12 de 02 de janeiro de 2001**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>> . Acesso em: 05 abr. 2005.

AMANTE, L.; DE ROSA, C.; FAZANO, L.; BANCHELLI, L.; MEDEA, D.; DE PALO, R. Valutazione dei puti critici della mungitura in aziende di bufale di pianura e di colina del basso Lazio. In: CONGRESSO NAZIONALE SULL'ALLEVAMENTO DEL BÚFALE,1; 2001, Salerno. **Annali...** Salerno, 2001. p. 251-255.

AMARAL, L.A.; NADER FILHO, A.; IARA, S.T.; FERRO, J.A. Variação das características físico-químicas e microbiológicas das salmouras empregadas na salga de queijos tipo mussarela durante o período de sua utilização. **Revista de Saúde Pública**, v.26, n.1, p.41-45, 1992.

ANDREWS, W.H.; JUNE, G.; SHERROD, P.S.; HAMMACK, T.S.; AMAGUANA, R.M. *Salmonella*. In: FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - **Bacteriological Analytical Manual**: Revision A Gaithersburg: AOAC INTERNATIONAL, 1998. 8th edition. P. 5.01- 5.20

ASSOCIAÇÃO DE CRÉDITO E ASSISTÊNCIA RURAL DE SANTA CATARINA - ACARESC. **Búfalo**: novas perspectivas para um animal mal-aproveitado. Florianópolis, 1984.

BARUSELLI, P.S. L'allevamento bufalino in Brasile. **Bubalus Bubalis**, n. 5, p.7-11, 1995.

BATHIA, K.L.; VALSA, C. Lactoferrin level in buffalo milk. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 4., 1994, São Paulo. **Proceedings...** São Paulo: Associação Brasileira de Criadores de Búfalos, 1994. v.2, p. 162.

BEHMER, M.L.A. **Tecnologia do leite**. São Paulo: Nobel, 1984. p.196-197.

BRANCIARI, R.; NIJMAN, I.J.; PLAS, M.E.; DI ANTONIO, E.; LENSTRA, J.A. Species origin in Italian mozzarella and Greek Feta cheese. **Journal of Food Protection**, n.63, p. 408-411, 2000.

*ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 22p.

BIOSIS. **Serial sources for the BIOSIS preview database**. Philadelphia, 1996. 468p

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal** (RIISPOA). Brasília, 1980.166p.

BRASIL. Instrução Normativa nº 51, de 20 de setembro de 2002. Aprova os regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, do leite tipo B, do leite tipo C, do leite pasteurizado e do leite cru refrigerado e o regulamento técnico de coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. **Diário Oficial da União**, Brasília, 21 set. 2002. p.13, Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa SDA 62, de 26 de agosto de 2003. **Métodos microbiológicos para análise de alimentos de origem animal e água**. Brasília. 2003. 265p. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 21 abr. 2004.

BRINEZ, W.; MOLERO, E.; MONTIEL, C.; VALBUENA, E.; CASTRO, G.; URDANETA, S. Quality parameters and more frequent bacteriological genus in buffaloes milk in the Mara county, Zulia state. **Revista Científica: Facultad de Ciencias Veterinarias**, v.10, n.4, p.346-352, 2000.

BUSANI, S.F.B. Matéria-prima. In: VAN DENDER, A.G.F. **Utilização artesanal do leite de búfala**. Campinas: ITAL, 1989. p.1-8 (ITAL, Manual técnico, 3)

CABRERA, M.C.; MENENDEZ, T.; ORTEGA, O.; REAL, E. Obtención de requesón a partir de suero de queso de búfala. **Alimentaria**, n. 260, p. 75-78, 1995.

CÂMARA, S.A.V.; AMARAL, G.B.; MULLER, M.T.; SILVEIRA, K.C.S.; ALMEIDA, T.N.; MEDEIRO, C.F. Avaliação microbiológica de queijos tipo minas frescal artesanal, comercializados no mercado municipal de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, 2000. **Higiene Alimentar**, v.16, n.101, p. 32-36, 2002.

CARTONI, G.P.; COCCIOLI, R.; JASIONOWSKA, R.; MASCI, M. Determination of cow milk in buffalo milk and mozzarella cheese by capillary electrophoresis of the whey protein fractions. **Italian Journal Food Science**, n.2, p. 127-131, 1998.

CARVALHO, I.C.; HUNH,S. Distribuição de nitrogênio no leite e índice de caseína. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. v.14, n.201, p. 19-28, 1979.

CASERIO, G.; SENESI,E.; FORLONI, M. EMALDI,G. Condizioni igieniche delle Mozzarelle in rapporto alla tecnologia di produzione. **Industria del Latte**, v.13, n.2, p.19-39, 1977.

CITRO, A. Dove va la mozzarella di bufala campana? **Notiziario Veterinario**, aprile, 1992.

COLDEBELLA, A. **Contagem de células somáticas e produção de leite em vacas holandesas confinadas**. 2003. 112p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba

COUSIN, M.A.; BRAMLEY, A.J. The microbiology of raw milk. In: ROBINSON, R.K. **Dairy microbiology**. New York: Applied Science, 1981. v.1, p.119-163.

COPPOLA, S.; PARENTE, E.; DUMONTET, S.; LA PECCERELLA, A. The microflora of natural whey cultures utilized as starters in the manufacture of mozzarella cheese from water buffalo milk. **Lait**, v. 68, n.3, p.295-310, 1988.

CORTESI, M.L.; CITRO, A.; SARLI, T.; SANTORO, A.; MURRU, N.; PEPE, T.; DELL'ORFANO, G. Behaviour of *Salmonella senftenberg* during manufacture of buffalo mozzarella cheese: preliminary researchs. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 5., 1997, Caserta. **Proceedings...** Caserta, 1997. p.266-271.

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

CUNHA NETO, O.C.; OLIVEIRA, C.A.F. Aspectos da qualidade microbiológica do leite de búfala. **Higiene Alimentar**, v.17, n.110, p. 18-23, 2003.

DEL PRATO, O.S. **Tratado di tecnologia casearia**. Bologna: s.n., 1998. 1070p.

EUROPEAN COMMUNITIES. Commission Regulation (EC) n° 213/01 of 9 January 2001 laying down detailed rules for the application of Council Regulation (EC) n° 1255/1999 as regards methods for the analysis and quality evaluation of milk and milk products and amending Regulations (EC) n°2771/1999 and (EC) n° 2799/1999. **Official Journal of the European Communities**, 1999. 037, p.1-99.

FAO. Disponível em <www.fao.org>. Acesso em: 27 ago. 2004.

FAO. **Faostat agriculture data**. Agricultural production – live animals – livestock. Disponível em: <<http://apps.fao.org>>. Acesso em: 10 mar. 2006.

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

FERRARA, B.; INTRIERI, F. Características e uso do leite de búfala II. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.30, n.178, p.27-35, 1975

FERREIRA, R. **Do búfalo só não se aproveita**. Agricultura: a força verde. São Paulo, 1980, p. 28-33

FERREIRA, T.A.; GUINART, T.C.; LAICINI, Z.M.; MURTA, P.H.G. Características do leite de búfala e seus derivados. **Leite & Derivados**, n. 22, p. 16-20, 1995.

FONSECA, L.F.L. Qualidade do leite e sua relação com equipamentos de ordenha e sistema de resfriamento. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DO LEITE, 1., 1998, Curitiba. **Anais...** Curitiba, 1998. p.54-56.

FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. **Qualidade do leite e controle da mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, 2000.

FURTADO, M.M. Leite de búfala: estudo da fabricação do queijo azul. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.35, n.207, p. 23-28, 1980a.

FURTADO, M.M. **Leite de búfala**: características e fabricação de queijos. Juiz de Fora: EPAMIG, 1980b, 60p.

FURTADO, M.M. Efeito do teor de sal na maturação de um queijo por *Penicilium camembert*. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.7, n.224, p.15-18, 1992.

FURTADO, M.M. **Mussarela**: uma atualização tecnológica sobre suas características fundamentais. Valinhos: Chr. Hansen Ind. Com. Ltda, 1997. 18p.

GLASS, V. Pureza garantida. **Revista Globo Rural**. Disponível em: <<http://globorural.globo.com/barra.asp.d=/edic/191/rep.bufalaa.htm>>. Acesso em: 15 mar. 2006.

GÓES, J.A.W.; FURTUNATO, D.M.N.; VELOSO, I.S. Capacitação dos manipuladores de alimentos e a qualidade da alimentação servida. **Higiene Alimentar**, n.82, v.15, p. 20-22, 2001.

GUERREIRO, M.G. **Bacteriologia especial**: com interesse à saúde pública. Porto Alegre: Sulina, 1984.

GUERREIRO, P.K.; MACHADO, M.R.F.; BRAGA, G.C.; GASPARINO, E.; FRANZENER, A.S.M. Qualidade microbiológica de leite em função de técnicas profiláticas no manejo de produção. **Ciência e Agrotecnologia**. v.29, n.1, p.216-222, 2005.

GUIDO, M.C.; CARVALHO, N.A.T.; BARUSELLI, P.S.; COSTA, E.O. Female bubaline mastitis etiology in brazilian state of São Paulo. In: CONGRESSO NAZIONALE SULL'ALLEVAMENTO DEL BÚFALO, 1., 1994. **Trabalhos apresentados...**s.n., 1994. 1CD-ROM.

HAMES, B.D.; RICKWOOD, D. **Electrophoresis of proteins**. 2ª edition. New York, 1990. 383 p.

HEESCHEN, W.H. **Bacteriological quality of raw milk: legal requirements and payment systems. Situation in the EU and IDF member countries.** In: INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION SYMPOSIUM ON BACTERIOLOGICAL QUALITY OF RAW MILK, 1996, Wolfpassing. **Proceedings...** Wolfpassing, 1996.

HERMAN, L. Determination of the animal origin of raw food by species-specific PCR. **Journal of Dairy Research**, n.68, p.420-436, 2001.

HERNÁNDEZ, M.; FERRANDO, A.; ESTEVE, T.; PUIGDOMÈNECH, P.; PRAT, S.; PLA, M. Real-time and conventional polymerase chain reaction systems based on the metallo-carboxypeptidase inhibitor gene for specific detection and quantification of potato and tomato in processed food. **Journal of Food Protection**, n.66, p.1063-1070, 2003.

HÜNH, S.; FERREIRO, L. Influência da mastite bovina na percentagem da caseína do leite. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.35, n.212, p. 33-35, 1980.

HÜNH, S.; HAJDENWURCEL, J.R.; MORAES, J.M.; VARGAS, O.L. Qualidade microbiológica do leite cru obtido por meio de ordenha manual e mecânica e ao chegar à plataforma. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.35, n.209, p. 3-8, 1980a.

HÜNH, S.; LOURENÇO JUNIOR, J.B.; MOURA CARVALHO, L.O. **Características do leite de búfalas da raça Mediterrâneo e mestiço Murrah-Mediterrâneo.** Belém: EMBRAPA-CPATU, 1980b.

HÜNH, S.; FERREIRO, L.; MOURA CARVALHO, L.O. **Estudo comparativo da composição química do leite de zebuínos e bubalinos.** Belém: EMBRAPA-CPATU, 1982.

IBGE. Banco de dados agregados – Sistema IBGE de recuperação automática – SIDRA. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 10 mar. 2006.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS - ICMSF. Leche y productos lacteos. In: _____. **Ecología Microbiana de los alimentos: productos alimenticios.** Zaragoza: Editorial Acribia S.A., 1985. cap. 18, p. 472-525.

ITALY. Decree of the Italian Minister of Agricultural, Food and Forestry Resources, 10 April 1996. **Official Journal of Italian Republic**, 11 June 1996. p.135.

JAY, J.M. Parametros intrínsecos y extrínsecos que influyen en el crecimiento de los microorganismos. In: _____. **Microbiología moderna de los alimentos.** 3 ed. Zaragoza: Acribia, 1992. cap.3, p. 45-74.

KOSIKOWSKI, F. Soft, uncured Italian cheese. In:_____. **Cheese and fermented milk foods**. New York: Cornell University, 1970. Cap.10, p.153-167.

LAU, H.D. Important economic diseases in buffaloes. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 4., 1994, São Paulo, **Anais...** São Paulo: Associação Brasileira de Criadores de Búfalos, 1994. p. 209-220.

MARTINS-VIEIRA, M.B.C.; SILVA, M.C.C.; DIAS, R.S. Surtos de toxinfecção alimentar ocorridos em Minas Gerais no período de 1992 a 1994. XVIII Congresso Brasileiro de Microbiologia. **Programa & resumos**, 268p. 1995.

McMAHON, D.J.; OBERG, C.J.; McMANUS, W. Functionality of Mozzarella cheese. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v.48, n.2, p.99-104,1993.

MESQUITA, A.J. **Qualidade físico-química e microbiológica do leite cru bubalino**. Goiânia: Ed. da UFG, 2002.

MOATSOU, G.; ANIFANTAKIS, E. Recent developments in antibody-based analytical methods for the differentiation of milk from different species. **International Journal of Dairy Technology**, n.56, p.133-138, 2003.

MOREIRA, P.; COSTA, A.L.; VALENTIN, J.F. **Comportamento produtivo e reprodutivo de bubalinos mestiços Murrah-Mediterrâneo em pastagem cultivada em terra firme, no estado do Acre**. Rio Branco: EMBRAPA – CPAF– Acre, 1994. 19 p. (Boletim de Pesquisa, 13).

NADER FILHO, A. Estudo da variação do ponto crioscópico do leite de búfala. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.39, n.234, 1984.

NAG, N.C. Staphylococcal mastitis in cows, buffaloes and goats and their antibiotic sensitivity. **Indian Journal Animal Hearth**, v.14, p.169-173, 1995.

NICOLAU, E.S.; MESQUITA, A.J.; BORGES, G.T.; KUAYE, A.Y. *Staphylococcus aureus* no processamento de queijo mussarela: detecção e avaliação da provável origem das linhagens isoladas. **Higiene Alimentar**, v.18, n.125, p. 51-56, 2004.

OLIVEIRA, J.S. **Queijo: fundamentos tecnológicos**. São Paulo: Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia, 1982. 233p.

OLIVEIRA, C.A.F.; MORENO, J.F.G.; MESTIERI, L.; GERMANO, P.M.L. Características físico-químicas e microbiológicas de queijos minas frescal e mussarela, produzidos em algumas fábricas de laticínios do estado de São Paulo. **Higiene Alimentar**, v.12, n.55, p. 31-35, 1998.

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

PLATH, A.; KRAUSE, I.; EINSPANIER, R. Species identification in dairy products by three different DNA-based techniques. **Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung a-Food Research and Technology**, n.205, p.437-441, 1997.

QUEIROZ, L.S.O.; LOURENÇO JR., J.B.; VIEIRA, L.C.; SOUSA, C.L. Avaliação microbiológica de iogute de leite de búfala, com sabor de frutas da amazônia, para merenda escolar. **Higiene Alimentar**, v.16, n.94, p. 39-44, 2002.

RAMOS, P.R.R. **Polimorfismo bioquímico de proteínas séricas do leite de vaca da raça holandês, puras por cruzamento, variedade malhada de preto**. 1992. 131p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu.

RUIZ, R.L. **Microbiologia zootécnica**. São Paulo: Roca, 1992, 314 p.

SAMPAIO NETO, J.C.; MARTINS FILHO, R.; LÔBO, R.N.B.; TONHATI, H. Avaliação dos desempenhos produtivos e reprodutivos de um rebanho bubalino no estado do Ceará. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.2, p. 368-373, 2001.

SÃO PAULO (Estado). **Código sanitário**: decreto nº 12.342, de 27 de setembro de 1978: regulamento da promoção, preservação e recuperação da saúde no campo de competência da Secretaria de Estado da Saúde (revisto e atualizado até dezembro de 1990). 5 ed. São Paulo: Imprensa Oficial do Estado, 1992. p.145-343.

SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE PIZZA CHEESE, Juiz de Fora, 1997. Valinhos: Chr. Hansen Ind. Com. Ltda, 1997

SILVA, E.O.T.R. **Fabricação artesanal de *mozzarella* elaborada com leite de búfala. Estudo da contaminação microbiológica associada à manipulação, em produção manual ou parcialmente mecanizada**. 1997. 47p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SILVA, E.O.T.R.; PANETTA, J.C.; ISHIZUKA, M.M. Efeito microbiocida da fase da filagem, durante a fabricação de *mozzarella* elaborada com leite cru de búfala. **Higiene Alimentar**, v. 13, n.59, p.28-34, 1999.

SILVA, M.S.T.; LOURENÇO JR., J.B.; MIRANDA, H.A.; ERCHESEN, R.; FONSECA, R. F. S. R.; MELO, J.A.; COSTA, J.M. **Programa de incentivo a criação de búfalos por pequenos produtores – PRONAF**. Belém, PA: CPATU, 2003. Disponível em: <www.cpatu.Silva et al,2003.br/bufalo>. Acesso em: 15 ago. 2004.

SIQUEIRA, R.S. **Manual de microbiologia dos alimentos**. Rio de Janeiro: EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos, 1995.p. 73-120.

SHUKLA, P.C.; SUPEKAR, P.G. Cell countin in milk samples of normal and mastitis animals. **Livestock Adviser**, v.12, n.12, p.44-48, 1987.

SOUZA, R.M.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; SILVA, T.J.P.; SILVA, A.N.; RODRIGUES, R.; SAMPAIO, I.B.M. pasteurização lenta e rápida. **Leite & Derivados**, n. 26, p.55-64, 1996.

TARGOWSKI, S.P. Role of inmune factors in protection of mammary gland. **Journal of Dairy Science**, n.66, p.1781-1789, 1983.

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

THANKER, P.N.; GANGOPADHYAY, S.K.; MIYANI, R.V. Influence of manufacturing parameters on rheology of mozzarella cheese made from buffalo milk. **Australian Journal of Dairy Technology**, v.11, p. 53-56, 1991.

VALLE, J.L.E. Queijos de massa filada. In: VAN DENDER, A.G.F. **Utilização artesanal do leite de búfala**. Campinas: ITAL, 1989. p.57-60. (ITAL. Manual técnico,3).

VAN DENDER, A.G.F.; MORENO, I.; GARCIA, S. Uso do creme de leite de búfala e de vaca na fabricação do queijo mascarpone. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.43, n.259, p. 35-42, 1988.

VARNAM, A.H.; SUTHERLAND, J.P. Liquid milk and liquid milk products. In:_____. **Milk and milk products: technology, chemistry and microbiology**. London: Chapman & Hall, 1994. v.1, cap.2, p. 42-100.

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

VERRUMA, M.R. **Avaliação química, nutricional e sensorial do leite de búfala e derivados em comparação aqueles de leite de vaca**. 1993. 110 p. Dissertação - Mestrado em Ciência dos Alimentos. Escola Superior de Agricultura “ Luiz de Queiroz” , Universidade de São Paulo, Piracicaba.

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

VIANNI, M.C.E.; NADER FILHO, A.; ROSSETI, D.J.G.; LONGHI, J.L.; SICHER, M. Eficiência do California Mastitis Test (CMT) na estimativa do número de células somáticas do leite bubalino. **Ciência Veterinária**, v.4, n.2, p3-4,1990.

VIEIRA, S.D.A.; NEVES, B. S. Padronização do teor de gordura e do extrato seco desengordurado do leite de búfala com leite reconstituído. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.35, n.208, p. 27-32, 1980.

WOOLFSHOON-POMBO, A.F. Composição físico-química do leite de vaca e de cabra na Microrregião do Vale do Paraíba. **Boletim do Leite**, n.5987, p.23-30, 1978.

YUNES, V.M.; BENEDET, H.D. Desenvolvimento experimental de queijo fresco de leite da espécie bubalina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.20, n.3, p.285-290, 2000.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Reagentes

Ácido Acético Glacial

Ácido Clorídrico

Acrilamida

Bis-acrilamida (N, N - Metilene Bis-Acrilamida)

Bromofenol

Cloreto de Sódio

Comassie Blue R-250

Etanol

Éter Etílico

Glicerol

Glicina

Metanol

Persulfato de Amônio

Riboflavina

TEMED (N,N,N',N' – Tetrametiletilenodiamino)

Tris (Tris (hidroximetil) aminometano)

Uréia 6M

Uréia 8M

APÊNDICE B - Soluções

TAMPÃO CARREADOR

30 mL de uréia 8M

70 mL de glicerol

azul de bromofenol (ponta de espátula)

TAMPÃO DE CORRIDA

6,0 g de tris

28,8 g de glicina

1000 mL de água MilliQ

pH 8,3

CORANTE COMASSIE BLUE R-250

1,0 g de comassie blue R-250

400 mL de metanol

100 mL de ácido acético glacial

500 mL de água MilliQ

DESCORANTE

300 mL de metanol

100 mL de ácido acético glacial

600 mL de água MilliQ

APÊNDICE C - Meios de cultura

PEPTONA : Bacto Peptone (DIFCO 211677)

BP: Bard-Parker Agar Base (DIFCO 276840)

APT: Buffered Peptone Water (OXOID CM 509)

RV: Rappaport-Vassiliadis Rio Broth (DIFCO 218581)

TT: Tetrathionate Broth Base (DIFCO 210430)

BS: Bismuth Sulfite Agar (DIFCO 273300)

XLD: XLD Agar (DIFCO 278850)

TSI: Triple Sugar Iron Agar (MERCK 103915)

LIA: Lysine Iron Agar (MERCK 11640)

BHI: Brain Heart Infusion (DIFCO 237500)

* Gema de ovo com telurito: Newprov

* Plasma de coelho liofilizado: Newprov

APÊNDICE D

TABELA 3: Resultados de coliformes totais, *Escherichia coli*, *Staphylococcus* coagulase-positiva e *Salmonella* spp. obtidos das amostras de mussarela de búfala.

amostra	coliformes totais	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus</i> coag-positiva	<i>Salmonella</i> spp.
1	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^2$	ausência/25g
2	$1,8 \times 10^3$	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^2$	ausência/25g
3	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^2$	ausência/25g
4	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^2$	ausência/25g
5	1×10^6	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^2$	ausência/25g
6	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^2$	ausência/25g
7	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^2$	ausência/25g
8	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^2$	ausência/25g
9	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^2$	ausência/25g
10	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^2$	ausência/25g
11	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^2$	ausência/25g
12	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^2$	ausência/25g
13	$1,9 \times 10^2$	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^2$	ausência/25g
14	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^2$	ausência/25g
15	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^2$	ausência/25g
16	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^2$	ausência/25g
17	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^2$	ausência/25g
18	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^2$	ausência/25g
19	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^2$	ausência/25g
20	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^2$	ausência/25g
21	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^2$	ausência/25g
22	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^2$	ausência/25g
23	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^2$	ausência/25g
24	$4,5 \times 10^3$	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^2$	ausência/25g
25	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^2$	ausência/25g

TABELA 3: Resultados de coliformes totais, *Escherichia coli*, *Staphylococcus* coagulase-positiva e *Salmonella* spp. obtidos das amostras de mussarela de búfala (continuação).

amostra	coliformes totais	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus</i> coag-positiva	<i>Salmonella</i> spp.
26	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^2$	ausência/25g
27	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^2$	ausência/25g
28	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^2$	ausência/25g
29	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^2$	ausência/25g
30	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^2$	ausência/25g
31	$1,1 \times 10^3$	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^2$	ausência/25g
32	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^2$	ausência/25g
33	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^2$	ausência/25g
34	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^2$	ausência/25g
35	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^2$	ausência/25g
36	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^2$	ausência/25g
37	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^2$	ausência/25g
38	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^2$	ausência/25g
39	$1,2 \times 10^5$	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^2$	ausência/25g
* 40	$1,3 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4$	$< 1 \times 10^2$	ausência/25g
41	$2,3 \times 10^2$	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^2$	ausência/25g
* 42	$2,2 \times 10^4$	$2,3 \times 10^3$	$< 1 \times 10^2$	ausência/25g
43	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^2$	ausência/25g
44	$1,9 \times 10^3$	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^2$	ausência/25g
45	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^2$	ausência/25g
46	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^2$	ausência/25g
47	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^2$	ausência/25g
48	$1,9 \times 10^2$	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^2$	ausência/25g
49	$5,3 \times 10^2$	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^2$	ausência/25g
50	$1,7 \times 10^2$	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^2$	ausência/25g

APÊNDICE E

TABELA 4: Mobilidades Relativas (RF) das amostras de mussarela de búfala submetidas ao teste de pureza eletroforética.

	C. Buf.	1	2*	3*	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	C. Vaca
b-casein	0,51	0,51	0,51	0,51	0,51	0,51	0,51	0,51	0,51	0,51	0,51	0,51	0,51	0,51	0,51
a-cas. B	0,76	0,76		0,76	0,76	0,76	0,76		0,76	0,76	0,76	0,76	0,76		
a-cas. B			0,8	0,8											0,8
a-cas. A	0,85	0,85		0,85		0,85	0,85		0,85	0,85	0,85	0,85		0,85	
a-cas. A			0,89	0,89											0,89
	C. Buf.	C. Vaca	14	15*	16*	17*	18*	19	20*	21	22	23	24	C. Vaca	C. Buf.
b-casein	0,36	0,36		0,36	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36
a-cas. B	0,48			0,48	0,48	0,48	0,48	0,48			0,48	0,48	0,48		0,48
a-cas. B		0,52		0,52	0,52	0,52	0,52		0,52					0,52	
a-cas. A	0,54			0,54	0,54	0,54	0,54	0,54	0,54		0,54	0,54	0,54		0,54
a-cas. A		0,58		0,58	0,58	0,58	0,58		0,58					0,58	
	C. Buf	C. Vaca	25	26*	27	28	29	30	31*	32*	33*	34	35	C. Vaca	C. Buf.
b-casein	0,54	0,54	0,54	0,54	0,54	0,54	0,54	0,54	0,54	0,54	0,54	0,54	0,54	0,54	0,54
a-cas. B	0,79		0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79		0,79
a-cas. B		0,85		0,85					0,85	0,85	0,85			0,85	
a-cas. A	0,89		0,89	0,89	0,89	0,89	0,89		0,89	0,89	0,89	0,89	0,89		0,89
a-cas. A		0,95		0,95					0,95	0,95	0,95			0,95	

TABELA 4: Mobilidades Relativas (RF) das amostras de mussarela de búfala submetidas ao teste de pureza eletroforética (*continuação*).

	C. Buf	C.Vaca	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46
b-casein	0,29	0,29	0,29	0,29	0,29	0,29	0,29	0,29	0,29	0,29	0,29	0,29	0,29
a-cas. B	0,44		0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44
a-cas. B		0,47											
a-cas. A	0,5		0,5	0,5	0,5	0,5	0,5		0,5	0,5	0,5	0,5	
a-cas. A		0,54											

	C. Buf	C. Vaca	47	48	49	50	C. Vaca	C. Buf
b-casein	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33
a-cas. B	0,47		0,47	0,47	0,47	0,47		0,47
a-cas. B		0,5					0,5	
a-cas. A	0,52		0,52		0,52	0,52		0,52
a-cas. A		0,58					0,58	

* Amostras que apresentaram leite de vaca na composição

Trabalho enviado para a revista Ciência e Tecnologia de Alimentos

Análise microbiológica e caracterização eletroforética do queijo mussarela, elaborado a partir de leite de búfala.

Microbiological analysis and electrophoretic characterization of mozzarella cheese made from buffalo milk.

Kate A BUZI¹; José P A N PINTO¹; Paulo R R RAMOS²; Germano F BIONDI¹

¹Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Botucatu, São Paulo; Caixa Postal 572 – CEP 18618-000

²Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Departamento de Física e Biofísica, Botucatu, São Paulo; Caixa Postal 510 – CEP 18618-000

RESUMO

O presente trabalho visou avaliar a qualidade microbiológica de queijos mussarela elaborados a partir de leite de búfala, adquiridos do comércio varejista, assim como, verificar a sua autenticidade, averiguando a possível presença de leite de vaca no produto. As análises microbiológicas compreenderam em contagem de coliformes totais e *E. coli*, contagem de *Staphylococcus* coagulase-positiva e pesquisa de *Salmonella* spp.; enquanto que, para a determinação da pureza das mussarelas, a técnica utilizada foi a eletroforese em gel de poliácridamida. Com base nos resultados obtidos na avaliação microbiológica, pode-se afirmar que 98% das amostras estão dentro dos padrões microbiológicos legais vigentes, embora algumas delas tenham apresentado valores elevados para coliformes totais, os quais indicam inadequadas condições de higiene durante a fabricação dos queijos. Entretanto, 2% das amostras encontram-se em desacordo com a legislação, uma vez que apresentaram populações de coliformes fecais acima do permitido, como resultado de uma alta contaminação por *E. coli*. Mediante a caracterização eletroforética, detectou-se a presença de leite de vaca em 22% das amostras, adicionado, provavelmente, de forma intencional.

Palavras-chaves: mussarela; búfalo; microbiologia; eletroforese; adulterações.

SUMMARY

This study evaluated the microbiological of mozzarella cheese made from buffalo milk bought in retail outlets and validated their authenticity by checking the product for the possible presence of cow milk. Microbiological analysis included counts of *E. coli*, total coliform, positive coagulase *Staphylococcus*, and *Salmonella* spp. For the determination of mozzarella purity, we used polyacrylamide gel electrophoresis. Based on the results of the microbiological evaluation, we can state that 98% of samples are within the legal microbiological standards, although some have shown high values of total coliforms, which indicates poor conditions and hygiene during cheese manufacture. However 2% of samples showed fecal coliform populations outside the legal limits as a result of a high *E. coli* contamination. Electrophoresis detected cow milk in 22% of the samples which was probably added intentionally.

Keywords: mozzarella; buffalo; microbiology; electrophoresis; adulterations.

1- INTRODUÇÃO

Os búfalos são tradicionalmente considerados como animais de tração e produtores de carne, porém, com a escolha de animais selecionados e a obtenção de melhores níveis de desempenho dos rebanhos, os produtores têm demonstrado um crescente interesse pela produção leiteira, com vistas sobretudo, ao fornecimento de leite para a elaboração de derivados [6].

A maior vantagem do leite bubalino, em relação ao leite de outras espécies, é o teor elevado de proteínas e gorduras, sendo o seu aproveitamento industrial efetivamente extraordinário, chegando comparativamente a sobrepujar o rendimento do leite bovino em mais de 40% [11],[12], [13].

A partir do leite de búfala, pode-se elaborar diversos produtos, como os mais variados tipos de queijos, requeijão, manteiga, iogurte, entre outros. Entretanto, a mussarela é, sem dúvida, o produto principal, sendo a maior parte do leite bubalino destinada à sua fabricação.

A carga microbiana do leite cru é de extrema importância na qualidade final dos produtos lácteos, sendo que é praticamente impossível melhorar as propriedades de um produto derivado, se o número de microrganismos inicialmente presente no leite 'in natura' é elevado [11],[12].

Para que o processo de fabricação atinja o seu ideal, a contagem total de bactérias do leite destinado a fabricação de mussarela, deve estar entre $5,0 \times 10^3$ a $5,0 \times 10^5$ UFC / mL. Se o leite apresentar alta contagem microbiana, além de modificar as características organolépticas como sabor, odor e maciez, poderá também alterar a coagulação da massa e conseqüentemente a textura do queijo, refletindo diretamente no rendimento da produção [2].

Apesar da importância da pasteurização, na Itália, ainda hoje, a mussarela é elaborada a partir do leite cru de búfala com o propósito de não alterar o processo tecnológico, além de garantir as características organolépticas particulares e inerentes ao produto. Pelo fato do nosso sistema de produção seguir o italiano, muitos laticínios brasileiros também trabalham com leite cru.

Para Del Prato [7], a teoria de que o processo de filagem em água quente equivale à pasteurização é errônea, pois durante o processo de filagem as bactérias podem estar protegidas pelas caseínas e pelos glóbulos de gordura, que possuem uma notável capacidade de isolamento térmico.

As flutuações sazonais na disponibilidade do leite de búfala e o preço mais elevado comparado com o leite de vaca, são um incentivo para que os laticínios o adicionem durante a elaboração da mussarela de búfala. Por isso, atualmente, são aplicados diversos métodos laboratoriais a fim de se detectar tal adulteração.

Similarmente como ocorreu na Itália, no Brasil foi criado um selo de pureza. Elaborado pela Associação Brasileira de Criadores de Búfalos (ABCB), este é concedido ao laticínio que, mediante teste de eletroforese, utiliza exclusivamente o leite bubalino em seus produtos [8].

O presente trabalho teve como objetivos avaliar a qualidade microbiológica das mussarelas de búfala distribuídas no comércio varejista, no sentido de verificar a sua inocuidade e averiguar a autenticidade de tais queijos, investigando, através da caracterização eletroforética, a possível adição de leite de vaca ao produto.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

No período de julho a novembro de 2005 foram feitas colheitas de queijos mussarela, elaborados exclusivamente com leite de búfala e comercializados em estabelecimentos varejistas de diferentes cidades do estado de São Paulo. As 50 amostras, em suas embalagens originais, foram acondicionadas em caixas isotérmicas com gelo reciclável, encaminhadas ao Laboratório de Análises Microbiológicas - Inspeção Sanitária de Alimentos de Origem Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e ao Laboratório de Fracionamento de Proteínas - Departamento de Física e Biofísica, do Instituto de Biociências, ambos pertencentes à UNESP/ Botucatu, para que pudessem ser processadas e analisadas.

2.1- Análises microbiológicas

As metodologias aplicadas para as análises microbiológicas foram realizadas segundo disposto na Instrução Normativa SDA nº 62, de 26 de agosto de 2003, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento [4], combinada com a metodologia preconizada por ANDREWS et al. [3]. Para a contagem de coliformes totais e *E. coli*, utilizou-se o Sistema de Placas Petrifilm (3M), seguindo as recomendações do fabricante. Foram preparadas diluições em série (10^{-1} a 10^{-5}) para as contagens de coliformes totais e *Escherichia coli* e de *Staphylococcus* coagulase-positiva, enquanto que para a determinação de *Salmonella* spp., não foram realizadas diluições, sendo a amostra transferida diretamente para o meio de cultivo de pré-enriquecimento.

2.2 - Eletroforese em gel de poliacrilamida

Utilizou-se a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida vertical, alcalina (pH 8,3), em sistema de tampões descontínuos, descrita por Hames & Rickwood [10] com algumas modificações descritas por Ramos [16]. Para a identificação das frações das caseínas, foram preparados géis de separação a 10% e de empilhamento a 4%, conforme descrito nas Tabelas 1 e 2 respectivamente.

No gel, após a sua polimerização, aplicou-se aproximadamente 10 µl de cada amostra e dos controles de vaca e de búfala, os quais foram obtidos no Laboratório de Fracionamento de Proteínas, a partir de mussarelas sabidamente elaboradas com leite de vacas e búfalas, respectivamente.

Fixado em uma cuba vertical, o gel foi ligado a uma fonte elétrica (Pharmacia – Electrophoresis Power Supply – EPS 600), sendo a eletroforese realizada em uma corrente constante de 200 V e amperagem de 10 mA, sob temperatura de refrigeração (4°C), durante aproximadamente 5 horas.

Terminada a corrida eletroforética, o gel foi corado e descorado. Suas imagens foram salvas e digitalizadas através do VDS (Pharmacia Biotech) e através de um software analisador de imagens (Image Master – Pharmacia Biotech), do Departamento de Física e Biofísica, Instituto de Biociências, UNESP – Botucatu/SP, determinou-se a mobilidade eletroforética relativa (RF) de cada banda proteica.

TABELA 1: Componentes do gel de separação a 10% de poliacrilamida para PAGE.

COMPONENTES	QUANTIDADE
Solução A (30% de Acrilamida e 0,8 de Bis-acrilamida)	10 mL
Solução B (Tris 36,3g, HCl(1M) 48 mL, q.sp.100mL, pH 8,8)	3 mL
Persulfato de amônio 10%	200µL
TEMED	11µL
Uréia 6M	16,8 mL

TABELA 2: Componentes do gel de empilhamento a 4% de poliacrilamida para PAGE.

COMPONENTES	QUANTIDADE
Solução A (30% de Acrilamida e 0,8 de Bis-acrilamida)	2,6 mL
Solução B (Tris 6g, HCl(1M) 48 mL, q.sp.100mL, pH 6,8)	5 mL
Riboflavina 0,004%	2,5 µL
Água MilliQ	9,9 mL

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores obtidos nas contagens de coliformes totais e *Escherichia coli* das amostras de mussarela de búfala se encontram na Tabela 3.

TABELA 3: Distribuição de 50 amostras de mussarela de búfala analisadas de acordo com os valores referentes às contagens de coliformes totais e *E. coli*.

Faixa de contagem em UFC/g* amostra	Coliformes totais		<i>E. coli</i>	
	nº	%	nº	%
0 -1 10 ¹	37	74	48	96
10 ¹ -1 10 ²	-	-	-	-
10 ² -1 10 ³	5	10	-	-
10 ³ -1 10 ⁴	4	8	1	2
10 ⁴ -1 10 ⁵	2	4	1	2
10 ⁵ -1 10 ⁶	2	4	-	-
TOTAL	50	100	50	100

* UFC/g: Unidade Formadora de Colônia/grama

No que se refere aos coliformes totais, observa-se que grande parte dos queijos analisados (74%) apresentou contagens menores que 10^1 UFC/g. Entretanto, foram obtidos resultados elevados, indicando provavelmente as inadequadas condições de higiene durante o processo de elaboração dos mesmos. Deve-se ressaltar que os valores encontrados na faixa de contagem entre 10^5 e 10^6 UFC/g correspondem às amostras contidas em embalagens com soro, o qual pode ter favorecido o crescimento dos microrganismos em função da sua atividade de água (A_w), considerada como um fator importante na multiplicação bacteriana.

Ao analisarem mussarelas elaboradas com leite cru de búfala, Silva et al. [18] verificaram que apesar do processo de filagem ter sido eficiente, permitindo a sobrevivência de apenas 0,04% de coliformes totais, a população média presente na massa pós-filagem ainda foi considerada alta ($3,49 \times 10^3$ NMP/g).

Apesar da legislação brasileira (Resolução RDC nº 12 de 02/01/01)[1] não estabelecer limites de tolerância para os coliformes totais, torna-se necessária a sua contagem por serem indicadores das condições de higiene, já que uma vez presentes no leite cru, geralmente são destruídos pelo processo de pasteurização. Altas contagens deste grupo podem significar contaminação pós-processamento, limpeza e sanitização deficientes ou tratamentos térmicos ineficientes [9].

Com relação aos coliformes fecais, o limite estabelecido pela Resolução RDC nº 12 de 02/01/01 para mussarela, é de 5×10^3 UFC/g. Considerado indicativo das condições higiênico-sanitárias, este grupo está relacionado com contaminação fecal de animais de sangue quente, inclusive o homem, mas pode originar-se também da deficiente sanitização das superfícies de trabalho na planta de processamento [18].

A ocorrência de *Escherichia coli*, principal representante deste grupo, é a mais indicada para comprovar a contaminação fecal, uma vez que tem como habitat exclusivo o trato intestinal do homem e animais. A importância da presença dessa bactéria no alimento, está na patogenicidade de algumas cepas e na possibilidade de haver outros microrganismos patogênicos, representando assim, um risco em potencial para a saúde dos consumidores.

Quanto aos valores da Tabela 3 referentes à contagem de *E. coli*, observa-se que apesar da maior parte das amostras ter apresentado populações menores que 10^1 UFC/g, 4% apresentaram valores entre 10^3 e 10^5 UFC/g. Entretanto, pode-se afirmar que apenas 2% delas encontram-se em desacordo com a legislação, uma vez que as contagens desse microrganismo ultrapassaram os valores permitidos para coliformes fecais. Cortesi et al. [5] ao analisarem mussarelas elaboradas com leite cru de búfala, armazenada sob refrigeração (6°C) por 7 dias em salmoura, não encontraram *E. coli*.

Olivieri [15] ao comparar duas marcas diferentes de mussarela de búfala preparadas com leite pasteurizado, verificou que todos os valores referentes a coliformes fecais estiveram abaixo do estabelecido pela legislação, entretanto, resultados acima de 10^2 UFC/g foram encontrados em 27,8% das amostras da marca A (com soro) e em 8,3% das amostras da marca B (sem soro).

Quanto aos resultados referentes à contagem de *Staphylococcus coagulase-positiva*, em todas as amostras, os valores obtidos estiveram abaixo de 10^2 UFC/g, enquadrando-se, portanto, no padrão microbiológico para mussarela estabelecido pela Resolução RDC nº 12 02/01/01, que tolera uma contagem de até 10^3 UFC/g para esse microrganismo. Resultados semelhantes foram obtidos por Olivieri [15] que

apresentaram somente contagens menores que 10^2 UFC/g para *Staphylococcus* coagulase-positiva neste tipo de queijo.

Embora os resultados obtidos por Silva et al. [18] tenham mostrado o potencial microbiocida da filagem, em 11% das amostras houve presença de *Staphylococcus* coagulase-positiva; entretanto, 50% delas eram negativas antes do processo tecnológico, indicando uma provável contaminação pelo manipulador.

No trabalho apresentado por Nicolau et al. [14] que objetivou investigar a origem (humana ou bovina) das linhagens de *S. aureus* isoladas de amostras de queijo tipo mussarela, 62,1% eram de origem humana, evidenciando a participação dos manipuladores na contaminação, desde a origem da matéria prima até a obtenção do produto final.

De acordo com os resultados da pesquisa de *Salmonella* spp., todas as amostras analisadas foram negativas, estando em conformidade com a Resolução RDC nº 12 02/01/01, a qual determina a ausência deste microrganismo em 25 g do produto analisado. Coincidentemente, nos trabalhos relatados por Olivieri [15] e Silva et al. [18] todas as amostras de mussarela de búfala analisadas, mostraram-se negativas para *Salmonella* spp.

Com base nos resultados obtidos, pode-se afirmar que as amostras analisadas apresentaram, em geral, uma boa qualidade microbiológica, em relação aos microrganismos estudados. A contaminação, quando observada, provavelmente teve origem nas etapas pós-pasteurização, já que todas as amostras eram provenientes de estabelecimentos sob inspeção oficial (federal ou estadual), que exige que a elaboração de qualquer derivado lácteo seja realizada a partir de leite pasteurizado.

Assim, considera-se que a não observância de alguns padrões microbiológicos em algumas amostras tenha sido oriunda de condições inadequadas de higiene durante a elaboração de tais queijos, que permitiram a recontaminação do produto após a etapa de pasteurização do leite. Esta recontaminação, provavelmente, foi atenuada pelo efeito microbiocida da filagem, que apesar de não ser suficiente para garantir um padrão de qualidade microbiológica, auxiliou na redução dos microrganismos, como já verificado por outros autores [18].

Quanto à pureza das mussarelas de búfala, através da eletroforese em gel de poliacrilamida, observou-se a diferença de mobilidade das frações homólogas das caseínas de origem bovina e bubalina. Baseado nos resultados referentes às mobilidades relativas (RF) de cada banda, comprovou-se a presença do leite de vaca em 22% das amostras analisadas. Com exceção de apenas uma, todas essas amostras indicavam no rótulo, o leite de búfala como única matéria-prima utilizada.

Verificou-se ainda que aquelas amostras que apresentavam o selo de pureza impresso na embalagem continham apenas leite bubalino na sua composição, comprovando assim, a sua veracidade.

De acordo com as Normas Técnicas Especiais Relativas a Alimentos e Bebidas [17] a mussarela é o queijo de massa filada, não prensada, obtido a partir de leite de vaca, de cabra, de ovelha, de búfala, ou com qualquer combinação de dois ou mais destes leites. Por não existir nenhuma legislação referente ao uso exclusivo de leite de búfala para a fabricação dessa mussarela, é permitida a adição do leite de vaca ao produto.

Entretanto, tal informação deve estar contida no rótulo, caso contrário, constitui-se numa fraude.

4 – CONCLUSÕES

A maior parte (98%) das amostras de mussarela de búfala analisadas está em conformidade com os padrões microbiológicos legais vigentes.

Uma parcela destas amostras apresentou resultados elevados para coliformes totais, indicando provavelmente, inadequadas condições de higiene durante o seu processo de fabricação.

As amostras que encontram-se em desacordo com a legislação vigente por terem apresentado populações elevadas de coliformes fecais, tiveram ainda altas contagens de *E. coli*, evidenciando a contaminação fecal do alimento, tornando-o um risco em potencial, pela possibilidade de conter outros agentes patogênicos.

Medidas mais efetivas de higiene devem ser implantadas desde a obtenção do leite até as diferentes fases de elaboração dos queijos, como forma de poder oferecer aos consumidores, produtos com melhor qualidade e segurança.

Uma considerável porcentagem (22%) das amostras de mussarela mostraram em sua composição a presença do leite de vaca, sugerindo uma adição de forma intencional. Tal fato pode ter ocorrido durante a fase de elaboração do produto ou durante o fornecimento do leite.

5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Resolução RDC nº12 de 02 de janeiro de 2001**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>> . Acesso em: 05 abr. 2005.

[2] AMANTE, L.; DE ROSA, C.; FAZANO, L.; BANCHELLI, L.; MEDEA, D.; DE PALO, R. Valutazione dei puti critici della mungitura in aziende di bufale di pianura e di colina del basso Lazio. In: CONGRESSO NAZIONALE SULL'ALLEVAMENTO DEL BÚFALE,1; 2001, Salerno. **Annali...** Salerno, 2001. p. 251-255.

[3] ANDREWS, W.H.; JUNE, G., SHERROD, P.S.; HAMMACK, T.S.; AMAGUANA, R.M. *Salmonella*. In: FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - **Bacteriological Analytical Manual**: Revision A Gaithersburg: AOAC INTERNATIONAL, 1998. 8th edition. p. 5.01- 5.20

[4] BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa SDA 62, de 26 de agosto de 2003. **Métodos microbiológicos para análise de alimentos de origem animal e água**. Brasília. 2003. 265p. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 21 abr. 2004.

[5] CORTESI, M.L.; CITRO, A.; SARLI, T.; SANTORO, A.; MURRU, N.; PEPE, T.; DELL'ORFANO, G. Behaviour of *Salmonella senftenberg* during manufacture of buffalo mozzarella cheese: preliminary researchs. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 5., 1997, Caserta. **Proceedings...** Caserta, 1997. p.266-271.

- [6] CUNHA NETO, O.C.; OLIVEIRA, C.A.F. Aspectos da qualidade microbiológica do leite de búfala. **Higiene Alimentar**, v.17, n.110, p. 18-23, 2003.
- [7] DEL PRATO, O.S. **Tratado di tecnologia casearia**. Bologna: s.n., 1998. 1070p.
- [8] GLASS, V. Pureza garantida. **Revista Globo Rural**. Disponível em: <<http://globo rural.globo.com/barra.asp.d=/edic/191/rep.bufalaa.htm>>. Acesso em: 15 mar. 2006.
- [9] GUERREIRO, M.G. **Bacteriologia especial: com interesse à saúde pública**. Porto Alegre: Sulina, 1984.
- [10] HAMES, B.D.; RICKWOOD, D. **Electrophoresis of proteins**. 2ª edition. New York, 1990. 383 p.
- [11] HÜNH, S.; LOURENÇO JUNIOR, J.B.; MOURA CARVALHO, L.O. **Características do leite de búfalas da raça Mediterrâneo e mestiço Murrah-Mediterrâneo**. Belém: EMBRAPA-CPATU, 1980.
- [12] HÜNH, S.; FERREIRO, L.; MOURA CARVALHO, L.O. **Estudo comparativo da composição química do leite de zebuínos e bubalinos**. Belém: EMBRAPA-CPATU, 1982.
- [13] NADER FILHO, A. Estudo da variação do ponto crioscópico do leite de búfala. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.39, n.234, 1984.
- [14] NICOLAU, E.S.; MESQUITA, A.J.; BORGES, G.T.; KUAYE, A.Y. *Staphylococcus aureus* no processamento de queijo mussarela: detecção e avaliação da provável origem das linhagens isoladas. **Higiene Alimentar**, v.18, n.125, p. 51-56, 2004.
- [15] OLIVIERI, D.A. **Avaliação da qualidade microbiológica de amostras de mercado de queijo mussarela, elaborado a partir de leite de búfala (*Bubalus bubalis*)**. Piracicaba, 2004, 61p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- [16] RAMOS, P.R.R. **Polimorfismo bioquímico de proteínas séricas do leite de vaca da raça holandês, puras por cruzamento, variedade malhada de preto**. Botucatu, 1992, 131p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu.
- [17] SÃO PAULO (Estado). **Código sanitário**: decreto nº 12.342, de 27 de setembro de 1978: regulamento da promoção, preservação e recuperação da saúde no campo de competência da Secretaria de Estado da Saúde (revisto e atualizado até dezembro de 1990). 5 ed. São Paulo: Imprensa Oficial do Estado, 1992. p.145-343.
- [18] SILVA, E.O.T.R.; PANETTA, J.C.; ISHIZUKA, M.M. Efeito microbiocida da fase da filagem, durante a fabricação de mozzarella elaborada com leite cru de búfala. **Higiene Alimentar**, v. 13, n.59, p.28-34, 1999.

6 – AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado concedida ao primeiro autor.