UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SÁUDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO

NOÁDIA PRISCILA ARAÚJO RODRIGUES

UTILIZAÇÃO DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA DETECÇÃO DE LEITE BOVINO EM LEITE CAPRINO

JOÃO PESSOA
2011

NOÁDIA PRISCILA ARAÚJO RODRIGUES

UTILIZAÇÃO DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA DETECÇÃO DE LEITE BOVINO EM LEITE CAPRINO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição do Centro de Ciências da saúde da Universidade Federal da Paraíba em cumprimento às exigências para obtenção ao grau de Mestre em Ciências da Nutrição.

Orientador(a): Profº Drº Celso José Bruno de Oliveira

João Pessoa - PB
2011

R696u Rodrigues, Noádia Priscila Araújo.
Utilização da reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de leite bovino em leite caprino / Noádia Priscila Araújo Rodrigues. - - João Pessoa: [s.n.], 2011.
65f. : Il.
Orientador: Celso José Bruno de Oliveira.
Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCS.

1. Ciências da Nutrição. 2. Leite caprino. 3. Leite - Adulteração. 4. Autenticação de alimentos- DNA.

UFPB/BC CDU: 612.39(043)

UTILIZAÇÃO DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA DETECÇÃO DE LEITE BOVINO EM LEITE CAPRINO

NOÁDIA PRISCILA ARAÚJO RODRIGUES

Dissertação aprovada em _____/_____/_____

BANCA EXAMINADORA

Orientador
(Prof. Dr. Celso José Bruno de Oliveira)

Membro Interno
(Profa. Dra. Rita de Cássia Ramos do Egypto Queiroga)

Membro Externo
(Profa. Dra. Maria das Graças Xavier de Carvalho)

João Pessoa – PB
2011

Dedico este trabalho aos meus pais: Justino e Josilva. Por terem escalado montanhas me levando a alçar vôos mais altos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, “Em quem estão escondidos todos os tesouros da sabedoria e da ciência (Cl. 2:3)”. Como diz o salmista: “Eu te louvarei, porque de um modo assombroso, e tão maravilhoso fui feito; maravilhosas são as tuas obras, e a minha alma o sabe muito bem. Os meus ossos não te foram encobertos, quando no oculto fui feito, e entretecido nas profundezas da terra. Os teus olhos viram o meu corpo ainda informe; e no teu livro todas estas coisas foram escritas; as quais em continuação foram formadas, quando nem ainda uma delas havia. E quão preciosos me são, ó Deus, os teus pensamentos! Quão grandes são as somas deles”! (Salmos 139:14-17). Por isto, todo louvor e honra são dEle.

Aos meus pais, que são meus pilares de sustentação, e que me ensinaram o caminho em que se deve andar (Pv. 22:6).

Aos meus irmãos. Sem a convivência com eles a vida não seria tão agradável (Sl. 133:1).

A minha grande família: avós, tios, primos e amigos. Por estarem sempre juntos, mesmo que distantes, por serem a válvula de escape em dias de grande tensão, por que todas as coisas se tornam menos difíceis e mais felizes quando estou com eles (Atos 2:42)!

Aos meus orientadores neste projeto: Professor Celso, Professora Patrícia e Professora Rita por me ajudarem a perceber a beleza da ciência ao serviço do outro e que isto não é um fim em si, mas um meio de promover saúde pública. Ver a disposição, integridade e ética deles me inspiram a continuar buscando conhecimento (Tito 2: 7-11).

À equipe do laboratório de Avaliação de Produtos de Origem Animal que deram beleza e cor durante os dias da pesquisa, vocês se tornaram irmãos e irmãs (Atos 2:44).

A minha querida turma do mestrado, vocês foram singulares nesta conquista, transformando dificuldades em motivos de boas gargalhadas (Pv.18:24). E, em especial a Bárbara e Talita a quem sempre recorri buscando orientação (Pv. 17:17).

A banca examinadora desta dissertação, pelas correções, orientações e sugestões. Muito obrigada por tanto carinho e paciência.

Ao Departamento de Nutrição da UFPB e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, responsáveis pela minha formação profissional.

Um simples "obrigada" não pode expressar toda a minha gratidão.

Que Deus maravilhoso nós temos!
Como são grandiosos sua sabedoria, seu conhecimento e suas riquezas!
Como é impossível a nós compreendermos suas decisões e seus métodos!
Quem é, dentre nós, que pode conhecer a mente do Senhor?
Quem é que sabe o suficiente para ser seu conselheiro e guia?
E quem jamais poderia oferecer ao Senhor o bastante para persuadi-lo a agir?
Todas as coisas vêm única e exclusivamente de Deus.
Tudo vive por seu poder, e tudo é para a sua glória.
A Ele seja a glória para todo o sempre.

Romanos 11: 33-36 – Bíblia Sagrada

RODRIGUES, Noádia Priscila Araújo. **Utilização da reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de leite bovino em leite caprino**. 2011. 57f. Dissertação (Mestrado)-Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2011.

RESUMO

O leite caprino além de fornecer nutrientes indispensáveis ao funcionamento adequado do organismo humano tem ganhado espaço no mercado consumidor. Há uma necessidade premente de estudos que disponibilizem ferramentas para detecção de adulteração em leite caprino por adição de leite bovino, uma prática que tem se tornado reincidente. O presente trabalho teve como objetivo disponibilizar uma ferramenta para validação em espécies caprinas e bovinas brasileiras a técnica de reação em cadeia da polimerase, a qual obteve um limiar de detecção de 0,5%. E, utilizou o método a base de fenol-clorofórmio e um kit comercial para a realização da extração de DNA de melhor qualidade e grau de pureza. A técnica foi utilizada em amostras de leite de conjunto coletadas em usinas de beneficiamento de leite caprino da região ocidental do cariri paraibano e encontrou a presença de leite bovino em 37,5% das amostras.

Palavras-chaves: Leite, PCR, Adulteração

RODRIGUES, Noádia Priscila Araújo. **Utilization of the polymerase chain reaction (PCR) for detection of bovine Milk in caprine milk**. 2011. 2011. 50f. Dissertação (Mestrado)-Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2011.

ABSTRACT

The goat milk provides nutrients essential for the proper operation of human organism has gained importance in consumer market. There is an urgent need for studies that provide tools for detection of adulteration in goat milk by addition of bovine milk, a practice that has become a recidivist. This study aimed to provide a tool for validation in Brazilian species of goat milk and cow milk technique of polymerase chain reaction, which had a detection threshold of 0,5%. And used the method of phenol-chloroform and a commercial kit for the extraction of DNA of high quality and purity. The technique was used in conjunction milk samples collected from processing plants of goat milk in western cariri paraibano and found the presence of bovine milk in 37,5% of samples.

Keywords: Milk, PCR, Adulteration

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Localização das Usinas de Beneficiamento de leite caprino onde foram coletadas as amostras para o estudo	**36**
Figura 2 –	Sistema de produção de leite caprino nas Usinas de beneficiamento da região ocidental do Cariri paraibano	**37**
Figura 3 –	Esquema do protocolo de extração de DNA por fenol-clorofórmio-álcool isoamílico utilizado na pesquisa	**39**
Figura 4 –	Esquema do protocolo de extração de DNA pelo kit comercial (Invitek, Alemanha) utilizado na pesquisa	**40**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição do leite materno, caprino e bovino por 100 mL do alimento **22**

Tabela 2 – Oligonucleotídeos iniciadores para detecção simultânea de leite caprino e leite bovino por duplex-PCR **41**

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

DIPOA	Divisão da inspeção de produtos de origem animal
DNA	Ácido desoxirribonucléico
GC	Cromatografia gasosa
GLC	Cromatografia gás-líquido
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance com troca de cátions
IEF	Focalização isoelétrica
IR	Infravermelho
LC	Cromatografia líquida
MAPA	Ministério da agricultura pecuária e abastecimento
NMR	Espectroscopia por ressonância nuclear magnética
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RIISPOA	Regulamento de inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal
SGC	Cromatografia gás-sólido
TLC	Cromatografia de camada fina
UBL	Usina de beneficiamento de leite
Uréia-PAGE	Eletroforese em gel de uréia poliacrilamida

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 15

2 REVISÃO DE LITERATURA 17

2.1 O mercado de leite de cabra 17

2.2 Leite caprino e a segurança alimentar e nutricional 20

2.3 Adulterações em alimentos 24

2.4 Métodos de detecção de mistura de leite de diferentes espécies 27

2.4.1 Técnicas cromatográficas 28

2.4.2 Técnicas espectroscópicas 28

2.4.3 Análise de isótopos estáveis 30

2.4.4 Enzimas na autenticação de alimentos 30

2.4.5 Técnicas eletroforéticas 31

2.4.6 Métodos baseados em DNA na autenticação alimentos 32

2.4.7 Considerações entre os principais métodos 33

3 MATERIAIS E MÉTODOS 35

3.1 Desenho experimental 35

3.1.1 Etapa I: Padronização da técnica de PCR para detecção de leite 35

3.1.2 Etapa II: Aplicação da técnica para avaliação de amostras de leite caprino 36

3.2 Extração de DNA 37

3.2.1 Protocolo de extração por fervura (SOUMET *et al*., 1994) 38

3.2.2 Protocolo de extração por fenol-clorofórmio (BANIA *et al*., 2001) com modificações 38

3.2.3 Protocolo de extração com kit comercial (Invitek, Alemanha) 39

3.3 Avaliação do DNA extraído 40

3.4 Amplificação do DNA pela PCR **41**

3.5 Eletroforese em gel de agarose **42**

REFERÊNCIAS **43**

APÊNDICE **51**

ARTIGO **52**

1 INTRODUÇÃO

O leite é um alimento considerado essencial para a nutrição humana, por conter substâncias importantes para o funcionamento adequado do organismo e ser uma boa fonte de energia. Porém, alguns desses nutrientes, como certos tipos de proteínas e lactose, podem provocar reações indesejáveis em organismos sensíveis a estas substâncias. Por este motivo é imprescindível que os órgãos competentes tomem providencias cabíveis a fim de manter a qualidade do leite. E não apenas regulamentar as condições microbiológicas, físico-químicas ou organolépticas adequadas para o consumo, mas também, ausência de agentes contaminantes e substâncias fraudulentas.

Tendo em vista a importância quanto às questões de segurança alimentar em termos de autenticidade em produtos é que têm surgido novas e cada vez mais sofisticadas técnicas para a detecção de adição de substâncias que alterem a constituição de produtos alimentares, devido, principalmente, ao aumento da sensibilização para a valorização deste tema em todo o mundo. Sobre este assunto, a identificação de espécies de origem nos alimentos como o leite, por exemplo, é um dos pontos predominantes de aplicação. Pois, no caso do leite de vaca, que é evitado por alguns consumidores por diversas razões, incluindo intolerância ou alergia, questões religiosas, éticas ou culturais, ou preferência pessoal, quando então se busca o consumo de leite de espécies alternativas é indispensável dar a garantia de que a espécie que se consome não seja adulterada com leite de origem diferente.

Os métodos utilizados na detecção de misturas de leite de espécies diferentes são, geralmente, ou, na sua maioria, baseados em proteínas, dentre estes os mais comumente utilizados são eletroforese em gel de uréia-poliacrilamida (uréia-PAGE) e cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). Porém, devido à desnaturação protéica, comum nos processos térmicos e fermentativos utilizados no beneficiamento do leite, os resultados obtidos por estas técnicas podem mascarar a real qualidade do produto.

Outra técnica que tem alcançado espaço internacional na certificação da determinação da espécie de origem em leites e derivados lácteos de diferentes espécies é a reação em cadeia polimerase (PCR). Este método baseia-se

na presença ou ausência do ácido desoxirribonucléico (DNA) da espécie de interesse e possui vantagens sobre os métodos baseados em proteínas, dentre estes, o fato de o DNA ser um elemento estável, pois, mantém-se integro mesmo quando submetido a altas temperaturas.

A PCR consiste, basicamente, em reproduzir milhares de vezes um fragmento ou região específica do DNA a ser pesquisado, e esta reprodução, ou amplificação como é denominado, permite que o DNA seja analisado ou visualizado por métodos mais simples como a eletroforese em gel de agarose, por exemplo. Portanto, a PCR, por si só, não fornece a informação que se busca na detecção de adição de leite de diferentes espécies, mas, promove esta detecção com especificidade, sensibilidade elevada e rapidez. Além da garantia dos resultados obtidos, pois se trata da pesquisa por substâncias que se mantêm íntegras apesar de determinadas condições do meio. Isso se torna possível, pois o leite é um tecido fluido rico em células somáticas provenientes das glândulas mamárias, como células do epitélio e do sistema imunológico.

A frequência de práticas como a adição não declarada de leite de outras espécies em lácteos no mercado fornecedor de leite e seus derivados se dá devido ao fato de que há diferença no preço pago desse alimento de espécies diferentes, como é o caso do valor dos lácteos de cabra que é, geralmente, maior do que o preço dos produtos bovinos. Esta adulteração causa prejuízo enorme ao desenvolvimento da cadeia de produção de leite caprino. Um dos motivos é o fato de o leite de cabra ser consumido principalmente por pessoas com problemas de digestibilidade ou alergia ao leite bovino. Por isso, há uma necessidade urgente de estudos que validem métodos a serem utilizados na detecção de adição de leite bovino no leite caprino no Brasil. Pois o mercado fornecedor de leite de cabra e derivados tem se consolidado no país, e mundialmente, já desponta como um dos vinte maiores produtores de leite caprino, segundo FAOSTAT (2011).

Para tanto, a fim de identificar a possível substituição de leite caprino por leite bovino, mesmo que em quantidades mínimas, é que se pretende disponibilizar a utilização de uma técnica que facilite a detecção de adição de leite bovino no leite caprino. Por isso, o presente trabalho teve como objetivo validar em leite de espécies brasileiras a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) como uma ferramenta de detecção de adulteração de leite caprino por adição de leite bovino.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O mercado de leite de cabra

O leite é um dos alimentos mais consumidos no mundo e considerado essencial na lista de compras do brasileiro (CARNEIRO, 2010). O leite caprino é preferencialmente utilizado para uso doméstico e o seu consumo tem-se elevado, o que dá a este produto importância econômica, principalmente em países onde o gado caprino é criado em larga escala, como é o caso de alguns países asiáticos e africanos, especialmente a Índia, onde o leite caprino desempenha um papel significativo no contexto nacional e, sobretudo, na economia rural (PANDYA; GHODKE, 2007)

O mercado de leite de cabra vem se destacando no cenário nacional, e dentre os produtos de origem caprina os lácteos são os produtos mais comercializados, apesar dos obstáculos ainda existentes quanto ao seu consumo (COSTA, 2005). Os empecilhos para o crescimento do mercado consumidor de leite caprino são: a falta de conhecimento quanto aos valores nutricionais e potencialidades nutracêuticas do leite caprino por parte da população; a sazonalidade na produção do leite caprino *in natura*, que leva a uma produção significativamente menor que a quantidade produzida de leite bovino por animal e que coloca restrições na eficiência de transporte e tratamento; o preconceito que ainda existe quanto ao consumo deste alimento; o preço elevado, quando comparado a produtos lácteos bovinos que são similares (CARVALHO, 2011; MICHAELIDOU, 2008; PANDYA; GHODKE, 2007;).

O número total de caprinos no mundo está estimado em 862 milhões de cabeças, estando 9,4 milhões destas no Brasil, deixando o Brasil em décimo nono na lista de classificação de maior rebanho no mundo em 2009. Já a média de produção mundial de leite caprino entre os anos de 2000 a 2005 foi de 138 mil toneladas (FAOSTAT, 2010). Os caprinos são animais de pequeno porte, hábeis na seleção de alimentos e possuem eficiente mastigação e ruminação devido a uma baixa ingestão de água, sendo estes fatores o que fazem com que estes ruminantes tenham uma boa adequação em áreas tropicais e subtropicais (CARNEIRO, 2010).

A fácil adaptação deste animal e o seu pequeno porte o tornam ideal para produtores de regiões áridas, onde é inviável a criação de bovinos e outros ruminantes de grande porte (COSTA, 2005; MICHAELIDOU, 2008), favorecendo a caprinocultura, como é o caso dos pequenos produtores da região nordeste do Brasil. E, segundo censo agropecuário de 2006, 67% da produção de leite caprino no Brasil vem da agricultura familiar (IBGE, 2011). Sendo destinados para venda de leite fluído (93%), venda de leite em pó (4%) e venda de queijos, doces e iogurtes (3%) (COSTA, 2005).

No Estado da Paraíba, a produção de leite caprino em 2008 foi de 6,48 milhões de litros, o que representa uma média de 18 mil litros de leite caprino por dia (PRODUÇÃO..., 2010). O que tornou este estado o maior fornecedor de leite caprino naquele ano. Este fato esteve relacionado, principalmente, ao incentivo de Programas Governamentais à Caprinocultura, pois, no nordeste, o principal destino da produção é para programas governamentais assistencialistas, onde, através de programas institucionais dos governos estaduais em parceria com o governo federal, como exemplo, pode-se citar o “Programa do Leite”, que tem como responsabilidade a distribuição de um litro de leite por dia às famílias carentes, atingindo, precisamente, crianças (6 meses a 6 anos), gestantes, nutrizes e idosos. (GOVERNO DO ESTADO DA PARAÍBA, 2009; CARVALHO, 2011).

Hoje o preço do leite de cabra pago ao produtor é de cerca de R$ 2,20 (CARNEIRO, 2010). Além de beneficiar as famílias carentes, esses programas governamentais também beneficiam, diretamente, os pequenos produtores de leite, que têm a garantia da compra de sua produção por um preço justo. O que tem estimulado o incentivo a caprinocultura leiteira e promoção de mecanismos que favoreçam e incitem ao consumo deste alimento tão importante na promoção de segurança alimentar. Como mostram os dados relatados por Costa (2005) que neste ano, em alguns estados da região nordeste, houve uma redução de 39% na desnutrição infantil, graças ao impulso no consumo de leite de cabra na merenda escolar.

Existe pouca produção literária para lácteos caprinos, porem, nos últimos anos, principalmente, pelo enfoque que tem sido dado a caprinocultura leiteira e o crescimento da indústria do leite de cabra que surge como opção para incrementar economicamente este mercado, no Brasil e mais ainda na região nordeste do País, muitos estudos técnicos e científicos vem se realizando, muitos

deles incentivados por órgãos governamentais (PANDYA; GHODKE, 2007; GONÇALVES *et al*., 2008). Isto confirma a assertiva de que o mercado de leite caprino e seus derivados tem um grande potencial ainda a ser explorado (HOFF; BRUCH; PEDROZO, 2007).

2.2 Leite caprino e a segurança alimentar e nutricional

Um dos fundamentos da segurança alimentar é que haja a produção de alimentos seguros, saudáveis e nutritivos, em bases sustentáveis, competitivas e, acima de tudo, confiáveis. Não se trata de dispor de alimentos em quantidade para abastecer a população, apenas (CONSEA, 2007). No caso do leite, é necessário que tenha qualidade em seus aspectos físico-químicos e organolépticos, ausência de agentes patogênicos, reduzida carga microbiana, baixa contagem de células somáticas e ausência de agentes contaminantes ou substituição fraudulenta (BRESSAN; MARTINS, 2004). Pois se sabe que a falsificação de leite, em particular, representa um enorme problema em relação à saúde pública, foi considerado um dos maiores responsáveis pela mortalidade infantil nas décadas passadas (TEUTEBERG, 1995). Os consumidores têm o direito de receber informações úteis e de fácil compreensão sobre a qualidade e os constituintes dos alimentos, de forma a poderem escolher com conhecimento de causa.

Com isto, a cadeia de produção alimentar torna-se cada vez mais complexa. E para assegurar proteção adequada à saúde dos consumidores, alem de um controle de qualidade efetivo, a rotulagem de todos os ingredientes deve assegurar não só uma informação ótima ao consumidor sobre a composição do produto alimentar. Mas também fornecer as informações necessárias aos consumidores que, por razões de saúde ou por motivos éticos, devem ou querem evitar certos ingredientes (COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS, 2000).

Na região do semi-árido nordestino, a situação de segurança alimentar e nutricional é complexa. Há desigualdades extremas entre o espaço urbano e a zona rural e, sobretudo, entre estratos socioeconômicos que caracterizam a produção e acesso aos bens e serviços. Esta área, com 980.000 km^2 e cerca de 20 milhões de habitantes, compõe uma das mais vastas e mais populosas áreas de pobreza de todo o mundo (BATISTA FILHO, 2009).

A ciência da nutrição avançou no estudo de nutrientes essenciais e sua relação com a saúde, acumulando provas científicas que apóiam a noção de que o consumo de leite, incluindo aí o leite caprino, que possui, praticamente, a mesma proporção de macronutrientes que o leite bovino, apresenta atributos que podem reforçar o papel da nutrição em diferentes fases da vida. A ingestão de leite

caprino é vantajosa para grupos específicos da população, como crianças, idosos e atletas (MICHAELIDOU, 2008).

O leite oferece muitos compostos nutricionalmente essenciais para a saúde humana. Tais como, matérias orgânicas e nitrogenadas, como a caseína e a albumina, necessárias para a constituição de tecidos e sangue, gordura insaturada que contribui para circulação sanguínea, sais minerais para a formação do esqueleto e manutenção da homeostase corpórea e junto com as vitaminas permitem funcionamento adequado de todo corpo. Alem dos fermentos lácticos, muito favoráveis à digestão e que defendem o intestino da ação nociva de bactérias patogênicas (PARK *et al*., 2007; HAENLEIN, 2004).

O leite é consumido como parte de uma dieta equilibrada e saudável, porque contém uma impressionante variedade de nutrientes e, portanto, desempenha um papel importante em ajudar os indivíduos a satisfazer as suas necessidades nutricionais diárias na manutenção da saúde e prevenção de doenças (MICHAELIDOU, 2008). No entanto, a investigação ao longo dos últimos vinte anos tem-se concentrado em leite de origem bovina (COSTA, 2005).

Por isso, cabras leiteiras ainda são uma atraente área de pesquisa. Pela facilidade do leite caprino e seus derivados de serem digeridos por grupos de consumidores com necessidades especiais. Este é um dos fatores que pode levar a aceleração destas pesquisas (MICHAELIDOU, 2008; COSTA, 2005).

Além disso, produtos lácteos caprinos naturais podem atuar como alimentos funcionais, influenciando a pressão sanguínea (MICHAELIDOU, 2008). A presença de fosfopeptídeos da caseína podem também aumentar o significado fisiológico dos laticínios caprinos. Além disso, há um enorme potencial nutracêutico no leite de cabra, que é utilizado no tratamento de uma ampla variedade de condições gastrintestinais, incluindo doença inflamatória intestinal e mucosite induzida por quimioterapia, porem estes dados necessitam de mais investigação (MICHAELIDOU, 2008; PARK *et al*., 2007; HAENLEIN, 2004).

A quantidade de proteína encontrada no leite de cabra e no leite de vaca é semelhante, cerca de 3%, com predominância de caseína, mas com uma grande diferença na composição dos tipos de caseína presentes. Por isso, na presença de alergia à proteína do leite de vaca, o de cabra é o mais indicado (HAENLEIN, 2004). Vale salientar que o leite caprino não é indicado como substituto

no tratamento de alergia ao leite bovino pela Sociedade Européia de Gastroenterologia Pediátrica, Hepatologia e Nutrição (CORTEZ *et al*., 2007).

O leite materno possui ausência ou uma concentração baixa de □s1-caseína em comparação ao leite de vaca, que chega a 35%, enquanto o leite caprino possui uma baixo percentual. Isto pode explicar a boa tolerância ao leite caprino por pessoas que são alérgicas ao leite de vaca. Além disso, o teor reduzido de □s1-caseína do leite de cabra também favorece a formação de coágulos finos e suaves, facilitando a absorção, tolerância e o processo digestivo deste produto (LUIZ *et al.,* 1999). O leite de cabra também contem maior quantidade de glóbulos de gordura menores e percentuais mais elevados de ácidos graxos de cadeia curta e média, o que facilita a digestibilidade e favorece o esvaziamento gástrico e, em consequência, reduz a incidência de refluxo gastroesofágico (FISBERG *et al.*, 1999). Com o pequeno tamanho dos glóbulos de gordura, há uma maior superfície exposta à ação das enzimas digestivas.

Os leites de cabra, vaca e humano fornecem praticamente o mesmo valor energético, entre 690 e 760 kcal/litro. A diferença está na contribuição de cada elemento, enquanto que o leite humano oferece 55%, 7% e 38% de seu valor energético em gorduras, proteínas e lactose, os leites de cabra e vaca oferecem 50%, 25% e 25%, respectivamente (LUIZ *et al*., 1999). Medeiros *et al*. (1997) expõe que esses tipos de leite tem a seguinte composição, conforme tab. 1.

Tabela 1 – Composição do leite materno, caprino e bovino por 100 mL do alimento

	Energia (kcal)	Carboidrato (g)	Proteína (g)	Lipídeo (g)
Leite materno	72,3	7,4	1	4,3
Leite caprino	77,55	4,72	3,98	4,75
Leite bovino	66,5	4,9	3,4	3,7

FONTE: Woltschoon-Pombo e Furtado (1978), citado por Medeiros *et al.* (1994)

Estima-se que, aproximadamente, 2 a 3% das crianças do mundo com menos de 3 anos são alérgicas às proteínas do leite de vaca (CORTEZ *et al*., 2007). Já em relação ao leite de cabra, esse valor aproxima-se de zero (FURTADO, 1981). Como o sistema de defesa das crianças menores de um ano é imaturo e o

sistema digestivo ainda não está preparado para receber alimentos que não sejam o leite materno, o organismo os reconhece como substancias estranhas e isso provoca reações de defesa, que são as reações alérgicas (VIEIRA *et al*., 2005). Os sintomas de alergias a alimentos podem surgir como reações de pele como coceira, inchaço dos lábios, pálpebras e outras partes do corpo, reações respiratórias como, nariz escorrendo, chiado no peito. E/ou reações gastrintestinais como vômito e diarréia (CORTEZ *et al*., 2007).

Por esses motivos, o leite de cabra, comparado ao leite de vaca, possui características de alta digestibilidade, permanecendo menos tempo no estômago e, consequentemente, aumentando o apetite.

Pode-se concluir que o leite de cabra é uma excelente opção para a alimentação de crianças após o primeiro ano de vida e também é muito saudável quando consumido por adultos. A produção de leite de cabra pode se tornar um importante instrumento na política de produção de alimentos e da segurança alimentar e, com isso, diminuir os índices de subnutrição e a taxa de mortalidade infantil.

2.3 Adulterações em alimentos

Nos últimos anos tem crescido a sensibilização quanto a questões de autenticidade de alimentos (DE LA FUENTE; JUAREZ, 2005). Pois, tem surgido um elevado interesse por parte dos consumidores em obter informações quanto à origem e forma de fabricação dos alimentos que consomem (REID; O'DONNELL; DOWNEY, 2006). Apesar de a adulteração de alimentos ser um velho problema em vez de uma característica do nosso tempo, ainda é uma das principais preocupações para pesquisadores, consumidores, indústrias e autoridades políticas em todos os níveis do processo de produção (BOTTERO; DALMASSO, 2010; SUN, 2008).

Uma matéria-prima autêntica deve obedecer à rotulagem, principalmente em termos de composição química, qualidade microbiológica, tecnologia de produção, e, sobretudo, identidade genética. Laticínios são de especial interesse, porque são um grupo de alimentos que desempenham um papel importante na alimentação da população e são essenciais para determinados grupos de consumidores (mulheres, crianças e idosos) (MICHALIDOU, 2008).

Sob o olhar das políticas de segurança alimentar, é imprescindível garantir que a população tenha acesso a alimentos essenciais à sua nutrição, o que inclui tanto produção como abastecimento e comercialização confiáveis. Em conformidade com Egito *et al.* (2006) a garantia de qualidade dos alimentos tornou-se um problema mundial. É cada vez mais importante detectar a introdução no mercado de produtos rotulados de forma fraudulenta e de qualidade inferior, por razões econômicas e por questões de saúde pública.

Dentre as propostas aprovadas na terceira conferencia nacional de segurança alimentar e nutricional no Brasil está aquela que estabelece mecanismos de regulação da rotulagem, com a devida indicação de sua composição. Com vistas a estimular a produção de alimentos saudáveis e seguros em relação ao grau de pureza e autenticidade, conforme o estabelecido nas políticas de promoção à saúde. Além de sugerir ações que garantam e reforcem os sistemas de avaliação, monitoramento e análise de alimentos com vistas a assegurar um consumo seguro (CONSEA, 2007).

Entende-se por adulteração em produtos alimentares de origem animal, entre outras formas, empregar substâncias de espécies diferentes das da composição normal do produto sem autorização da Divisão da Inspeção de Produtos de Origem Animal (D.I.P.O.A), do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (M.A.P.A.) e a fraude é o ato de substituir um elemento por outro de valor inferior visando obter maior lucro (BRASIL, 1996).

Ou seja, para que se caracterize fraude é necessário haver a presença de má fé, pois, nos casos em que há negligência no processo de fabricação ou beneficiamento que levam a adição de substâncias indesejáveis, denomina-se adulteração. Porem, ambos os casos são considerados impróprios ao consumo e devem ser excluídos dos canais de comercialização. O fornecimento destes aos consumidores implica em penalidades previstas na legislação vigente.

O código penal brasileiro considera crime contra a saúde pública, no artigo 272, a adulteração ou falsificação de alimentos. Que é o ato de adicionar substancia de qualidade inferior com o fim de obter maiores lucros, causando prejuízo a saúde pública e a economia. No seu artigo 270, considera crime de envenenamento adicionar substancias aos alimentos que podem causar morte ou prejuízo à saúde do indivíduo. Todos os envolvidos na cadeia produtiva e de comercialização do produto alimentar são considerados responsáveis pela ação e, portanto, culpados (BRASIL, 1995).

O RIISPOA (Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal) considera fraude, falsificação ou adulteração de leite: a adição de substancias estranhas à sua composição. Neste caso, pode-se incluir a adição de leite de outra espécie animal (BRASIL, 1996).

Uma adulteração comum em produtos lácteos consiste em efetuar a substituição do leite caprino por quantidades superiores não declaradas de leite bovino, tendo em vista o valor econômico inferior deste produto comparado ao de origem caprina. Assim, a detecção de espécies de leite é importante no controle de qualidade de alimentos de origem animal (MAFRA *et al.*, 2007). No Brasil, tem-se observado esse tipo de adulteração no leite de cabra (EGITO *et al.*, 2006).

A adição de quantidades não declaradas de leite de vaca em leite caprino é, frequentemente, realizada devido à variação sazonal na produção de leite caprino e o menor valor econômico de leite bovino (LÓPEZ-CALLEJA *et al.*, 2007a). A identificação das espécies de origem em produtos lácteos tem se tornado cada

vez mais importante no que diz respeito ao cumprimento da legislação sanitária, fidelidade nas informações apresentadas ao consumidor, do ponto de vista econômico e para a saúde pública (MININNI *et al.*, 2009).

Apesar dos avanços feitos na autenticação de alimentos até o momento, a adulteração dos alimentos continuará a ser um problema sério no futuro. Independentemente do método analítico em si, a limitada disponibilidade de métodos de referência ainda representa um problema na autenticação de alimentos (ITO, 2005).

Novas abordagens na autenticação de alimentos serão fazer levantamentos dos novos métodos de adulteração, que por sua vez, exigem ainda mais técnicas analíticas refinadas para a sua detecção (SUN, 2008). A seção de tecnologia da D.I.P.O.A. é o órgão responsável pela padronização e atualização de técnicas de exame em alimentos, mas, aceita sugestões de laboratórios oficiais ou particulares para alterá-las desde que a Seção de Tecnologia verifique e confirme as vantagens e a nova técnica (BRASIL, 1996).

Portanto, é imprescindível canalizar esforços no sentido de promover técnicas mais avançadas na detecção de adulteração em alimentos, a fim de garantir ao consumidor alimentos de qualidade, com especificações confiáveis, promovendo saúde e, por outro lado dando a credibilidade exigida aos sistemas de produção e comercialização. Por isto, sendo o leite caprino, um alimento que começa a ganhar espaço no mercado consumidor brasileiro, é indispensável assegurar esta garantia.

2.4 Métodos de detecção de mistura de diferentes espécies

Para garantir a genuinidade de alimentos é necessário ter a disposição dos órgãos responsáveis por esta fiscalização métodos analíticos que avaliem esta autenticidade.

Apesar de grandes progressos já terem sido feitos na autenticação de alimentos, e isto está intimamente ligado com os avanços da biologia e da química e da disponibilidade de métodos analíticos apropriados (SUN, 2008) ainda há muito a percorrer. Dentre os métodos modernos para autenticação de alimentos estão à cromatografia e espectroscopia nos seus vários formatos, análise de isótopos estáveis e os métodos imunoquímicos, bem como os métodos baseados em DNA, e estes representam os métodos atualmente mais utilizados na autenticação de alimentos, com uma gama de aplicações cada vez mais abrangente (BOTTERO; DALMASSO, 2010; REID; O'DONNELL; DOWNEY, 2006).

Muitos trabalhos tem dirigido esforços a estudar métodos de análise para detecção de adulteração de leite de cabra com o leite de vaca. E atualmente, estas pesquisas tem se canalizado no sentido de investigar métodos que objetivem detectar misturas de espécies em derivados lácteos, como em queijos, por exemplo (BOTTERO *et al.,* 2003; MAUDET; TABERLET, 2001). Pelo fato destes alimentos serem submetidos a processos que promovem modificação de seus componentes, através dos processos fermentativos. O que dificulta a aplicação de métodos convencionais.

Dentre as metodologias disponíveis para a detecção da mistura de leite de diferentes espécies, particularmente a adição deste substrato bovino ao caprino, destacam-se os métodos que se baseiam na determinação da atividade enzimática e na identificação de diferenças nas frações protéicas e gordurosas (REID; O'DONNELL; DOWNEY, 2006). Entre as ferramentas utilizadas para identificar estes compostos, as que consideram as diferenças nas frações protéicas parecem ser as mais adequadas e podem ser executadas por diferentes processos analíticos, como os métodos imunológicos, eletroforéticos e cromatográficos e há também os métodos baseados em DNA (HURLEY *et al*., 2006).

2.4.1 Técnicas cromatográficas

As técnicas de cromatografia em suas várias formas estão entre os mais importantes métodos utilizados na análise de alimentos (REID; O'DONNELL; DOWNEY, 2006). O termo "Cromatografia" engloba técnicas capazes de separar, permitindo a identificação, de praticamente qualquer tipo de moléculas presentes em uma amostra alimentar. Assim, a cromatografia gasosa (GC), seja realizada como cromatografia gás-líquido (GLC) ou cromatografia gás-sólido (SGC), representa um método onde a fase móvel é gasosa, por tanto, é mais adequada para análise das moléculas naturalmente voláteis ou semi-voláteis (HE; BEESLEY, 2005).

Na cromatografia líquida (LC), geralmente referida como cromatografia liquida alto desempenho (HPLC), a fase sólida estacionária é aplicada em uma coluna e a fase móvel é bombeada através da coluna, pode detectar compostos como proteínas, aminoácidos, compostos fenólicos e carboidratos (VOLITAKI; KAMINARIDES, 2001).

Os sistemas de cromatografia de camada fina (TLC) consistem de uma fase plana sólida e uma fase móvel que é líquida. Devido à capacidade superior de GC e HPLC, esta última técnica tem sido raramente usada para fins de certificação de alimentos (LEHOTAY; HAJŠLOVA, 2002).

2.4.2 Técnicas espectroscópicas

Técnicas espectroscópicas, em particular por infravermelho (IR) e espectroscopia por ressonância nuclear magnética (NMR), bem como espectrofotometria UV-Visível, são amplamente utilizadas na autenticação de alimentos (LE GALL; COLQUHOUN, 2003). Eles são freqüentemente combinados com quimiometria, que na verdade é uma metodologia química que usa procedimentos matemáticos e estatísticos para fornecer o máximo de informações químicas analisando dados químicos (LEARDI, 2003). A escolha do método mais adequado depende principalmente da natureza química e o conhecimento prévio do estado físico da amostra, e os prazos necessários para os resultados. Outras

questões que precisam ser considerados são os custos de obtenção e execução do equipamento analítico, e as especificações das medições (SUN, 2008).

A espectrofotometria UV-Visível representa uma técnica simples e barata que encontrou ampla aceitação na química analítica. Algumas aplicações bem conhecidas incluem a determinação do teor de proteína avaliando o progresso da hidrólise da proteína, a determinação fotométrica de pigmentos como, por exemplo, carotenóides na margarina, e a detecção de adulteração de azeites virgens com óleos refinados (STRASBURG; LUDESCHER, 1995; SUN, 2008).

O espectrofotômetro portátil tem sido utilizado para estudos de autenticidade em de bebidas alcoólicas (REID; O'DONNELL; DOWNEY, 2006). Nos casos em que os métodos não estão disponíveis por HPLC, espectrofotometria é uma ferramenta útil para a determinação de compostos fenólicos (LUYKX; RUTH, 2008). Outra aplicação interessante da espectrofotometria UV-visível é a determinação do conteúdo total de antocianinas. Apesar das vantagens indubitáveis de espectrofotometria UV-Visível, esta técnica não tem tido uma grande dose de inovação em comparação com outros métodos utilizados na autenticação de alimentos (SUN, 2008).

A espectroscopia por infravermelho é uma técnica rápida e não destrutiva, permitindo o rastreio de um grande número de amostras que podem ser recuperadas após a medição e utilizadas em análises posteriores. Por esta razão, a espectroscopia em infravermelho é usada não apenas para estudos de autenticidade, mas também, por exemplo, para a determinação do grau de maturação dos frutos, como mostrado para mangas (REID *et al.,* 2005). A utilização deste método em pesquisas que envolvem autenticação de alimentos é dada pelo baixo custo em execução, à facilidade de uso e a versatilidade em frutas e derivados, como geléias, preparações de frutas, sucos de frutas, carne de caranguejo, óleos graxos em suplementos dietéticos, chocolate e produtos de chocolate, azeite e óleos de milho, bebidas alcoólicas, mel e café (SUN, 2008).

A espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é conhecida como uma ferramenta poderosa para a elucidação estrutural, e é cada vez mais usado também para fins de autenticidade dos alimentos e incluem óleos vegetais, sucos de frutas, bebidas alcoólicas, café e chá, produtos lácteos, carnes e peixes. O método de RMN poderia ser utilizado para avaliação de qualidade e autenticação do chá verde (LE GALL; COLQUHOUN, 2003).

2.4.3 Análise de isótopos estáveis

Os átomos de hidrogênio, carbono, nitrogênio, oxigênio e enxofre presentes na constituição dos alimentos podem ser utilizados como isótopos estáveis para detectar a autenticidade de alimentos.

As técnicas envolvendo essas moléculas são talvez as mais específicas e os métodos mais sofisticados para determinar a origem dos alimentos (REID; O'DONNELL; DOWNEY, 2006).

No entanto, uma aplicação mais generalizada é impedida pelos custos relativamente elevados de aquisição e execução dos instrumentos (SUN, 2008).

2.4.4 Enzimas na autenticação de alimentos

As enzimas são encontradas e utilizadas em vários aspectos na análise de alimentos. Pois, são responsáveis pela formação de um grande número de componentes nos alimentos, tais como os ácidos orgânicos, açúcares e aminoácidos (SUN, 2008). Além de serem baratos, estes ensaios normalmente exigem uma amostra mínima para execução. Apesar das muitas vantagens desta técnica, a análise enzimática não permite a determinação simultânea de dois componentes da amostra, em oposição a outros métodos. Além disso, devido à natureza protéica das enzimas, quaisquer compostos que interagem com proteínas também pode inibir a atividade das enzimas e, assim, prejudicar as medições. O tanino seria um exemplo (REID; O'DONNELL; DOWNEY, 2006; SUN, 2008; SONG; XUE; HAN, 2011).

As enzimas estão envolvidas na determinação de diversos alimentos usando ensaio imunoenzimático de ligações por enzima (ELISA). Os ensaios são baseados na medição da ligação do antígeno (analito) com o anticorpo correspondente (SUN, 2008). A ação da enzima, que está marcada para o anticorpo (ou, em algumas modificações do ensaio, ao antígeno) é utilizada como uma reação auxiliar para quantificação (BONWICK; SMITH, 2004). Porem, em análises de

detecção de adição de leite bovino em caprino, o limite de detecção é de dois por cento na amostra, o que representa um limiar adequado para análises em larga escala de produtos lácteos (SONG; XUE; HAN, 2011). Mas, não identifica más condições de práticas de fabricação.

2.4.5 Técnicas eletroforéticas

Dentre as diferentes técnicas analíticas que podem ser empregadas para analisar os alimentos e compostos alimentares, o uso de eletroforese surgiu como uma boa ferramenta que pode ser utilizada em alimentos nos laboratórios de regulamentação como uma técnica de análise complementar de outras mais tradicionais ou novos procedimentos analíticos, devido às múltiplas vantagens analíticas que esta técnica proporciona (CASTANEDA; RODRIGUEZ-FLORES; RIOS, 2005). Assim, a eletroforese oferece análise de alta velocidade, grande variedade de aplicações, reduzido consumo de amostra e solventes, e automatização. Sendo uma grande variedade de moléculas, incluindo pequenos íons, aminoácidos, carboidratos, ácidos orgânicos, vitaminas, lipídios, flavonóides, aditivos, contaminantes, peptídeos, proteínas e fragmentos de DNA, que podem ser analisados usando técnicas eletroforéticas (CIFUENTES, 2006).

Esta técnica consiste em um esquema com uma instrumentação básica necessária para a separação de diferentes moléculas que são chamados de *analitos*. É realizada no interior do capilar, que geralmente é feito de sílica fundida. Os *analitos* são separados com base na sua mobilidade eletroforética diferente sob a influência de um campo elétrico, de passar para o ponto de detecção de bandas como puro. Esta técnica também permite análise quantitativa. Porem fornece limites de detecção pobres, tornando-se difícil sua aplicação na análise de vestígios ou pequenas quantidades (CASTANEDA; RODRIGUEZ-FLORES; RIOS, 2005; CIFUENTES, 2006, PESIC *et al*., 2011) As técnicas eletroforéticas utilizadas na detecção de adição de leite bovino em leite caprino tem a vantagem de serem de baixo custo, quando comparadas aos demais instrumentos utilizados para este fim. Porem, eletroforese pode oferecer resultados falsos negativos quando o leite for

submetido a processos térmicos que promovem desnaturação protéica (PESIC *et al*., 2011).

2.4.6 Métodos baseados em DNA na autenticação alimentos

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica biológica extremamente poderosa que permite a detecção de material genético mesmo que estejam presentes em quantidades muito baixas, e a determinação da seqüência desses ácidos nucléicos através da amplificação de DNA (DALMASSO *et al*., 2011; MAFRA *et al.,* 2007;).

Como o leite cru e pasteurizado de glândulas mamárias saudáveis contém um grande número de células somáticas (1,6 x 10^5/ mL no leite cru; 8,5 x 10^3/mL no leite pasteurizado), as quais contêm DNA genômico e mitocondrial adequado para amplificação por PCR, a persistência destas células somáticas presentes no leite durante processos térmicos ou maturação em produção de queijos, tem permitido o uso de PCR para distinguir as espécies de origem com êxito (DÍAZ *et al.*, 2007; LÓPEZ-CALLEJA *et al*., 2005).

A PCR tem a vantagem de garantir alta sensibilidade e desempenho rápido, com números elevados de amostras a serem processadas automaticamente (DALMASSO *et al*., 2011; DE LA FUENTE; JUAREZ, 2005). Além disso, a PCR é um método baseado em material resistente, ou seja, não está tão vulnerável a alterações provocadas pelo tempo, local de armazenamento, ou variações de temperatura e etc.

Para se obter sucesso no método de amplificação do DNA, depende-se de um protocolo de extração eficiente desse DNA, o que deve proporcionar uma elevada qualidade e quantidade de material genético, porem os produtos alimentares são estruturas complexas que poderiam conter uma série de inibidores de PCR tais como polissacarídeos, polifenóis e proteínas (MAFRA; FERREIRA; OLIVEIRA, 2008; TERRY; HARRIS; PARKERS, 2002). Além disso, os alimentos são geralmente submetidos a uma ou mais etapas de processamento, tais como mecânica, térmica, química ou tratamento enzimático, que afetam a

integridade do DNA. Conseqüentemente, o isolamento de DNA de alimentos pode às vezes ser um desafio para a análise dos alimentos.

A utilização desta metodologia nos produtos lácteos limitava-se a detecção de bactérias contaminantes, porem nos últimos anos tem sido aplicada no controle da autenticidade e identificação entre espécies relevantes para a indústria leiteira, pelo fato deste grupo alimentar fornecer alta contagem de células somáticas, em especial o leite caprino que possui contagem de células somáticas superior ao leite bovino. Por isto é possível utilizar o leite como uma fonte de DNA e como substrato para a PCR (LUYKX; RUTH, 2008; MAFRA *et al.,* 2004; ANDRADE *et al.*, 2001).

A PCR é capaz de identificar diferentes substâncias em um mesmo ensaio, como por exemplo, leite de vaca, cabra e ovelha em produtos lácteos (BAI *et al*., 2009; BOTTERO *et al*., 2003) E, também a detecção e quantificação de espécies semelhantes como derivados mistos de leite bovino e bubalino (DALMASSO *et al*., 2011). Desde que os oligonucleotídeos iniciadores de PCR, também denominados *primers*, específicos para cada espécie sejam concebidos de modo a resultar em fragmentos de diferentes tamanhos. Através desta técnica é possível encontrar limiares de detecção a partir de 0,1% por amostra (BOTTERO *et al*., 2003; MAYER, 2005; LÓPEZ-CALLEJA *et al*., 2007a).

2.4.7 Considerações entre os principais métodos

Os métodos imunológicos, cromatográficos e eletroforéticos foram avaliados quanto à sensibilidade e as limitações. E concluiu-se que alguns destes, apesar de altamente sensíveis, apresentam limitações aplicativas ou, até mesmo, técnicas, como alto custo, dificuldade de execução e demora na obtenção de resultados (RAMOS; JUARÉZ, 1985; DIAS *et al.*, 2009).

Constatou-se que, apesar de ambas as técnicas PCR e ELISA indireto permitirem a detecção de baixos percentuais de leite de vaca. A PCR combina sensibilidade e especificidade, e detecta DNA bovino, independentemente da sua fonte, enquanto que o teste de ELISA indireto pode fornecer resultados

errôneos se a adulteração for feita com soro de leite bovino, pois este é mais sensível a processamento térmico (LÓPEZ-CALLEJA *et al*., 2007b).

A reação em cadeia da polimerase mostra-se como uma alternativa confiável, rápida e sensível para assegurar autenticidade em produtos lácteos. Quando comparado a técnicas cromatográficas e eletroforéticas. Pois, além de proporcionar o menor limiar de detecção, possui sensibilidade elevada, permitindo que sejam detectados até 0,1% de componentes na amostra (MAYER, 2005).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Desenho experimental

O experimento foi realizado no Laboratório de Avaliação de Produtos de Origem Animal (LAPOA) no Centro de Ciências Agrárias (UFPB), em duas etapas. Sendo a primeira a padronização da técnica de PCR em leite caprino produzido de espécies nativas, e em seguida a análise em amostras coletadas de agricultores familiares, que realizam o fornecimento de leite caprino para programa governamental do estado da Paraíba.

3.1.1 Etapa I: Padronização da técnica de PCR para detecção de leite

Para padronizar a técnica de PCR em leite caprino foram coletadas amostras de leite nos setores de caprinocultura e bovinocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal da Paraíba, sendo estas retiradas da ordenha da manhã, conforme protocolo local de trabalho. Armazenadas em frascos estéreis, foram transportadas por um curto espaço de tempo, cerca de dois a três minutos em média, ao laboratório de Avaliação de produtos de origem animal (LAPOA). Em seguida, procedeu-se a mistura quantificada das espécies de leite. Seguindo os percentuais descritos por Mayer (2005) que são: 0%, 0,1%, 0,5%. 1%, 5%, 10%, 50%, 100% de leite bovino em leite caprino. Estas inoculações foram feitas em tubos de ensaio em um total de 10 mL de leite e armazenadas sob refrigeração até a realização da extração de DNA. Em curto espaço de tempo.

3.1.2 Etapa II: Aplicação da técnica para avaliação de amostras de leite caprino

As amostras utilizadas para análise foram amostras de leite de conjunto *in natura*, coletadas de quatro usinas de beneficiamento de leite caprino (UBL) que se localizam na microrregião ocidental do Cariri paraibano. Esta região apresenta solos pedregosos com reduzida capacidade de retenção hídrica, clima seco, índices pluviométricos baixos, altas temperaturas e taxas de insolação anuais. A vegetação é de Caatinga do tipo arbustivo-arbórea (LUCENA; PACHECO, 2007). Foram selecionadas estas UBLs por serem as mini-usinas que tem a produção mais significativa de leite caprino no estado. Coletou-se 160 amostras de diferentes produtores, todos praticavam ordenha manual e sistema de produção extensivo. A quantidade de amostras foi colhida com base em 40% do número total de produtores cadastrados nas UBLs.

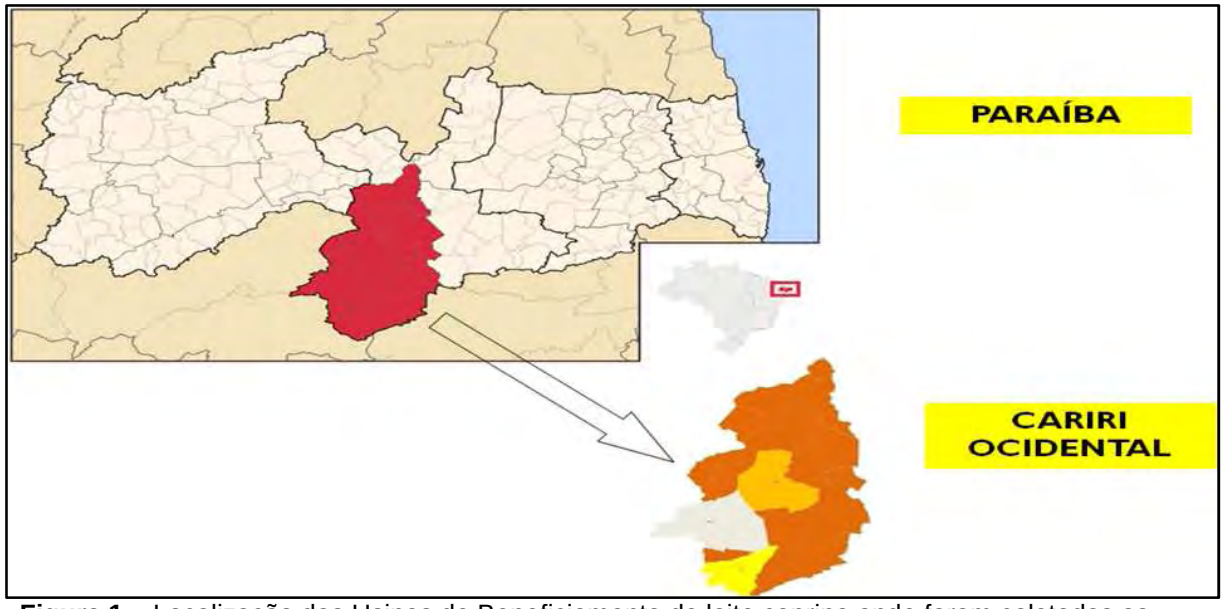

Figura 1 – Localização das Usinas de Beneficiamento de leite caprino onde foram coletadas as amostras para o estudo



Figura 2 – Sistema de produção de leite caprino nas Usinas de beneficiamento da região ocidental do Cariri paraibano

3.2 Extração de DNA

O DNA genômico das amostras de leite foi extraído conforme protocolo descrito por Bania *et al.* (2001) com algumas modificações, que utilizou extração por fenol, substância orgânica capaz de dissolver substâncias apolares ou fracamente polares presentes na amostra, deixando o DNA livre em solução aquosa. Para avaliar a pureza e qualidade do DNA extraído utilizou-se o biofotômetro (Biophotometer Plus, Eppendorf). Também foram testados outros métodos como o método por fervura descrito por Soumet *et al*. (1994), que consiste, basicamente, em submeter a amostra à temperaturas elevadas fazendo que a água presente na matriz celular entre em ebulição liberando o material genômico do seu interior. Foi utilizado um kit de extração (Invitek, Alemanha) que tem como base de extração a utilização de membranas que, através de substâncias adicionadas a amostra promovem a lise do material, liberam o DNA e este fica retido na membrana até o processo final de lavagem quando o material genético é liberado para o meio que já está livre de outras substâncias.

3.2.1 Protocolo de extração por fervura (SOUMET *et al*., 1994)

Alíquotas (1 mL) foram centrifugadas a 6.000 x g por 15 minutos e em seguida o sobrenadante foi descartado e a amostra diluída em 300 μL de água deionizada autoclavada com o auxílio do vortex. As amostras foram, então, incubadas em banho-maria a 100ºC por 10 minutos e posteriormente centrifugadas a 12.000 x g por 30 segundos e o sobrenadante posto em um novo microtubo.

3.2.2 Protocolo de extração por fenol-clorofórmio (BANIA *et al*., 2001) com modificações

Amostras (400 μL) de leite individuais foram misturados com 200 μL de tampão de digestão composto por Tris-HCl, 200 mM e pH 8, EDTA 100 mM, SDS 1% e 60 μg de proteinase K. A mistura foi incubada por 1 hora a 55 ° C e em seguida extraída duas vezes com volume igual de fenol-clorofórmio-álcool Isoamílico (25:24:1) e uma vez com um volume igual de clorofórmio. Após a adição de 30 μL de acetato de amônio a 7,5 M, o DNA foi precipitado com dois volumes de etanol e peletizado por centrifugação a 12.000 x g por 2 min. O precipitado foi seco e novamente dissolvido em tampão TE (Tris-HCI 10 mM e pH 8, EDTA, 1mM).

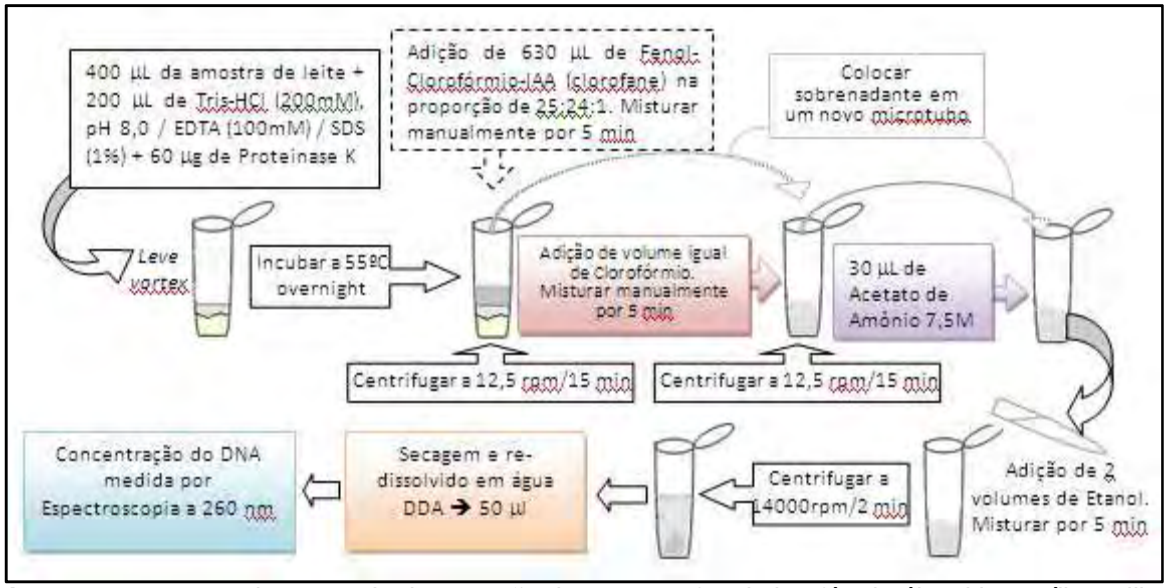

Figura 3 – Esquema do protocolo de extração de DNA por fenol-clorofórmio-álcool isoamílico utilizado na pesquisa

3.2.3 Protocolo de extração com kit comercial (Invitek, Alemanha)

A extração foi realizada conforme protocolo fornecido pelo fabricante. Alíquotas de 500 µL foram digeridas em 100 µL de tampão de lise adicionado de 10 µL de proteinase K e 20 µL de carreador de RNA, e incubadas em banho-maria a 56ºC por uma noite. Posteriormente, acrescentou-se 200 µL de tampão de ligação B6 misturando-se às amostras com o auxilio da pipeta e transferindo para microtubos que contém filtros fornecidos. Centrifugou-se a 13000 x g por um minuto e adicionou-se 300 µL de tampão de lavagem I, em seguida centrifugaram-se as amostras por 2 minutos a 13000 x g, por duas vezes, e então os tubos de recepção foram descartados e os filtros colocados em novos microtubos de recepção quando se acrescentou 600 µL de tampão de lavagem II e procedeu-se a centrifugação por 2 minutos a 13000 x g, repetindo a centrifugação duas vezes, então se colocou os filtros em um microtubo eppendorf de 1,5 mL e acrescentou-se 60 µL de Tampão de eluição D à temperatura de 56ºC, após repouso por um minuto

em temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 6000 x g por 1 minuto, os filtro foram descartados

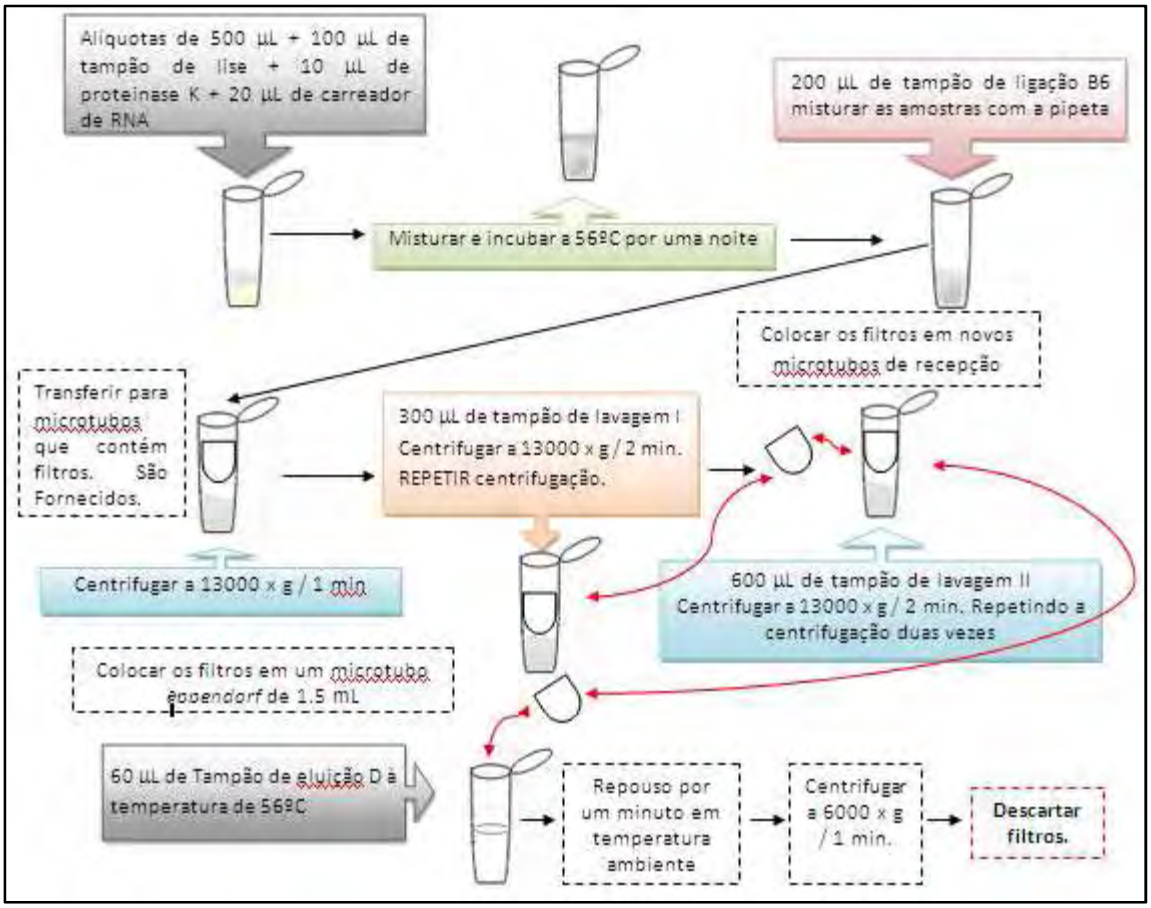

Figura 4 – Esquema do protocolo de extração de DNA pelo kit comercial (Invitek, Alemanha) utilizado na pesquisa

3.3 Avaliação do DNA extraído

Conforme já mencionado, procedeu-se à avaliação quali-quantitativa do DNA utilizando-se biofotômetro (Biophotometer Plus, Eppendorf, Alemanha). Que mediu a qualidade e quantidade das amostras de DNA com base no grau ou nível de absorbância que cada uma delas apresentou.

3.4 Amplificação do DNA pela PCR

Foi realizada uma PCR duplex (d-PCR) contendo oligonucleotídeos iniciadores para detecção de DNA bovino e DNA caprino descritos por Kotowicz; Adamczyk; Bania (2007) conforme tab.2 a seguir:

Tabela 2 – Oligonucleotídeos iniciadores para detecção simultânea de leite caprino e leite bovino por duplex-PCR

Iniciadores	Nº de acesso no GenBank	Localização no genoma mitocondrial	Sequência (5'→3')	Tamanho do produto
BosD-F	V00654	15856-15887	CAATAACTCAACACAGAATTTGC	300 pb
BosD-R		16135-16156	CGTGATCTAATGGTAAGGAATA	
GoaD-F	AF533441	16043-16060	CCAACATGCGTATCCCGT	444 pb
GoaD-R		16468-16487	AGCGGATGCATGATGAAATG	

A reação foi montada com tampão de reação 1x, $MgCl_2$ 1,5 mM, 0,8 μM do fragmento iniciador para DNA bovino e 0,2 μM do fragmento iniciador para DNA caprino, 0,2 mM de cada dNTP, 1 unidade de Taq DNA polimerase e 50 a 150 ng de DNA, para um volume final de 25 μL. O programa utilizado foi realizado em termociclador (Techne TC3000) e incluiu 35 ciclos de 95ºC por 30 segundos, 52ºC por 30 segundos e 72ºC por 2 minutos, com uma desnaturação inicial de 95ºC por 10 minutos e extensão final de 72ºC por 5 minutos.

Alternativamente foi avaliado protocolo descrito por Matsunaga *et al*. (1999), no qual foram utilizados iniciadores para a seqüência direta comum SIM (5-GACCTCCCAGCTCCATCAAACATCTCATCTTGATGAAA-3) e as seqüências reversas específicas para caprino (5-CTCGACAAATGTGAGTTACAGAGGGA-30) e bovino (5-CTAGAAAAGTGTAAGACCCGTAATATAAG-3). Considerados fragmentos iniciadores clássicos na detecção de produtos alimentares de origem bovina e outras espécies. Inicialmente criados para análises em produtos cárneos. E, posteriormente utilizados para leite e derivados. Sendo amplamente utilizado em estudos na Europa e Ásia.

3.5 Eletroforese em gel de agarose

Para a visualização dos resultados da PCR, denominados amplificados, utilizou-se gel com concentração de agarose em 1,5% elaborado em tampão TAE (Tris-Acetato de EDTA) e submetidos a uma corrente elétrica de 70 V, por aproximadamente 50 minutos. Em seguida, era realizada a coloração do gel com GelRed (Biotium), corante fluorescente substituto ao brometo de etídio, possuindo o mesmo espectro, e alega não ser citotóxico, nem mutagênico.

A presença ou ausência de bandas específicas para as espécies em questão foram analisadas visualmente e os resultados visualizados em sistema de fotodumentação (Bioagency T36M).

REFERÊNCIAS

ANDRADE, P.V.D.; SOUZA, M.R.; BORGES, I.; PENNA, C.F.A.M. Contagem de células somáticas em leite de cabra. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia,** v.53 n. 3, 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352001000300021&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 02 Mar. 2011.

BAI, W.; XU, W.; HUANG, K.; YUAN, Y.; CAO, S.; LUO, Y. A novel common primer multiplex PCR (CP-M-PCR) method for the simultaneous detection of meat species. **Food Control**, v. 20, p. 366-370, 2009.

BANIA, J.; UGORSKI, M.; POLANOWSKI, A.; ADAMCZYK, E. Application of polymerase chain reaction for detection of goats' milk adulteration by milk of cow. **Journal of Dairy Research**, v. 68, p. 333-336, 2001.

BATISTA FILHO, M. **Segurança Alimentar no semi-árido**. Disponível em: <www.comciencia.br>. Acesso em 24 de novembro de 2009.

BONWICK, G. A.; SMITH, C. J. Immunoassays: their history, development and current place in food science and technology. **International Journal of Food Science and Technology**, n. 39, p. 817-827, 2004.

BOTTERO, M. T.; CIVERA, T.; NUCERA, D.; ROSATI, S.; SACCHI, P.; TURI, R. M. A multiplex polymerase chain reaction for the identification of cows', goats' and sheep's milk in dairy products. **International Dairy Journal,** v. 13, p. 277–282, 2003.

BOTTERO, M. T.; DALMASSO, A. Animal species identification in food products: Evolution of biomolecular methods. **The Veterinary Journal**, v. xxx, p. xxx–xxx, 2010.

BRASIL. **Código penal**. Organização dos textos, notas remissivas e índices por Juarez de Oliveira. 33. ed. São Paulo: Saraiva, 1995.

BRASIL. Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal.
Aprovado pelo decreto nº 30.691, de 29/03/52, alterado pelo decreto nº 1.255, de 25/06/62, alterado pelo decreto nº 1.812, de 08/02/96. **Diário Oficial da União**, Brasília, 09/02/96, seção I, p. 2241-2243, 1996.

BRESSAN, M.; MARTINS, M. C. Segurança alimentar na cadeia produtiva do leite e alguns de seus desafios. **Revista de Política Agrícola,** EMBRAPA, Brasília, v. 13, n.3, 2004.

CARNEIRO, H. Leite de cabra. Panorama do leite online. Embrapa gado de leite, Minas Gerais, ano 5, n. 50. Jan. 2011. Disponível em: <http://www.cileite.com.br/content/leite-de-cabra>. Acesso em: 11 mar. 2011.

CARVALHO. R. B. Potencialidades dos Mercados para os Produtos Derivados de Caprinos e Ovinos. Disponível em: <http://www.capritec.com.br/artigos.htm>. Acesso em: 05 mar. 2011.

CASTANEDA, G.; RODRIGUEZ-FLORES, J.; RIOS, A. Analytical approaches to expanding the use of capillary electrophoresis in routine food analysis**. Journal of Separation Science,** v. 28, p. 915-924, 2005.

CIFUENTES, A. Recent advances in the application of capillary electromigration methods for food analysis. **Electrophoresis,** v. 27, p. 283-303, 2006.

COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS. Livro Branco sobre a segurança dos alimentos. **Documento final**. Bruxelas, 2000, 61p.

CONSELHO NACIONAL DE SEGURANÇA ALIMENTAR E NUTRICIONAL (CONSEA). **III Conferência Nacional de Segurança Alimentar**. Documento Final. Fortaleza, CE, 2007.

CORTEZ, A. P. B.; MEDEIROS, L. C. S.; SPERIDIÃO, P. G. L.; MATTAR, R. H. G. M., FAGUNDES NETO, U.; MORAIS, M. B. Conhecimento de pediatras e nutricionistas sobre o tratamento da alergia alimentar ao leite de vaca no lactente. **Revista paulista de Pediatria,** v. 25, p. 106–113, 2007.

COSTA, A. L. Leite caprino: um novo enfoque de pesquisa. **EMBRAPA Caprinos,** Dez. 2005. Disponível em: <http://www.portaldoagronegocio.com.br/conteudo.php?id=23103> Acesso em 02/03/2011.

DALMASSO, A.; CIVERA, T.; LA NEVE, F.; BOTTERO, M. T. Simultaneous detection of cow and buffalo milk in mozzarella cheese by Real-Time PCR assay. **Food Chemistry.** v. 124, p. 362–366, 2011.

DE LA FUENTE, M. A.; JUAREZ, M.. Authenticity Assessment of Dairy Products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition,** v. 45, p. 563-585, 2005.

DIAS, L. A.; PERES, A. M.; VELOSO, A. C. A.; REIS, F. S.; VILAS-BOAS M.; MACHADO, A. A. S. C. An electronic tongue taste evaluation: Identification of goat milk adulteration with bovine milk. **Sensors and Actuators,** v. 136 p. 209–217, 2009.

DÍAZ, I. L.; ALONSO, I. G.; FARJADO, V.; MARTÍN, I.; HERNÁNDEZ, P.; LACARRA, T. G.; SANTOS, R. M. Application of a polymerase chain reaction to detect adulteration of ovine cheeses with caprine milk. **European Food Research and Technology**. v. 225, p. 345–349, 2007.

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

FAOSTAT- Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/569/DesktopDefault.aspx?PageID=569#ancor>. Acesso em 04 de mar. 2011.

FISBERG, M.; NOGUEIRA, M.; FERREIRA, A. M. A.; FISBERG, R. M. Aceitação e tolerância de leite de cabra em pré-escolares. **Pediatria moderna**, v. 35, n. 7, 1999.

FURTADO, M. M. Leite de Cabra: características especiais. Seu uso na alimentação. Intolerancia. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes,** v. 10, p. 31-37, 1981.

GONÇALVES, A. L.; LANA, R. P.; VIEIRA, R. A. M.; HENRIQUE, D. S.; MANCIO, A. B.; PEREIRA, J. C. Avaliação de sistemas de produção de caprinos leiteiros na Região Sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 2, p. 366-376, 2008.

GOVERNO DO ESTADO DA PARAÍBA. Secretaria de Estado do Desenvolvimento Humano. Disponível em: <http://www.paraiba.pb.gov.br/index.php?option=com_content&task=view&id=30777&Itemid=2 >. Acesso em: 23 de fevereiro de 2011.

HAENLEIN, G. F. W. Goat milk in human nutrition. **Small Ruminant Research**, v. 1, n. 51, p. 155-63, 2004.

HE, L.; BEESLEY, T. E. Applications of enantiomeric gas chromatography: a review. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies,** v. 7, n. 8, p. 1075-1114, 2005.

HOFF, D. N.; BRUCH, K. L.; PEDROZO, E. A. Desenvolvimento de nichos de mercado para pequenos negócios: leite e laticínios de cabras e ovelhas em Bento Gonçalves, RS**. Teoria e Evidência Econômica,** v. 14, n. 28, p. 128-154, 2007.

HURLEY, I. P.;COLEMAN, R. C.; IRELAND, H. E.; WILLIAMS, J. H. H. Use of sandwich IgG ELISA for the detection and quantification of adulteration of milk and soft cheese. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 805–812, 2006.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo agropecuário**: banco de dados, 2006. Disponível em: < http://www.ibge.gov.br/estadosat/ >. Acesso em: 03 mar. 2011.

ITO, Y. Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography,** v. 1065, p. 145–168, 2005.

KOTOWICZ, M.; ADAMCZYK, E.; BANIA, J. Application of a duplex-PCR for detection of cows' milk in goats' milk. **Annals Agricultural Environmental Medicine,** v. 14, p. 215-218, 2007.

LE GALL, G., COLQUHOUN, I.J. NMR spectroscopy in food authentication. **Food Authenticity and Traceability,** p.131-148, 2003.

LEARDI , R. Nature-Inspired Methods in Chemometrics: Genetic Algorithmsand Artificial Neural Networks. **The Data Handling in Science and Technology Series**, v. 23, 2003.

LEHOTAY, S.J.; HAJŠLOVA, J. Application of gas chromatography in food analysis**. Trends in Analytical Chemistry**, v. 21 , p. 686-697, 2002.

LÓPEZ-CALLEJA, I. M.; ALONSO, G.; FARJADO, V.; RODRIGUEZ, M. A.; HERNÁDEZ, P. E.; GARCÍA, T.; MARTÍN, R. PCR detection of cows' milk in water buffalo milkand mozzarella cheese. **International Dairy Journal**. v.15, p. 1122–1129, 2005.

LÓPEZ-CALLEJA, I. M.; GONZÁLEZ, I.; FARJADO, V.; MARTÍN, I.; HERNÁDEZ, P. E.; GARCÍA, T.; MARTÍN, R. Real-time TaqMan PCR for quantitative detection of cows' milk in ewes' milk mixtures. **International Dairy Journal**. v.17, p. 729–736, 2007a.

LÓPEZ-CALLEJA, I. M.; GONZÁLEZ, I.; FARJADO, V.; HERNÁDEZ, P. E.; GARCÍA, T.; MARTÍN, R. Application of an indirect ELISA and a PCR technique for detection of cows' milk in sheep's and goats' milk cheeses. **International Dairy Journal**. v.17, p. 87-93, 2007b.

LUCENA, R. L.; PACHECO, C. O cariri paraibano: aspectos geomorfológicos, climáticos e de vegetação. In: *Encuentro de Geografos da America Latina-EGAL, 12., 2009, Montevideo, **Resumos**…*

LUIZ, M. T. B.; DRUNKLER, D. A.; HENN, R.; FETT, R. Leite de cabra: hipoalergenicidade, composição química e aspectos nutricionais. **Revista do Instituto de Latícinios Cândidos Tostes**. v. 54, n. 306, p. 23-31, 1999.

LUYKX, D.M.A.M.; RUTH, S.M. An overview of analytical methods for determining the geographical origin of food products. **Food Chemistry**. v. 107, p. 897-911, 2008.

MAFRA, I.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O.; FARIA, M. A.; OLIVEIRA, B. P. P. A Novel Approach to the Quantification of Bovine Milk in Ovine Cheeses Using a Duplex Polymerase Chain Reaction Method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. V. 52, p. 4943-4947, 2004.

MAFRA, I.; ROXO, A.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O.; OLIVEIRA, M. B. P. P. 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.

MAFRA, I.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Food authentication by PCR-based methods. **European Food Research and Technology**. v. 227, p. 649–665, 2008.

MATSUNAGA, T.; CHIKUNI, K.; TANABE, R.; MUROYA, S.; SHIBATA, K.; YAMADA, J.; SHINMURA, Y. A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. **Meat Science**. v. 51, p. 143-148, 1999.

MAUDET, C.; TABERLET, P. Detection of cow' milk in goats' cheeses inferred from mitocondrial DNA polymorphism. **Journal Dairy Research**. v. 68, p. 220-235, 2001.

MAYER, H. K. Milk species identification in cheese varieties using electrophoretic, chromatographic and PCR techniques. **International Dairy Journal**. V. 15, P. 595–604, 2005.

MEDEIROS, L. P.; GIRÃO, R. N.; GIRÃO, E. S.; PIMENTEL, J. C. N. Caprinos: princípios básicos para sua exploração. Teresina: **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária,** Brasília, 1994. 177p.

MICHAELIDOU, A.M. Factors influencing nutritional and health profile of milk and milk products. **Small Ruminant Research**. v. 79, p. 42-50, 2008.

MININNI, A. M.; PELLIZZARI, C.; CARDAZZO, B.; CARRARO, L.; BALZAN, S.; NOVELLI, E. Evaluation of real-time PCR assays for detection and quantification of fraudulent addition of bovine milk to caprine and ovine milk for cheese manufacture. **International Dairy Journal.** v.19, p. 617–623, 2009.

PANDYA, A.J. GHODKE, K.M.Goat and sheep milk products other than cheeses and yoghurt. **Small Ruminant Research**, v. 68, P. 193–206, 2007.

PARK, Y. W.; JUAREZ, M.; RAMOS, M.; HAENLEIN, G. F. W. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. **Small Ruminant Research**, v. 68, p. 88-113, 2007.

PESIC, M.; BARAC, M.; VRVIC, M.; RISTIC, N.; MACEJ, O.; STANOJEVIC, S. Qualitative and quantitative analysis of bovine milk adulteration in caprine and ovine milks using native-PAGE. **Food Chemistry,** v. 125, p. 1443–1449, 2011.

PRODUÇÃO de leite dobra na Paraíba. **O leite**, Paraíba, p. 1, ago. 2010. Disponível em: <http://www.oleite.com.br > Acesso em: 25 de março de 2011.

RAMOS, M.; JUARÉZ, M. Estado actual de los metodos analiticos existentes para detectar mezclas de leche de vaca, oveja y cabra. **Revista Española de Lecheria**, Madrid, n.4, p.5-12, 1985

REID, L. M.; WOODCOCK, A.; O'DONNELL, C. P.; KELLY, J. D.; DOWNEY, G. Differentiation of apple juice samples on the basis of heat-treatment and variety using chemometric analysis of MIR and NIR data. **Food Research International**, v. 38, p. 1109-1115, 2005.

REID, L. M.; O'DONNELL, C. P.; DOWNEY, G. Recent technological advances for the determination of food authenticity. **Food Science & Technology,** v. 17, p. 344–353, 2006.

SONG, H.; XUE, H.; HAN, Y. Detection of cow's milk in Shaanxi goat's milk with an ELISA assay. **Food Control,** v. 22, p. 883-887, 2011.

SOUMET, C.; ERMEL, G.; FACH, P.; COLIN, P. Evaluation of different DNA extraction procedures for the detection of Salmonella from chicken products by polymerase chain reaction. **Letters in Applied Microbiology**, v. 19, p. 294-298, 1994.

STRASBURG, G.M.; LUDESCHER, R.D. Theory and applications of fluorescence spectroscopy in food research. **Trends in Food Science & Technology**, n. 6, p. 69-75, 1995.

SUN, DA-WEN. **Modern techniques for food authentication,** 1ª ed. Irlanda: Editora AP, 2008. 689p.

TEUTEBERG, H. J. Die Verfälschung von Nahrungs- und Genußmitteln und die Anfänge eines einheitlichen staatlichen Lebensmittelschutzes in Deutschland. **Zeitschrift für Ernährungswissenschaft,** v. 34, p. 95-112, 1995.

VERKAAR, E.; NIJMAN, I.; BOUTAGA, K.; LENSTRA, J. Differentiation of cattle species in beef by PCR-RFLP of mitochondrial and satellite DNA. **Meat Science,** v. 60, p. 365–369, 2002.

VIERIA, M. C.; TOPOROVSKI, M.; MORAIS, M. B.; SPOLIDORO, J. V.; FONSECA, M. C. M.; ARAÚJO, G. T. B. Cow's Milk allergy in children: a survey on its main features in Brazil. Journal **of Parenteral and Enteral Nutrition,** v.1, p. 27-31, 2005

VOLITAKI, A. J.; KAMINARIDES, S.E. Detection of bovine milk in bovine Halloumi cheese by HPLC analysis cheese caseins hydrolysed by plasmin. **Milchwissenschaft International**, v. 56, n. 4, p. 207-210, 2001.

APÊNDICE

APENDICE – ARTIGO

PCR COMO FERRAMENTA NA DETECÇÃO DE ADIÇÃO DE LEITE BOVINO EM LEITE CAPRINO DE ESPÉCIES BRASILEIRAS.

PCR AS A TOOL IN DETECTION OF ADDITION OF BOVINE MILK IN GOAT MILK OF BRAZILIAN SPECIES.

Artigo elaborado a partir dos resultados obtidos da presente dissertação, a ser submetido ao ***Brazilian Journal of Veterinary and animal Sciences***
ISSN 0102-0935, qualis B2 (ano-base: 2008), área: Medicina II

PCR como ferramenta na detecção de adição de leite bovino em leite caprino de espécies brasileiras.

PCR as a tool in detection of addition of bovine milk in goat milk of Brazilian species.

Noádia Priscila A. Rodrigues[1], Rita de Cássia Ramos do Egypto Queiroga[2], Celso José Bruno de Oliveira[3] e-mail:celso.oliveira@pq.cnpq.br

[1] Aluna do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, CCS/UFPB
[2] Professor Adjunto do Departamento de Nutrição, CCS/UFPB
[3] Professor Adjunto do Departamento de Zootecnia, CCA/UFPB

RESUMO

O leite caprino tem se estabelecido no mercado nacional. Estudos já comprovam a garantia da sua contribuição para a segurança alimentar e nutricional, principalmente para grupos específicos da população como idosos, atletas e crianças. Este trabalho teve como objetivo disponibilizar a reação em cadeia da polimerase (PCR) para detectar a presença de leite bovino adicionado ao leite caprino, uma prática reincidente na indústria leiteira de caprinos. Utilizou-se uma d-PCR com fragmentos iniciadores propostos por Kotowicz; Adamczyk; Bania (2007) para bovinos e caprinos, gerando bandas de 300 pb e 444 pb, respectivamente, com um limiar de detecção de 0,5% de leite bovino nas amostras. Também foram testados três métodos de extração de DNA revelando que, para o leite, os melhores métodos são aqueles a base de fenol. Foram avaliadas 160 amostras provenientes de usinas de beneficiamento de leite da região ocidental do cariri paraibano e detectou-se 37,5% de presença de leite bovino nas amostras.

Palavras-chaves: leite caprino, reação em cadeia da polimerase, adulteração

ABSTRACT

The goat milk has been established in the national market. Studies already proven the guarantee of its contribution to food and nutrition security, especially for specific population groups as older people, athletes and children. This study aimed to provide the polymerase chain reaction (PCR) to detect the presence of bovine milk added to goat milk, a recurrent practice in the goat dairy industry. Was used a d-PCR with primers proposed by Kotowicz, Adamczyk, Bania (2007) for cattle and goats, producing bands of 300 bp and 444 bp, respectively, with a detection threshold of 0,5% of bovine milk in samples. Also were tested three methods of DNA extraction revealed that, for milk, the best methods are those based on phenol. We evaluated 160 samples coming from milk processing plants in western cariri paraibano and was detected presence of 37,5% of bovine milk in the samples.

Keywords: goat milk, polymerase chain reaction, adulteration

INTRODUÇÃO

O leite caprino é amplamente utilizado para o consumo doméstico em todo o mundo, o que o torna um produto de grande valor econômico em países onde rebanhos caprinos são criados em larga escala. Nos países asiáticos e africanos, especialmente na Índia, o leite caprino desempenha um papel significativo no contexto nacional e, sobretudo, na economia rural (PANDYA, GHODKE, 2007). A cadeia de produção tem passado por profundas mudanças, através da organização dos produtores em associações e dos investimentos privados e públicos. No entanto, os custos mais elevados de produção do leite caprino, podem estimular a prática da adição de leite bovino por produtores desinformados ou desonestos.

Há, portanto, uma necessidade premente de estudos que visem a validação de métodos analíticos para detecção de fraude de leite caprino com leite bovino no Brasil, uma vez que o problema já foi detectado (EGITO *et al*., 2006).

O desenvolvimento de novas e cada vez mais sofisticadas técnicas de detecção da autenticação de produtos alimentares tem surgido rapidamente com o aumento da sensibilização quanto às questões de autenticidade (REID; O'DONNELL; DOWNEY, 2006). Dentre as diversas ferramentas para detecção de fraude em alimentos, está a reação em cadeia da polimerase (PCR), que consiste basicamente em amplificar as regiões específicas do DNA de interesse. O método é aplicável na detecção da espécie de origem no leite, pois esse produto contém células somáticas (células epiteliais e leucócitos) proveniente das glândulas mamárias (ANDRADE *et al.*, 2011). A vantagem decisiva da PCR em comparação aos métodos químicos é sua rapidez, elevada sensibilidade e especificidade, além de apresentar custo relativamente baixo. Adicionalmente, por ser um método baseado em material resistente (ácidos nucléicos), não está tão vulnerável a alterações provocadas pelo tempo, local de armazenamento e variações de temperatura, fazendo com que possa ser aplicado em derivados lácteos.

Portanto, o objetivo do presente trabalho foi padronizar a técnica de PCR e avaliar a ocorrência de leite bovino em amostras de leite caprino produzido na região do Cariri paraibano.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado em duas etapas. A primeira etapa consistiu na padronização da técnica de PCR junto ao Laboratório de Avaliação de Produtos de Origem Animal (LAPOA) no Centro de Ciências Agrárias (UFPB). Foi realizado ensaio experimental em amostras de leite caprino artificialmente inoculadas com leite bovino, ambas obtidas nos setores de caprinocultura e bovinocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal da Paraíba, de acordo com protocolo descrito por Mayer (2005), contendo percentuais de leite bovino que variam de 0%, 0,1%, 0,5%,

1%, 5%, 10%, 50% e 100%. A segunda etapa consistiu na aplicação pós-padronização da técnica de PCR para avaliação de amostras de leite caprino a campo. Para tanto, amostras de leite foram coletadas junto a 160 produtores de leite na microrregião do Cariri Ocidental da Paraíba. As amostras foram mantidas sob refrigeração e transportadas ao laboratório para análise.

O estudo experimental incluiu a avaliação de três protocolos de extração de DNA:

A Termo-extração descrita por Soumet *et al.* (1994), na qual, uma alíquota de leite (1 mL) da amostra foi centrifugada a 6.000 x g por 15 minutos e, em seguida, o sobrenadante foi descartado e a amostra diluída em 300 μL de água deionizada autoclavada com o auxílio do vortex. As amostras foram, então, incubadas em banho-maria a 100 ºC por 10 minutos e, posteriormente, centrifugadas a 12.000 x g por 30 segundos. O sobrenadante foi colhido e utilizado como DNA molde.

A extração por fenol-clorofórmio, descrita por Bania *et al.* (2001), na qual, alíquotas de leite (400 μL) foram misturados com 200 μL de tampão de digestão composto por Tris-HCl, 200 mM e pH 8, EDTA 100 mM, SDS 1% e 60 μg de proteinase K. A mistura foi incubada por 1 hora a 55 ºC e, em seguida, extraída duas vezes com volume igual de fenol-clorofórmio-álcool Isoamílico com concentração na proporção de 25:24:1, e uma vez com um volume igual de clorofórmio. Após a adição de 30 μL de acetato de amônio a 7,5 M, o DNA foi precipitado com dois volumes de etanol absoluto e peletizado por centrifugação a 12.000 x g por 2 minutos. O precipitado foi seco e novamente dissolvido em tampão TE (Tris-HCI 10 mM e pH 8, EDTA, 1 mM).

O último método de extração foi realizado com um *Kit comercial* (Invitek, Alemanha) que foi realizado conforme protocolo fornecido pelo fabricante, onde alíquotas de 500 μL foram digeridas em 100 μL de tampão de lise adicionado de 10 μL de proteinase K e 20 μL de carreador de RNA, e incubadas em banho-maria a 56ºC por uma noite. Posteriormente, acrescentou-se 200 μL de tampão de ligação B6 misturando-se às amostras com o auxilio da pipeta e transferindo para microtubos que continham filtros, fornecidos pelo kit. Centrifugou-se a 13000 x g por um minuto e adicionou-se 300 μL de tampão de lavagem I, em seguida centrifugaram-se as amostras por 2 minutos a 13000 x g, por duas vezes, e então os tubos de recepção foram

descartados e os filtros colocados em novos microtubos de recepção quando se acrescentou 600 μL de tampão de lavagem II e procedeu-se a centrifugação por dois minutos a 13000 x g, repetindo a centrifugação duas vezes, então colocou-se os filtros em um microtubo *eppendorf* de 1,5 mL e acrescentou-se 60 μL de Tampão de eluição D à temperatura de 56 ºC, após repouso por um minuto em temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 6000 x g por um minuto, os filtro foram descartados.

A avaliação quali-quantitativa do DNA extraído nos três métodos avaliados foi realizada utilizando-se biofotômetro (Biophotometer Plus, Eppendorf, Alemanha).

A PCR duplex (d-PCR) foi realizada contendo oligonucleotídeos iniciadores para detecção de DNA bovino e DNA caprino descritos por Kotowicz; Adamczyk; Bania (2007), conforme Tab. 1.

Tabela 1 – Oligonucleotídeos iniciadores para detecção simultânea de leite caprino e leite bovino por duplex-PCR

Iniciadores	Nº de acesso no GenBank	Localização no genoma mitocondrial	Sequência (5'→3')	Tamanho do produto
BosD-F	V00654	15856-15887	CAATAACTCAACACAGAATTTGC	300 pb
BosD-R		16135-16156	CGTGATCTAATGGTAAGGAATA	
GoaD-F	AF533441	16043-16060	CCAACATGCGTATCCCGT	444 pb
GoaD-R		16468-16487	AGCGGATGCATGATGAAATG	

A mistura de reação foi preparada contendo tampão de reação 1x, $MgCl_2$ 1,5 mM, 0,8 μM do iniciador para DNA bovino e 0,2 μM do iniciador para DNA caprino, 0,2 mM de cada dNTP, 1 unidade de Taq DNA polimerase e 50 a 150 ng de DNA, para um volume final de 25 μL. A amplificação foi realizada em termociclador (Techne TC3000) e incluiu 35 ciclos de 95ºC por 30 segundos, 52ºC por 30 segundos e

72ºC por 2 minutos, com uma desnaturação inicial de 95ºC por 10 minutos e extensão final de 72ºC por 5 minutos.

Os produtos da d-PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% utilizando-se corrente de 70 V. A presença ou ausência de bandas específicas para as espécies em questão foram visualizadas após coloração com Gelred (Biotium) e em sistema de fotodumentação (Bioagency T36M).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A PCR apresentou sensibilidade analítica de detecção de 0,5% de leite bovino adicionado ao leite caprino (Fig. 1). A presença de adulteração nas amostras nestas quantidades pode representar falta de boas práticas de fabricação e manipulação do alimento em estabelecimentos que fornecem as duas espécies de leite. Visto que é pequena a quantidade diária fornecida por pequeno produtor. Contudo, mesmo que sejam em mínimas quantidades, pode representar riscos à saúde do consumidor. A técnica utilizada na pesquisa não quantifica a adulteração, não sendo possível identificar se a mistura trata-se apenas de más condições de operacionalização ou há uma quantidade considerável de adição, representando fraude, que é a adição de leite bovino com o intuito de obter vantagens na comercialização. Resultados semelhantes foram encontrados por Kotowicz; Adamczyk; Bania (2007), Maudet; Taberlet, (2001) utilizando a mesma técnica. E Silva (2010) que utilizou ELISA e imunocromatografia para analises de amostras da mesma região encontrou resultados similares.

Mayer (2005) concluiu que o método de PCR é mais adequado que os eletroforéticos e cromatográficos na detecção de adição de leite bovino em produtos lácteos caprinos e ovinos, pelo fato de que se podem extrair DNA adequado para análise até de produtos aquecidos e maturados. Enquanto Pesic et al. (2011) afirmam que os métodos eletroforéticos apresentam resultados falsos-negativos em lácteos processados termicamente, assim como os métodos enzimáticos, segundo Song; Sue; Hang (2011)

Bai *et al.* (2009) conseguiram detectar a presença de 0,1% de leite bovino. Bottero *et al.* (2003) utilizaram PCR multiplex na detecção concomitante de

leite de espécies bovina, caprina e ovina, com um limite de detecção de 0,5%. Isto demonstra a sensibilidade da técnica, mesmo sabendo-se que a PCR multiplex apresenta sensibilidade menor que a PCR uniplex. Isto confirma que o método utilizado na presente pesquisa, mesmo se tratando de uma multiplex, possui alta sensibilidade.

Portanto, os resultados observados no presente estudo corroboram com aqueles disponíveis na literatura sobre a PCR ser um método rápido e eficaz para identificação da espécie de origem em leites, conferindo-se grande potencial para aplicação de rotina para o controle de produtos lácteos.

A sensibilidade da PCR é relativa à quantidade de DNA isolado que, por sua vez, depende da eficácia do protocolo de extração e da abundância de células somáticas no leite, uma vez que a quantidade dessas varia de acordo com a espécie, raça e estado fisiológico dos animais. No presente trabalho houve algumas adequações no protocolo de extração, a fim de encontrar os melhores resultados de quantidade e qualidade de DNA com o menor número de inibidores para a PCR, visto que o leite é uma fonte de inibidores para esta reação. A extração por fervura não ofereceu resultados satisfatórios, provavelmente por conter muitos inibidores de PCR, pois este método consiste em explodir, por meio da ebulição do meio intracelular aquoso, as células liberando o material genético do seu interior, sem proporcionar etapas de limpeza, que retiram ao máximo, proteínas, sais e gorduras que podem inibir a PCR em várias fases. Já a extração por fenol-clorofórmio mostrou-se adequada para a realização da técnica, por proporcionar DNA de boa qualidade e quantidade adequadas para a realização da reação. O kit comercial testado, também apresentou resultados adequados, tendo este a vantagem do menor tempo de realização do processo de extração e o menor contato do pesquisador com substâncias tóxicas, como é o caso fenol e do clorofórmio.

Os resultados das análises para detecção de fraude em amostras de leite caprino produzido por agricultores familiares no Cariri paraibano detectaram que 37,5% de amostras de leite caprino continham também leite bovino. Esses resultados indicam elevada frequência de adulteração do leite caprino com leite bovino, o que é motivo de preocupação para o setor, já que a adulteração prejudica o desenvolvimento da cadeia produtiva, alem de ser um risco para a saúde do consumidor.

É preciso que os produtores assegurem a qualidade e a segurança do produto oferecido, e que não haja a busca por vantagem econômica em detrimento da adulteração de alimentos (REID; O'DONNELL; DOWNEY, 2006).

MAFRA *et al.* (2007) detectou adição fraudulenta de leite bovino em queijos de leite caprino em 15 das 17 amostras coletadas comercialmente. A identificação das espécies de origem em produtos lácteos tem se tornado cada vez mais importante no que diz respeito ao cumprimento da legislação sanitária internacional, fidelidade nas informações apresentadas ao consumidor, do ponto de vista econômico e para a saúde pública (MININNI, 2009).

Os resultados apresentados neste estudo indicam haver, na região estudada, adulteração de leite caprino por adição de leite bovino. E estes resultados corroboram com os dados encontrados por Silva (2010), que através de testes imunocromatográficos e por ELISA detectou de 35% a 37% de adulteração. Portanto, é necessário um trabalho de conscientização, e ainda, a disponibilização dessa ferramenta à associação de produtores, o que pode contribuir para a redução de fraude.

Díaz *et al*. (2007) sugerem que o método de PCR, por sua eficiência em alimentos tratados termicamente ou maturados, seja aplicado na cadeia de leite caprino afim de evitar tais fraudes.

CONCLUSÕES

A técnica de duplex PCR demonstrou limite de detecção analítica de 0,5% de leite bovino em leite caprino, podendo ser utilizada como método de rotina para detectar adulteração de leite caprino por adição de leite bovino nas mini-usinas de beneficiamento de leite brasileiras.

Os resultados apresentados neste estudo indicam haver, na região estudada, prática frequente de adição de leite bovino em leite caprino, sendo necessário um trabalho de conscientização e capacitação quanto às boas práticas de fabricação, controle de qualidade e ética na produção de alimentos seguros, e ainda, a

disponibilização da técnica às associações de produtores, o que pode contribuir para a redução de tais práticas e o desenvolvimento do setor.

REFERENCIAS

BAI, W.; XU, W.; HUANG, K.; YUAN, Y.; CAO, S.; LUO, Y. A novel common primer multiplex PCR (CP-M-PCR) method for the simultaneous detection of meat species. **Food Control**, v. 20, p. 366-370, 2009.

BOTTERO, M. T.; CIVERA, T.; NUCERA, D.; ROSATI, S.; SACCHI, P.; TURI, R. M. A multiplex polymerase chain reaction for the identification of cows', goats' and sheep's milk in dairy products. **International Dairy Journal,** v. 13, p. 277–282, 2003.

DÍAZ, I. L.; ALONSO, I. G.; FARJADO, V.; MARTÍN, I.; HERNÁNDEZ, P.; LACARRA, T. G.; SANTOS, R. M. Application of a polymerase chain reaction to detect adulteration of ovine cheeses with caprine milk. **European Food Research and Technology**. v. 225, p. 345–349, 2007.

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

KOTOWICZ, M.; ADAMCZYK, E.; BANIA, J. Application of a duplex-PCR for detection of cows' milk in goats' milk. **Annals Agricultural Environmental Medicine,** v. 14, p. 215-218, 2007.

LÓPEZ-CALLEJA, I. M.; ALONSO, G.; FARJADO, V.; RODRIGUEZ, M. A.; HERNÁDEZ, P. E.; GARCÍA, T.; MARTÍN, R. PCR detection of cows' milk in water buffalo milkand mozzarella cheese. **International Dairy Journal**. v.15, p. 1122–1129, 2005.

MAFRA, I.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O.; FARIA, M. A.; OLIVEIRA, B. P. P. A Novel Approach to the Quantification of Bovine Milk in Ovine Cheeses Using a Duplex Polymerase Chain Reaction Method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. V. 52, p. 4943-4947, 2004.

MAFRA, I.; ROXO, A.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O.; OLIVEIRA, M. B. P. P. 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.

MATSUNAGA, T.; CHIKUNI, K.; TANABE, R.; MUROYA, S.; SHIBATA, K.; YAMADA, J.; SHINMURA, Y. A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. **Meat Science**. v. 51, p. 143-148, 1999.

MAUDET, C.; TABERLET, P. Detection of cow' milk in goats' cheeses inferred from mitocondrial DNA polymorphism. **Journal Dairy Research**. v. 68, p. 220-235, 2001.

MAYER, H. K. Milk species identification in cheese varieties using electrophoretic, chromatographic and PCR techniques. **International Dairy Journal**. V. 15, P. 595–604, 2005.

MININNI, A. M.; PELLIZZARI, C.; CARDAZZO, B.; CARRARO, L.; BALZAN, S.; NOVELLI, E. Evaluation of real-time PCR assays for detection and quantification of fraudulent addition of bovine milk to caprine and ovine milk for cheese manufacture. **International Dairy Journal.** v.19, p. 617–623, 2009.

PANDYA, A.J. GHODKE, K.M.Goat and sheep milk products other than cheeses and yoghurt. **Small Ruminant Research**, V. 68, P. 193–206, 2007.

PESIC, M.; BARAC, M.; VRVIC, M.; RISTIC, N.; MACEJ, O.; STANOJEVIC, S. Qualitative and quantitative analysis of bovine milk adulteration in caprine and ovine milks using native-PAGE. Food Chemistry, v. 125, p. 1443–1449, 2011.

REID, L. M.; O'DONNELL, C. P.; DOWNEY, G. Recent technological advances for the determination of food authenticity. **Food Science & Technology,** v. 17, p. 344–353, 2006.

SILVA, R. V. S. **Detecção da presença de leite bovino no leite caprino por imunocromatografia e ELISA**. Patos: UFCG, 2010.

SONG, H.; XUE, H.; HAN, Y. Detection of cow's milk in Shaanxi goat's milk with an ELISA assay. **Food Control,** v. 22, p. 883-887, 2011.

IMAGENS

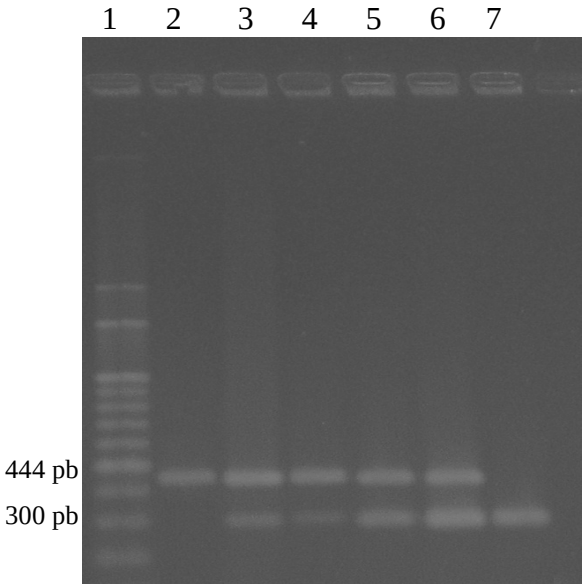

FIGURA 1 - Eletroforese em gel de agarose a 1,5% de produtos da PCR. Extração com fenol-clorofórmio. Linha 1: marcador de peso molecular 100 bp (LGC Biotecnologia); Linha 2: 0,1% de leite bovino; Linha 3: 0,5% de leite bovino; Linha 4: 1% de leite bovino; Linha 5: 5% de leite bovino; Linha 6: 10% de leite bovino; Linha 7: 100% de leite bovino. Os fragmentos gerados apresentam peso molecular de 300 pb e 444 pb para os primers bovino e caprino, respectivamente.

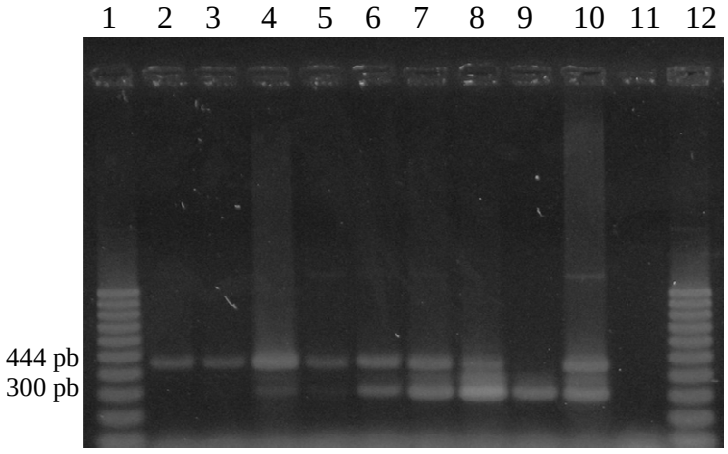

FIGURA 2 - Eletroforese em gel de agarose a 1,5% de produtos da PCR. Extração com kit comercial (Invitek, Alemanha). Linha 1: marcador de peso molecular 100 bp (LGC Biotecnologia); Linha 2: 0% de leite bovino; Linha 3: 0,1% de leite bovino; Linha 4: 0,5% de leite bovino; Linha 5: 1% de leite bovino; Linha 6: 5% de leite bovino; Linha 7: 10% de leite bovino; Linha 8: 50% de leite bovino; Linha 9: 100% de leite bovino; Linha 10: Controle positivo – 50% leite bovino extração com fenol-clorofórmio; Linha 11: controle negativo – ausência de amostra; Linha 12: marcador de peso molecular 100 bp (LGC Biotecnologia) . Os fragmentos gerados apresentam peso molecular de 300 pb e 444 pb para os primers bovino e caprino, respectivamente.