

Padronização de uma PCR multiplex para a detecção de fraude em leite bubalino e caprino por adição de leite bovino*

Standardization of a multiplex PCR for detection of fraud in buffalo and goat milk by addition of bovine milk

Joelson Sousa Lima,** Ana Paula Presley Oliveira Sampaio,*** Mylla Christy da Silva Dufossé,***
Francisco Rômulo Oliveira Magalhães,**** Carina Martins de Moraes,*** Talita Bandeira Roos***

Resumo

O consumo de leite de espécies como bubalino e caprino tem se popularizado por representarem uma alternativa para indivíduos que possuem restrições alimentares relacionadas ao leite bovino e em virtude das propriedades nutricionais desses alimentos. No entanto, fatores como a baixa produção e a sazonalidade predisõem a adulterações destes alimentos, principalmente pela adição de leite bovino, visando maior rendimento e lucratividade. Assim, o objetivo do estudo foi padronizar um método de PCR multiplex para autenticação de leites bubalino e caprino. Para isso, amostras de leite exclusivamente de cada espécie foram utilizadas para a padronização da técnica. Em seguida, foi realizada a fraude pela adição de leite bovino ao caprino e ao bubalino, em proporções de 0,1% até 100%. A técnica foi eficaz, precisa, rápida e prática para a detecção do DNA de bovino, bubalino e caprino, separadamente e em conjunto. Na fraude experimental, o limite de detecção da técnica ocorreu a partir do menor percentual testado (0,1%) tanto no leite caprino quanto no bubalino. Dessa forma, a PCR multiplex testada mostrou ser uma importante ferramenta para a autenticação de leite, pendendo ser utilizada para fins de fiscalização por órgãos competentes.

Palavras-chave: autenticação, segurança alimentar, métodos moleculares.

Abstract

Milk consumption of species such as buffalo and goat has become popular due to the nutritional properties of these foods and because they represent an alternative for individuals who have dietary restrictions related to bovine milk. However, factors such as low production and seasonality predispose to adulteration, mainly by the addition of bovine milk, aiming at higher yield and profitability. Thus, the aim of the present study was to standard a multiplex PCR method for buffalo and goat milks authentication. For this, the milks exclusively of each species were used to standardize the technique. Subsequently, fraud was performed by the addition of bovine milk to goat and buffalo in proportions from 0.1% to 100%. The technique was effective and accurate for detecting bovine, buffalo and goat DNA separately and together quickly and practically. In experimental fraud, the detection limit of the technique occurred from the lowest percentage tested (0.1%) in both goat and buffalo milk. Thus, the multiplex PCR tested proved to be an important tool for milk authentication, pending to be used for supervision by competent agencies.

Keywords: authentication, food safety, molecular methods.

Introdução

O leite é um alimento mundialmente consumido e seus derivados possuem grande aceitação. Atualmente, além do leite bovino, a produção do leite de outras espécies tem aumentado, visando atender o consumidor que vislumbra nesses produtos uma dieta saudável. O leite de búfala possui elevado valor nutricional, devido ao considerável teor de proteínas, minerais, gordura e de baixos níveis de colesterol (Araújo et al., 2011;

Pingnata et al., 2014; FAO, 2019; Pantoja et al., 2022). Nessa mesma perspectiva, o leite de cabra também chama atenção de produtores e consumidores, tanto por apresentar níveis de nutrientes elevados comparado ao leite bovino, quanto por ser bastante procurado por indivíduos que possuem condições alérgicas relacionadas ao consumo de leite de vaca (Jirilo et al., 2010; Golinelli et al., 2014; Clark e García, 2017). Na tabela 1 é possível observar algumas características nutricionais dos três tipos de leite.

*Recebido em 14 de fevereiro de 2022 e aceito em 4 de outubro de 2022.

**Universidade Federal do Pará, Campus de Castanhal, Instituto de Medicina Veterinária, Castanhal, Pará, Brasil. Autor para correspondência: joelsonbio@live.com.

***Universidade Federal do Pará, Campus de Castanhal, Instituto de Medicina Veterinária, Castanhal, Pará, Brasil.

****Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Campus de Seropédica, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil.

Tabela 1: Comparativo das propriedades nutricionais dos leites bovino, bubalino e caprino.

Composição	Bovino	Bubalino	Caprino	Referência
Proteínas (g/L)				
<i>Teor de Proteínas total</i>	27,8	49,2	33,4	(Borková e Snášelová, 2005; Rafiq et al. 2016; Khan et al., 2019)
<i>Proteínas do soro do leite</i>	6,46	6,46	6,14	
Vitaminas (mg/100g)				
<i>Vitamina A</i>	46	69	185	
<i>Vitamina B6</i>	0,04	0,33	0,046	(Singh, 2004; Barlowaska et al., 2011; Ren et al., 2015; Khan et al., 2019)
<i>Vitamina B12</i>	0,45	0,4	0,665	
<i>Vitamina C</i>	0,09	2,5	1,29	
<i>Vitamina D</i>	2,0	2,0	1,33	
Minerais (mg/100g)				
<i>Cálcio</i>	122	112	134	
<i>Fósforo</i>	119	99	121	(Sretenović et al., 2007; Barlowaska et al., 2011; Helaly et al., 2013; Khan et al., 2019)
<i>Sódio</i>	58	35	41	
<i>Ferro</i>	80	161	7,22	
Ácidos Graxos (g/100g)				
<i>Saturados</i>				
<i>ác. butanoico (C4:0)</i>	3,5	3,9	2,46	
<i>ác. octanoico (C8:0)</i>	1,2	2,41	2,53	
<i>ác. tetradecanoico (C14:0)</i>	9,3	10,64	10,16	(Tijerina-Sáenz et al., 2009; Medhammar et al., 2012; Nadeem et al., 2015; Khan et al., 2019)
<i>ác. octadecanoico (C18:0)</i>	14,3	12,58	12,51	
<i>Insaturados</i>				
<i>ác cis-octadec-9-enoico (C18:1)</i>	27,6	24,1	23,01	
<i>ác cis, cis-octadec-9,12-dienoico (C18:2)</i>	2,1	2,04	2,72	
<i>ác cis, cis, cis-octadec9,12,15-trienoico (C18:3)</i>	0,7	0,68	0,53	

Mesmo diante dos benefícios do consumo desses alimentos, as limitações com relação a disponibilidade, custo da matéria-prima e do produto acabam tornando-os potenciais alvos de fraude, o que acaba gerando prejuízos econômicos e pode causar danos à saúde do consumidor (Jung et al., 2011; Breitenbach et al., 2018; Montgomery et al., 2020).

A fraude alimentar é um ato intencional que inclui adulterações por adição, substituição de ingredientes e declarações falsas ou enganosas sobre um produto, com motivação econômica, o que gera além de dano ao consumidor, vulnerabilidade à saúde pública (Spink e Moyer, 2011). Entre os alimentos de origem animal, os produtos lácteos são alguns dos alvos mais frequentes de fraude (Zhang e Xue, 2016; Tibola et al., 2018; Montgomery et al., 2020), ratificando a necessidade do desenvolvimento de metodologias que avaliem a autenticidade destes.

A mistura de leite de diferentes espécies não declaradas é uma prática comumente observada. Isso acontece principalmente pela adição de leite bovino ao bubalino ou caprino, devido ao leite de vaca ser mais disponível e ter um custo mais baixo com relação ao das outras espécies. Em outros casos, pode até mesmo ocorrer

a fraude por substituição total de um leite por outro (López-Caleja et al., 2007; Darwish et al., 2009; Dalmaso et al., 2011). Segundo o regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal – RIISPOA, a mistura de leites é admitida, desde que na rotulagem esteja descrita a porcentagem do leite de cada espécie (Brasil, 2020). No entanto, nem sempre essa informação é fornecida ao consumidor, caracterizando uma prática fraudulenta.

Para a detecção deste tipo de fraude várias metodologias já foram adotadas, principalmente as que se baseiam em análises de proteínas, como métodos eletroforéticos e Western blot (Molina et al., 1999; Egito et al., 2006; Chávez et al., 2008). Entretanto, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), é considerada como um método alternativo de maior eficiência, quando comparado aos procedimentos que identificam proteínas, pois apresenta características importantes como maior sensibilidade, especificidade e economia de tempo e custos. Por essa razão, a referida técnica tem sido aplicada com êxito para diversas finalidades, inclusive para a detecção de fraudes por incorporação de leite de espécies diferentes daquelas especificadas no rótulo do produto (Darwish et al., 2009; Mafra et al., 2007; Silva et al., 2015; Cardoso et al., 2019).

Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi padronizar uma PCR multiplex para a detecção de leite bovino em leite bubalino e caprino e fornecer um método eficiente para as agências de fiscalização utilizarem como parte das medidas de controle de monitoramento.

Material e métodos

Para a realização do experimento foram utilizadas amostras de leite exclusivamente de cada espécie, adquiridos em propriedades rurais do município de Salvaterra (leite bubalino), Castanhal (leite bovino) e de também colhidas de animais do Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Pará (IFPA- Castanhal). Estas amostras foram utilizadas tanto para a realização da fraude experimental quanto como controle positivo, nos casos onde não foram misturadas a amostras de leite de outras espécies.

Para a padronização da técnica, amostras puras do leite de cada uma das espécies estudadas foram submetidas ao procedimento de extração de DNA conforme o protocolo de Darwish et al. (2009), com modificações propostas por Lima et al. (2021). Primeiramente, as amostras de 5 mL de leite foram centrifugadas por 10 minutos, a 4.000 rpm. Após, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 10 mL de tampão Tris HCl-EDTA (TE), pH 8,0, e uma nova centrifugação nas mesmas condições foi realizada. O *pellet* obtido foi ressuspenso em 5mL de TE e 200 µL dessa solução foram acrescidos de 480µL de tampão de lise (10mM de Tris-HCl; 100mM de NaCl; 1mM de EDTA, pH 8,0; 0,5% de SDS) e 20µL de proteinase K (20mg/mL). O material foi incubado durante a noite, a 37°C, em banho maria. As demais etapas foram realizadas de acordo com o protocolo original de Darwish et al., (2009).

O DNA obtido foi eluído em 30µL de TE e as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 0,8%, coradas com corante não mutagênico (GelRed®) e visualizadas sob luz ultravioleta, com o auxílio do *Software* Total Lab. A qualidade e concentração do material foi aferida por meio de espectrofotometria, utilizando-se dos filtros de 260nm e 280nm. Os DNAs de cada espécie foram utilizados separadamente como controle positivo e também foram misturados na mesma proporção (*pool*) para a padronização da Reação em Cadeia da Polimerase multiplex (mPCR).

Para a execução da mPCR foram utilizados *primers* que amplificaram segmentos de DNA específicos para bubalinos (*Primer reverse* 5' TTCATAAATACTTTCTGTTGTTGGGTGT 3'), bovinos (*Primer reverse* 5' AAATAGGGTTAGATGCACTGAATCCAT 3') e que amplificam uma sequência comum a ambas as espécies (*Primer forward* 5'CTAGAGGAGCCTGTTCTATAATCGATA 3'), descritos por López-Calleja et al. (2005). Esses *primers* amplificam fragmentos de 220 pares de base (pb) para o DNA de bubalino e 346pb para DNA bovino. Já para a espécie caprina utilizou-se um par de *primers* que amplifica uma sequência de 157 pb (SIM 5'-GACCTCCCAGCTCCATCAAACATCTCATCTTGATGAAA-3'; Goat 5'-CTCGACAAATGTGAGTTACAGAGGGA-3') descritos por Matsunaga et al. (2009). Os *primers* utilizados foram escolhidos por já terem sido testados pelos autores que os projetaram e validados por diversos pesquisadores (Silva et al., 2015; Cardoso et al., 2019; Lima et al., 2021) e por apresentarem especificidade para as regiões alvo preservadas de cada espécie, minimizando a ocorrência de produtos inespecíficos amplificados.

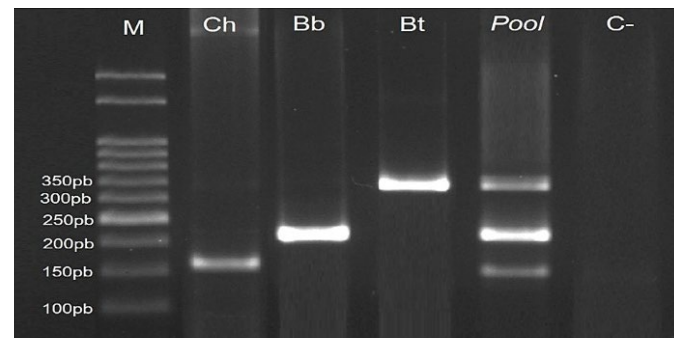
A mistura de reagentes para a mPCR foi calculada para um volume final de 25µL, onde foram utilizados 0,4 pmol de cada *primer*, 2 mM de MgCl₂, 100 mM de Tris-HCl (pH 8,5), 500mM de KCl (tampão 1,8 x) 0,4 mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (DNTP), 1,5 U de Taq DNA Polimerase, 50 ng de DNA molde (2 µL) e água Mili-Q esterilizada. Para cada reação foram utilizados controles positivos (amostras comprovadamente bovina, bubalina e caprina) e negativo (reação utilizando água ultrapura em substituição ao DNA). A reação ocorreu em termociclador (Applied Biosystems VERITI® 96), com a etapa de desnaturação inicial (93°C, por 3 minutos), seguida de 35 ciclos de desnaturação (93°C, por 30 segundos), anelamento (testou-se as temperaturas de 56/ 57/ 58 e 60 °C, por 30 segundos) e extensão (72°C, por 30 segundos) e da etapa de extensão final (72°C, por 10 minutos). Os *amplicons* obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, coradas com corante não mutagênico (GelRed®), juntamente com marcador de peso molecular de 100 e 50 pb. A leitura dos resultados se deu sob luz ultravioleta, com auxílio do *software* Total lab.

Para a fraude experimental, adicionou-se ao leite bubalino e ao leite caprino diferentes proporções de leite de vaca (0,1%, 0,25%, 0,50%, 0,75%, 1%, 3%, 5%, 10%, e 50%) em um volume final de 10mL para cada tratamento. Após a mistura foi realizada a extração de DNA dessas amostras e ensaio de mPCR previamente padronizado foi aplicado. Para a garantia da reprodutibilidade da técnica, todos os testes foram realizados em triplicata, com duas repetições do experimento.

Resultados e discussão

A extração do DNA das amostras, tanto do controle positivo quanto da fraude experimental, resultou em material genético adequado para a realização dos testes, com concentrações variando de 50 a 500 ng/µL e os valores de pureza (razão entre as absorvâncias medidas nos filtros de 260 nm e 280 nm) variando de 1,58 a 1,67. O ensaio de PCR multiplex proposto foi preciso para a detecção do DNA de bovino, bubalino e caprino, separadamente e em conjunto (*pool*), conforme pode ser observado na figura 1. Sobre a padronização da reação, a melhor temperatura empregada para o anelamento dos *primers* foi 57°C.

Figura 1: Gel de agarose 2,5% demonstrando a presença de fragmentos de DNA caprino (157 pb), bubalino (220 pb) e bovino (346 pb). Onde M: marcador de tamanho molecular de 50 pb; Ch: controle positivo com DNA de caprino (*Capra hircus*); Bb: controle positivo com DNA de bubalino (*Bubalis bubalis*); Bt: controle positivo com DNA de bovino (*Bos taurus*); Pool: reação com a mistura de DNA das três espécies; C-: controle negativo da reação.



Na fraude experimental pela incorporação de leite bovino ao bubalino foi possível a identificação das espécies desde o menor percentual de adulteração (0,1%) e esse resultado também foi observado quando o leite caprino foi fraudado, mostrando, assim, a capacidade da técnica em acusar baixas porções de leite bovino nas amostras, como é possível observar nas tabelas 2 e 3.

Tabela 2: Proporções de incorporação de leite bovino ao bubalino para a verificação da capacidade da mPCR em detectar a fraude experimental.

Porcentagem de leite bovino	Porcentagem de leite bubalino	mPCR*
0%	100%	+
0,10%	99,90%	+
0,25%	99,75%	+
0,50%	99,50%	+
0,75%	99,25%	+
1%	99%	+
3%	97%	+
5%	95%	+
10%	90%	+
50%	50%	+
100%	0%	+

*Resultado da mPCR (Reação em Cadeia da Polimerase), que identifica simultaneamente a presença de mais de uma sequência alvo de DNA. Neste caso, a detecção de DNA bovino e bubalino para testar a fraude por mistura de leites.

Tabela 3: Proporções de incorporação de leite bovino ao caprino para a verificação da capacidade da mPCR em detectar a fraude experimental.

Porcentagem de leite bovino	Porcentagem de leite caprino	mPCR*
0%	100%	+
0,10%	99,90%	+
0,25%	99,75%	+
0,50%	99,50%	+
0,75%	99,25%	+
1%	99%	+
3%	97%	+
5%	95%	+
10%	90%	+
50%	50%	+
100%	0%	+

*Resultado da mPCR (Reação em Cadeia da Polimerase), que identifica simultaneamente a presença de mais de uma sequência alvo de DNA. Neste caso, a detecção de DNA bovino e caprino para testar a fraude por mistura de leites.

A PCR multiplex permite a identificação simultânea de duas ou mais sequências-alvo de DNA, podendo ser usada para a discriminação do material genético das espécies presentes em uma amostra. Em nosso estudo essa técnica pôde ser aplicada com êxito na investigação da fraude pela mistura do leite de diferentes origens animal. Várias características favoráveis são conferidas à técnica, tais como: boa sensibilidade, especificidade, rapidez, praticidade e baixo custo, sendo dessa forma considerada uma importante ferramenta para o controle da qualidade e inspeção de produtos lácteos, conforme já anteriormente observado em outros estudos (Darwish et al., 2009; Abrantes et al., 2014; Silva et al., 2015).

Alguns autores já aplicaram com êxito a PCR para a autenticação de produtos lácteos (Darwish et al., 2009; Abrantes et al., 2014; Cardoso et al., 2019). Porém, diferente dos trabalhos desses pesquisadores, o ensaio aqui padronizado permite a identificação de DNA bovino, bubalino e caprino em uma mesma reação, de modo simultâneo. Além da capacidade de detectar baixos percentuais de fraude, o método é vantajoso, pois gera praticidade, economia de tempo e de reagentes. E, visto que não há metodologias oficiais para a autenticação desses alimentos, sobretudo em leite de espécies diferentes ao bovino, a validação de metodologias é extremamente importante.

A bubalinocultura tem se popularizado e o norte do Brasil concentra o maior número de búfalos (64,21%) do país (IBGE, 2018). A matéria-prima obtida desses animais, como o leite e seus derivados, ganharam importância no cenário econômico da região (Amaral et al., 2005). Os produtos lácteos de origem bubalina são amplamente apreciados, devido suas características nutritivas e sensoriais. No entanto, mesmo que haja comprovação do elevado valor nutricional, do rendimento industrial e do crescimento da produção e comercialização do produto em relação ao leite bovino, poucos esforços têm sido empregados para o estabelecimento de normas para padronização, identidade e qualidade do leite bubalino, dificultando assim que medidas de controle e fiscalização sejam adotadas (Amaral et al., 2005). Nesse sentido, o desenvolvimento de técnicas para o controle da autenticidade desse alimento é de fundamental importância, principalmente para regiões onde a exploração do produto se torna mais intensa.

Sabe-se que é grande o número de produtos de origem animal adulterados e a incorporação de leite bovino ao bubalino, não declarada no rótulo do alimento, é uma prática comumente observada em várias localidades (Cardoso et al., 2019). Cottenet et al. (2011) investigaram adulteração tanto em leites rotulados como de origem bovina quanto bubalina e, das 119 amostras coletadas na China, Índia e Paquistão, os maiores produtores de leite da Ásia, cerca de 20% dos produtos apresentaram altos níveis de contaminação cruzada. Já Ewida e El-Magiud (2018) investigaram amostras de leite de búfala disponíveis comercialmente no Egito, por meio de um método molecular, e identificaram um alto percentual de adulteração, uma vez que em 90% das amostras coletadas havia a presença de DNA de bubalino e de bovino simultaneamente, acusando a presença da fraude.

Por seu turno, Darwish et al. (2009) avaliaram 21 amostras de leite rotulados como de bubalino e, dessas amostras, dez eram autênticas, ao passo que em oito havia a mistura com leite de vaca e em três delas a fraude ocorreu por substituição total da

matéria-prima. Pelo acima exposto observa-se que a fraude do leite de búfala é uma prática observada no mercado mundial e que merece atenção.

Cardoso et al. (2019) observaram que a sazonalidade é um dos fatores que propicia a adoção da prática fraudulenta na produção de queijo de búfala na Ilha do Marajó, principal produtora e distribuidora do alimento no Brasil, visto que a disponibilidade de leite bubalino é afetada pela estação do ano. Esses autores detectaram um alto percentual de fraude na região sendo que, no período chuvoso, 22% das amostras coletadas possuíam leite bovino na composição e em 11% ocorreu a fraude por substituição total da matéria-prima. Já no período seco, a fraude foi observada em 100% das amostras. Essa prática além de ludibriar o consumidor do ponto de vista financeiro, diminui as características nutricionais do produto.

Acerca do limiar de detecção da técnica no leite bubalino, Cottenet et al. (2011), mesmo utilizando uma PCR multiplex em tempo real, só conseguiram a identificação de DNA bovino a partir de 1% de fraude. Já nos experimentos de Darwish et al. (2009), a amplificação do material genético ocorreu desde a adição de 0,5% de leite bovino. Por outro lado, nossos resultados mostraram a capacidade de detecção de um limite ainda menor, em consonância com os achados de López Calejja et al. (2007), os quais, assim como nós, conseguiram a detecção de porções mínimas de 0,1% de fraude. Conferimos o sucesso da nossa metodologia aos ajustes realizados no protocolo de extração de DNA (Lima et al., 2021), que garantiram material genético de melhor qualidade e também pela padronização da reação da mPCR, que associou uma combinação otimizada dos reagentes e do ciclo de tempo e temperatura de amplificação.

Silva et al. (2015) propuseram uma PCR multiplex para a detecção de DNA bovino e bubalino em queijo de búfala e utilizaram os mesmos primers aplicados em nosso trabalho. Embora os autores tenham testado e identificado fraude a partir da adição de 10% de leite bovino em queijo bubalino no nosso estudo a adulteração foi detectada mesmo em percentagens menores (tabela 2). Salientamos que embora esse dado seja relevante, as diferenças entre os dois tipos de alimentos devem ser consideradas, especialmente no que diz respeito a composição e ao processamento, o que pode interferir diretamente na PCR. Acreditamos que modificações nas etapas iniciais do processo de extração do DNA realizadas no presente estudo, que visaram a eliminação do excesso de gordura do leite, foram, de grande importância para a obtenção de material genético de qualidade para ser utilizado no ensaio molecular.

O mercado de produtos lácteos caprino também tem crescido no Brasil. O leite de cabra é um alimento completo, rico em proteínas, vitaminas e minerais, fato este que desperta o interesse dos consumidores, todavia a sazonalidade e a pequena produção tornam esses alimentos mais caros e propensos a fraude (Golinelli et al., 2014; Di Pinto et al., 2017; Guo et al., 2019).

Golinelli et al. (2014) testaram uma PCR para a acusar a presença de DNA bovino em queijo caprino e análise sensorial

do alimento com diferentes proporções de leite de ambas as espécies. Os resultados desses autores demonstraram que a técnica de PCR foi sensível, específica e reprodutível acerca da finalidade proposta, com limite de detecção de 0,5% de fraude. Já durante a análise sensorial os consumidores não perceberam adulteração abaixo de 25% de adição da matéria prima bovina. Além disso, foram realizadas coletas de queijo comercializados em mercados do Rio de Janeiro, dos quais todos apresentaram DNA bovino em sua composição, ou seja, um percentual de 100% de fraude.

Abrantes et al. (2014) avaliaram a eficácia e a sensibilidade de um ensaio de PCR para a autenticação de leite e queijo de cabra. Esses autores fraudaram experimentalmente amostras dos produtos lácteos caprino com leite bovino e os resultados dos testes acusaram a presença da fraude a partir de 0,5% para o leite fluido e 5% para o queijo. Esses pesquisadores também analisaram amostras de campo obtidas de produtores individuais e de tanques de resfriamento comunitários e identificaram que, dos produtos coletados, 87,7% possuíam DNA bovino, demonstrando uma alta prevalência da prática fraudulenta, fato que elucida a importância de ferramentas eficientes, sensíveis e práticas para a autenticação desses alimentos, como a PCR proposta no presente estudo.

Tanto Golinelli et al. (2014), quanto Abrantes et al. (2014) alcançaram um limite de detecção de 0,5% de fraude. Em nosso estudo esse percentual foi menor, de 0,1%, uma vantagem, podendo identificar traços reduzidos de DNA bovino nas amostras. Nossos resultados estão em consonância com outros os trabalhos de outros autores que atingiram limites semelhantes (López-Caelejja et al., 2005; Mafra et al., 2007).

Sabe-se que o leite é um dos produtos de origem animal que mais sofre adulterações (Zhang e Xue, 2016). A fraude além de prejuízos econômicos gera vulnerabilidade do ponto de vista da saúde pública, uma vez que o leite de outras espécies como o de bubalino e, principalmente de caprino, são muito utilizados por indivíduos que apresentam restrições alimentares como alergia a proteína do leite de vaca (Spink e Moyer, 2011; Jirilo et al., 2010; Golinelli et al., 2014). A autenticação de produtos alimentícios é de suma importância para fins de rastreabilidade, qualidade e segurança, a substituição ou adição de matéria prima de espécies não declaradas no rótulo, além da contaminação cruzada pode gerar muitos problemas de natureza regulamentar, religiosa e alérgica (Cottenet et al., 2011).

Conclusão

A mPCR proposta foi eficiente para acusar a presença do leite bovino incorporado ao leite bubalino e caprino em baixas proporções (desde 0,1%), demonstrando que a metodologia apresentada pode ser considerada uma importante ferramenta para a detecção de fraude ou para a autenticação deste tipo de alimento.

Referências

- ABRANTES, M. R.; CAMPÊLO, C.S.; SILVA, J. B. A. Fraude em leite: Métodos de detecção e implicações para o consumidor. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, v. 73, n. 3, p. 244-51, 2014.
- AMARAL, F. R.; CARVALHO, L.B.; SILVA, N.; BRITO, J.R.F. Qualidade do leite de búfalas: composição. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 29, n. 2, p. 106-110, 2005.
- ARAÚJO, T. P. M.; RANGEL, A.H.N.; SOARES, A.D.; LIMA, T.C.C.; LIMA JÚNIOR, D.M.; NOVAES, L.P. Influência das estações do ano sobre a composição do leite de búfalas mantido em tanque de resfriamento. *Agropecuária Científica no Semiárido*, v. 7, n. 1, p. 01-05, 2011.
- BARLOWASKA, J.; LITWINCZUK, Z.; KROL, J. Nutritional value and technological suitability of milk from various animal species used for dairy production. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v.10, p.291–302, 2011.
- BORKOVÁ, M.; SNÁŠELOVÁ, J. Possibilities of different animal milk detection in milk and dairy products – a review. *Czech Journal of Food Sciences*, v.2, p.41–50, 2005.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA. Aprovado pelo Decreto nº 10.468, de 18 de agosto de 2020. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 19 agosto 2020
- BREITENBACH, R.; RODRIGUES, H.; BRANDÃO, J.B. Whose fault is it? Fraud scandal in the milk industry and its impact on product image and consumption - The case of Brazil. *Food Research International*, v.108, p.475-481, 2018.
- CARDOSO, G. V. F.; OLIVEIRA, A. C. DO S. DE.; SILVA, A. S. da.; ARAÚJO, W. S. C.; DANTAS, V. V.; SILVA, J. B. da.; LIMA, J. S.; NUNES, E. S. C. L.; SOUZA e GUIMARÃES, R. J. P.; ROOS, T. B.; MORAES, C. M. Detection of fraud by addition cow's milk in cheese buffalo and its connection with seasonality. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v. 26, n. 4, p. 152-157, 2019.
- CHÁVEZ, N. A.; SALINAS, E.; JAUREGUI, J.; PALOMARES, L.A.; MACÍAS, K. Detection of bovine milk adulterated with cheese whey by western blot immunoassay. *Food and Agricultural Immunology*, v. 19, n. 4, p. 265-72, 2008.
- CLARK, S.; MORA GARCÍA, M. B. A 100-Year Review: Advances in goat milk research. *Journal of Dairy Science*, v.12, p.10026-10044, 2017.
- COTTENET, G.; BLANCPAIN, C.; GOLAY, P. A. Simultaneous detection of cow and buffalo species in milk from China, India, and Pakistan using multiplex real-time PCR. *Journal of Dairy Science*, v. 94, p. 3787–3793, 2011.
- DALMASSO, A. C. 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, n. 1, p. 362-6, 2011.
- DARWISH, S. F.; ALLAM, H. A.; AMIN, A. S. Evaluation of PCR Assay for Detection of Cows Milk in Water Buffalo's Milk. *World Applied Sciences Journal*, v. 7, n. 4, p. 461-7, 2009.
- DI PINTO, A.; TERIO, V.; MARCHETTI, P.; BOTTARO, M.; MOTTOLA, A.; BOZZO, G.; BONERBA, E.; CECI, E.; TANTILLO, G. DNA-based approach for species identification of goat-milk products. *Food Chemistry*, v.229, p.93–97, 2017.
- EGITO A. S.; ROSINHA, G.M.S.; LAGUNA, L.E.; MICLO, L.; GIRARDET, J.M.; GAILLARD, J.L. Método eletroforético rápido para detecção da adulteração do leite caprino com leite bovino. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 58, n. 5, p. 932-939, 2006.
- EWIDA, R.M.; EL-MAGIUD, D.S.M.A. Species adulteration in raw milk samples using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Veterinary World*, v.11, n.6, p.830-833, 2018.
- FAO, 2019. Dairy and dairy products. Accessed in: July, 18, 2022. Disponível em <http://www.fao.org/3/CA4076EN/CA4076EN_Chapter7_Dairy.pdf>.
- GOLINELLI, L.P.; CARVALHO, A.C.; CASAES, R.S.; LOPES, C.S.; DELIZA, R.; PASCHOALIN, V.M.; SILVA, J.T. Sensory analysis and species-specific PCR detect bovine milk adulteration of frescal (fresh) goat cheese. *Journal of Dairy Science*, v. 97, n. 11, p. 6693–6699, 2014.
- GUO, L.; YA, M.; HAI, X.; GUO, Y.-S.; LI, C.-D.; XU, W.-L.; LIAO, C.-S.; FENG, W.; CAI, Q. A simultaneous triplex TaqMan real-time PCR approach for authentication of caprine and bovine meat, milk and cheese. *International Dairy Journal*, v.95, p.58-64, 2019.
- HELALY, L.; RASHED, S.; BDAIWI, L. A comparative study of oxidant and antioxidant levels between human milk with other type of ruminant milk. *Iraqi National Journal Of Chemistry*, v.49, p.86–99, 2013.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. Pesquisa da Pecuária Municipal - PPM, 2018. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?=&t=resultados/>>. Acesso em: 18 de julho de 2022.
- JIRILLO, F.; JIRILLO, E.; MAGRONE, T. Donkey's and goat's milk consumption and benefits to human health with special reference to the inflammatory status. *Current Pharmaceutical Design*, v. 16, n. 7, p. 859-863, 2010.
- JUNG, Y.-K.; JHON, D.-Y.; KIM, K.-H.; HONG, Y.-H. Quantitative Detection of Cow Milk in Goat Milk Mixtures by Real-Time PCR. *Korean Journal For Food Science Of Animal Resources*, v.31, n.6, p.827-833, 2011.
- KHAN, I.T.; NADEEM, M.; IMRAN, M.; ULLAH, R.; AJMAL, M.; JASPAL, M.H. Antioxidant properties of Milk and dairy products: a comprehensive review of the current knowledge. *Lipids Health Disease*, v.,18, n.1, p.41, 2019.
- LIMA, J.S.; SAMPAIO, A.P.P.O.; DUFFOSE, M.C.S.; ROSA, A.M.B.P.; SOUSA, P.F.M.; SILVA, J.B.; CARDOSO, G.V.F.; MORAES, C. M.; ROOS, T.B. Standardization of a rapid quadriplex PCR method for the simultaneous detection of bovine, buffalo, *Salmonella* spp., and *Listeria monocytogenes* DNA in milk. *Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.73, n.4, p.781-790, 2021.
- LÓPEZ-CALLEJA I.; GONZÁLEZ-ALONSO, I.; FAJARDO, V.; RODRÍGUEZ, M.A.; HERNÁNDEZ, P.E.; GARCÍA, T.; MARTÍN, R. PCR Detection of Cow's Milk in Water Buffalo Milk and Mozzarella Cheese. *International Dairy Journal*, v. 15, n. 11, p. 1122-9, 2005.
- LÓPEZ-CALLEJA I.; GONZÁLEZ-ALONSO, I.; FAJARDO, V.; RODRÍGUEZ, M.A.; HERNÁNDEZ, P.E.; GARCÍA, T.; MARTÍN, R. Application of a polymerase chain reaction to detect adulteration of ovine cheeses with caprine milk. *Journal of Dairy Science*, v. 225, p. 345-9, 2007.
- 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. 1132-8, 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.
- MEDHAMMAR, E.; WIJESINHA-BETTONI, R.; STADLMAYR, B.; NILSSON, E.; CHARRONDIÈRE, U.R.; BURLINGAME, B. Composition of milk from minor dairy animals and buffalo breeds: a biodiversity perspective. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.92, p.445-474, 2012.
- MOLINA, E.; MARTIN-ALVAREZ, P. J.; RAMOS, M. Analysis of cows', ewes' and goats' milk mixtures by capillary electrophoresis: Quantification by multivariate regression analysis. *International Dairy Journal*, v. 9, p. 99-105, 1999.
- MONTGOMERY, H.; HAUGHEY, S.A.; ELLIOTT, C.T. Recent food safety and fraud issues within the dairy supply chain (2015-2019). *Global Food Security*, v.26, p.100447, 2020.
- NADEEM, M.; ABDULLAH, M.; HUSSAIN, I.; INAYAT, S. Modification of fatty acid profile of cow milk by calcium salts of fatty acids and its use in ice cream. *Journal of Food Science and Technology*, v.52, p.1061-1067, 2015.
- PANTOJA, L.S.G.; AMANTE, E.R.; RODRIGUES, A.M.C.; SILVA, L.H.M. World scenario for the valorization of byproducts of buffalo milk production chain. *Journal of cleaner production*, v.364, 132605, 2022.
- PIGNATA, M. C.; FERNANDES, S.A.A.; FERRÃO, S.P.B.; FALEIRO, A.S.; CONCEIÇÃO, D.G. Estudo comparativo da composição química, ácidos graxos e colesterol de leites de búfala e vaca. *Revista Caatinga*, v. 27, n. 4, p. 226-233, 2014.
- RAFIQ, S.; HUMA, N.; PASHA, I.; SAMEEN, A.; MUKHTAR, O.; KHAN, M.I. Chemical composition, nitrogen fractions and amino acids profile of milk from different animal species. *Asian-Australia Journal Animal Science*, v.29, p.1022-1028, 2016.
- REN, D.X.; ZOU, C.X.; LIN, B.; CHEN, Y.L.; LIANG, X.W.; LI, J.X. A comparison of milk protein, amino acid and fatty acid profiles of river buffalo and their F₁ and F₂ hybrids with swamp buffalo in China. *Pakistan Journal of Zoology*, v.47, p.1459-1465, 2015.
- SILVA, C. L.; SALES, G. A.; SANTOS NETO, J. G.; SILVA, J. da S. e; LARA, A. P. de S. S. de; LIMA, S. C. G. de; LEITE, F. P. L.; NUNES, E. do S. C. de L.; MORAES, C. C. G. de; ROOS, T. B.; MORAES, C. M. de. Detecção de fraude em amostras comerciais de queijo bubalino por adição de leite bovino por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) multiplex. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 74, n. 1, p. 21-9, 2015.
- SINGH, M. Role of micronutrients for physical growth and mental development. *Indian Journal of Pediatrics*, v.71, p.59-62, 2004.
- SPINK, J.; MOYER, D. C. Defining the public health threat of food fraud. *Journal of Food Science*, v. 76, n. 9, p. 157-163, 2011.
- SRETENOVIC, L.J.; ALEKSIĆ, S.; PETROVIĆ, P.M.; MIŠČEVIĆ, B. Nutritional factors influencing improvement of milk and meat quality as well as productive and reproductive parameters of cattle. *Biotechnology in Animal Husbandry*, v.23, n.5-6, p.217-226, 2007.
- TIBOLA, C.S.; DA SILVA, S.A.; DOSSA, A.A.; PATRÍCIO, D.I. Economically Motivated Food Fraud and Adulteration in Brazil: Incidents and Alternatives to Minimize Occurrence. *Journal of Food Science*, v.83, n.8, p.2028-2038, 2018.
- TIJERINA-SÁENZ, A.; INNIS, S.M.; KITTS, D.D. Antioxidant capacity of human milk and its association with vitamins a and E and fatty acid composition. *Acta Paediatrica*. v.98, p.1793-1798, 2009.
- ZHANG, W.; XUE, J. Economically motivated food fraud and adulteration in China: Na analysis based on 1553 media reports. *Food control*, v. 67, p. 192-198, 2016.