

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS JABOTICABAL**

ADULTERAÇÃO DE QUEIJOS PRODUZIDOS COM LEITE DE BÚFALA

Fernanda Carolina Barbosa

Jaboticabal - SP
1º Semestre/2024

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS JABOTICABAL**

ADULTERAÇÃO DE QUEIJOS PRODUZIDOS COM LEITE DE BÚFALA

Fernanda Carolina Barbosa

Orientador: Prof. Dr. Humberto Tonhati
Coorientadores: Dr. Aníbal Eugênio Vercesi Filho
Laura Zuliani

Trabalho de Conclusão de Curso (Iniciação Científica)
apresentado à Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte
das exigências para graduação em Zootecnia.

Jaboticabal - SP
1º Semestre/202

B238a Barbosa, Fernanda Carolina
 Adulteração de queijos produzidos com leite de búfala / Fernanda
 Carolina Barbosa. -- Jaboticabal, 2024
 36 p. : tabs.

 Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Zootecnia) -
 Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências
 Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
 Orientador: Humberto Tonhati
 Coorientador: Anibal Eugênio Vercesi Filho

 1. bubalinocultura. 2. fraudes na fabricação de mozzarella. 3. caseína
 A2. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

FERNANDA CAROLINA BARBOSA

ADULTERAÇÃO DE QUEIJOS PRODUZIDOS COM LEITE DE BÚFALA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, para obtenção do título de Bacharel em Zootecnia.

Orientador: Prof. Dr. Humberto Tonhati

Coorientador: Dr. Aníbal Eugênio Vercesi Filho e Laura Zuliani


Área de Concentração: Zootecnia

Data da defesa: 03/07/2024

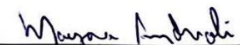
Aprovado

Reprovado

Banca Examinadora:


Prof. Dr. Humberto Tonhati

UNESP – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus de Jaboticabal



Me. Mayara Adrioli

UNESP – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus de Jaboticabal


Profa. Dra. Almy Cristina Sant'Anna

UNESP – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus de Jaboticabal

10/07/2024
Aprovado em reunião do Conselho do Departamento em:


Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte
Chefe do Departamento

DEDICATÓRIA

“ Não fui eu que ordenei a você?

Seja forte e corajoso!

Não se apavore nem desanime,

pois o Senhor, o seu Deus,

estará com você por onde você andar.” - Josué 1:9

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela oportunidade de estar aqui, pela sabedoria e força concedidas para superar todos os obstáculos ao longo desta jornada.

À minha família, que não mediu esforços para me apoiar, sempre presente e apoiando minhas decisões; que me fortaleceu nos momentos mais difíceis e que estiveram ao meu lado em toda essa caminhada.

Ao meu orientador, Humberto Tonhati, por sua orientação constante, sendo uma inspiração tanto como profissional quanto como ser humano.

À Unesp FCAV, por me proporcionar tantas experiências enriquecedoras e ampliar meus horizontes.

Ao meu coorientador Aníbal Eugênio Vercesi Filho e sua equipe, pela paciência e apoio durante as análises e pela calorosa recepção no IZ de Nova Odessa.

À minha coorientadora e companheira [Laura Zuliani](#) por todo apoio, ajuda e paciência durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus companheiros de graduação, Extraviada, Namaria e Lucas, pela amizade e suporte durante todo o período acadêmico.

A todos, meu sincero obrigado por todo carinho e suporte ao longo dessa jornada.

SIGLAS E DEFINIÇÕES

SIGLA	DEFINIÇÃO
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
μL	Micro litro (milésima parte de um mililitro)
mL	Mililitro (milésima parte de um litro)
EQ-nº	Número de identificação do equipamento
PCR	Proteína C reativa - reação em cadeia da polimerase

SUMÁRIO

Siglas e Definições	6
1. INTRODUÇÃO.....	8
2. REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1. Bubalinocultura no Brasil.....	10
2.4 Características do leite de vaca e de búfala	11
2.5 Possíveis fraudes na fabricação da Mozzarella	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1. Local e período do experimento.....	17
3.2 Amostras e análise de pureza	17
4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	19
5. RESULTADOS	21
6. DISCUSSÃO.....	24
7. CONCLUSÃO.....	27
8.RESUMO.....	28
9. ABSTRACT.....	29
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

1. INTRODUÇÃO

Os búfalos representam 11% da produção global de leite, com uma população mundial de 201,1 milhões (FAO, 2018). A maior parte dessa população, cerca de 96,9%, está concentrada no continente asiático, abrangendo países como Índia, Paquistão e China. Na Índia, especificamente, os búfalos são responsáveis por 57% da produção de leite (Cavali; Pereira , 2020).

O Brasil detém o maior rebanho de búfalos no mundo ocidental, totalizando 1,4 milhão de animais. Sua distribuição por região é 65,93% na região Norte; 13,23% na região Sudeste; 9,59% na região Nordeste; 7,59% na região Sul e o Centro-Oeste com 3,73%, conforme dados da Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne em 2018. O estado do Pará se destaca como o principal detentor desse rebanho, com mais de 600 mil animais, seguido pelo Amapá, que possui 300 mil cabeças de búfalos. Juntos, os rebanhos desses dois estados correspondem a 85% do total da região Norte do país (Cavali; Pereira , 2020)

Segundo a legislação brasileira, o leite é definido como o produto proveniente de ordenha completa, ininterrupta, em condições higiênicas, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. Para o leite de outras espécies, é obrigatório utilizar a denominação correspondente à espécie animal. É permitida a mistura de leite de diferentes espécies, desde que isso seja explicitamente indicado na denominação de venda do produto e que a porcentagem de leite de cada espécie seja informada na rotulagem (Brasil, 2017).

No leite de búfala, por se tratar de um produto disponível em pequenas quantidades em vários países do mundo, fraudes e adulterações por adição de matérias-primas com maior disponibilidade e/ ou custo mais baixo, são constantemente relatadas (Drummond, 2013), podendo comprometer a saúde do consumidor pela ingestão de compostos não relatados no rótulo do produto (Dias, 2009) como a beta-caseína A1, por exemplo. Sendo assim, a detecção da adulteração de forma mais rápida e eficiente é fundamental para que se garanta a autenticidade, evitando fraudes quanto aos produtos comercializados.

O leite de búfala apresenta distinções dos demais animais devido às características nutricionais que possui, ele apresenta em sua composição maior concentração de proteínas e lipídios, que garantem um maior rendimento de fabricação (Verruma, 1994; Silva et al., 2003), além de ser mais rico em vitaminas, sais minerais, e gorduras (Tonhati et al., 2000); possui coloração mais branca e sabor mais adocicado (Tonhati et al., 2000). Todos esses fatores o tornam diferente e interessante do ponto de vista comercial, exibindo um maior rendimento na produção de derivados quando comparado ao leite bovino (Bernardes, 2010).

Apesar de apresentar variações entre raças, tipo de alimentação, diferentes épocas de lactação, e possuindo apenas a beta-caseína A2, o leite de búfala apresenta melhores resultados quando comparados com o leite de vaca, e cerca de 40-50% mais produtivo na elaboração de derivados (Silva et al., 2003).

Os produtos fabricados a partir desse leite são voltados principalmente para a produção de queijos, com destaque para Mozzarella, o mais fabricado e consumido no Brasil, além de produzir também outros produtos como requeijão, manteiga, iogurte e doce de leite. Seu maior teor de cálcio e vitaminas, deixam o queijo mais suave, o que agrada o consumidor e fazem com que o valor pago pelo litro de leite de búfala chegue a ser até duas vezes maior que o valor do leite de vaca (Buzi et al., 2009).

Após 13 anos de procedimentos burocráticos e logísticos a ABCB criou em 2013 o selo de pureza “100% búfalo” visando certificar os laticínios que comercializam produtos com leite de búfala com a finalidade de garantir ao consumidor final a qualidade e procedência do produto, bem como, auxiliar às empresas certificadas na publicidade e fortalecimento deste mercado (Selo da Búfala, 2018).

Para identificação de adulterações de misturas de leite em queijos são utilizadas técnicas para baseadas na análise das diferentes proteínas do leite, caseínas e proteínas do soro, como a eletroforese, imunologia, cromatografia e espectroscopia de infravermelho, que identificam a diferença entre os produtos e quantificam a mistura (Feligini et al., 2005).

A técnica utilizada no estudo é baseada no método PCR geralmente utilizado para a detecção e diferenciação de espécies devido a sua alta especificidade, sensibilidade e velocidade, que foi desenvolvida por Reale, Campanella, Merigioli e Pilla (2008) e seguindo as modificações recomendadas por Giglioti et al. (2020).

Assim, esse estudo objetivou identificar as possíveis adições de leite bovino em queijos comercializados como sendo de origem exclusivamente bubalina, utilizando técnicas de extração de DNA comparando diferentes períodos de safra e entressafra.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Bubalinocultura no Brasil

Os bubalinos possuem origem Asiática, mais tarde sendo introduzidos na África, Europa, Oceania e, por último, no continente americano, e atualmente são encontrados em todos os continentes (Borghese; Mazzi; 2005).

A população global de búfalos é estimada em cerca de 204 milhões de animais, conforme dados da FAO em 2022. Nos últimos anos, houve um notável crescimento nesse número, com destaque para o Brasil, que detém atualmente o maior rebanho de búfalos no mundo ocidental, totalizando 1,4 milhão de cabeças, conforme o IBGE em 2022. Esses animais estão distribuídos por todas as regiões do país, com maior concentração no Norte (65,93%), seguido pelo Sudeste (13,23%), Nordeste (9,59%), Sul (7,59%), e Centro-Oeste (3,73%). (ABIEC, 2018).

Os búfalos estão presentes em todos os continentes por apresentar boa adaptabilidade, fácil manejo de alimentação, rusticidade, resistência, docilidade, longevidade, precocidade, prolificidade e conversão alimentar eficiente (Jorge et al., 2011). Uma evidência da adaptabilidade do búfalo no Brasil são as condições de manejo e ambiente totalmente diferentes em cada região do país (Zava, 1984). São animais de tripla aptidão, sendo utilizados para produção de leite e derivados, carne e trabalho (Pereira, 2007).

Esses animais chegaram ao Brasil na década de 1880 no Estado do Pará, e entre os anos de 1919 e 1920 ocorreram as importações de búfalos em diferentes regiões como Minas Gerais, Amazonas, Nordeste e Sul (Marques, 1998).

A produção com fim comercial só se iniciou em 1973, quando o pecuarista Wanderley Bernardes, dono de uma fazenda que fica localizada no Vale do Ribeira em

São Paulo, iniciou sua pequena produção com cerca de 117 fêmeas de diferentes categorias, mestiças e das raças Mediterrânea e Murrah. Essas fêmeas foram cruzadas com machos da raça Murrah, em um total de 37 touros. Entre 1973 e 2013, produziu 3.487 crias (Dantas, et al, 2020). A partir das reproduções desses animais surgiram grande parte da população bubalina do centro-sul e sudeste do Brasil, principalmente de Minas Gerais e São Paulo (Zava, 2011).

Entre os estados do Brasil com maior número de animais produtores, o Pará se encontra em primeiro, com 644.672, seguido do Amapá (312.355) e São Paulo (122.766) (IBGE, 2022). Esses resultados demonstram o real potencial de produção da bubalinocultura no Brasil, sendo uma atividade econômica rentável para pequenos e médios produtores, que utilizam os produtos derivados de búfalos para comercialização (Vieira et al, 2009).

2.4 Características do leite de vaca e de búfala

O leite produzido pelas búfalas possui características peculiares quando comparados com outros, com destaque para o sabor característico adocicado e cor mais branca devido a vitamina A na sua forma natural e menores percentuais de beta-caroteno em sua composição lipídica, que é o causador e responsável pela cor amarelada dos demais leites de mamíferos (Ganguli, 1979).

Alguns nutrientes encontrados no leite de búfala são importantes para a saúde humana, como a prevenção de futuras doenças. O cálcio e o fósforo em maior porcentagem, ajudam na atuação dos dentes e nos ossos (Harper, 1971; Huhn et al., 1991). A vitamina A é necessária para um crescimento normal, manutenção do tecido epitelial, resistência a certas infecções e uma boa visão. A falta desta vitamina produz cegueira noturna (baixa adaptação à escuridão).

A gordura é o constituinte do leite que apresenta maior valor econômico, ela contribui para seu sabor característico e melhoria da textura. A partir do ponto de vista nutricional, os lipídios do leite de búfalas possuem níveis altos de ácidos graxos essenciais ao organismo, sendo a proporção de ácido graxo saturado/ polinsaturado considerada nutricionalmente correta (Zoccal, et al., 2008; Guo, et al., 2004)

Quando comparado ao leite bovino apresenta vantagens nutricionais, como maiores teores de gordura, proteína, cálcio, fósforo e sólidos totais (Tabela 1) (Oliveira et al., 2009; Silva e Ribeiro, 2021), além do rendimento do leite bubalino em mais de 40%, favorecendo o produtor, causando uma melhor remuneração quando comparado ao leite de vaca (Hunh et al, 1982; Nader Filho et al, 1984). Também possui uma maior concentração, apresentando menos água e mais matéria seca, o que o tornou mais utilizado na fabricação de produtos lácteos (Dubey et al, 1997; Macedo et al., 2001).

A partir da tabela é possível perceber que o leite de búfala é cerca de 40-50% mais produtivo na elaboração de derivados (Silva et al., 2003). Possui 33% menos colesterol, 48% mais proteína, 59% mais cálcio e 47% mais fósforo (Marques, 1998). A FAO reconheceu a importância do leite da búfala devido a superioridade da composição química em relação ao de vaca (FAO, 2022).

Tabela 1 - Análise láctea comparativa entre os leites de vaca e búfala

Vaca	Búfala
Cálcio: 1,30%	Cálcio: 1,30%
Ferro: 37 ppm*	Ferro: 61 ppm*
Gordura: 3,68%	Gordura: 8,16%
Proteínas: 3,7%	Proteínas: 4,5%
Sólidos Totais: 12%	Sólidos Totais: 17%
Fósforo: 82 mg	Fósforo: 120 mg
Vitamina A: 185,49 UI**	Vitamina A: 204,27 UI**
Calorias por 100 ml: 62,83	Calorias por 100 ml: 104,29

Fonte: Adaptado de Verruma e Salgado (1994)

Em estudos comparativos com o leite bovinos, foram obtidos resultados que demonstram superioridade no leite bubalino, com um maior teor de cálcio (1,99 g/kg x

1,17 g/kg de vaca) e magnésio (0,18 g/kg x 0,11 g/kg de vaca). O leite de búfala é 1,5 a 1,9 vezes mais calórico que o leite bovino, com concentração total menor de colesterol dessas espécies (275 mg x 330 mg em vacas por cada 100 g de gordura (De Franciscis et al, 1994).

Ao analisarem a composição dos aminoácidos, foi verificado que o leite de búfalas apresenta 25,5% de aminoácidos essenciais que o leite de vacas, de acordo com Verruma e Salgado (1994). O pH do leite de bubalinas apresenta-se, dentro das medidas esperadas de higienização, como ideal para a absorção intestinal, ficando entre 6,55 e 6,70 (Neves, 2002). A acidez varia entre 14 - 20°D, o que se deve ao elevado teor de proteínas, em especial a caseína (Cunha Neto, 2003).

O leite possui diversas proteínas e elas são divididas em proteínas do soro do leite (alfa-lactalbumina e beta-lactoglobulina) (Zohreh et al., 2015) e proteínas caseínas, como: alfa s1, alfa s2, kappa e beta-caseína (CSN2) (Sulimova et al., 2007; Jaiswal et al., 2014). As beta-caseínas chegam a 30% das proteínas totais, o que as torna o maior grupo de proteínas (Kminski et al., 2007; Haq et al., 2013; Keaating et al., 2008;). Existem ainda, as variantes genéticas da CSN2, sendo a A1 e a A2 as mais comumente encontradas e estudadas entre as diferentes raças. (Haq et al., 2013).

A caseína compõe cerca de 80% das proteínas do leite. No de búfala ocorre a presença de 100% da beta caseína A2, não possuindo a A1 (Boro et al., 2018). A beta-caseína é uma molécula que possui 209 aminoácidos, que é traduzida pelo gene CNS2, no qual as variantes mais comuns são A1 e A2 (Jaiswal et al., 2014).

O leite de búfala torna-se superior aos demais devido à possibilidade de ingestão por pessoas alérgicas ao leite de vaca, considerando que ele não possui a beta-caseína A1 em sua composição, componente que é indicado como o causador das alergias ao leite bovino, que possui tanto a beta-caseína A1 quanto a A2 (Mishra, 2009).

O alelo A2 geneticamente é associado ao aumento da produção de leite e diminuição de gordura (Olenski et al, 2010). A existência da beta-caseína A2 na composição do leite serve como alternativa para pessoas que possuem alergia ao leite de vaca, que possui a beta-caseína A1, geralmente responsável por inflamações e digestão dificultada em algumas pessoas causando desordens gastrintestinais devido a presença da betacasomorfina-7 (Ho et al., 2014).

Jiaqin et al., (2016) conduziu um experimento, onde 45 adultos intolerantes à lactose foram divididos em dois grupos, no qual um grupo consumiria apenas “leite A2” e o outro consequentemente “leite A1”. Os participantes que consumiram leite A1 relataram que houve maior desconforto e mais trânsito gastrointestinal, enquanto os que consumiram leite A2 não sentiram diferença durante o consumo. Além disso, após a mudança do leite A1 para o A2, houve uma diminuição de 20% na inflamação do intestino delgado. Com isso, pressupõe-se que a beta-caseína A1 reduz as atividades da lactase e agrava os desconfortos gastrointestinais (He et al., 2017). Outro estudo comparando o leite A1 com o A2 foi feito em atletas e mostrou que o consumo de leite de A2 pode ajudar na recuperação muscular pós treino (Kirk et al., 2017).

Em relação aos derivados, a quantidade de gordura influencia no rendimento dos produtos: 14L de leite de búfala produzem 1 kg de manteiga, enquanto o leite bovino é necessário aproximadamente 22L. Além da *mozzarella*, onde são necessários 5L para produzir 1 kg de *mozzarella* de búfala, enquanto leite de vaca são necessários 10L para produção de 1 kg de *mozzarella* (Cavalli e Pereira, 2010).

Um problema recorrente relacionado ao setor é a estacionalidade reprodutiva dos bubalinos que, em algumas latitudes, faz com que haja uma concentração de partos em determinada época do ano, dificultando a disponibilidade de leite para a indústria de forma regular ao longo dos meses.

2.5 Possíveis fraudes na fabricação da *Mozzarella*

A *mozzarella* é um queijo de origem italiana, onde a receita original é feita com leite de búfala. É um produto natural, sem aditivos e com alto teor de umidade, muito diferente daquela produzida com leite de vaca, denominada *Fiore de Late*, na Itália (Mozzarella, 2020). No Brasil é também chamado de muçarela ou *mozzarella* e se tornou popular a partir do leite de vaca, isso faz com que os tipos de produtos lácteos derivados dos dois tipos de leite sejam bem diferentes um do outro (Madella-Oliveira et al., 2005; Rodrigues et al., 2012; Bernardes, 2013).

Em decorrência da fácil fabricação e rendimento do queijo *mozzarella*, além da grande aceitabilidade no mercado e alto valor agregado, houve estímulo para o aumento

em sua produção e, conseqüentemente, de sua importância para a indústria brasileira (Buzi; Pinto, 2009).

A *mozzarella* pode ser comercializada de diferentes formas, como as tradicionais bolas, tiras, fatias, tranças e outros. Também pode ser encontrada em embalagens plásticas a vácuo, líquido de conserva (sal e ácido cítrico), sendo possível aumentar a meia vida do produto (Kosikowski, 1979).

Diversas reportagens relatam a situação da “pirataria” no mercado varejista. A revista Dinheiro Rural, de 11 de junho de 2008 apresenta reportagem com título “A *mozzarella* contra – ataca” mencionando que há no mercado queijos com 80% de leite de vaca sendo vendidos como *mozzarella* de búfala. Um dos principais motivos que incentivam a fraude ao produto é a menor disponibilidade da matéria-prima, consequência da sazonalidade de produção, e o maior valor agregado se comparado ao leite de vaca (Amaral; Escrivão, 2005; Bernardes, 2007; Buzi et al., 2009; Vieira et al., 2009; ABCB, 2010; Souza, 2010; Dalsecco, 2013; Pignata, 2013; Souza, 2015).

No mercado varejista o valor pago em média pelo quilo da *mozzarella* de vaca é de aproximadamente R\$50,92 e o da *mozzarella* de búfala R\$90,00 (Pão de Açúcar, 2020), provocando um estímulo a fraude dos produtos pelas indústrias, aumentando o volume produzido devido a mistura dos leites (Verruma e Salgado, 1994; Bastianetto, 2005; Teixeira et al., 2005).

Embora haja grande comercialização de produtos bubalinos no mercado, a legislação brasileira ainda não possui um método oficial válido para detecção de fraude em produtos dessa origem, bem como, de outras espécies com adição de leite bovino.

Um dos objetivos dos métodos utilizados para avaliar a autenticidade de alimentos é identificar a individualidade de cada espécie na elaboração de produtos lácteos. As proteínas têm sido amplamente utilizadas como marcadores por meio de técnicas bem estabelecidas e validadas (Guerreiro, 2013).

Devido a grande variedade de produtos lácteos com diferentes características microbiológicas e bioquímicas, vindas do leite de diferentes espécies e aos fatores que podem afetar o processo de maturação dos queijos, são citados na literatura vários métodos como, eletroforese, imunologia, cromatologia e espectroscopia de infravermelho, que identificam a diferença entre eles e mensuram a quantidade da mistura

de maneira confiável, através da caseína que apresentam diferenças entre cada espécie, podendo ser dividida em quatro grupos: α , β , γ , κ (Veloso et al., 20004; Mayer, 2005).

A técnica de PCR (Polymerase chain Reaction ou Reação em cadeia da polimerase) é baseada na análise de DNA, ampliando fragmentos de DNA mitocondrial de células somáticas, leucócitos, células mamárias e β - caseína. A extração de DNA de produtos lácteos processados é feita através de primers (Oligonucleicos específicos), codificando a sequência do gene desejado, amplificando e identificando através da eletroforese, essa técnica apresenta sensibilidade alta, no nível de 0,5% de mistura de espécies, podendo chegar a 0,1% de limite de detecção (Feligini et al., 2005).

Os métodos de PCR utilizando DNA mitocondrial como alvo específico para detecção de DNA bovino em produtos lácteos de búfalas, cabras e ovelhas têm sido frequentemente estudados (Mafra, Ferreira, Faria, & Oliveira, 2007; Feligini et al., 2005; Cottenet, Blacpain, & Golay, 2011).

Sendo assim, as técnicas empregadas para detecção de adulteração de queijos e produtos lácteos são confiáveis na função de separação, identificação e quantificação das proteínas do leite de diferentes espécies (Fontenele, 2013)

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Local e período do experimento

O experimento foi conduzido na Universidade Estadual Paulista - UNESP, no campus de Jaboticabal/SP em parceria com o Instituto de Zootecnia na cidade de Nova Odessa/SP. A coleta das amostras de queijos comercializados como oriundas da espécie bubalina foi realizada no ano de 2023 em diferentes localidades e estabelecimentos comerciais do estado de São Paulo. As análises químicas e físicas dos queijos foram conduzidas no Instituto de Zootecnia de Nova Odessa/SP.

3.2 Amostras e análise de pureza

Para esse estudo foram utilizadas 76 amostras de queijo elaborado com leite de búfala, colhidas de janeiro a outubro de 2023 de diferentes marcas existentes no mercado.

O efeito das estações foi definido ao longo dos meses do ano como: Outono (20 de março a 21 de junho), Inverno (21 de junho a 23 de setembro), Primavera (23 de setembro a 22 de dezembro) e Verão (22 de dezembro a 20 de março) (INMETRO, 2023), e subdivididos em dois períodos para análise: safra e entressafra.

O período de safra representa a época de alta produção, sendo de Abril a Junho, enquanto o período de entressafra vai de Julho a Março.

Os produtos lácteos observados foram de 24 marcas diferentes, elaboradas somente com leite bubalino, baseando-se na data de fabricação de cada produto. Sendo que quatro marcas recebem o “Selo de Pureza” da Associação Brasileira de Criadores de Búfalos. Os queijos utilizados para o experimento eram do tipo *mozzarella*, *burrata*, *ricota*, *requeijão*, *minas* e *coalho*.

Cada produto foi analisado individualmente, desde a rotulagem, conferindo os requisitos obrigatórios de presença em produtos embalados de origem animal, de acordo com a RDC no 259, 23 de setembro de 2002, 7 em relação a rotulagem de alimentos embalados: denominação de venda, marca do produto, lista de ingredientes, conteúdo líquido, identificação de origem, identificação do lote, data de validade; até a extração do DNA.

O método utilizado foi desenvolvido por Reale et al., (2008), seguindo as modificações recomendadas por Giglioti et al. (2020), do Instituto de Zootecnia de Nova Odessa, que é baseado no método PCR geralmente utilizado para a detecção e diferenciação de espécies devido a sua alta especificidade, sensibilidade e velocidade. Amostras de DNA de produtos lácteos foram extraídas de acordo com o método descrito por Azevedo et al. (2021). Todas as amostras de DNA foram diluídas para uma concentração final de 5 ng/ μ L.

Sua utilização em produtos lácteos é possível devido à presença de DNA recuperável derivado de células somáticas (leucócitos e células da mama) (Lipkin, Shalon, Khatib, Soller, Friedmann, 1993).

A partir dele foi desenvolvido o PCR quantitativo em tempo real (qPCR) que serve para detecção e quantificação simultânea de DNA bovino em amostras de DNA de leite

e derivados de búfalos, caprinos e ovinos. Além disso, esse método estabelece um limite de detecção, também calcula a quantidade de DNA contaminante.

Este procedimento descreve a extração de DNA, a partir de amostras de produtos derivados do leite (*mozzarella*, requeijão, iogurte, manteiga e outros), independente da espécie original, que será utilizada na amplificação de região polimórfica (contendo SNPs) para a identificação da pureza na composição.

Um conjunto de primers específicos foi projetado usando as sequências que cercam o gene mitocondrial da subunidade 1 do citocromo c oxidase (cox 1 DNA) para cada espécie. O DNA extraído de amostras de leite (vaca, búfala, cabra e ovelha, n = 12) foi submetido a reações de PCR.

Um conjunto de primers específicos para qPCR foi projetado usando as regiões do gene cox 1 DNA sequenciado delimitado pelos primers desenhados para PCR convencional. O ensaio qPCR foi realizado em volumes de reação de 10 µL usando um termociclador Rotor-Gene Q (Qiagen, Venlo, Holanda). Cada reação continha 5,4 µL de água estéril, 2 µL de mistura 5 X HOT FIREPol EvaGreen® HRM (Solis Biodyne, Tartu, Estônia), 0,3 µL de cada iniciador (10 µM) e 2 µL de DNA (10 ng).

Um controle de modelo negativo foi incluído em cada execução de PCR. A qPCR foi realizada nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C por 12 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação (95 °C por 15 s), anelamento (63 °C por 20 s) e extensão (72 °C por 20 s). Após a amplificação, a análise HRM (fusão de alta resolução) foi realizada durante as curvas de dissociação de 70 a 92 °C em incrementos de 0,2 °C, aumentando a 0,1 °C/2 s.

As corridas de PCR foram realizadas em conjunto de acordo com o primer específico comparando as diferentes marcas de *mozzarella* de búfala. As amostras padrão de *mozzarella* utilizadas para cada reação de PCR foram as previamente sequenciadas

A especificidade de cada primer específico foi verificada quanto à presença ou ausência de amplificações inespecíficas pela temperatura do pico de fusão (°C) e alterações na forma das curvas normalizadas pela análise HRM. A sensibilidade analítica foi avaliada usando diluições seriadas de 5 vezes (51 a 5⁻⁵, 10 ng a 0,0032 ng) de controles de amostras de DNA de cada espécie (amostras de espécies específicas sequenciadas).

Para estimar a quantidade de DNA de cada espécie-alvo, as curvas de calibração foram padronizadas a partir de diluições seriadas de 5 vezes (descritas acima) e as faixas de quantificação foram determinadas para cada espécie. A eficiência da reação (E), inclinação e coeficiente de determinação (r^2) também foram determinados para cada espécie.

Além disso, a sensibilidade analítica também foi avaliada testando concentrações decrescentes de DNA bovino em amostras de DNA de búfalos, caprinos e ovinos: 50% (5 ng), 10% (1 ng), 5% (0,5 ng), 2% (0,2 ng), 1% (0,1 ng), 0,5% (0,05 ng) e 0,1% (0,01 ng). O limite de detecção foi definido na última diluição que apresentou $\geq 90\%$ de detecção, e para cada concentração foram utilizadas 10 réplicas técnicas.

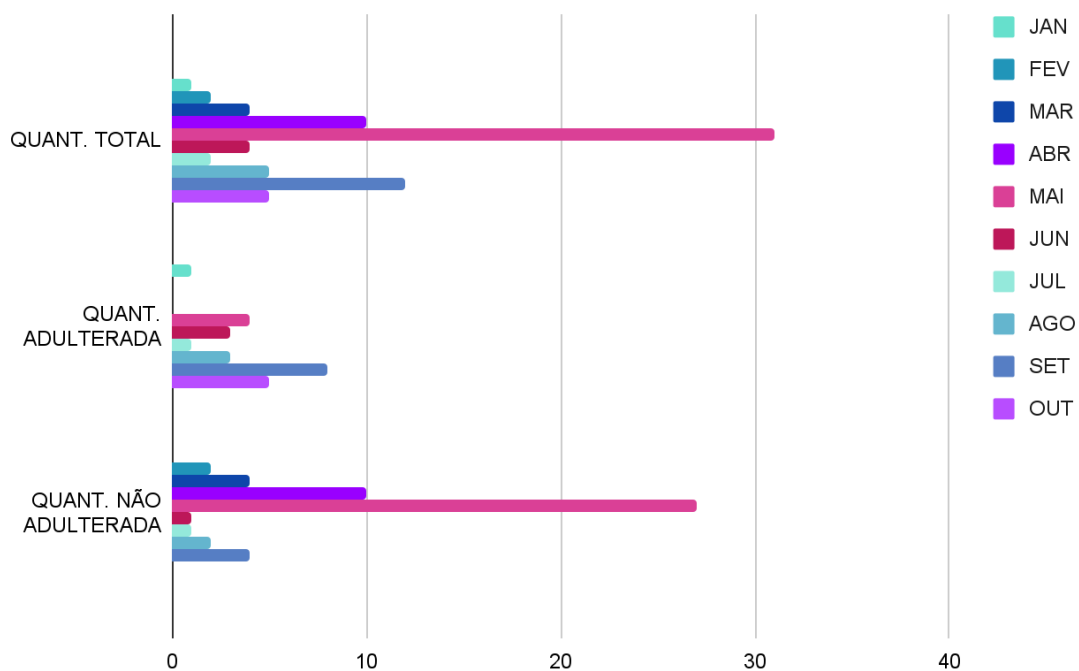
As 76 amostras de DNA de muçarela de búfala foram avaliadas por qPCR para detectar e quantificar a presença de DNA de vaca. As diferenças entre a quantidade de DNA (ng) entre vaca e búfala foram transformadas em porcentagens de DNA de vaca: $(\text{DNA de vaca} - [\text{DNA de vaca} + \text{DNA de búfalo}]) * 100$

4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Após coleta dos dados, estes foram organizados em planilha Microsoft Excel em relação à distribuição de frequência dos produtos ao longo dos meses e estações do ano, avaliando esta distribuição através de teste Qui-quadrado (χ^2), que é utilizado para avaliar variáveis qualitativas, observando se existe diferença significativa entre as frequências observadas e frequência esperada.

As análises estatísticas foram realizadas sob nível de significância $p=0,05$ em todos os teste estatísticos.

Gráfico - Distribuição da quantidade dos queijos elaborados com leite bubalino, ao longo dos meses do ano.



O teste Qui-quadrado foi elaborado na forma de hipótese, onde deve-se testar que as estações do ano influenciam na fraude e adulteração da mozzarella de búfala, isto é, o período do ano difere na proporção dos queijos adulterados.

Gráfico - Distribuição de frequência (F_o) observada dos queijos elaborados com leite bubalino, ao longo dos meses do ano, divididos em Safta (de abril a junho), e Entressafta (de julho a março).

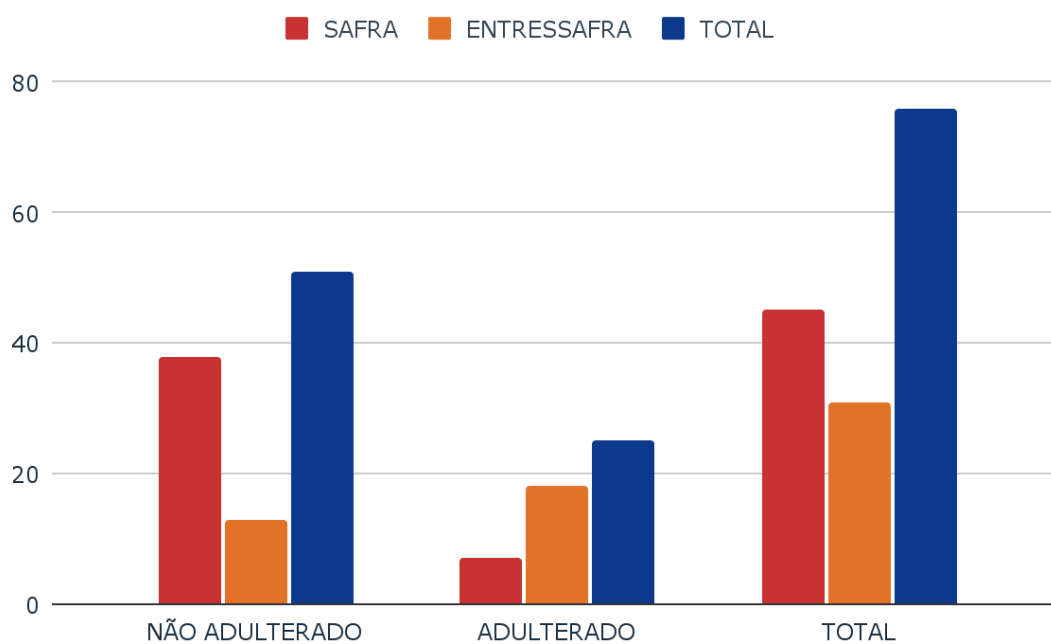
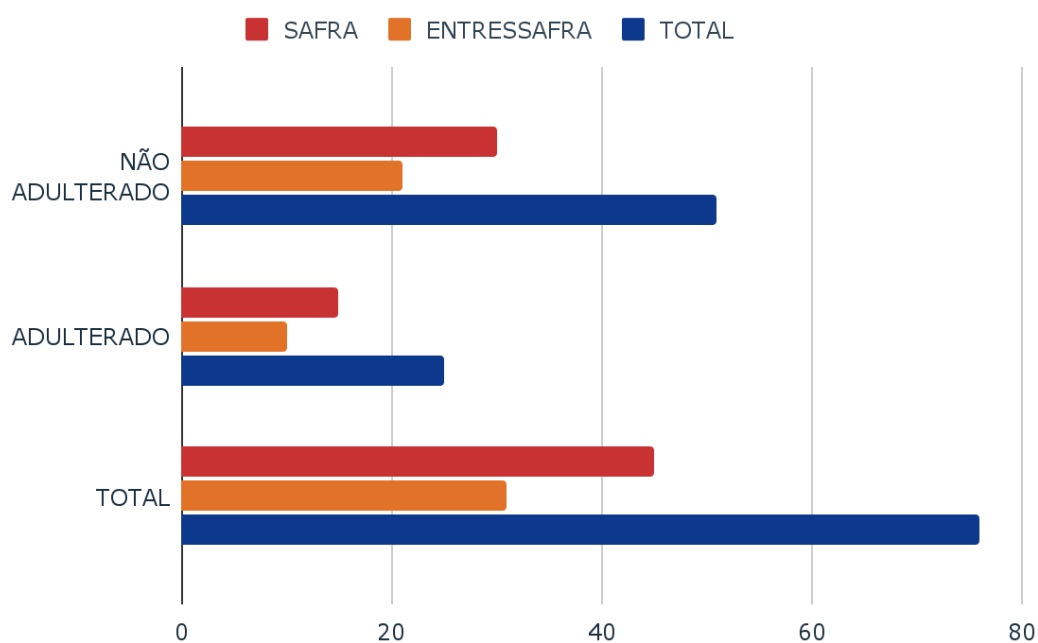


Gráfico - Distribuição de frequência (Fe) esperada dos queijos elaborados com leite bubalino, ao longo dos meses do ano, divididos em Safra (de abril a junho), e Entressafra (de julho a março).



5. RESULTADOS

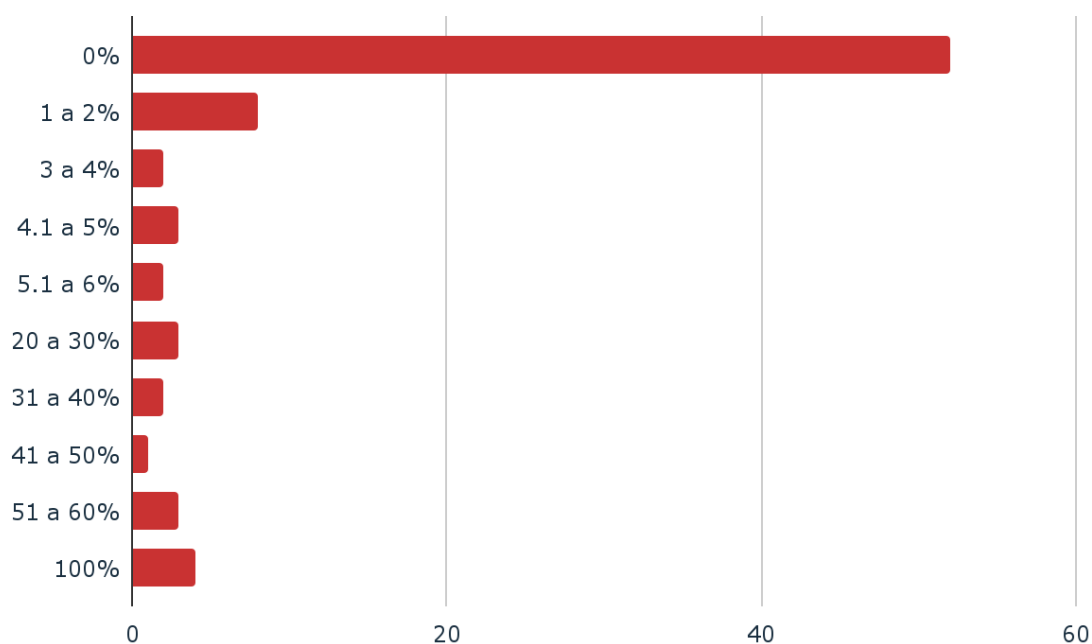
Das 24 marcas de queijos de búfala analisadas, apenas quatro possuíam a certificação "Selo de Pureza", indicando que seus produtos foram testados e comprovadamente contêm 100% de leite de búfala, conforme regulamentação da Associação Brasileira de Criadores de Búfalos (ABCB). Essas marcas foram submetidas a uma análise específica de PCR, onde é possível ampliar e detectar sequências de DNA.

Além das marcas que participam do programa, outras 9 marcas que não estavam envolvidas no "Selo de Pureza" também alcançaram 100% de pureza em seus produtos. Isso indica que elas também usam exclusivamente leite de búfala, embora não possuíssem a certificação oficial.

No entanto, nem todas as marcas atingiram esse nível máximo de pureza. Cinco marcas foram identificadas com uma pureza que variava entre 50% e 99%, o que significa que parte dos seus produtos era composta por leite de búfala. Três marcas apresentaram uma pureza entre 1% e 49,9%, mostrando uma menor proporção de leite de búfala em seus produtos.

As análises mostraram que 4 marcas não continham leite de búfala, apresentando 100% de adulteração no produto.

Gráfico - Porcentagem de DNA de vaca detectado em cada amostra de queijo de búfala



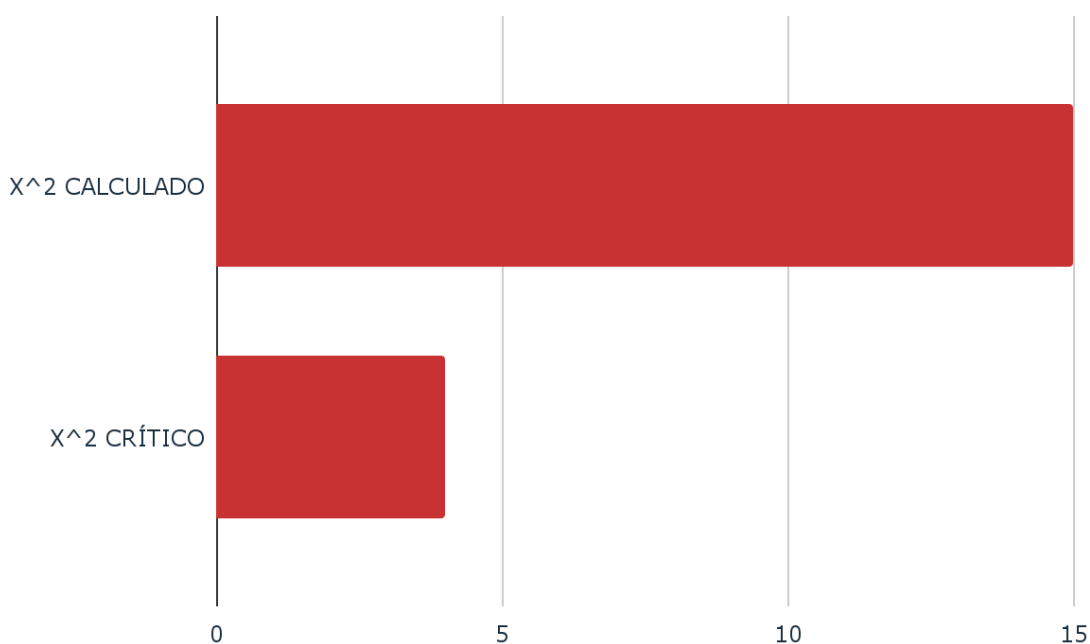
Em síntese, o estudo revela que a maioria das marcas participantes do programa de certificação ou que alegam usar leite de búfala realmente o fazem, apresentando consistentes resultados de pureza. Contudo, algumas marcas não participantes também conseguiram manter elevados padrões de pureza. Por outro lado, algumas marcas não cumpriram suas alegações sobre o uso de leite de búfala, o que pode induzir os consumidores ao erro ao procurarem produtos específicos por suas características de origem.

A adição significativa de leite bovino ao leite de búfala torna as amostras adulteradas mais facilmente distinguíveis das amostras puras de leite de búfala. Isso ocorre porque a composição das amostras adulteradas se assemelha mais ao leite de vaca não adulterado, que é mais comum. Em contrapartida, o leite de búfala puro possui características químicas distintas. Essa diferença fortalece os testes de identificação de fraudes, já que as amostras adulteradas divergem dos padrões típicos do leite de búfala, facilitando a detecção precisa das fraudes.

Nas análises foram considerados dois períodos do ano: safra (Abril a junho) e entressafra (julho a março) representando uma subdivisão das estações do ano.

O resultado do teste estatístico indicou que a proporção dos queijos adulterados na safra difere da entressafra sob nível de significância $p=0,05$.

Gráfico - Resultado Qui-quadrado



X^2 CALCULADO (15,03) > X^2 CRÍTICO (3,841)

6. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo indicam a necessidade de utilização de métodos próprios para a detecção e quantificação de adulteração em produtos lácteos utilizando técnicas de PCR.

A adulteração de queijos, particularmente pela adição de leite de vaca em produtos rotulados como feitos exclusivamente de leite de búfala, mostrou-se uma prática que compromete a autenticidade e a qualidade dos produtos.

A adulteração de queijos com a adição de leite bovino ao leite bubalino, é uma prática mais comum nos períodos de escassez sazonal de leite de búfala. A estacionalidade reprodutiva da espécie bubalina interfere significativamente na disponibilidade de produtos lácteos. A concentração de produção nos meses de abril a junho resulta em uma alta oferta de leite de búfala, enquanto nos meses de verão a produção é drasticamente reduzida, incentivando práticas fraudulentas, fazendo com que a produção de leite bubalino caia até 60%, o que leva produtores a utilizarem leite bovino para atender à demanda do mercado (Bastianetto et al., 2005; Czerwenka et al., 2010; Andrighetto, 2011).

Dentre as adulterações de leite bubalino mais comumente relatadas, a adição de leite bovino é a mais frequente. Segundo o Art. 235, parágrafo 2º, do RIISPOA, é permitida a mistura de leite de diferentes espécies de animais, desde que conste na denominação de venda do produto e seja informada na rotulagem a porcentagem do leite de cada espécie (Brasil, 2017). Tratando-se de adulteração, essa mistura não é informada ao consumidor e, por esta razão, além da avaliação da qualidade sensorial, microbiológica e físico-química do leite, torna-se necessário que métodos eficazes sejam empregados para detecção desses processos (Mendes et al., 2010).

Na análise, revelou-se que 5 marcas registraram níveis de pureza variando entre 50% e 99%. Esses produtos, apesar de conterem uma quantidade significativa de leite de búfala, também possuíam algum nível de adulteração com leite de vaca.

Mais intrigante foi o fato de que 3 marcas apresentaram uma pureza de apenas 1% a 49,9%. Esse baixo nível de pureza indica uma adulteração considerável, comprometendo seriamente a integridade do produto.

Essas práticas podem lesar os consumidores em relação aos valores agregados ao produto (Dias, et al., 2012) e acarretar riscos indiretos à saúde pública, como reações alérgicas devido à ocorrência de alergias específicas à proteína do leite de vaca.

A fraude no leite de búfala não se limita apenas à adição de leite bovino. Outras práticas incluem a adição de água e soro, que aumentam o volume e reduzem o custo de produção, comprometendo ainda mais a qualidade do produto final (ABCB, 2009).

Os resultados refletem a variação na qualidade dos queijos de búfala disponíveis no mercado e a necessidade de fiscalização rigorosa para garantir a autenticidade dos produtos. A adulteração de queijos não só prejudica os consumidores, mas também afeta negativamente os produtores que seguem as normas de pureza.

Cottenet et al. (2011) conduziram um estudo sobre a aplicação do PCR multiplex em tempo real com amplificação do DNA mitocondrial para verificar a autenticidade de leites fluidos de diversas marcas vendidas na China, Índia e Paquistão, focando na detecção de contaminação e fraudes. O estudo revelou, que a técnica foi eficaz na identificação de amostras contendo DNA de múltiplas espécies, incluindo casos em que houve mistura de leites de diferentes espécies não declaradas na rotulagem.

Especificamente, foi observado que 21% das amostras de leite bovino continham DNA de búfala. No leite bovino indiano, 20% das amostras continham pequenas quantidades de leite de búfala (<5%), enquanto 50% continham entre 5% e 50% de leite de búfala. Além disso, o estudo investigou a presença de DNA de vaca em leite de búfala da Índia e Paquistão, encontrando DNA bovino apenas em amostras de leite indiano, com 70% dessas amostras mostrando presença de leite bovino.

Lopez-Calleja et al. (2007) descreveram o uso da PCR como uma abordagem simples e rápida para detectar DNA específico de vaca em amostras de leite e queijo tipo muçarela de búfala comprados na Espanha. Da mesma forma, Darwish et al. (2009) analisaram 21 amostras de leite de búfala disponíveis no mercado, identificando fraudes em oito amostras.

Silva et al. (2015) utilizaram o PCR Multiplex para diferenciar DNA de diferentes espécies em queijos feitos com leite de búfala fraudados experimentalmente, além de 44

amostras de queijos obtidas no comércio varejista do Pará. O estudo revelou que o PCR foi eficaz em identificar misturas de leites de diferentes espécies, detectando fraudes em 13,63% das amostras comerciais analisadas, principalmente provenientes do mercado informal e feiras livres. Esses estudos destacam a rapidez e eficácia do método na garantia da autenticidade dos produtos analisados.

Em resumo, as variações na pureza dos queijos estão diretamente relacionadas ao período do ano e a sazonalidade reprodutiva dos búfalos. Essas informações são cruciais para a indústria de laticínios e podem orientar práticas de produção mais eficientes e confiáveis (Torres et al., 2016).

7. CONCLUSÃO

Os achados neste trabalho permitem concluir que há produtos rotulados como oriundos de leite bubalino, mas que apresentam mistura de leite bovino. Cabe destacar que aqueles laticínios associados ao Programa Selo de Pureza da ABCB e outros cumprem as informações contidas nos rótulos utilizando somente o leite de búfalas. Conclui-se ainda que em períodos de entressafra há maiores adulterações com adição de leite bovino na elaboração dos produtos.

Estes resultados indicam que se faz necessário que os órgãos públicos responsáveis realizem inspeções visando a proteção do consumidor e a integridade do mercado como um todo.

8. RESUMO

ADULTERAÇÃO DE QUEIJOS PRODUZIDOS COM LEITE DE BÚFALA

O estudo aborda a adulteração de queijos produzidos com leite de búfala, uma prática que pode comprometer a qualidade e a segurança dos produtos lácteos. Com uma população global de búfalos significativa, especialmente concentrada na Ásia, o Brasil destaca-se no cenário ocidental com o maior rebanho de búfalos. O leite de búfala possui características nutricionais superiores ao leite de vaca, sendo mais rico em proteínas, lipídios, vitaminas, sais minerais, e não contém a beta-caseína A1, o que o torna uma alternativa para pessoas com alergia ao leite bovino. Devido ao seu alto valor comercial, o leite de búfala é frequentemente adulterado com leite bovino, uma prática que pode prejudicar a saúde do consumidor. O trabalho teve como objetivo identificar possíveis adulterações em queijos comercializados como de origem bubalina utilizando técnicas de extração de DNA. Foram analisadas amostras de queijos por meio de métodos como eletroforese, imunologia, cromatografia e espectroscopia de infravermelho para detectar e quantificar misturas de leite. Os resultados evidenciam a presença de adulterações em amostras de queijos, destacando a necessidade de métodos eficientes para garantir a autenticidade dos produtos. A pesquisa contribui para a melhoria dos processos de fiscalização e certificação, promovendo a segurança alimentar e a confiança dos consumidores.

Palavras Chave: Bubalinocultura, fraudes na fabricação de mozzarella, caseína A2.

9. ABSTRACT

ADULTERATION OF CHEESE PRODUCED WITH BUFFALO MILK

The study addresses the adulteration of cheeses made with buffalo milk, a practice that can compromise the quality and safety of dairy products. With a significant global population of buffaloes, especially concentrated in Asia, Brazil stands out on the western scene with the largest herd of buffaloes. Buffalo milk has superior nutritional characteristics than cow's milk, being richer in proteins, lipids, vitamins, minerals, and does not contain A1 beta-casein, which makes it an alternative for people with allergies to bovine milk. Due to its high commercial value, buffalo milk is often adulterated with bovine milk, a practice that can harm the consumer's health. The aim of the work was to identify possible adulterations in cheeses marketed as buffalo origin using DNA extraction techniques. Cheese samples were analyzed using methods such as electrophoresis, immunology, chromatography and infrared spectroscopy to detect and quantify milk mixtures. The results highlight the presence of adulterations in cheese samples, highlighting the need for efficient methods to guarantee the authenticity of the products. The research contributes to improving inspection and certification processes, promoting food safety and consumer confidence.

Keywords: buffalo farming, fraud the manufacture of mozzarella, A2 casein.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE - ABIEC. **Perfil da Pecuária no Brasil: relatório anual**. 2018. 48 p. Disponível em: <abiec.siteoficial.ws/images/upload/sumario-pt-010217.pdf

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS CRIADORES DE BÚFALOS - ABCB - **Regulamento do SRG**. Disponível em <www.bufalo.com.br>.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS CRIADORES DE BÚFALOS - ABCB. **Dados de produção 2017**. Disponível em: <http://www.bufalo.com.br>.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS CRIADORES DE BÚFALOS - ABCB. **Padrão racial**. Disponível em <www.bufalo.com.br>.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS CRIADORES DE BÚFALOS - ABCB. **Raças**. São Paulo, 2015. Disponível em: <https://www.bufalo.com.br/racas.html>.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS CRIADORES DE BÚFALOS - ABCB. **Manual do criador**. Disponível em <www.bufalo.com.br>.

AZEVEDO, B. T.; VERCESI FILHO, A. E.; GUTMANIS, G.; VERISSIMO, C. J.; KATIKI, L. M.; OKINO, C. H.; GIGLIOTI, R. New sensitive methods for fraud detection in buffalo dairy products. **International Dairy Journal**, v. 117, p. 105013, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2666566222000028>.

BASTIANETTO, E. Aspectos econômicos da criação de bubalinos em Minas Gerais. In: **SIMPÓSIO MINEIRO DE BUIATRIA**, 2., 2005, Belo Horizonte. Anais... Belo Horizonte, 2005. Disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/abmg/2005/pdf06.pdf>

BERNARDES, O. Bubalinocultura no Brasil e no Mundo. Perspectivas frente ao agronegócio. **I Simpósio de Ruminantes – Unesp Registro – 02 de setembro de 2010**.

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

BORGHESE, A; MAZZI, M. Buffalo population and strategies in the world. Roma: **FAO**, 2005.

BORO, P.; DEBNATH, J.; DAS, K. T.; NAHA, B. C.; DEBBARMA, N.; DEBBARMA, P.; DEBBARMA, C.; DEVI, L. S. B.; DEVI, T. G. Milk composition and factors affecting it in dairy Bufaloes: **A review**. **Journal of Entomology and Zoology Studies, India**, v. 6, n. 3, p. 340 - 343, 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n.º 51, de 29 de dezembro de 2017.**

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

CAVALI, Jucilene; PEREIRA, RG de A. Produção leiteira de búfalos. **Pecuária leiteira na Amazônia**. Brasília, DF: Embrapa, p. 391-399, 2020.

COTTENET, G. BLANCPAIN, C. GOLAY, P. A. V. Simultaneous detection of cow and buffalo species in milk from China, India, and Pakistan using multiplex real-time PCR. **Journal of Dairy Science**. v. 94 p.3787–3793. 2011.

COTTENET, G. BLANCPAIN, C. GOLAY, P. A. V. Simultaneous detection of cow and buffalo species in milk from China, India, and Pakistan using multiplex real-time PCR. **Journal of Dairy Science**. v. 94 p.3787–3793. 2011.

CUNHA NETO, O.C. Avaliação do iogurte natural produzido com leite de búfala contendo diferentes níveis de gordura. **Dissertação (mestrado em zootecnia)**. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de alimentos da Universidade de São Paulo: Pirassununga, 2003.

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

DALSECCO, L. S. Análise da ocorrência de substituição de matéria-prima e quantificação do material bovino em produtos de origem bubalina: desenvolvimento da técnica por PCR em tempo real. 2013. 60 f. **Dissertação (Mestrado em Zootecnia)** – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

DANTAS, et al. Diagnóstico do perfil do consumidor de derivados de leite de búfala na região metropolitana de Belém-PA. **V Congresso Internacional das Ciências Agrárias**. DOI: 10.31692/2526-7701.VCOINTERPDVAgro.0092. 2020.

DE FRANCISCIS, G.; DI PALO, R. Buffalo Milk Production. In: world buffalo congress. **Revista São Paulo**. v I. p. 137-146, 1994.

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

DRUMMOND, M.G., BRASIL, B.S.A., DALSECCO, L.S. et al. A versatile real-time PCR method to quantify bovine contamination in buffalo products. **Food Control**. v.29 n.1 p.131-137. 2013.

DUBEY, P. C.; SUMAN, C. L.; SANYAL, M. K. Factors affecting composition of milk of buffaloes. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 67, p. 802-804, 1997.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **World buffalo population**. Rome: FAO, 2022. Disponível em: <https://www.fao.org>.

FAO. **Food safety risk analysis**. An overview and framework manual. Rome, 2018. Disponível em: <www.fao.org/docrep/i9166e/i9166e_Chapter_6_Meat.pdf>.

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

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

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

GIGLIOTI, Rodrigo; POLLI, Hiago; AZEVEDO, Bianca Tainá; KATIKI, Luciana Morita; VERCESI FILHO, Anibal Eugênio. Detection and quantification of adulteration in milk and dairy products: A novel and sensitive qPCR-based method. **Food Chemistry: Molecular Sciences**, v. 4, p. 100074, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2666566222000028>.

GUERREIRO, A. C. M. Métodos analíticos para avaliação da autenticidade de produtos lácteos. 2013. 120 f. **Tese (Doutorado em Ciências)** - Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Porto, 2013.

GUO, M.; FOX, P. F. **Functional dairy products**. CRC Press, 2004.

Haq, M.R.U., Kapila, R., Sharma, R., & Saliganti, V. (2013). "Comparative evaluation of cow β -casein variants (A1/A2) consumption on Th2-mediated inflammatory response in mouse gut." **European Journal of Nutrition**, 53(4), 1039-1047.

HARPER, H. A. **Revisão da bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1971.

HE, M. et al. Effects of cow's milk beta-casein variants on symptoms of milk intolerance in Chinese adults: a multicentre, randomised controlled study. **Nutrition Journal**, v. 16, n. 1, 2017.

HO, S.; WOODFORD, K.; KUKULIJAN, S.; PAL, S. Comparative effects of A1 versus A2 beta-casein on gastrointestinal measures: a blinded randomized cross-over pilot study. **Eur. J. Clin. Nutr.**, 68 (9): 994-1000, 2014.

HÜHNE, R.; et al. **Bioquímica ilustrada**. São Paulo: Manole, 1991.

HUNH, S.; GUIMARÃES, M.C. de F.; NASCIMENTO, C.N.B. do; MOURA CARVALHO, L.O. de; MOREIRA, E.D.; LOURENÇO JÚNIOR, J. de B. **Estudo comparativo da composição química de leite de zebuínos e bubalinos**. Belém: EMBRAPA CPATU, 15 p. 1982.

IBGE- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA: **Produção de**

pecuária municipal. 2022. Disponível em: <
https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2018_v46_br_informativo.pdf

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA (INMET). *Estações do ano*. 2023. Disponível em: <https://www.inmet.gov.br>

JAISWAL, K. A.; KUMAR, A.; KUMAR, R.; et al. Review on bovine beta-casein (A1, A2) gene polymorphism and their potentially hazardous effects on human health. *Research & Reviews: Journal of Dairy Science and Technology*, v. 3, n. 1, p. 1-5, 2014.

JIANQIN, S., LEIMING, X., LUEMAIL, X., YELLAND, G. W., NI, J., & CLARKE, A. J. (2016). Effects of milk containing only A2 beta casein versus milk containing both A1 and A2 beta casein proteins on gastrointestinal physiology, symptoms of discomfort, and cognitive behavior of people with self-reported intolerance to traditional cows' milk. *Nutrition Journal*, 15(35).

JORGE, A.M., COUTO, A.G., CRUDELI, G.A., PATIÑO, E.M. **Produção de búfalas de leite. Botucatu: FEPAF**, p.181. 2011.

KAMINSKI, S., et al. (2007). "Genetic polymorphism of milk proteins." *Journal of Applied Genetics*, 48(3), 189-198.

KEATING, A.F., et al. (2008). "Differences in the beta-casein content of cow's milk from different breeds and their relevance to inflammation." *Journal of Dairy Science*, 91(10), 3764-3769.

KIRK, B., et al. (2017). A2 Milk Enhances Dynamic Muscle Function Following Repeated Sprint Exercise, a Possible Ergogenic Aid for A1-Protein Intolerant Athletes? *Nutrients*, 9(2).
 KOSIKOWSKI, F.V. Cheese and fermented milk foods. 3. ed. Ann Arbor, MI: **Westport Brothers**, 1979. 2v.

LIPKIN, E.; SHALOM, A.; KHATIB, H.; SOLLER, M.; FRIEDMANN, A. Milk as a Source of Deoxyribonucleic Acid and as a Substrate for the Polymerase Chain Reaction. Elsevier, 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/>.

LÓPEZ-CALLEJA DÍAZ, I. ALONSO I. G; FAJARDO, V. et al. Application of a polymerase chain reaction to detect adulteration of ovine cheeses with caprine milk. *Journal of Dairy Science*. v.225 p.345-349. 2007

MACEDO, M. P., WECHSLER, F. S., RAMOS, A. A., AMARAL, J. B, SOUZA, J. C., RESENDE, F. D., OLIVEIRA, J. V. Composição físico-química e produção do leite de búfalas da raça Mediterrâneo no Oeste do Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Zootecnia**. Viçosa. v. 30, sup. 1, mai. 2001.

MADELLA-OLIVEIRA, A. F. et al. Aspectos da comercialização de carne e leite de bubalinos da região Norte Fluminense. **Rev. Bras. Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 29, n. 1, p. 53-54, 2005.

MAFRA, I; ROXO, A; FERREIRA, I. M. P. L. V. O, et al. A duplex polymerase chain reaction for the quantitative detection of cows' milk in goats' milk cheese. **International Dairy Journal**.

v.17 p.1132-1138. 2007.

MARQUES, José Ribamar Felipe. **Criação de búfalos**. Brasília: Serviço de Produção de Informação, 1998.

MENDES, C. G.; SAKAMOTO, S. M. SILVA, J. B. A. et al. Análises físico-químicas e pesquisa de fraude no leite informal comercializado no município de Mossoró, RN. *Ciência Animal Brasileira*, v. 11, n. 2, p. 349 - 356, 2010

MENDOZA-SÁNCHEZ, Geovanny. Estudo genético e quantitativo da contagem de células somáticas em bubalinos leiteiros. 2007. xiii, 72 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2007.

MISHRA, B.P. MUKESH. M; PRAKASH, B.; SODHI, M.; KAPILA, R.; KISHORE, A.; KATARIA, R.E.; JOSHI, B.K.; BHASIN, V.; RASOOL, T.J; BUJARBARUAH, K.M. Status of Milk protein, β -casein variatns among Indian milch animals. **Indian Journal of Animal Sciences**, n 79, 2009.

MOZZARELLA. Mozzarella di Bufala Campana. Disponível em: <<http://www.mozzarelladibufala.org/>>. Acesso em: jun. 2023.

NADER FILHO, A., SCHOKEN-ITURRINO, R.P., ROSSI JUNIOR et al. 1984. Influência do teor de proteínas totais na acidez e pH do leite de búfala. **Revista Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.39. p.231.

NEVES, E.C. A recente progress concerning buffalo milk technology in Amazon- Brazil. **In: Buffalo Symposium of Americas**. 2002. Belém. p.312-316.

OLENSKI, K. et al. Polymorphism of the beta-casein gene and its associations with breeding value for production traits of Holstein–Friesian bulls K. **Livestock Science**, p. 137-140, 2010.

OLIVEIRA, G.B.; GATTI, M.D.S.; VALADÃO, R.C. et al. Detecção da adição fraudulenta de soro de queijo em leite: interferência da atividade de proteases bacterianas. **Revista Instituto Laticínios "Candido Tostes"**, v.64, p.56-65, 2009.

PEREIRA, R.G. de A. Produção diária de leite e curva de lactação de búfalas mestiças sob dois sistemas de produção em Rondônia. 2007. Disponível em: http://ww2.pdiz.ufrpe.br/sites/ww2.prppg.ufrpe.br/files/ricardo_gomes_de_araujo_pereira.pdf.

PIGNATA, M. C. Queijo muçarela de búfala elaborado com inclusão de leite de vaca: qualidade nutricional e instrumental. 2013. 86 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – **Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia**, Itapetinga, 2013. Disponível em: <http://www.uesb.br/ppgengalimentos/dissertacoes/2013/MIRELLE_COSTA_PIGNATA.pdf>

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

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

RODRIGUES, N. P. A.; GIVISIEZ, P. E. N.; QUEIROGA, R. C. R. E.; et al. Milk adulteration: Detection of bovine milk in bulk goat milk produced by smallholders in northeastern Brazil by a duplex PCR assay. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 5, p. 2749-52, 2012

SELO DA BÚFALA. **Boletim Bimestral**, jul./ago. 2018, n. 1. Disponível em: <<https://readymag.com/u51840262/819613/>>.

SILVA, C.L; SALES, G.A; SANTOS NETO, J.; et al. Detecção de fraude em amostras comerciais de queijo bubalino por adição de leite bovino por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) multiplex. *Revista Instituto Adolfo Lutz. São Paulo.* v.74 n.1 p.21- 29. 2015

SILVA, M. M., & Ribeiro, C. M. (2021). Comparação da composição nutricional do leite de búfala e bovino. **Journal of Dairy Science**, 104(5), 5173-5180.

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.

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

SOUZA, G. O. de. Mozzarella de búfala no mercado varejista de São Paulo: avaliação da qualidade sanitária e da autenticidade do queijo. 2015. 58 f. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015. 125 Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10134/tde-07102015-104212/>>.

SULIMOVA, G. E.; BELONOGOVA, N. M.; DODONOVA, Z. V.; et al. Evaluation of beta-casein locus for detection of A1 and A2 alleles in cattle breeds. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 12, p. 5257-5262, 2007.

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

TORRES, J. K. F.; STEPHANI, R.; TAVARES, G. M.; CARVALHO, A. F.; COSTA, R. G. B.; SCHUCK, P.; PERRONE, I. T. Hidrólise da lactose e produção de leite em pó: Aspectos tecnológicos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 71, n. 2, p. 94-105, abr./jun. 2016. DOI: 10.14295/2238-6416.v70i2.529.

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

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

VIEIRA, M. C. et al. Viabilidade econômica da implantação de uma unidade industrial para a produção de mozzarella e de massa coagulada, fermentada e congelada de leite de búfala. **Inf. Econôm.**, v. 39, n. 10, p. 32-42, 2009

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

ZOCCAL, R.; et al. Lipídios no leite de búfala: composição e aspectos nutricionais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p. 45-50, 2008.

ZOHREH, Z.; MAJID, N.; ABBAS, A.; HAMID, M. Simultaneous detection of α -Lactoalbumin, β -Lactoglobulin and Lactoferrin in milk by Visualized Microarray. **BMC Biotechnology**, 2015. Disponível em: <https://bmcbiotechnol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12896-015-0158-2>.