

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*

Detection of fraud of cow milk addition into the commercially available buffalo cheese samples by *multiplex* Polymerase Chain Reaction (PCR)

RIALA6/1633

Cleyzer Lopes SILVA¹, Gustavo Aguiar SALES¹, José Gatinho dos SANTOS NETO¹, Jacqueline da Silva e SILVA², Ana Paula de Souza Stori DE LARA³, Suely Cristina Gomes de LIMA⁴, Fábio Pereira Leivas LEITE⁵, Emília do Socorro Conceição de Lima NUNES¹, Carla Cristina Guimarães de MORAES², Talita Bandeira ROOS¹, Carina Martins de MORAES^{1*}

*Endereço para correspondência: ¹Laboratório de Higiene e Qualidade de Alimentos e Laboratório de Microbiologia, Instituto de Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Pará (UFPA), Campus Castanhal, BR 316, Km 62, Bairro Saudade, Castanhal, PA, Brasil, CEP: 68740-970. Tel: (91) 3711-4723. E-mail: carinamoraes@ufpa.br.

²Laboratório de Zoonoses e Saúde Pública, Instituto de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Pará (UFPA), Campus Castanhal

³Laboratório de Imunologia e Parasitologia Molecular, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas (UFPEL)

⁴Laticínio Escola, Instituto de Educação Tecnológica do Estado do Pará (IFPA), Campus Castanhal

⁵Laboratório de Bacteriologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec), Faculdade de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas (UFPEL)

Recebido: 26.09.2014 - Aceito para publicação: 27.03.2015

RESUMO

No presente estudo foi verificada a eficiência da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) *multiplex* para detecção de fraude por adição de leite bovino em queijo de búfala, e para identificar amostras de queijo fraudadas no comércio de municípios dos estados do Pará e Amapá. Os queijos de búfala contendo 10 %, 25 %, 50 %, 75 % e 90 % de leite bovino foram produzidos, bem como os queijos exclusivamente de vaca e búfala (controles). Essas amostras foram analisadas por meio de Reação em Cadeia da Polimerase. Posteriormente, 44 amostras de queijos bubalinos foram coletadas na região alvo do estudo e a PCR *multiplex* foi novamente utilizada, visando à detecção de fraude. Os resultados obtidos demonstraram que os iniciadores utilizados neste trabalho foram capazes de detectar o incremento de todas as percentagens de leite de vaca nos queijos de búfala experimentalmente fraudados, e que 13,6 % das amostras comercialmente disponíveis continham leite bovino. PCR *multiplex* é uma técnica capaz de detectar adição de valores a partir de 10 % de leite bovino não declarado na rotulagem de queijo de búfala, e este tipo de fraude foi encontrado nas amostras comercializadas nos municípios do Amapá e Pará, Brasil.

Palavras-chave. queijo de búfala, fraude, PCR *multiplex*.

ABSTRACT

This study aimed at verifying the efficiency of the technique of *multiplex* Polymerase Chain Reaction (PCR) for detecting the fraud by adding bovine milk into cheese samples made from buffalo milk, and to identify the fraudulent cheeses samples marketed in the municipalities of Pará and Amapá. The buffalo cheeses samples containing 10 %, 25 %, 50 %, 75 % and 90 % of bovine milk were experimentally produced; and also the cheeses made from the cow and the buffalo milk were separately prepared as controls. The analysis of these samples was performed by *multiplex* Polymerase Chain Reaction. Subsequently, 44 samples of buffalo cheeses were collected from the study target region, and they were analyzed by PCR for detecting the fraudulent specimens. The primers used in this study showed actual performance for detecting all of the increasing percentages of cow milk experimentally added into buffalo cheeses; also it indicated that 13.6 % of these marketed samples contained bovine milk. It was concluded that the *multiplex* PCR is a suitable technique for detecting the fraud from the concentration of 10 % bovine milk added into buffalo cheese.

Keywords. buffalo cheese, fraud, *multiplex* PCR.

INTRODUÇÃO

De acordo com o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal – RIISPOA, entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. O leite de outros animais deve denominar-se segundo a espécie de que procede¹.

O leite de búfala quando comparado ao leite de vaca oferece vantagens nutricionais, como maiores teores em sólidos totais, gordura, proteína, cálcio e fósforo² e, por isso, este produto tem grande importância tanto para o consumo *in natura* quanto para elaboração de seus derivados, principalmente o queijo. Porém, por se tratar de um produto disponível em pequenas quantidades em vários países do mundo, fraudes e adulterações por adição de matérias primas com maior disponibilidade e/ou custo mais baixo são frequentemente descritas³.

Dentre as fraudes mais comumente relatadas, a mistura de leite bovino ao leite bubalino é a mais frequente. Por esta razão, além da avaliação da qualidade organoléptica, microbiológica e físico-química do leite, se torna necessário que métodos eficazes sejam empregados para detecção de fraudes⁴, que podem lesar os consumidores em relação aos valores agregados ao produto⁵ e acarretar riscos indiretos a saúde pública, como reações alérgicas.

Vários autores relatam técnicas eficientes para a detecção de possíveis fraudes em leite de diferentes espécies e seus derivados^{3,4}. Os principais métodos mencionados na literatura baseiam-se na análise das proteínas do leite e, dentre os métodos baseados na análise de DNA, a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é considerada uma importante ferramenta a ser estudada. Tais métodos são capazes de identificar as diferenças entre os produtos analisados e quantificar a mistura de leite de diferentes espécies^{3,5}.

No Brasil, autores relatam a utilização de *Real Time* PCR para a identificação e quantificação de material bovino em derivados lácteos e carnes bubalinos³. Porém, embora os referidos pesquisadores tenham comprovado a eficiência da técnica, poucos trabalhos tem demonstrado

a presença de fraude em produtos bubalinos comercializados no Brasil e, em especial, na região Norte, que dispõe do maior rebanho de búfalos do país, segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE)⁶.

Por esta razão, o presente trabalho tem por objetivo verificar a eficiência da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase *multiplex* para detecção de fraude por adição de leite bovino em queijo de búfala e determinar a detecção de fraude acima de 10 % de adição pela referida técnica, através da produção de queijos experimentalmente fraudados contendo diferentes percentagens de leite bovino.

MATERIAL E MÉTODOS

Visando a determinação de fraude por incremento de leite bovino através da técnica de PCR *multiplex*, 5 queijos bubalinos fraudados experimentalmente (um queijo para cada proporção) foram fabricados, em triplicata, no Laticínio Escola do Instituto Federal de Educação Tecnológica do estado do Pará (IFPA) – Campus Castanhal, através da adição de 10 %, 25 %, 50 %, 75 % e 90 % de leite de vaca e queijos exclusivamente a base de leite de vaca e búfala foram produzidos para serem usados como controle. Para a fabricação dos queijos, primeiramente as misturas de leite foram pasteurizadas separadamente a temperatura de 72 °C, durante 15 segundos. Posteriormente as proporções de leite previamente pasteurizadas foram resfriadas até atingirem a temperatura de 35 °C e transferidas para um tanque apropriado, onde foi adicionado cloreto de cálcio na proporção 40 mL para cada 100 L de leite e 20 mL de coalho, seguindo o prescrito pelo fabricante da enzima. Após, as massas para fabricação dos queijos permaneceram em repouso por 45 minutos. Passado este período, com o auxílio de liras, iniciou-se o corte vertical e horizontal da coalhada e foi realizada a homogeneização da massa durante 25 minutos, visando facilitar a eliminação do soro. Após este processo, parte do soro liberado foi descartado e cloreto de sódio (10 mg/L) foi adicionado à massa. A massa salgada foi novamente homogeneizada e o soro remanescente foi eliminado. Posteriormente a enformagem da coalhada foi realizada e os queijos foram prensados

na própria forma até que o soro residual fosse eliminado. Após a enformagem, os produtos foram acondicionados na câmara de refrigeração a 4 °C, onde ficaram por 24 horas.

Para a identificação de fraude em queijos comercializados nas regiões norte e nordeste do estado do Pará e em Macapá, capital do estado do Amapá, foram coletadas 44 amostras de 500 g cada de diferentes tipos de queijos de búfala disponíveis comercialmente de maneira formal ou informal. Destas, 9 foram adquiridas no município de Belém (PA), 7 no município de Castanhal (PA), 1 no município de Moju (PA), 1 no município de Bujarú, 22 na Ilha do Marajó (PA) e 4 em Macapá (AP). Tanto os queijos fraudados experimentalmente quanto as amostras obtidas em diferentes estabelecimentos comerciais foram transportadas em caixas isotérmicas e mantidas em refrigeração até o encaminhamento ao Laboratório de Higiene e Qualidade de Alimentos da UFPA, onde foram realizadas a extração de DNA e as reações de PCR *multiplex* em triplicata, através da colheita de diferentes frações de cada amostra.

Para a realização da PCR *multiplex*, DNA das amostras foi extraído, segundo protocolo sugerido anteriormente por Darwish et al⁷ com modificações, sendo as alterações realizadas na etapa inicial do protocolo, onde frações de 0,5 g de queijo foram umedecidas e maceradas com 1000 µL de tampão de lise STES (0,2 M de Tris base, 0,5 M de cloreto de sódio, 0,1 % de Dodecil Sulfato de Sódio e 0,01 M de Ácido Etilenodiamino Tetraacético). Posteriormente o material foi agitado em agitador orbital e incubado em banho-maria a 55 °C, durante a noite, com 10 µL de proteinase K (20 mg/mL). O restante do processamento das amostras foi realizado de acordo com o protocolo original⁵, sendo o DNA extraído eluído em 200 µL tampão TRIS-EDTA (TE), pH 8,0. As amostras de DNA obtidas foram então submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1 % para avaliação, que foi realizada sobre luz ultravioleta e com auxílio do Software Total Lab. TL 100v. 2006, após o gel ter sido banhado em cuba contendo brometo de etídeo na concentração de 5 µg/mL, durante 40 min.

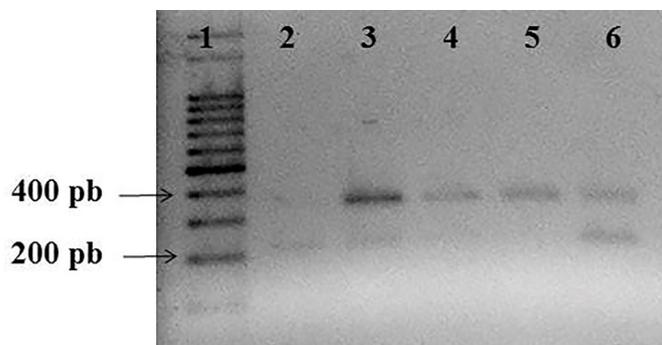
Para a execução da referida técnica foram utilizados *primers* que amplificam sequências do RNA ribossomal mitocondrial

12S específicos para búfala (*Primer reverse* 5' TTCATAATAACTTTTCGTGTTGTTGGGTGT 3'), para vaca (*Primer reverse* 5' AAATAGGGTTAGATGCACTGAATCCAT 3') e *primers* que amplificam sequências comuns as duas espécies (*Primer forward* 5'CTAGAGGAGCCTGTTCTATAATCGATA 3'), descritos previamente por Lopez-Calleja et al⁸. Os *primers* amplificam fragmentos de 220 pares de base (pb) para DNA de búfala e fragmentos de 346pb para DNA de vaca e foram preparados de acordo com a instrução do fabricante (Ludwing Biotec[®]), sendo diluídos em TE pH 8,0, até a concentração de 100 pmol/µL. Solução para PCR foi calculada para o volume final de 25 µL para cada reação, sendo utilizadas as seguintes concentrações dos reagentes: 50 mM de KCl e 10 mM Tris-HCl (tampão 1X) , 10 mM DNTP *mix*, aproximadamente 50 ng de DNA molde, 1U Taq DNA Polimerase e 10 pmol de cada *primer*, sendo o volume completado com água Milli-Q esterilizada. Posteriormente, a reação de PCR foi realizada em termociclador (Biocycler[®] MJ96G) durante 30 ciclos, com etapas de desnaturação, anelamento e extensão de 93 °C/30 s, 56 °C/30 s e 72 °C/30 s respectivamente, desnaturação inicial de 93 °C por 3 min e extensão final de 72°C por 10min, sendo os *amplicons* obtidos submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5 %, visualizada sobre luz ultravioleta com auxílio do Software Total Lab. TL 100v. 2006, após banho em brometo de etídeo (5 µg/mL), durante 40 min.

Os resultados da determinação de fraude nas amostras comerciais foram apresentados através de estatística descritiva.

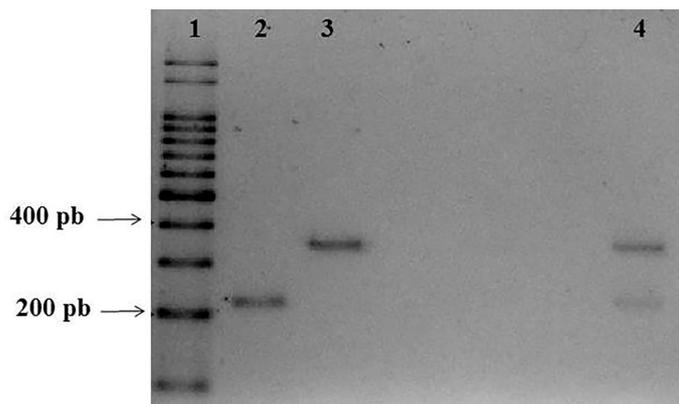
RESULTADOS

A Figura 1 demonstra os resultados obtidos a partir da PCR *multiplex* realizada em amostras de queijo experimentalmente fraudados. Já a Figura 2 demonstra os controles utilizados (queijos exclusivamente fabricados com leite de vaca e búfala) e a presença de uma das seis fraudes detectadas em amostras de queijo adquiridas no comércio da região alvo do estudo, durante a execução do trabalho.



1: marcador molecular 1 kb; 2: queijo contendo 10 % de leite bovino; 3: queijo contendo 25 % de leite bovino; 4: queijo contendo 50 % de leite bovino; 5: queijo contendo 75 % de leite bovino; 6: queijo contendo 90 % de leite bovino

Figura 1. Gel de agarose 1,5 % demonstrando a presença fragmentos de DNA bovino (346 pb) e bubalino (220 pb) obtidos através de PCR *multiplex* realizada a partir de amostras de queijos de búfala experimentalmente fraudados com diferentes percentagens de leite bovino



1: marcador de peso molecular molecular 1kb; 2: queijo produzido com 100 % de leite bubalino; 3: queijo produzido com 100 % de leite bovino; 4: queijo de búfala adquirido comercialmente apresentando bandas correspondentes a presença de DNA bovino e bubalino

Figura 2. Gel de agarose 1,5 % demonstrando a presença fragmentos de DNA bovino (346 pb) e/ou bubalino (220 pb) obtidos através de PCR *multiplex* realizada a partir de amostras de queijos fabricados exclusivamente com leite bovino e bubalino (controles) e em uma amostra adquirida comercialmente

A Tabela 1 demonstra os dados obtidos a partir da coleta e análise de queijos bubalinos comercializados na área alvo do estudo.

Os resultados demonstraram que a PCR *multiplex* proposta foi capaz de detectar leite de vaca nos queijos bubalinos fraudados experimentalmente e que, das 44 amostras comerciais de queijos bubalino analisadas, 6 (13,63 %) apresentaram incremento de leite bovino, sendo 5 (11,36 %) destas amostras provenientes da Ilha do Marajó (PA)

e 1 (2,27 %) proveniente do município de Macapá(AP). As amostras fraudadas adquiridas na Ilha do Marajó eram provenientes do comércio de ambulantes e a amostra de Macapá foi coletada em uma feira-livre do município. Os dados aqui demonstrados não descartam a possibilidade de que os queijos considerados não fraudados neste trabalho apresentem quantidades inferiores a 10 % de leite bovino, visto que esta foi a percentagem mínima testada como referência no presente artigo.

Tabela 1. Resultados obtidos a partir da coleta e análise através de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) *multiplex* para a detecção de fraude de amostras de queijos de búfala comercializados em municípios dos estados do Pará e Amapá, Brasil

IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA	LOCAL DE ORIGEM	TIPO DE QUEIJO	RESULTADO DA PCR
LHQA1	Ilha do Marajo, PA	Marajó tipo creme	Detecção de DNA bubalino
LHQA2	Ilha do Marajo, PA	Marajó tipo creme	Detecção de DNA bubalino
LHQA3	Ilha do Marajo, PA	Marajó tipo creme	Detecção de DNA bubalino
LHQA4	Ilha do Marajo, PA	Marajó tipo creme	Detecção de DNA bubalino
LHQA5	Ilha do Marajo, PA	Marajó tipo creme	Detecção de DNA bubalino
LHQA6	Ilha do Marajo, PA	Marajó tipo creme	Detecção de DNA bubalino
LHQA7	Ilha do Marajo, PA	Marajó tipo creme	Detecção de DNA bubalino
LHQA8	Ilha do Marajo, PA	Marajó tipo creme	Detecção de DNA bubalino
LHQA9	Ilha do Marajo, PA	Marajó tipo creme	Detecção de DNA bubalino
LHQA10	Ilha do Marajo, PA	Marajó tipo creme	Detecção de DNA bubalino e bovino
LHQA11	Ilha do Marajo, PA	Marajó tipo creme	Detecção de DNA bubalino e bovino
LHQA12	Ilha do Marajo, PA	Marajó tipo creme	Detecção de DNA bubalino e bovino
LHQA13	Belém, PA	Marajó tipo manteiga	Detecção de DNA bubalino
LHQA14	Belém, PA	Coaho	Detecção de DNA bubalino
LHQA15	Belém, PA	Ricota	Detecção de DNA bubalino
LHQA16	Belém, PA	Muçarela	Detecção de DNA bubalino
LHQA17	Belém, PA	Muçarela	Detecção de DNA bubalino
LHQA18	Castanhal, PA	Ricota	Detecção de DNA bubalino
LHQA19	Castanhal, PA	Ricota	Detecção de DNA bubalino
LHQA20	Castanhal, PA	Coalho	Detecção de DNA bubalino
LHQA21	Castanhal, PA	Coalho	Detecção de DNA bubalino
LHQA22	Castanhal, PA	Muçarela	Detecção de DNA bubalino
LHQA23	Ilha do Marajó, PA	Marajó tipo creme	Detecção de DNA bubalino e bovino
LHQA24	Ilha do Marajó, PA	Marajó tipo creme	Detecção de DNA bubalino e bovino
LHQA25	Ilha do Marajó, PA	Marajó tipo creme	Detecção de DNA bubalino
LHQA26	Ilha do Marajó, PA	Marajó tipo creme	Detecção de DNA bubalino
LHQA27	Ilha do Marajó, PA	Marajó tipo creme	Detecção de DNA bubalino
LHQA28	Belém, PA	Tipo Minas Frescal	Detecção de DNA bubalino
LHQA29	Belém, PA	Tipo Minas Frescal	Detecção de DNA bubalino
LHQA30	Belém, PA	Muçarela	Detecção de DNA bubalino
LHQA31	Belém, PA	Frescal	Detecção de DNA bubalino
LHQA32	Castanhal, PA	Muçarela	Detecção de DNA bubalino
LHQA33	Castanhal, PA	Muçarela	Detecção de DNA bubalino
LHQA34	Moju, PA	Frescal	Detecção de DNA bubalino
LHQA35	Ilha do Marajó, PA	Marajó tipo creme	Detecção de DNA bubalino
LHQA36	Ilha do Marajó, PA	Marajó tipo creme	Detecção de DNA bubalino
LHQA37	Ilha do Marajó, PA	Marajó tipo creme	Detecção de DNA bubalino
LHQA38	Ilha do Marajó, PA	Marajó tipo creme	Detecção de DNA bubalino
LHQA39	Ilha do Marajó, PA	Marajó tipo creme	Detecção de DNA bubalino
LHQA40	Bujaru, PA	Frescal	Detecção de DNA bubalino
LHQA41	Macapá, AP	Frescal	Detecção de DNA bubalino
LHQA42	Macapá, AP	Provolone	Detecção de DNA bubalino
LHQA43	Macapá, AP	Frescal	Detecção de DNA bubalino e bovino
LHQA44	Macapá, AP	Requeijão	Detecção de DNA bubalino

DISCUSSÃO

Considera-se fraude a substituição de um tipo de leite por outro, na produção de queijos¹. Desta forma, o incremento de leite de vaca em qualquer quantidade, em queijos comercializados como bubalinos sem especificação em rótulo pode vir a lesar o consumidor, que acredita estar adquirindo um produto derivado exclusivamente do leite de búfala.

Os queijos analisados neste trabalho estavam disponíveis comercialmente como sendo exclusivamente de búfala. Trabalhos sobre a produção do queijo Marajoara demonstram que, embora existam variações, o incremento de leite de vaca não é relatado e estes produtos são comercializados como sendo derivados exclusivamente de búfala. Desta forma, nenhum dos queijos analisados neste artigo poderia apresentar traços de leite bovino sem que este fato fosse informado ao consumidor.

Visando detectar fraudes em queijos por adição de leite de outra espécie que não aquela descrita no produto, autores vem utilizando diversas técnicas. Dentre elas, a PCR vem se destacando, por se tratar de uma ferramenta que gera resultados rápidos e por sua alta especificidade^{3,7-10}. Segundo Dias et al¹¹, diversas formas de PCR podem ser utilizadas para a detecção de fraude em queijos, tais como a PCR tradicional, PCR *multiplex* e a *Real Time* PCR. Nosso trabalho propõe a utilização da técnica de PCR para esta finalidade nos queijos comercializados na região alvo do estudo, visto que a mesma vem sendo utilizada com sucesso por diversos autores em vários locais do mundo. Ainda, o presente estudo relata o uso de uma PCR *multiplex* para a referida detecção, técnica esta ainda pouco relatada por outros autores com o propósito de detectar fraude em queijo bubalino comercialmente disponível.

Bottero et al¹² descrevem o uso da PCR *multiplex* para detecção de fraude em amostras de produtos lácteos, porém demonstram a eficiência da técnica na detecção de DNA de bovinos, ovinos e caprinos. Já Reale et al¹³ propuseram a detecção de fraude em produtos a base de leite ovino, caprino, bovino e bubalino, porém estes autores não analisaram amostras disponíveis no comércio.

Além destes autores, Felligini et al¹⁴ também propuseram o uso da PCR *multiplex* para detecção de DNA bovino e bubalino em queijos, utilizando *primers* diferentes daqueles propostos em nosso trabalho.

A PCR como método de detecção de fraude é possível devido à extração de DNA total do leite e seus derivados, como o queijo. O DNA extraído é utilizado para amplificar o DNA específico, utilizando-se *primers* que codificam parte do gene de interesse. Esses *primers* são responsáveis pela especificidade da técnica e sua capacidade de anelamento à fita molde determina o sucesso de sua aplicação.

Autores como Mašková e Paulíčková¹⁰ utilizaram *primers* para identificar o gene que codifica o citocromo B, sendo o *primer forward* comum as espécies estudadas e o *reverse* espécie-específico. Analisando queijos de cabra e ovelha, em 24 amostras analisadas, os referidos autores detectaram quatro fraudes por adição de leite de vaca. Esse mesmo alvo também foi utilizado em *primers* em pesquisas feitas por Zhang et al¹⁵ e Rea et al¹⁶, que objetivaram detectar o limite mínimo de fraude em queijo de búfala fabricados experimentalmente, que foi de 35 pg de DNA bovino¹⁵ e 1 % de adição de leite bovino¹⁶, respectivamente. Ainda, *primers* visando detectar um componente próprio do leite também podem ser utilizados, como exemplo aqueles que amplificam o gene da β -caseína¹⁷. No presente estudo, os *primers* utilizados amplificam sequências do RNA ribossomal mitocondrial 12S de bovinos e bubalinos. Os resultados aqui relatados demonstram que os iniciadores utilizados foram eficientes na detecção de fraude, tanto para uso em PCR convencional^{5,6} quanto em PCR *multiplex*.

Ainda, neste trabalho, a detecção em amostras reais foi estabelecida pela fabricação de queijos experimentalmente fraudados com incremento de diferentes percentagens de leite bovino. Através desta avaliação observou-se que a PCR *multiplex* proposta foi capaz de detectar incorporação de leite bovino em percentagens que variaram de 10 a 100 %, semelhante ao relatado por Darwish et al⁷, que utilizaram os mesmos *primers* e propuseram o uso de uma PCR tradicional.

Embora a PCR seja eficiente, algumas de suas etapas são cruciais para o sucesso da técnica.

Dentre estas etapas pode-se citar a extração de DNA. Esta etapa se torna ainda mais relevante para a realização da técnica diretamente em amostras alimentares, visto que os alimentos apresentam vários inibidores, que podem vir a inviabilizar sua realização. Vários autores citam técnicas de extração de DNA eficientes^{10,15,18}. A técnica relatada neste trabalho foi a preconizada por Darwish et al⁷, sendo conhecida como técnica do fenol/clorofórmio. Este protocolo foi modificado neste trabalho e foi efetivo em todas as amostras. O sucesso deste método de extração pode estar relacionado ao uso da Proteinase K, que segundo os fabricantes degrada muitas proteínas no estado nativo, mesmo na presença de detergentes, sendo desta forma utilizada em vários protocolos de extração por sua ampla ação em diferentes amostras.

Vários autores relatam protocolos para extração de DNA a partir de amostras de queijo. Lopez-Calleja et al⁸ realizaram em seu estudo a extração de DNA do queijo de búfala, utilizando além do tampão de lise, Cloridato de Guanidina 5 M e Proteinase K. No estudo de Teixeira et al¹⁸ foram testados três protocolos de extração de DNA em amostras de queijo (fenol/clorofórmio, uso de Tiocinato de Guanidina e Kit QIAMP DNA stool) e estes autores demonstraram que a utilização da técnica sugerida por Boom et al¹⁹, que utiliza o Tiocinato de Guanidina bem como a utilização do Kit QIAMP DNA stool para extração de DNA foram superiores, pois o leite e principalmente o queijo possuem baixa quantidade de DNA proveniente da descamação do úbere e este produto contém vários inibidores da PCR, como alto teor de proteínas, gorduras e degradação do DNA pelo processo de fabricação. Os mesmos autores relatam que a técnica com Tiocinato de Guanidina não permite que proteínas e outros contaminantes estejam presente no final do processo de extração. Já Maskova e Paulickova¹⁰, ao extraírem DNA de queijo de cabra e ovelha utilizando o Kit Invisorb Spin Food (Invitek, Co., Berlin, Germany) e Zhang et al¹⁵ foram bem sucedidos realizando a extração de DNA pelo método de Brometo de Cetiltrimetilamônio.

As amostras comerciais analisadas neste trabalho apresentavam características distintas de comercialização, uma vez que eram oriundas

de diferentes tipos de pontos de venda. Dentre as amostras analisadas, aquelas comercializadas na Ilha do Marajó e em feiras livres foram as que se apresentaram fraudadas. Os derivados do leite de búfala no estado do Pará, principalmente na Ilha do Marajó, tornaram-se bastante populares, sendo procurados frequentemente por diversos turistas e sendo consumidos nos diversos pratos típicos comercializados em restaurantes e hotéis dos municípios que compõe a referida ilha, sendo considerado um queijo amplamente consumido na região Norte do país.

Vários autores definem as características do queijo marajoara, porém, por se tratar de um alimento produzido na maioria das vezes de forma artesanal, grandes variações são relatadas. As duas variações mais conhecidas do queijo marajoara são o tipo creme, que possui maior quantidade de umidade e menor de lipídeo e tipo manteiga, que possui em sua composição manteiga propriamente dita, contendo menor teor de umidade e maior teor de lipídeo²⁰.

Visando padronizar e legalizar a produção do queijo do Marajó, a Agência de Defesa Agropecuária do Estado do Pará (ADEPARA), criou a lei nº 7.565 de 25 de outubro de 2011, que legaliza o licenciamento, o registro e a comercialização de produtos artesanais no estado do Pará, e entre os produtos descritos estão: Camarão salgado, produtos lácteos, Derivados de carne, Derivados da mandioca, Frutas, legumes, Hortaliças e o queijo do Marajó²¹. Embora esta legislação demonstre um avanço, a mesma não fornece concretamente os padrões necessários para uma fiscalização eficiente, deixando a desejar na fiscalização do produto final por parte dos órgãos competentes.

Embora a técnica de PCR venha sendo aplicada com sucesso na detecção de fraudes em nível experimental, poucos autores descrevem resultados referentes à investigação em amostras comercialmente disponíveis. Das 44 amostras analisadas nesse trabalho, seis (13,63 %) apresentaram fraude por adição de leite de vaca. Resultados semelhantes foram alcançados por Lopez-Calleja et al⁸, que relataram o uso da PCR como alternativa simples e rápida para detecção de DNA específico de vaca em amostras de leite e queijo tipo muçarela de búfala adquiridas na Espanha.

O *primer* ou iniciador utilizado por esses autores foi o mesmo utilizado neste trabalho.

Darwish et al⁷ analisaram 21 amostras de leite fluido de búfala disponíveis no mercado e detectaram fraude em 8 das amostras coletadas. Já Mašková e Paulíčková¹⁰, investigando fraude em 17 amostras de queijo de cabra, detectaram incorporação de leite de vaca em 3 amostras, e investigando 7 amostras de queijo de ovelha, detectaram a incorporação de leite de vaca em 1 amostra.

Teixeira et al¹⁸, ao adquirirem 30 amostras de queijos, que possuíam registro no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento no município de Belo Horizonte no estado de Minas Gerais, dentre as quais sete eram consideradas somente de leite de búfala e 23 provenientes de leite, sem especificação da espécie, observaram percentagens de 93,3 % de PCR positivas utilizando o protocolo de extração com Tiocinato de Guanidina. Ao utilizar a técnica com fenol/clorofórmio, que também foi testado em nosso trabalho nas mesmas amostras, o resultado diminuiu para 60 %. Este fato deve ser considerado, visto que o número de fraudes aqui demonstrado pode ser ainda maior, caso outro protocolo de extração de DNA seja testado.

Lopez-Calleja et al⁸, detectaram fraude em todas amostras de queijo e leite de búfala experimentalmente preparados com as seguintes proporções de leite de vaca: 100 %, 10 %, 5 %, 1 %, 0,5 % e 0,1 %, esse fato pode estar relacionado com o protocolo de extração desses autores, que utilizaram no início do processo de extração kit de purificação de DNA (Kit Wizard DNA cleanup, Promega, Madison, WI). Resultado semelhante foi obtido em nosso trabalho, demonstrando que o protocolo de extração aqui adotado pode ser uma alternativa viável para a detecção de fraudes em produtos lácteos através da técnica alvo do estudo.

Reale et al¹³, além de detectarem as mesmas proporções que os autores citados a cima, detectaram fraude em proporções de 99 %, 90 %, 75 % e 50 % de leite de vaca utilizando o protocolo de Sambrook et al²² para a extração de DNA. Os mesmos resultados foram obtidos por Mašková e Paulíčková¹⁰, que também conseguiram detectar a fraude por adição de leite de vaca em queijos de

cabra com porcentagem mínima de 1 %.

O leite de búfala possui composição química diferenciada e, por tanto, salientamos que este fato pode dificultar ainda mais a quebra de estruturas que possibilitam a liberação do DNA nas amostras. Por esta razão, estudos futuros devem ser desenvolvidos, visando determinar a influência que diferentes tipos de queijo bubalino podem ter na análise proposta, uma vez que estes podem apresentar características químicas distintas que poderão inclusive inibir as reações de PCR. Além disso, embora os resultados aqui demonstrados sejam relevantes e apontem para a presença de fraude na região estudada, pesquisas posteriores devem ser realizadas visando a detecção de percentagens menores de leite bovino e/ou a quantificação desta matéria prima por meio da *Real Time PCR*.

CONCLUSÃO

Concluiu-se que a técnica de PCR *multiplex* proposta foi capaz de detectar de forma eficiente a presença de fraude em amostras de queijos bubalinos pela incorporação de 10 %, 25 %, 50 %, 75 % 90 % de leite bovino, podendo ser uma alternativa a ser utilizada na rotina de fiscalização destes produtos para esse percentual de fraude. Além disso, o referido trabalho demonstrou a existência de fraude em aproximadamente 13 % das amostras de queijo de búfala comercializadas na região alvo do estudo, o que reforça a necessidade de maior fiscalização por parte dos órgãos competentes para o consumidor não siga sendo lesado.

REFERÊNCIAS

1. Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal (RIISPOA). Diário Oficial [da] União. Brasília, DF, 7 jul. 1956. Seção 1, 10785p.
2. Oliveira RL, Ladeira MM, Barbosa MAAF, Matsushita M, Santos GT, Bagaldo AR. Composição química e perfil de ácidos graxos do leite e muçarela de búfalas alimentadas com diferentes fontes de lipídeos. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2009; 61 (3): 736-44. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352009000300030>

3. Drummond MG, Brasil BSAF, Dalsecco LS, Brasil RSAF, Teixeira LV, Oliveira DAA. A versatile real-time PCR method to quantify bovine contamination in buffalo products. *Food Control*. 2013; 29(1): 131-7. doi:10.1016/j.foodcont.2012.05.051
4. Mendes CG, Sakatomo SM, Silva JBA, Jácome CGM, Leite AI. Análise físico-químicas e pesquisa de fraude no leite informal comercializado no município de Mossoró, RN. *Ci Anim Bras*. 2010; 11 (2): 349-56. doi 10.526/cab.v11i2.1146
5. Dias SS, Nogueira LC, Reis RCS, Barbosa CG. Avaliação da Disponibilidade e Rotulagem de Derivados de Leite de Búfala nas Diferentes Estações do ano comercializados na Zona Oeste do Rio de Janeiro. *Alim Nutr*. 2012;23(3):421-6.
6. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pecuária 2012: Bovinos - efetivo dos rebanhos. [Acesso 2014 jul13]. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/estadosat/].
7. Darwish S F, Allam HA, Amin AS. Evaluation of PCR Assay for Detection of Cow's Milk in Water Buffalo's Milk. *World Appl Sci J*. 2009; 7(4): 461-7.
8. López-Calleja I, Gonzalez A, Farjado V, Rodríguez MA, Hernández PE, García RM. PCR Detection of Cow's Milk in Water Buffalo Milk and Mozzarella Cheese. *Int Dairy J*. 2005; 15(11): 1122-9. doi:10.1016/j.idairyj.2004.12.003
9. Dalmaso E, Fontanella P, Piattib T, Civeraa S, Rosatic MT, Bottero A. Multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs. *Mol Cell Probes*. 2004; 18(2): 81-7. doi:10.1016/j.mcp.2003.09.006
10. Mašková E, Paulíčková E. PCR-Based Detection of Cow's Milk in Goat and Sheep Cheeses Marketed in the Czech Republic. *Czech J Food Sci*. 2006; 24(3): 127-32.
11. Dias SS, Lobato V, Verruma-Bernardi MR. Metodologias para identificar adulteração em queijos produzidos com leite de diferentes espécies de animais. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2009; 68(3): 327-33.
12. Bottero MT, Civera T, Nucera D, Rosati S, Sacchi P, Turi RM. A multiplex polymerase chain reaction for the identification of cow's, goat's and sheep's milk in dairy products. *Int Dairy J*. 2003; 13(4): 277-82. doi:10.1016/S0958-6946(02)00170-X
13. Reale S, Campanella A, Mergiolli A, Pilla F. A novel method for species identification in milk and milk-based products. *J Dairy Res*. 2008; 75(1): 107-12. doi: 10.1017/S0022029907003020
14. Fellugini M, Bonizzi I., Curik VC, Parma P, Greppi GF, Enne G. Detection of adulteration in Italian Mozzarella Cheese Using Mitochondrial DNA Templates as Biomarkers. *Food Technol Biotechnol*. 2005; 43(1): 91-5.
15. Zhang CL, Fowler MR, Scott NW, Lawson G, Slater A. A TaqMan real-time PCR system for the identification and quantification of bovine DNA in meats, milks and cheeses. *Food Control*. 2007; 18(9): 1149-58. doi:10.1016/j.foodcont.2006.07.018
16. Rea S, Chikuni K, Branciari R, Sangamayya RRS, Ranucci D, Avellini P. Use of duplex polymerase chain reaction (duplex-PCR) technique to identify bovine and water buffalo milk used in making mozzarella Cheese. *J Dairy Res*. 2001; 68(4): 689-98. doi: 10.1017/S0022029901005106
17. Veloso ACA, Teixeira N, Ferreira IMPLVO, Ferreira MA. Detecção de Adulterações em Produtos Alimentares Contendo Leite e/ou proteínas Lácteas. *Quim Nova*. 2002; 25 (4): 609-15. http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422002000400016
18. Teixeira LV, Teixeira CS, Caldeira LGM, Bastianetto E, Oliveira DAA. Extração de DNA e Avaliação da Composição Espécie- específica de Queijos. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2012; 64(3): 721-6. http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352012000300025
19. Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, Van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol*. 1990; 28(3): 495-503.
20. Figueiredo EL, Júnior JBL, Toro UM, Lima SCG. Queijo do Marajó Tipo Creme: Parâmetros Físico-Químicos e Sensoriais. *Rev Inst Latic Cândido Tostes*. 2011; 373(66): 26-33.
21. Pará. Secretaria de Estado de Pesca e Aquicultura. Lei Estadual nº 7.565, de 25 de Outubro de 2011. Dispõe sobre normas para licenciamento de estabelecimentos processadores, registro e comercialização de produtos artesanais comestíveis de origem animal e vegetal no Estado do Pará. Diário Oficial [do] Estado do Pará. Belém, Pará, 16 Jul. 2012. Caderno 6 -7, 8p.
22. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1989.