GISELE OLIVEIRA DE SOUZA

Mozzarella de búfala: avaliação da reação em cadeia pela polimerase (PCR) para detectar fraude devido à adição de leite de vaca ao de búfala.

São Paulo
2010

GISELE OLIVEIRA DE SOUZA

Mozzarella de búfala: avaliação da reação em cadeia pela polimerase (PCR) para detectar fraude devido à adição de leite de vaca ao de búfala.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:
Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:
Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:
Profª. Dra Evelise Oliveira Telles

São Paulo

2010

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP
5/11/10

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2359
FMVZ

Souza, Gisele Oliveira de
Mozzarella de búfala: avaliação da reação em cadeia pela polimerase (PCR) para detectar fraude devido à adição de leite de vaca ao de búfala / Gisele Oliveira de Souza. -- 2010.
72 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2010.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.
Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Profa. Dra. Evelise Oliveira Telles.

1. Mozzarella. 2. Leite de búfala. 3. Leite de vaca. 4. Fraude. 5. Detecção. 6. PCR. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Mozzarella de búfala: avaliação da reação em cadeia pela polimerase (PCR) para detectar fraude devido à adição de leite de vaca ao de búfala", protocolado sob o nº1556/2008, não utilizando animais, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Evelise Oliveira Telles, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 11/02/09.

(We certify that the Research "Mozzarella of buffalo: assessment by polymerase chain reaction (PCR) to detect fraud due to milk addition of cow to the one of buffalo", protocol number 1556/2008, will not be used animals, under the responsibility Profa. Dra. Evelise Oliveira Telles, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 02/11/09).

São Paulo, 12 de fevereiro de 2009

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

1934 | 2009 USP FMVZ 75

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
fone: + 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
http://www.fmvz.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SOUZA, Gisele Oliveira de

Título: ***Mozzarella* de búfala**: avaliação da reação em cadeia pela polimerase (PCR) para detectar fraude devido à adição de leite de vaca ao de búfala.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data_____/_____/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr.:_____Instituição:_____

Assinatura:_____Julgamento:_____

Prof. Dr.:_____Instituição:_____

Assinatura:_____Julgamento:_____

Prof. Dr.:_____Instituição:_____

Assinatura:_____Julgamento:_____

DEDICATÓRIA

A Jesus Eucarístico que me fortalece e ilumina o meu caminho e a Virgem Maria por sua interseção.

*Aos meus Pais (**Orlando e Nalva**) que muitas vezes deixaram de realizar os seus sonhos para a realização dos meus, pelo incentivo nos meus estudos e pelo grande exemplo de vida me dado.*

*As minhas irmãs **Kátia** e **Sheila** pelos momentos alegres e tristes que com elas enfrento com mais facilidade, pelo apoio e encorajamento.*

*Aos meus sobrinhos **Leonardo** e **Larissa** que fazem dos nossos dias agitados e a manutenção dos nossos sonhos.*

*Ao meu querido amigo, companheiro, e esposo (**Fábio**), pela alegria e palavras de incentivo: falta pouco você já é uma vencedora.*

*Aos meus avós (**Anizia, José, Nair** e **Leonardo**) in memória por gerar as pessoas mais incríveis os meus pais.*

AGRADECIMENTO

A minha orientadora e colega profissional **Profª. Dra. Evelise Oliveira Telles**, que desde a minha especialização em vigilância Sanitária de Alimentos colaborou com a minha monografia, pela confiança, incentivo e principalmente pela amizade construída de 2000 até o atual momento o meu muito obrigado.

Aos Professores: **Silvio Arruda Vasconcellos, Sonia Regina Pinheiro e José Soares Ferreira Neto** pelo incentivo no meu crescimento profissional.

Ao **Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares** e **Lara Borges**, pela atenção, ajuda nos momentos difícies, sugestões e amizade.

Ao **Prof. Dr. Leonardo José Richtzhain** e **Paulo Eduardo Brandão** por te me permitido fazer parte do Labmas.

Ao **Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli** por ceder os bovinos para colheita de sangue.

Aos meus cunhados **Ricardo** e **José** pela amizade e força.

Aos funcionários do VRA, **Belau, Iraiton e Luiz** pela ajuda, atenção e disponibilidade.

Aos técnicos de laboratório **Sheila** e **Bispo** pela colaboração, disponibilidade, ensinamento e sugestões prestadas neste projeto.

A todos os meus colegas de trabalho **Zenaide, Bispo, Sandra, Sheila, Priscila, Valquiria, Simone, Renato, Pedrinho, Hilda, Jucélia, Alexandre, Rosana, Carol, Rose, Nilde, Antonio, Washington, Danival, Cristina e Virginia** do VPS que de forma direta ou indiretamente utilizaram palavras de incentivo nesta nova jornada da minha vida.

As MAAM do LZB: **Amane, Flavia, Vivi** por todo o divertimento, alegria em todos os momentos no lab.

A **Cássia** por realizar as colheitas de sangue dos bovinos, e pelo incentivo e apoio.

A **Flavia Carolina, Vanessa, Erika** e **Léia** pelos momentos de descontração.

As meninas do LABMAS: **Alessandra, Cintia Baldin, Cintia Maria, Vanessa, Suely (Suelen), Iracema, Camila Oliveira, Gisele Ayres, Karen Ferrari e Carol** pelos momentos de diversão.

Aos pós-graduando da Higiene Alimentar: **Juliana, Cássia, Camila, Mauricio, Carina** e **Danielle**.

Aos meus amigos do Colégio **Priscila, Clodoaldo, Silvana, Marcio** e **Eliane** pelos momentos de alegria.

As minhas amigas Camilianas **Priscila, Monaliza, Patrícia, Luciana** e **Cristiane** pela força e apoio.

A **Eugênia** (in memória) pela amizade adquirida e incentivo para que eu inicia-se o mestrado.

À **Claudia Lima, Tânia Delonero, Daura, Carlos** e **Joana**, da Secretaria da Pós – graduação, por todo apoio e auxílio

À **Sandra e Helena**, da Biblioteca, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, pela atenção e colaboração para finalizar a dissertação.

À comissão de Bioética e **Roseli da Costa Gomes**, Secretaria da Comissão.

A todos os **Mestres** do Programa de Pós – Graduação do VPS pelos ensinamentos adquiridos nas disciplinas.

A Coordenadora do Programa de PÓS-GRADUAÇÃO **Profª. Dra. Solange Maria Gennari**, e ao Departamento VPS por todo apoio e incentivo para o meu crescimento profissional.

Um grupo de pesquisadores estava decidindo qual deles iria encontrar com Deus e dizer que eles não precisavam mais Dele.
Finalmente um dos cientistas apresentou-se como voluntário e foi dizer a Deus que Ele não era mais necessário...
Assim, ao encontrar Deus, o cientista diz a Ele:
Deus, sabe como é, um punhado de nós tem estado pensando neste assunto e eu vim dizer que você não é mais necessário.
Quero dizer, nós temos elaborado grandes teorias e idéias, nós clonamos uma ovelha e logo iremos clonar humanos.
Como você pode ver, nós realmente não precisamos mais de você.Deus balança a cabeça, compreensivamente e diz: Bom, sem ressentimentos. Mas, antes, vamos fazer um concurso.
O que você acha?O cientista diz: Para mim, tudo bem. Que tipo de concurso?
Um concurso de fazer homem - Deus responde. Legal! Sem problemas! - Exclama o cientista. O cientista rapidamente se adianta pegando um punhado de barro e diz: Vamos lá, estou pronto!!! E Deus diz: Não assim.
Você tem que criar seu próprio barro.

"Prometo que, ao exercer a profissão de nutricionista, o farei com dignidade e eficiência, valendo-me da ciência da nutrição, em benefício da saúde da pessoa, sem discriminação de qualquer natureza. Prometo, ainda, que serei fiel aos princípios da moral e da ética. Ao cumprir este juramento com dedicação, desejo ser merecedor dos louros que a profissão proporciona."

(Juramento Oficial do Nutricionista - Resolução CFN nº 382/2006)

RESUMO

SOUZA, G. O. ***Mozzarella* de búfala:** avaliação da reação em cadeia pela polimerase (PCR) para detectar fraude devido à adição de leite de vaca ao de búfala. [Buffalo mozzarella: assessment by polymerase chain reaction (PCR) to detect fraud due to the addition of cow milk to buffalo]. 2010. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Mozzarella de búfala é um queijo de fácil fabricação e que tem grande aceitabilidade no mercado. Esses fatos, associados ao melhor rendimento de fabricação e maior valor agregado, quando comparado ao similar feito com leite de vaca, têm estimulado a fraudação. Embora a PCR já seja uma técnica reconhecida para garantir a autenticidade da *mozzarella* de búfala em outros países, é necessária sua validação para as condições do rebanho nacional. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a PCR para a detecção de adulteração de queijo tipo mussarela de búfala no Brasil, em condições experimentais. Utilizou-se dois *primer*, já descritos na literatura, para detecção do gene citocromo b (cytb) de bovino e de bubalino. Esses primers foram testados em sangue das raças Nelore e Holandês (representantes, respectivamente, das espécies *Bos indicus* e *Bos taurus*), e em sangue da raça Mediterrânea (*Bubalus bubalis*). Também foram testados em leite e na mozzarella, tanto nos produtos puros como em misturas. Os primers reconheceram especificamente o DNA bovino e bubalino tanto no sangue quanto no leite e mozzarella. A técnica foi mais sensível para detectar a fraude na mozzarella que no leite. Na *mozzarella* foi possível detectar a presença de 0,01% de leite bovino adicionado ao de búfala, utilizando uma técnica de extração (Fenol/Clorofórmio) e 0,05% de adição, quando se fez outro método de extração (Kit Nucleospin Food). Os resultados mostraram que a técnica é muito sensível e pode ser empregada como método para assegurar a autenticidade do produto, especialmente se a fábrica produzir exclusivamente produtos de leite de búfala. No entanto, se o fabricante utilizar os mesmos equipamentos para a fabricação de produtos de búfala e de vaca, a técnica pode gerar resultados falsos positivos (quanto à fraude).

Palavras-chaves: *Mozzarella*. Leite de búfala. Leite de vaca. Fraude. Detecção. PCR.

ABSTRACT

SOUZA, G. O. **Buffalo mozzarella:** assessment by polymerase chain reaction (PCR) to detect fraud due to the addition of cow milk to buffalo. [*Mozzarella* de búfala: avaliação da reação em cadeia pela polimerase (PCR) para detectar fraude devido à adição de leite de vaca ao de búfala]. 2010. 72 f . Dissertação. (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

The buffalo *mozzarella* is a cheese of easy fabrication that has great acceptability in the market. These facts, associated to the best fabrication income and higher added value, when compared to the similar made with cow milk, has stimulated fraud. Although the PCR is an acknowledged technique that guarantees the authenticity of the buffalo *mozzarella* in other countries, its validation is necessary for the conditions of the national herd. The objective of the present study was to evaluate PCR for the detection of buffalo *mozzarella* adulteration in Brazil, in experimental conditions. Two primers were utilized, already described in literature, for the detection of bovine and bubaline citocrome b (cytb). These primers were tested in blood of Nellore and Holstein race (respectively representatives of *Bos indicus* and *Bos taurus*), and in blood of Mediterranean race (*Bubalus bubalis*). They were also tested in milk and *mozzarella*, in pure products and in mixtures. The primers specifically recognized the bovine and bubaline DNA, either in blood as in milk and *mozzarella*. The technique was more sensitive to detect fraud in *mozzarella* then in milk. In *mozzarella*, it was possible to detect the presence of 0,01% of cow milk added to the buffalo's, utilizing an extraction technique (Phenol/Chloroform) and 0,05% of addition when another extraction method was used (Kit Nucleospin Food). The results showed that the technique is very sensitive and can be applied as a method to assure the authenticity of the product, especially if the industry exclusively produces buffalo milk products. However, if the producer utilizes the same equipments for the fabrication of buffalo and cow products, the technique can generate false positive results (related to fraud).

Keywords: Mozzarella. Bufallo Milk. Cow Milk. Fraud. Detection. PCR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Eletroforese em gel de agarose 2% para detecção de fragmentos amplificados do gene citocromo b.....45

Figura 2 – Eletroforese em gel de agarose 2% para detecção de fragmentos amplificados do gene citocromo b (cytb) haplotype RB2.....46

Figura 3 – Eletroforese em gel de agarose 2% PCR para detecção de DNA bubalino extraído com protocolo Fenol / Clorofórmio de leite puro e integral de búfala e adição de leite de vaca ao de búfala em diferentes porcentagens.....47

Figura 4 – Eletroforese em gel de agarose 2% PCR para detecção de DNA bovino extraído com protocolo Fenol / Clorofórmio em leite puro e integral de búfala e adição de leite de vaca ao de búfala em diferentes porcentagens.....48

Figura 5 – Eletroforese em gel de agarose 2% PCR para detecção de DNA bubalino extraído com protocolo Kit Nucleo Spin Food em leite puro e integral de búfala e adiçãode leite de vaca ao de búfala em diferentes porcentagens.....49

Figura 6 – Eletroforese em gel de agarose 2% PCR para detecção de DNA bovino extraído com protocolo Kit Nucleospin Food em leite puro e integral de búfala e adição de leite de vaca ao de búfala em diferentes porcentagens.....50

Figura 7 – Eletroforese em gel de agarose 2% PCR para detecção de DNA bubalino extraído com protocolo Fenol / Clorofórmio em *mozzarella* pura de búfala e fraudada com leite de vaca em diferentes porcentagens.....52

Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose 2% PCR para detecção de DNA bovino extraído com protocolo Fenol / Clorofórmio em *mozzarella* pura de búfala e fraudada com leite de vaca em diferentes porcentagens.....53

Figura 9 - Eletroforese em gel de agarose 2% PCR para detecção de DNA bubalino extraído com protocolo kit nucleospin food em *mozzarella* pura de búfala e fraudada com leite de vaca em diferentes porcentagens.....59

Figura 10 - Eletroforese em gel de agarose 2% PCR para detecção de DNA bovino extraído com protocolo kit nucleospin food em *mozzarella* pura de búfala e fraudada com leite de vaca em diferentes porcentagens.....59

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Raças que representam a diversidade do rebanho brasileiro de bovinos e bubalino.....30

Quadro 2 - Sequência dos *primers* utilizados para a detecção de *Bos taurus* e *Bos indicus*.....32

Quadro 3 – Sequência dos *primers* utilizados para a detecção de *Bubalus bubalis*.....33

Quadro 4 - Porcentagens de mistura de leite de búfala ao leite de vaca que constituíram as amostras submetidas a PCR para avaliar o limiar de detecção da técnica.....37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise genotípica das seqüências utilizando o gene citocromo b e gene Citocromo b (cytb) haplotype RB2 (*Bubalus Bubalis*)….....……...46

Tabela 2 – Resultados das leituras de absorbância feitas com os comprimentos de onda 260 e 280 nM para dois protocolos de extração de DNA, segundo diferentes porcentagens de adição de leite vaca ao de búfala – São Paulo – 2010.....57

Tabela 3 – Resultados das leituras de absorbância feitas com os comprimentos de onda 260 e 280 nM para dois protocolos de extração de DNA de *mozzarella*, em diferentes porcentagens de adição de leite vaca ao de búfalo – São Paulo – 2010.....58

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcento
ºC	graus Celsius
®	marca registrada

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cytb	citocromo b
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	desorribonuleotídeo trifosfatado
et al.	colaboradores
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
g	gramas
HCl	ácido clorídrico
LABMAS	Laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia
M	molar
mg	miligrama
$Mgcl_2$	Cloreto de magnésio
mL	militro
mM	milimolar
NaCl	cloreto de sódio
pb	pares de base
PCR	reação em cadeia pela polimerase
pH	concentração de hidrogênio iônico
Pk	proteinase K
SDS	dodecil sulfato de sódio
TBE	tris borato EDTA
TE	TRIS EDTA
TRIS	hidroximetil aminometanoS
U	unidades

µL	microlitros
µg	microgramas
Xg	vezes aceleração da gravidade terrestre (9,8 m s^2)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....22

2 OBJETIVOS.....28

3 MATERIAIS E MÉTODO.....30

3.1 Avaliação do *primer* de BOTTERO quanto à capacidade de discriminação entre *Bubalus bubalis*, *Bos indicus* e *Bos taurus*.....30

3.1.2 Obtenção do sangue.....31

3.1.3 Protocolo de extração e purificação de DNA das amostras de sangue.....31

3.1.4 Amplificação do DNA.....32

3.1.5 Visualização do produto amplificado.....33

3.1.6 Purificação do produto amplificado.....34

3.1.7 Quantificação do DNA purificado.....34

3.1.8 Reação de seqüenciamento.....34

3.1.9 Precipitação do produto amplificado.....35

3.1.10 Sequenciamento.....35

3.1.11 Alinhamento, tradução das sequencias de nucleotídeos e edição final.....36

3.2 Avaliação da PCR para detecção da fraude no leite de búfala.....36

3.2.1 Protocolo de extração e purificação de DNA das amostras de leite.....37

3.2.2 Protocolo de extração e purificação de DNA das amostras de leite com KIT.....39

3.3 Fabricação da mozzarella.....40

4 QUANTIFICAÇÃO DE DNA EXTRAÍDO.....42

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....44

5.1 Avaliação do *primer* de BOTTERO nas amostras de sangue.....44

5.2 Avaliação do *primer* de BOTTERO nas amostras de leite.....47

5.2.1 Amplificação do DNA nas amostras de leite utilizando a extração com Fenol / Clorofórmio.....47

5.2.2 Amplificação de DNA nas amostras de leite utilizando extração com Kit Nucleo Spin Food.....48

5.3 Avaliação dos *primers* de Bottero nas amostras de *mozzarella*.....51

5.3.1 Amplificação do DNA das amostras de *mozzarella* utilizando extração com

Feno / Clorofórmio.....51
5.3.2 Amplificação do DNA das amostras de *mozzarella* utilizando extração com Kit.....53
5.4 Quantificação de DNA.....56
6 CONCLUSÕES 60
REFERÊNCIAS.....62
APÊNDICES.....69

INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

Mozzarella é o principal derivado do leite bubalino e na Itália é fabricado desde o século XVI exclusivamente com leite de búfala. É mais valorizada que o similar obtido com o leite de vaca devido, principalmente, às suas características organolépticas e reológicas peculiares segundo Silva et al (2003).

Essa peculiaridade da *mozzarella* está relacionada às características do leite de búfala, quando comparadas às do leite de vaca. O leite bubalino apresenta maior quantidade de proteína, lipídios, lactose e cálcio, o que favorece o rendimento de fabricação de derivados lácteos, e ainda tem menos colesterol total (VERRUMA, 1993; VERRUMA; OLIVEIRA, 1993; VERRUMA, 1994; TEIXEIRA; BASTIANETTO; AMARAL et al., 2005; OLIVEIRA, 2005).

Segundo Amaral e Escrivão (2005), o produtor brasileiro de leite de búfala recebe um valor de 40 a 50% maior do que o preço pago pelo litro de leite de vaca.

Os fatos de a *mozzarella* ser um queijo de fácil fabricação, ter grande aceitabilidade no mercado, ter bom rendimento de fabricação e ser um produto de alto valor agregado, têm estimulado o aumento da produção desse queijo e, conseqüentemente, sua importância econômica para a indústria nacional (ZICARELLI, 1990; TONHATI, 1999; SENO; CARDOSO; TONHATI, 2007; BUZI; PINTO, 2009).

A produção mundial de leite bubalino vem aumentando a cada ano segundo dados divulgados pela EMBRAPA (2008); a produção de leite de búfala, em 2007, representou 12,7% do total de leite produzido.

De acordo com a Associação Brasileira de Criadores de Búfalos (ABCB, 2010), o rebanho bubalino hoje no Brasil conta com cerca de 3 milhões de animais, representando 2% do rebanho bovino, hoje com 150 milhões. Em torno de 30% das criações de búfalos são destinadas à produção leiteira e, nos últimos anos, o rebanho tem crescido a uma taxa de 45%.

Segundo Glass (2001) a produção diária de *mozzarella* de búfala para o mercado paulistano é de cerca de 3 mil quilos, enquanto a demanda, só para as pizzarias da cidade, é de aproximadamente 30 mil quilos. A ABCB (2005) calcula que 10 % das pizzas consumidas diariamente em São Paulo contêm, supostamente, *mozzarella* de búfala. Esses dados sugerem que há grande risco da população consumir um produto fraudado.

Deve-se considerar que a produção da *mozzarella* não atende apenas às pizzarias. Observa-se uma grande demanda pelo produto tanto para o consumo *in natura* quanto para utilização na culinária. Este produto tem presença nas gôndolas dos mercados e empórios e nos cardápios de pizzarias, cantinas e lanchonetes. Se essa demanda é um grande estimulo à indústria nacional, mas por outro, torna o produto mais susceptível à fraudação pela mistura de leite de menor valor no mercado, como o leite de vaca.

Assim, na tentativa de preservar o produtor, o industrial honesto e também o consumidor, a ABCB criou um selo de pureza concedido àqueles laticínios que comprovam o uso exclusivo de leite de búfala em seus produtos (GLASS, 2001). Esse certificado se estende, além da *mozzarella,* ao provolone, a ricota e ao queijo minas frescal (BERNARDES, 2004). Atualmente, nove laticínios participam do programa do Selo de Pureza. Foram registradas a produção de 31 milhões de litros de leite e 5,2 milhões de quilos de *mozzarella* em 2008 com expectativa de 15% de aumento em 2009 (ABCB, 2010).

Diante esses fatos, testes que permitam checar a espécie animal que deu origem à *mozzarella* têm grande aplicabilidade, tanto para o serviço oficial de fiscalização quanto para entidades que certificam a origem do produto, em benefício do consumidor. Com essa finalidade, alguns métodos são conhecidos e vêm sendo aplicados já há alguns anos (ADDEO et al., 1983, 1989, 1995; PELLEGRINO et al., 1991; VELOSO et al., 2002), o que valoriza o produto puro e incentiva o crescimento e fortalecimento da cadeia produtiva (GLASS 2001). Protege, ainda, a economia e, eventualmente, a saúde do consumidor; a constatação de mistura ilícita de leite de diferentes espécies sugere que, também, não se pode assegurar a qualidade higiênico-sanitária do produto.

Atualmente diferentes técnicas são utilizadas para identificar a autenticidade dos produtos contendo leite ou proteínas lácteas: métodos eletroforéticos através da fração correspondente à caseína (OTAVIANO et al., 2008; BUZI et al., 2009), reação em cadeia pela polimerase - PCR (REA et al., 2001; MAUDET; TABERLET, 2001, DI PINTO et al., 2004; FELIGINI et al., 2005, LÓPEZ-CALLEJA et al., 2005; MASKOVA; PAULICKOVA, 2006; DARWISH; ALLAM; AMIN, 2009). Segundo Veloso et al. (2002) podem ainda ser utilizados métodos imunológicos e espectrometria de massa.

Como destaca Herman (2001), embora não seja possível quantificar o grau de adulteração de uma determinada amostra, a PCR oferece a vantagem de poder ser aplicada em alimentos mesmo após estes terem sido submetidos a tratamento que produza desnaturação protéica como, por exemplo, tratamentos térmicos. O desenvolvimento e aprimoramento de técnicas

laboratoriais com este fim são relevantes na medida em que facilita a detecção de fraudes pela adição de leite de outra espécie animal.

A metodologia convencional utilizada para identificação de fraudes em leite de búfala, inclusive aquela adotada pela ABCB, baseia-se na identificação e diferenciação dos perfis eletroforéticos de proteínas do leite, em especial a fração correspondente à caseína. Esse recurso é eficiente e empregado com sucesso, no entanto, exige elevada habilidade e sofisticação laboratorial (REA et al., 2001).

A técnica de eletroforese ou focalização isoelétrica consiste na precipitação da fração de caseína proveniente do leite, para que esta possa caracterizar, quando exposta a corrente elétrica pré-determinada (2000 V, 25 mA, 4,0W) em gel de poliacrilamida, a espécie a qual pertence através do peso molecular característico de cada uma de cada espécie. Quando se avalia fraude em "Mozzarella di Buffala", esta técnica é sensível a partir de misturas com 4 % de leite de vaca e 96 % de búfala (REA et al 1991).

Em virtude de suas características operacionais, os métodos moleculares vêm sendo estudados como alternativa aos métodos baseados em diferenciação de perfil eletroforético de proteínas. Entre eles a reação em cadeia pela polimerase (PCR) destaca-se pela facilidade e rapidez de execução (REA et al., 2001; BOTTERO et al, 2002).

As espécies de mamíferos, mesmo as mais estreitamente correlacionadas, podem ser diferenciadas por PCR desde que marcadores moleculares adequados sejam utilizados. Dentre os marcadores utilizados para este fim, destacam-se aqueles que identificam polimorfismos no genoma mitocondrial (MATIOLI, 2001; AVISE, 1994).

O DNA mitocondrial (DNAmt) animal é uma molécula de fita dupla circular que codifica cerca de 5 % de toda a maquinaria necessária para o funcionamento da mitocôndria. Uma característica marcante do DNAmt é a sua alta taxa de evolução, quando comparada às taxas de evolução do DNA nuclear, fazendo do DNAmt um importante marcador para estudos de elucidação da relação evolutiva entre indivíduos, espécies e populações (MATIOLI, 2001; AVISE, 1994). De fato, um grande número de seqüências parciais do genoma mitocondrial, em especial às do gene codificador da cytocromo b oxidase (*cytB*) e da região controladora (*D-loop*) estão disponíveis em bancos de dados moleculares (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/).

A ocorrência de fraudes em outros produtos alimentícios também tem sido estudada pela técnica de PCR com base na detecção de genes mitocondriais. Assim, o desenvolvimento de PCRs específicas para detecção diferencial de DNA de galinha, peru, suínos, bovinos e ovinos

permitiu a determinação da origem animal de fragmentos de diversos alimentos disponíveis no mercado (HERMAN, 2001; BRUGNANO, 2010).

A identificação da origem animal de queijos tipo *mozzarella* de búfala foi realizada com base na detecção diferencial entre DNAmt bovino e bubalino por Rea et al. (2001) e Bottero et al. (2002). Em ambos os casos, os autores utilizaram PCR direcionadas ao gene codificador da *cytB*.

Pela avaliação da PCR descrita por Rea et al. (2001), é possível detectar queijo tipo mussarela de búfala adulterado com até 1 % de leite de origem bovina.

Bottero et al. (2002) desenharam e testaram dois *primers* para diferenciar DNA bovino do DNA bubalino em sangue. Após resultados satisfatórios de especificidade, aplicaram os primers em uma PCR duplex para identificar DNA das espécies bovina e bubalina em *mozzarella*. Fabricaram o queijo com 70% leite bovino e 30% leite de búfala e detectaram a presença do DNA de bovino e de bubalino. Os autores aplicaram também essa metodologia em amostras comerciais de queijos alegadamente produzidos com leite de vaca, leite de búfala e leite de mistura. Nas amostras de *mozzarella* DOP (produto com denominação de origem controlada) identificaram apenas o DNA bubalino (n=3); nas amostras de queijo de vaca (n=2) detectaram apenas o DNA correspondente ao bovino; na amostra assumidamente ser queijo de mistura (n=1), detectaram o DNA de ambas as espécies animais; finalmente, em seis amostras cujos rótulos diziam se tratar de *mozzarella* de búfala, cinco revelaram o DNA de ambas as espécies, caracterizando a fraude.

Maskova e Paulickova (2006), trabalhando com fraude em queijos por adição de leite de vaca ao de cabra e de ovelha, detectaram a presença do leite bovino até a mais baixa mistura estudada, que foi de 1%.

Darwish, Allam e Amin, (2009) estudaram esse tipo de fraude em misturas crescentes de leite de vaca ao de búfala (de 0,5% até 90%) e detectaram o DNA bovino em todas as amostras.

Já o trabalho apresentado por Buzi et al. (2009), objetivou investigar a fraude através da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida vertical para identificar as frações das caseínas. Os autores utilizaram 50 *mozzarellas* elaboradas com leite de búfala, que eram comercializadas em estabelecimentos varejistas de diferentes cidades do Estado de São Paulo. Comprovaram a presença do leite de vaca em 22% das amostras analisadas. Todas essas amostras, exceto uma, indicavam no rótulo que o leite de búfala era a única matéria prima. Além disso, observaram que as amostras que apresentavam o selo de pureza da ABCB

impresso nas embalagens continham apenas leite de búfala, comprovando assim a sua veracidade.

Porém, ressalta-se que um queijo de búfala manufaturado em instalações que tenham sido previamente utilizadas para processamento de leite bovino pode ser classificado, pela PCR, como adulterado, já que mínimas quantidades de DNA bovino podem ser detectadas em amostras de queijo (BOTTERO et al., 2002).

Para a adaptação das técnicas de PCR para as condições brasileiras deve-se considerar o patrimônio genético bovino nacional. Parte desse patrimônio é formada por bovinos da espécie *Bos taurus* vindos durante a colonização do País e, mais recentemente, das importações para cruzamento industrial. A outra parte é oriunda de bovinos da espécie *Bos indicus*, importados durante o século dezenove e meados do século vinte, sendo, até hoje, a espécie predominante na pecuária extensiva de corte e pecuária mista.

Neste sentido, embora a PCR para detecção de fraude em *mozzarella* de búfala seja uma técnica promissora, inclusive para fins de emissão de certificação de autenticidade do produto, é necessária sua validação para as condições do rebanho bovino nacional.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1. Avaliar os *primers* desenhados por Bottero et al. (2002) quanto à capacidade de detecção de DNA de bovinos e bubalinos.

2.2. Avaliar os *primers* desenhados por Bottero et al. (2002) quanto à capacidade discriminação das espécies *Bos taurus*, *Bos indicus* e *Bubalus bubalis*.

2.3. Avaliar a PCR para a detecção de adulteração de queijo tipo mussarela de búfala, em condições experimentais.

MATERIAIS E MÉTODO

3 MATERIAL E MÉTODOS

A seguir serão apresentados o material e a metodologia para realização de cada etapa do estudo para atingir os objetivos propostos.

3.1 Avaliação do *primer* de BOTTERO quanto à capacidade de discriminação entre *Bubalus bubalis*, *Bos indicus* e *Bos taurus*.

Para avaliar a capacidade da PCR sugerida por Bottero et al. (2002) em detectar e diferenciar as diferentes raças e espécies que compõe o rebanho bovino e bubalino do Brasil, foi feito um teste em amostras de sangue total das raças Nelore (representante escolhido da espécie *Bos indicus*), Holandês (representante escolhido da espécie *Bos taurus*) e Mediterrâneo (representante escolhido da espécie *Bubalus bubalis*). O quadro 1 mostra raças que compõem a diversidade dos gêneros *Bos* e *Bubalus* no país.

Gênero/espécie	**Raças**
Bos indicus	Nelore, Guzerá e Indubrasil
Bos taurus	Simental, Marchigiana, Holandês, Pardo-Suíço, Jersey e Caracu
Bubalus bubalis	Murrah, Jafarabadi e Mediterrâneo

Quadro 1 - Raças que representam a diversidade do rebanho brasileiro de bovinos e bubalinos

3.1.2 Obtenção do sangue

As amostras de sangue foram colhidas em tubos contendo anticoagulante citrato de sódio e foram transportadas e mantidas em refrigeração até o momento da análise, que se deu no laboratório de Zoonoses Bacterianas da FMVZ USP.

O sangue de Nelore e de Holandês proveio de animais do Departamento de Reprodução da FMVZ USP, *campus* da capital, e o sangue de Mediterrâneo, de animais da Fazenda Di búfala, Sorocaba- São Paulo.

3.1.3 Protocolo de extração e purificação de DNA das amostras de sangue (VIEIRA, 2004), adaptado

- Transferiu-se 800 µL da amostra sangue para um microtubo;
- Adicionou-se 800 µL de TE (10mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0);
- Homogeneizou por 10 segundos em vortex;
- Centrifugou-se a 13.000 x g por 5 minutos;
- Desprezou-se o sobrenadante num Becker com uma mistura de água e hipoclorito de sódio a 2,5%;
- Ressuspendeu-se com 800 µL TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0);
- Homogeneizou-se por 10 segundos em vortex;
- Centrifugou-se 13.000 x g por 5 minutos;
- Descartou-se o sobrenadante num Becker com uma mistura de água e hipoclorito de sódio a 2,5%;
- Repetiu-se este processo até que o sobrenadante obtido estivesse claro;
- Transferiu-se 500 µL da amostra purificada de sangue para outro microtubo;
- Adicionou-se 100 µL de solução de lise (Tris-HCl 1M pH 8; 20 µL EDTA 0,5 M pH8; 50 µL SDS 10%; 40 µL de PK 20mg/mL; 290 µL de água deionizada);
- Homogeneizou-se por 10 segundos em vortex;
- Incubou-se a 37ºC overnight;
- Adicionou-se 500 µL de fenol-clorofórmio (1:1);

- Centrifugou-se a 13.000 x g por 10 minutos;
- A fase aquosa foi transferida para outro microtubo de 1,5 mL (aproximadamente 400 µL);
- Adicionou-se 400 µL isopropanol;
- Incubou-se overnight a -20ºC;
- Centrifugou-se a 13.000 xg por 20 minutos;
- Desprezou-se o sobrenadante por inversão do tubo;
- Ressuspendeu-se o sedimento em 1 mL de etanol 70% gelado a 5 ºC;
- Centrifugou-se a 13.000 xg por 15 minutos;
- Desprezou-se sobrenadante por inversão do tubo;
- Incubou-se a 56ºC sem agitação até a secagem total do sedimento;
- Ressuspendeu-se o sedimento em 30 µL de TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1mM EDTA pH 8,0);
- Incubou-se a 56ºC por 30 minutos
- Armazenou-se a -20ºC até o momento da amplificação do DNA extraído.

3.1.4 Amplificação do DNA

A partir do DNA extraído das amostras de sangue total, foram realizadas as reações de PCRs. Utilizou-se os *primers* descritos no quadro 2 para a detecção de *Bos taurus* e *indicus* do gene citocromo b (cytb) descrito por Bottero et al. (2002), o mesmo encontra-se no banco de dados do GenBank (n. acesso J01394).

Primer	**Seqüência 5' – 3'(nt)**	**Região de hibridação**	**Fragmento (pb)**
Senso	GGCTTATATTACGGGTCTTACACT	14814	279
Antisenso	GGCAATTGCTATGATGATAAATGGA	15092	

Quadro 2 - Sequência dos *primers* utilizados para a detecção de *Bos taurus* e *Bos indicus*

Os *primers* para detecção de *Bubalus bubalis* é da região do gene citocromo b (cytb) haplotype RB2 . As sequências destes primers estão localizadas no GenBank (n. acesso D82894) descritas no quadro 3.

Primer	**Seqüência 5' – 3'(nt)**	**Região de hibridação**	**Fragmento (pb)**
Senso	GGCATATACTACGGATCATATACC	301	192
Antisenso	AATTCATTCAACCAGACTTGTACCA	492	

Quadro 3 - Sequência dos *primers* utilizados para a detecção de *Bubalus bubalis*

A PCR foi realizada em um volume final de 25 µL contendo, 1,5 do DNA extraído, 4 µL de dNTP's, 1,25 µL de cada *primer* , 2,5 µL de tampão 10x PCR Buffer (KCl 50mM; Tris-HCl 10mM; (pH 9,0), 0,75 µL MgCl2 (50 mM), 0,125 µL de Taq DNA polimerase platinum 5 U/ µL e 13,625 µL de água ultra pura.

As condições utilizadas na amplificação pela PCR foram: desnaturação inicial de anelamento de 95ºC por 3 minutos, seguida por 39 ciclos de desnaturação a 94ºC por 30 segundos, 60ºC por 30 segundos, extensão a 72ºC por 45 segundos e extensão final a 72ºC por 10 minutos.

3.1.5 Visualização do produto amplificado

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese, utilizou-se cuba horizontal com gel de agarose a 1,5% imerso em tampão Tris-Borato-EDTA (0,04M Tris-Borato 0,5mM EDTA). Uma alíquota de 10 µL de cada amostra amplificada foi homogeneizada com 2 µL de corante (30% de glicerol : 0,25% de azul bromofenol). A corrida foi realizada em voltagem adequada às dimensões de cada gel (1 a 10V/cm^2).

Após a corrida eletroforética o gel foi imerso numa solução de brometo de etídio a 0,5 µg por mL (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989) e a visualização dos fragmentos foi realizada em transluminador ultravioleta (UV) e fotografada pelo sistema foto-documentação (Alphalmager®, Alpha Innotech), para análise. .

A avaliação comparativa dos fragmentos foi feita com um padrão de marcador molecular de 100 pares de bases, disposto no gel juntamente com todas as amostras analisadas em cada eletroforese.

3.1.6 Purificação do produto amplificado

Após a separação dos produtos amplificados pela eletroforese, as bandas de interesse foram recortadas, e purificadas com o *kit* GFX™ (Amersham Biosciences®) de acordo com as instruções do fabricante.

3.1.7 Quantificação do DNA purificado

Uma nova eletroforese foi realizada para estimar a concentração de DNA presente nas amostras purificadas. Para isso, comparou-se uma alíquota de 5 µL do produto purificado com o padrão *Low Mass* DNA *Ladder* (Gibco BRL-Gaytherburg/USA), utilizando a tabela fornecida pelo fabricante, obtendo-se a concentração em ng/ µL.

3.1.8 Reação de seqüenciamento

A reação de seqüenciamento foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular e Sorologia Aplicada (LABMAS).

Para a reação de seqüenciamento empregou-se o kit BigDye Terminator Cycle Sequencing ready Reaction (Perkin Elmer). As quantidades de reagentes foram determinadas a partir da concentração de DNA purificado. Para uma reação com 10 µL de volume final, foram utilizados 1 µL de BigDye™ v.3.1 (Applied Biosystems), 2 µL de tampão Save Money 5x (200mM Tris-HCl; 5 mM $MgCl_2$; pH 9,0), 10 pmoles de primer (senso ou anti-senso) e 24 ng de DNA purificado. Em amostras com concentração de DNA abaixo de 4 ng/ µL, o volume

final da reação foi dobrado, assim como as concentrações dos reagentes, exceto a do primer utilizado.

As condições das reações de seqüenciamento consistiram de desnaturação inicial a 96ºC por 1 minuto e 40 ciclos de 96ºC por 15 segundos, 50ºC por 15 segundos e 60ºC por 4 minutos.

3.1.9 Precipitação do produto amplificado

Após a reação de seqüenciamento, os produtos foram purificados por precipitação em álcool. A cada amostra, adicionaram-se 40 µL ou 80 µL de isopropanol a 65ºC para reações com volumes finais de 10 µL e 20 µL, respectivamente. Após a homogeneização, as amostras foram mantidas em local protegido da luz por 15 minutos, em temperatura ambiente, e em seguida, centrifugadas a 14.000 x g por 25 min. Descartou-se o isopropanol por inversão de tubos e o sedimento foi homogeneizado com 300 µL de etanol a 70%. Procedeu-se nova centrifugação a 14.000 g por 10 minutos. O excesso de etanol foi cuidadosamente aspirado com o auxílio de pipeta, sendo sua total remoção conduzida em banho-seco a 80ºC por 2 minutos. As amostras foram mantidas a -20ºC até o momento do sequenciamento.

3.1.10 Sequenciamento

As amostras foram homogeneizadas com 3,4 µL de formamida e Blue Dextran-EDTA (Applied Biosytems, USA) na proporção de 5:1, desnaturadas a 95ºC por dois minutos e colocadas no gelo por dois minutos e, então, foram submetidas à eletroforese em seqüenciador automático modelo ABI Prism™ DNA Sequencers (Applied Biosytems, USA).

3.1.11 Alinhamento, tradução das sequencias de nucleotídeos e edição final

As sequencias de nucleotídeos foram analisadas e modificadas com o auxilio do programa Phred online (HTTP://asparigin.cenargen.embrapa.br/phph/) e BioEdit Sequence Alignment Editor (HALL, 1999). As sequencias resultantes foram comparadas com sequencias homólogas disponíveis no GenBank. Os genótipos dos isolados foram determinados com base nessa comparação.

3.2 Avaliação da PCR para detecção da fraude no leite de búfala

Para otimizar a produção experimental da *mozzarella* com diferentes porcentagens de mistura do leite das espécies, primeiramente foi feita uma avaliação da PCR em detectar a fraude no próprio leite, conforme descrito a seguir.

Utilizou-se leite cru e integral de bubalino e bovino misturados/fraudados de acordo com as porcentagens descritas no quadro 4. Retirou-se três alíquotas de cada amostra de leite, que foram armazenadas a -20ºC, até o momento da análise. O leite de vaca foi fornecido pela Indústria de Laticínios Vigor o leite de búfala foi fornecido pela fazenda Di búfala, que produz leite da raça Mediterrâneo.

Salienta-se que não se estudou amostras com menos que 10% de leite bubalino, devido à importância econômica da fraude ser relativa à adição de leite de vaca ao de búfala e não o inverso.

Descrição	Leite de búfala (%)	Leite de vaca (%)
Leite bubalino	100	0
Leite adulterado	99,99	0,01
Leite adulterado	99,975	0,025
Leite adulterado	99,95	0,05
Leite adulterado	99,9	0,1
Leite adulterado	99,25	0,75
Leite adulterado	99,5	0,50
Leite adulterado	99	1
Leite adulterado	98,5	1,5
Leite adulterado	98	2
Leite adulterado	96	4
Leite adulterado	94	6
Leite adulterado	92	8
Leite adulterado	90	10
Leite adulterado	0	100

Quadro 4 - Porcentagens de mistura de leite de búfala ao leite de vaca que constituíram as amostras submetidas a PCR para avaliar o limiar de detecção da técnica

3.2.1 Protocolo de extração e purificação de DNA das amostras de leite (modificado de GUIDO, 2003)

- Transferiu-se 500 µL da amostra de leite para um microtubo de 1500 µL;
- Adicionou-se 50 µL de Tween 20% (adapatado de SERPE et al, 1999);
- Homogeneizou-se por 10 segundos em agitador orbital (vortex);
- Centrifugou-se a 24 ºC por dez minutos a 14000xg;
- Descartou-se o sobrenadante por inversão;
- Adicionou-se 500µL de TE (10nM de TrisHCL, pH 8,0 e 1mM de EDTA, pH 8,0);
- Centrifugou-se a 24ºC por 10 minutos a 14000xg;
- Descartou-se o sobrenadante por inversão;

- Repetiu-se este processo de adição de TE, centrifugação e descarte do sobrenadante obtido esteja claro;
- Adicionou-se solução de lise composta de:
  - ✓ 4 µL de TrisHCl, pH 8,0 a 1M;
  - ✓ 20 µL de EDTA 0,5M;
  - ✓ 8 µL de NaCl 5M;
  - ✓ 40 µL SDS 10%;
  - ✓ 10 µL de proteinase K a 20mg/mL;
  - ✓ 418 µL de água deionizada;
- Homogeneizou-se por 10 segundos em agitador orbital (vórtex);
- Incubou-se overnigth a 37ºC em termobloco sob agitação a 1400 rpm por 15 segundos a cada 15 minutos;
- Colocou-se em banho de gelo por 15 minutos;
- Adicionou-se 500 µL de fenol tamponado (UBS);
- Homogeneizou-se por dez segundos em agitador orbital (vórtex);
- Centrifugou-se a 24 ºC por cinco minutos a 14000xg;
- Transferiu-se 400 µL da fase aquosa para um novo microtubo de 1500 µL;
- Adicionou-se 200 µL de fenol tamponado e 200 µL de clorofórmio;
- Homogeneizou-se por dez segundos em agitador orbital (vórtex);
- Centrifugou-se a 24 ºC por cinco minutos a 14000xg;
- Transferiu-se 300 µL da fase aquosa para um novo microtubo de 1500 µL;
- Adicionou-se 300 µL de propanol;
- Homogeneizou-se por dez segundos em agitador orbital (vórtex);
- Colocou-se a -20 ºC por duas horas;
- Centrifugou-se a 24 ºC por 20 minutos a 14000xg;
- Desprezou-se o sobrenadante por inversão;
- Adicionou-se 500 µL de etanol a70%;
- Centrifugou-se a 24 ºC por 20 minutos a 14000xg;
- Desprezou-se o sobrenadante por inversão;
- Secou-se o sedimento em termobloco com as tampas dos microtubos abertos sem agitação a 56 ºC por dez minutos;
- Ressuspendeu-se com 30 µL de TE (10mM de TrisHCl, pH 8,0 e 1mM de EDTA, pH 8,0);
- Homogeneizou-se por 10 segundos em agitador orbital (vortex);

- Incubou-se a 56 ºC por 30 minutos;
- Armazenou-se o produto extraído (DNA) a -20 ºC até o momento da amplificação;

Foi realizada a amplificação descrita no item 4.1.4 e a detecção do produto amplificado no item 4.1.5.

3.2.2 Protocolo de extração e purificação de DNA das amostras de leite com KIT Nucleo Spin Food

- Adicionou-se 100 µL do leite em microtubo de 1,5 ml;
- Adicionou-se 550 µL de CF (lysis buffer) a 65ºC;
- Adicionou-se 10 µL de pK (proteinase K);
- Homogeneizou-se por 30 segundos em agitador orbital (vórtex);
- Colocou-se o tubo em termobloco por 30 minutos a 65ºC;
- Centrifugou-se por 10 minutos a 10.000xg;
- Transferiu-se o sobrenadante para outro microtubo de 1,5 ml;
- Adicionou-se 300 µL de C4 (binding buffer) e 300 µL de etanol P.Al;
- Homogeneizou-se por 30 segundos em agitador orbital (vórtex);
- Preparou-se o microtubo com a coluna de sílica;
- Adicionou-se 750 µL do homogeneizado;
- Centrifugou-se por 2 minutos a 11.000xg;
- Descartou-se o microtubo e manteve-se a coluna de sílica em outro microtubo;
- Adicionou-se 400 µL de CQW (wash buffer);
- Centrifugou-se por 2 minutos a 11.000xg;
- Descartou-se o microtubo e manteve-se a coluna de sílica em outro microtubo;
- Adicionou-se 700 µL de C5 (wash buffer);
- Centrifugou-se por 2 minutos a 11.000xg;
- Descartou-se o microtubo e manteve-se a coluna de sílica em outro microtubo;
- Adicionou-se 200 µL de C5 (buffer);
- Centrifugou-se por 2 minutos a 11.000xg;
- Descartou-se o microtubo e manteve-se a coluna de sílica em outro microtubo;
- Adicionou-se 100 µL de CE (elution buffer) a 70ºC;

- Incubou-se por 5 minutos em temperatura ambiente;
- Centrifugou-se por 2 minutos a 11.000xg;
- Descartou-se a coluna de sílica;
- Armazenou-se o produto extraído (DNA) a -20 ºC até o momento da amplificação;
- Foi realizada a amplificação descrita no item 4.1.4 e a detecção do produto amplificado no item 4.1.5.

3.3 Fabricação da *mozzarella*

As *mozzarellas* foram produzidas no laboratório de Higiene Alimentar do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal - FMVZ/USP, utilizando a adição de leite bovino nas mesmas concentrações empregadas para avaliar a PCR na detecção da fraude no leite descrita no quadro 4.

Utilizou-se banho maria para manter a temperatura da *mozzarella* a 38ºC os utensílios (panela, colher, garfo, faca), foram esterilizados a 100ºC por 30 minutos e o termômetro higienizado com hipoclorito de sódio para cada partida de *mozzarella* confeccionada.

- Aqueceu-se 500 ml de leite cru na panela, em banho Maria, até que atingisse 38ºC;
- Adicionou-se 5ml de fermento (SF-M7/CHR-Hansen);
- Homogeneizou-se com a utilização de uma colher;
- Deixou-se o leite descansar por 30 minutos a 38ºC;
- Adicionou-se 125 µL coagulante líquido (Três coroas) diluído em 15 ml de água estéril;
- Deixou-se a mistura descansar por 45 minutos a 38ºC;
- Cortou-se a coalhada em “X” com a utilização de uma faca para o corte;
- Deixou-se a coalhada descansar por 15 minutos a 38ºC;
- Cortou-se novamente a coalhada em quadrados de aproximadamente 1,5 a 2,0cm;
- Deixou-se a coalhada descansar por 20 minutos a 38ºC;
- Retirou-se o soro da panela;
- Deixou-se a massa descansar por 2 horas e 30 minutos a 38ºC;

- Realizou-se testes de “filabilidade” na massa, submetendo uma pequena amostra à água quente e verificando sua capacidade de fusão e elasticidade;
- Quando atingiu o ponto de filagem, a massa foi filada em água fervente até que a massa se mostrasse lisa e brilhante, formando fios longos quando submetida à tração;
- Retirou-se três alíquotas da *mozzarella* em microtubos 1,5 ml para realização dos protocolos de extração do DNA descrita no item 4.3.1 e item 4.3.2 utilizou-se 200 mg de *mozzarella*.

4 QUANTIFICAÇÃO DE DNA EXTRAÍDO

Todas as alíquotas da solução de DNA de cada amostra extraída foram diluídas 1:100 em TE. Homogeneizou-se e transferiu-se o produto para o cuvette de quartzo, onde a amostra foi submetida à leitura espectrofotométrica nos comprimentos de onda 260 nm (DO_{260}) e 280 nm (DO_{280}). Em espectrofotômetro a leitura deve situar-se entre 1,5 e 2,0, para estimar a concentração e a qualidade de DNA para análise posterior, segundo Embrapa, 2007.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir serão descritos os dados obtidos experimentos realizados com o sangue, o leite e a *mozzarella*.

5.1 Avaliação do *primer* de BOTTERO nas amostras de sangue

O *primer* descrito por Bottero et al. (2002) para identificar *Bos indicus / Bos taurus* detectou o DNA da amostra de sangue das raças Nelore e Holandês, sem detectar o DNA da amostra de sangue da raça Mediterrânea (*Bubalus bubalis*) e ambas as raças foram sequenciadas e genotipadas como demostra a Tabela 1. Esse resultado pode ser observado na figura 1 pela presença do fragmento de 279 pb apenas nas linhas referentes às raças bovinas.

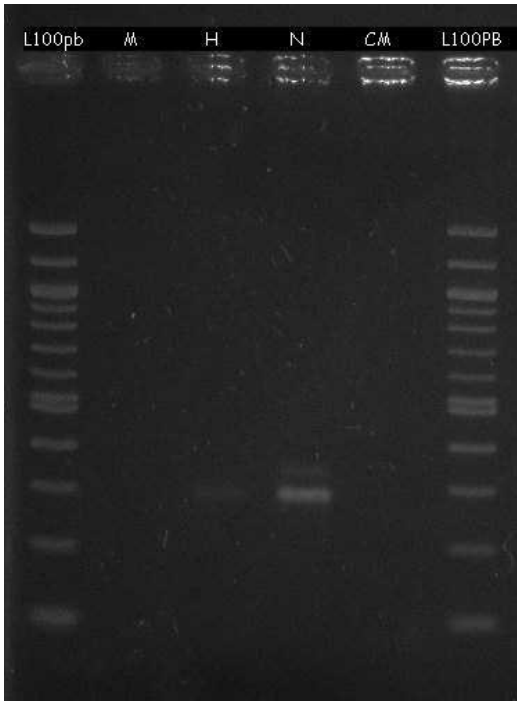

Figura 1 – Eletroforese em gel de agarose 2% para detecção de fragmentos amplificados do gene citocromo b. As linhas representam amplificações de sangue total de bovinos das raças Holandês e Nelore. L 100 – peso molecular de 100 pares de base; M- mediterrâneo; H – holadês; N – nelore; CM – controle negativo; L 100 – peso molecular de 100 pares de base

Da mesma forma, os *primers* propostos por Bottero et al. (2002) para identificar *Bubalus bubalis* detectou o DNA da amostra de sangue da raça mediterrânea e a mesma foi seqüenciada e genotipada demonstrada na tabela 1, sem detectar o DNA da amostra de sangue da raça holandesa (*Bos taurus*) ou nelore (*Bos indicus*). O que pode ser observado na figura 2 pela presença do fragmento de 192 pb apenas na linha referente à raça Mediterrâneo.

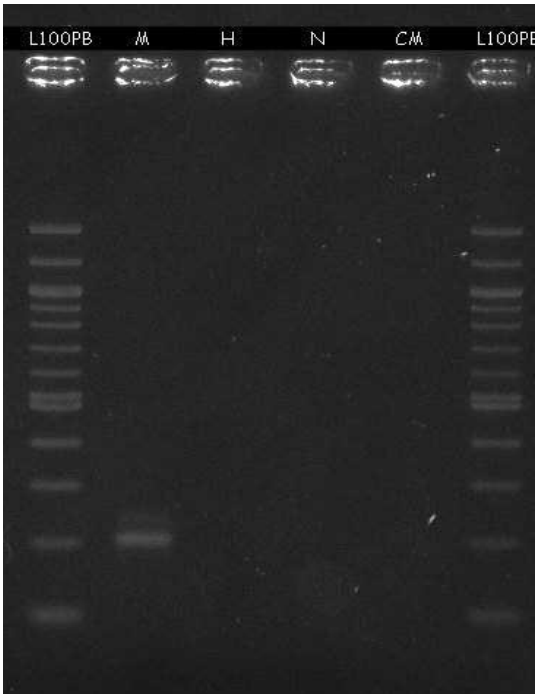

Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose 2% para detecção de fragmentos amplificados do gene citocromo b (cytb) haplotype RB2. As linhas representam amplificações de sangue total da raça Mediterräneo sendo L 100 – peso molecular de 100 pares de base; M- mediterrâneo; H – holadês; N – nelore; CM – controle negativo; L 100 – peso molecular de 100 pares de base

Tabela 1 - Análise genotípica das seqüências utilizando o gene citocromo b e gene citocromo b (cytb) haplotype RB2 (*Bubalus Bubalis*)

Amostra	Identificação Molecular	Nº de nucleotídeos sequenciados	Similaridade
Holandês	HQ122570-1 *Bos Taurus*	263	99,45%
Nelore	FJ530557-1 *Bos Indicus*	272	100%
Mediterrâneo	AF371962-1 *Bubalus Bubalis*	172	100%

O presente trabalho revelou através da analise genotípica a especificidade do *primer* em discriminar DNA bovino e bubalino semelhante Bottero et al. (2002).

5.2 Avaliação do *primer* de BOTTERO nas amostras de leite

A seguir serão apresentados os resultados obtidos com a utilização dos *primers* propostos por Bottero et al. (2002) para detectar o DNA no leite bubalino e bovino, submetidos à dois protocolos de extração.

5.2.1 Amplificação do DNA nas amostras de leite utilizando a extração com Fenol / Clorofórmio.

A seguir, são mostrados os resultados da aplicação dos *primers* de búfala nas amostras de leite de búfala, leite de búfala adicionado de leite de vaca (em concentrações crescentes) e leite de vaca. Observa-se que o *primer* foi capaz de revelar a presença do DNA bubalino (fragmento de 192 pb) em todas as amostras que continham leite de búfala (linhas 1 a 15 da figura 3).

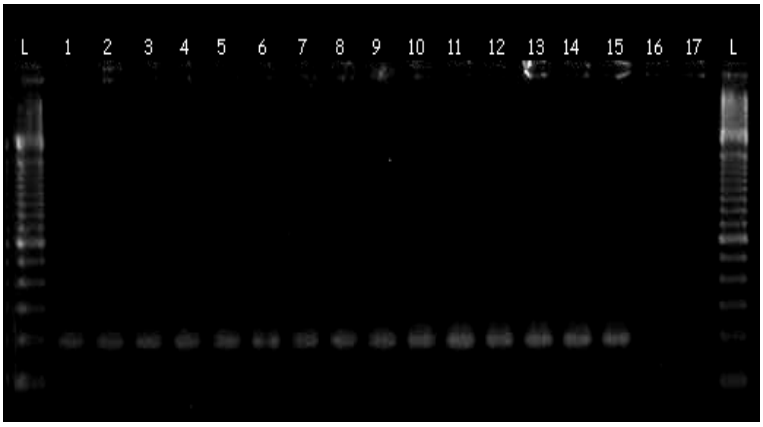

Figura 3 – Eletroforese em gel de agarose 2% PCR para detecção de DNA bubalino extraído com protocolo Fenol / Clorofórmio de leite puro e integral de búfala e adição de leite de vaca ao de búfala em diferentes porcentagens. As linhas correspondem a L – peso molecular 100 pares de base; leite puro e integral de búfala; 2 – adição de 0,01% leite de vaca; 3- 0,025% leite de vaca; 4 – 0,050% leite de vaca; 5-0,075% leite de vaca; 6 – 0,1% leite de vaca;7 – 0,75% leite de vaca; 8 – 0,50% leite de vaca; 9 – 1% leite de vaca; 10 – 1,5% leite de vaca; 11 – 2% leite de vaca; 12 – 4% leite de vaca; 13 – 6% leite de vaca; 14 – 8% leite de vaca; 15 – 10% leite de vaca; 16 – leite puro e integral de vaca; 17 – controle negativo; L – peso molecular 100 pares de base

A figura 4 mostra os resultados obtidos quando se aplicou o *primer* de vaca às mesmas amostras de leite. O *primer* bovino foi capaz de detectar o DNA de vaca a partir da linha 3, que corresponde a 0,025% de leite bovino.

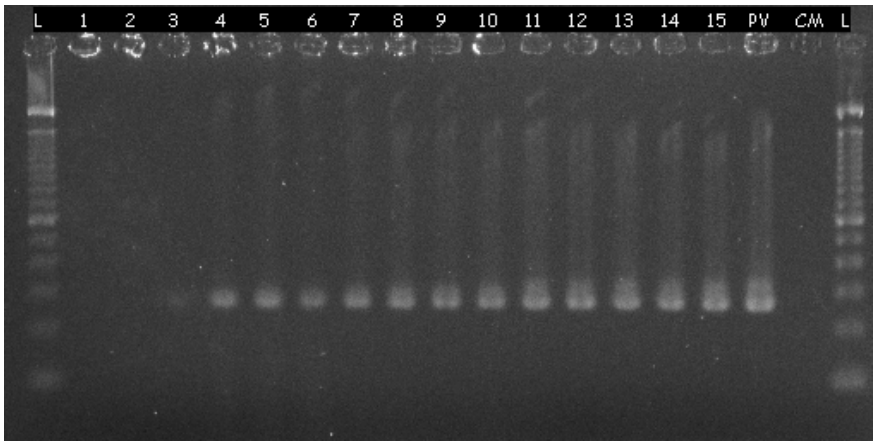

Figura 4 – Eletroforese em gel de agarose 2% PCR para detecção de DNA bovino extraído com protocolo Fenol / Clorofórmio em leite puro e integral de búfala e adição de leite de vaca ao de búfala em diferentes porcentagens. L – peso molecular 100 pares de base; 1 – leite puro e integral de búfala; 2 – adição de 0,01% leite de vaca; 3- 0,025% leite de vaca; 4 – 0,050% leite de vaca; 5 – 0,075% leite de vaca; 6 – 0,1% leite de vaca; 7 – 0,75% leite de vaca; 8 – 0,50% leite de vaca; 9 – 1% leite de vaca; 10 – 1,5% leite de vaca; 11 – 2% leite de vaca; 12 – 4% leite de vaca; 13 – 6% leite de vaca; 14 – 8% leite de vaca; 15 – 10% leite de vaca; PV – leite puro e integral de vaca; cm – controle negativo; L – peso molecular 100 pares de base

5.2.2 Amplificação de DNA nas amostras de leite utilizando extração com Kit Nucleo Spin Food.

A figura 5 mostra os resultados obtidos quando se aplicou os *primers* de búfala nas amostras de leite de búfala, de leite de búfala adicionado de leite de vaca (em concentrações crescentes) e de leite bovino. A figura revela que os *primers* de búfala foi capaz de revelar a presença do DNA bubalino (fragmento de 192 pb) em todas as amostras de leite testadas (linhas 1 a 15).

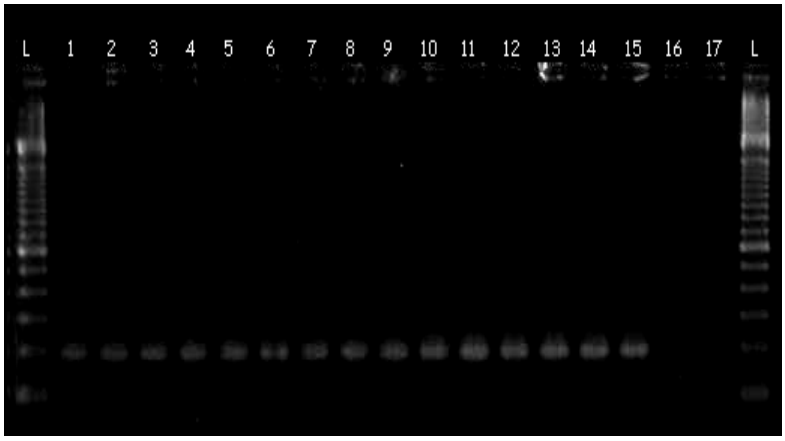

Figura 5 – Eletroforese em gel de agarose 2% PCR para detecção de DNA bubalino extraído com protocolo Kit Nucleo Spin Food em leite puro e integral de búfala e adição de leite de vaca ao de búfala em diferentes porcentagens. As linhas demonstram: L – peso molecular 100 pares de base; 1 – leite puro e integral de búfala; 2 – adição de 0,01% leite de vaca; 3- 0,025% leite de vaca; 4 – 0,050% leite de vaca; 5 – 0,075% leite de vaca; 6 – 0,1% leite de vaca; 7 – 0,75% leite de vaca; 8 – 0,50% leite de vaca; 9 – 1% leite de vaca; 10 – 1,5% leite de vaca; 11 – 2% leite de vaca; 12 – 4% leite de vaca; 13 – 6% leite de vaca; 14 – 8% leite de vaca; 15 – 10% leite de vaca; 16 – leite puro e integral de vaca; 17 – controle negativo; L – peso molecular de 100 pares de base

A menor concentração de leite de vaca detectada, utilizando o Kit como método de extração, foi 0, 075%, o que pode ser observado pelo surgimento do fragmento de 279 pb a partir da linha 5 na figura 6. Desta forma, a extração usando o kit mostrou-se menos sensível para a detecção de leite bovino que a extração pela proteinase K.

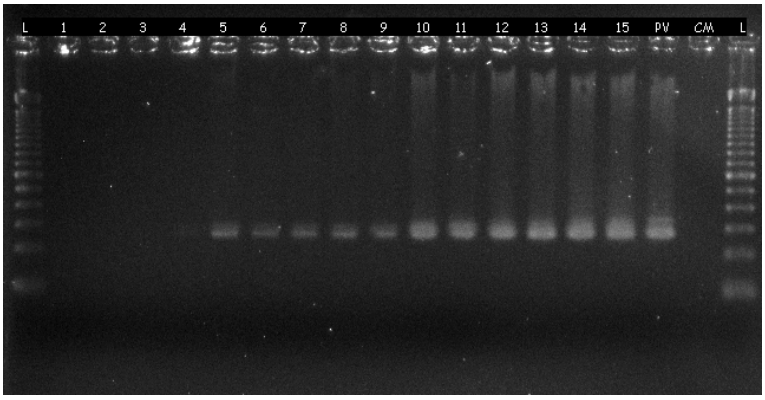

Figura 6 – Eletroforese em gel de agarose 2% PCR para detecção de DNA bovino extraído com protocolo kit núcleo spin em leite puro e integral de búfala e adição de leite de vaca ao de búfala em diferentes porcentagens. L – peso molecular 100 pares de base; 1 – leite puro e integral de búfala; 2 – adição de 0,01% leite de vaca; 3- 0,025% leite de vaca; 4 – 0,050% leite de vaca; 5 – 0,075% leite de vaca; 6 – 0,1% leite de vaca; 7 – 0,75% leite de vaca; 8 – 0,50% leite de vaca; 9 – 1% leite de vaca; 10 – 1,5% leite de vaca; 11 – 2% leite de vaca; 12 – 4% leite de vaca; 13 – 6% leite de vaca; 14 – 8% leite de vaca; 15 – 10% leite de vaca; pv – leite puro e integral de vaca; cm – controle negativo; L – peso molecular 100 pares de base

No presente estudo, o método de extração utilizando o protocolo Fenol / Clorofórmio foi mais sensível que o método de extração utilizando o Kit e ambos revelaram limiar de detecção menor que o reportado na literatura.

A maioria dos trabalhos que investigaram a adição de leite de vaca ao leite de outras espécies (búfala, cabra ou ovelha), utilizando a técnica da PCR com *primer* que codificam o citocromo b específico para mamíferos, relatam limite de detecção variando entre 0,1 e 1% (BANIA et al., 2001; LÓPEZ-CALLEJA et al., 2005; KOTOWICZ; ADAMCZYK; BANIA, 2007; DARWISH; ALLAM; AMIN, 2009).

Egito et al. (2006) reportam limite de detecção de 2,5% de adição de leite de vaca ao de cabra empregando método de focalização isoelétrica da caseína.

5.3 Avaliação dos *primers* de Bottero nas amostras de *mozzarella*

A seguir serão apresentados os resultados obtidos com a utilização dos *primers* propostos por Bottero et al. (2002) para detectar o DNA em mozzarella elaborada com leite bubalino e bovino, submetidos à dois protocolos de extração.

5.3.1 Amplificação do DNA das amostras de mozzarella utilizando extração com Feno / Clorofórmio.

A figura 7 mostra os resultados obtidos quando se aplicou o *primer* de búfala nas amostras de *mozzarella* fabricadas com leite de búfala, com leite de búfala adicionado de leite de vaca (em concentrações crescentes) e com leite bovino. Observa-se que o *primer* foi capaz de revelar a presença do DNA bubalino (fragmento de 192 pb) em todas as amostras de *mozzarela* que continham leite de búfala (linhas 1 a 15).

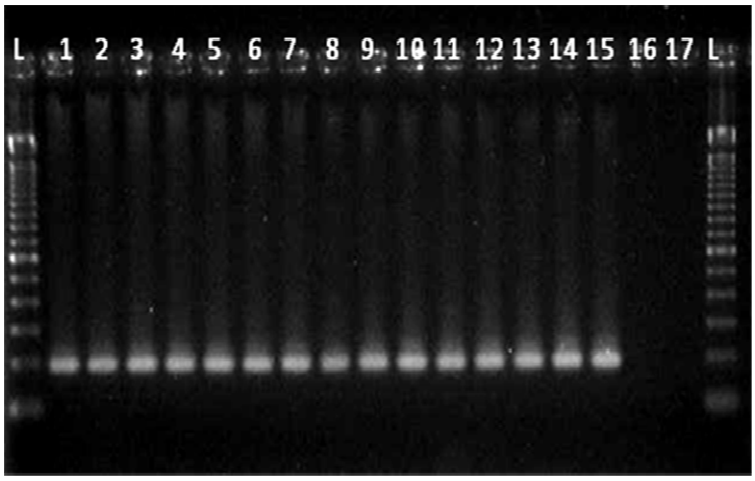

Figura 7 – Eletroforese em gel de agarose 2% PCR para detecção de DNA bubalino extraído com protocolo Fenol / Clorofórmio em *mozzarella* pura de búfala e fraudada com leite de vaca em diferentes porcentagens. As linhas demonstram. L - peso molecular 100 pares de base; 1 – *mozzarella* pura de búfala; 2 – *mozzarella* de búfala fraudada com 0,01% leite vaca; 3- 0,025% leite vaca; 4 – 0,050% leite de vaca; 5 – 0,075% leite de vaca; 6 – 0,1% leite de vaca; 7 – 0,75% leite de vaca; 8 – 0,50% leite de vaca; 9 – 1% leite de vaca; 10 – 1,5% leite de vaca; 11 – 2% leite de vaca; 12 – 4% leite de vaca; 13 – 6% leite de vaca;14 – 8% leite de vaca; 15 – 10% leite de vaca;16 – *mozzarella* pura de vaca;17 – controle negativo; L – peso molecular 100 pares de base

A figura 8 mostra os resultados obtidos quando se aplicou o *primer* de vaca às amostras de *mozzarella*. Os resultados mostram que o *primer* bovino foi capaz de detectar a presença do DNA de vaca a partir da presença de 0,01% da adição de leite bovino ao bubalino, usado para fabricar a *mozzarella*. Isso pode ser verificado pela presença do fragmento de 279 pb a partir da linha 2.

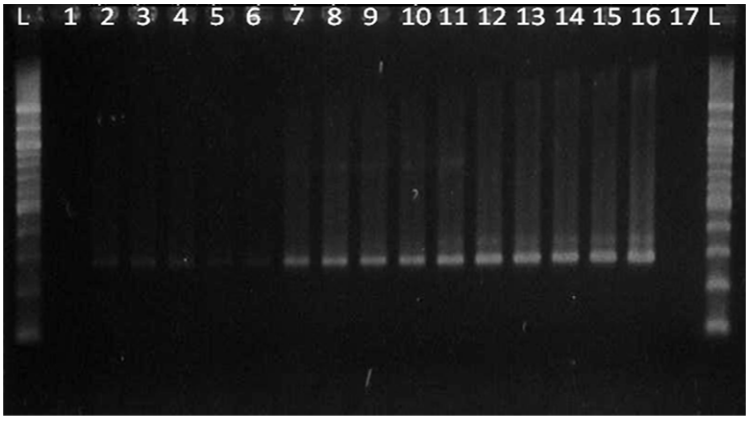

Figura 8 – Eletroforese em gel de agarose 2% PCR para detecção de DNA bovino extraído com protocolo Fenol / Clorofórmio em *mozzarella* pura de búfala e fraudada com leite de vaca em diferentes porcentagens. As linhas demonstram. L – peso molecular 100 pares de base; 1 – *mozzarella* pura de búfala; 2– *mozzarella* de búfala fraudada com 0,01% leite de vaca; 3- 0,025% leite de vaca; 4 – 0,050% leite de vaca; 5 – 0,075% leite de vaca; 6 – 0,1% leite de vaca; 7 – 0,75% leite de vaca; 8 – 0,50% leite de vaca; 9 – 1% leite de vaca; 10 – 1,5% leite de vaca; 11 – 2% leite de vaca; 12 – 4% leite de vaca; 13 – 6% leite de vaca; 14 – 8% leite de vaca;15 – 10% leite de vaca; 16 – *mozzarella* pura de vaca; 17 – controle negativo; L – peso molecular 100 pares de base

5.3.2 Amplificação do DNA das amostras de mozzarella utilizando extração com Kit Nucleospin Food

A figura 9 mostra os resultados obtidos quando se aplicou o *primer* de búfala nas amostras de mozzarella fabricadas com leite de búfala, com leite de búfala adicionado de leite de vaca (em concentrações crescentes) e com leite bovino. Observa-se que o *primer* foi capaz de revelar a presença do DNA bubalino (fragmento de 192 pb) em todas as amostras de *mozzarela* que continham leite de búfala (linhas 1 a 15), exceto na linha 16, referente a *mozzarella* fabricada com leite puro bovino, o que era esperado.

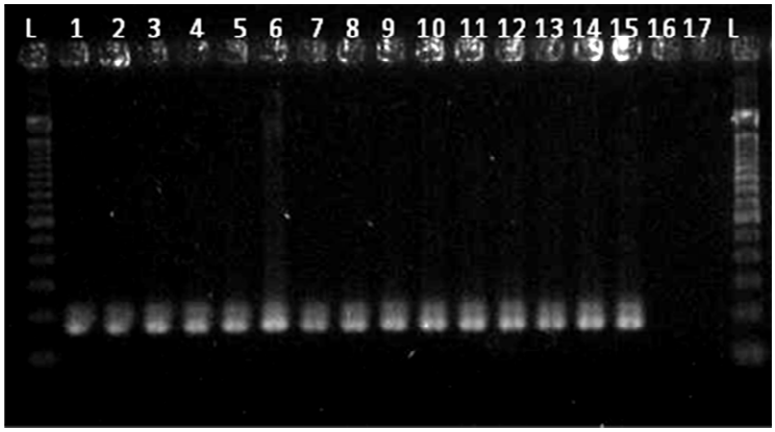

Figura 9 – Eletroforese em gel de agarose 2% PCR para detecção de DNA bubalino extraído com protocolo kit núcleospin Food em *mozzarella* pura de búfala e fraudado com leite de vaca em diferentes porcentagens. As linhas demonstram. L – peso molecular 100 pares de base; 1 – *mozzarella* pura de búfala; 2 – *mozzarella* de búfala fraudada com 0,01% leite de vaca; 3- 0,025% leite vaca; 4 – 0,05% leite de vaca; 5 – 0,075% leite de vaca; 6 – 0,1% leite de vaca; 7 – 0,75% leite de vaca; 8 – 0,50% leite de vaca; 9 – 1% leite de vaca; 10 – 1,5% leite de vaca; 11 – 2% leite de vaca; 12 – 4% leite de vaca; 13 – 6% leite de vaca; 14 – 8% leite de vaca; 15 –10% leite de vaca; 16 – *mozzarella* pura de vaca; 17 – controle negativo; L – peso molecular 100 pares de base

A figura 10 mostra os resultados obtidos quando se aplicou o *primer* de vaca às amostras de *mozzarella*. Os resultados mostram que o *primer* bovino foi capaz de detectar a presença do DNA de vaca a partir da presença de 0, 05% da adição de leite bovino ao bubalino, usado para fabricar a *mozzarella*. Isso pode ser verificado pela presença do fragmento de 279 pb a partir da linha 4.

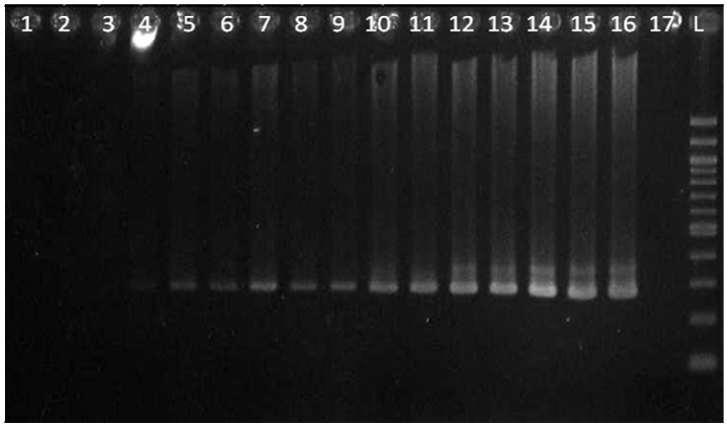

Figura 10 – Eletroforese em gel de agarose 2% PCR para a detecção de DNA bovino extraído com o protocolo kit núcleo spin Food em *mozzarella* pura de búfala e fraudado com leite de vaca em diferentes porcentagens. As linhas demonstram. L – peso molecular 100 pares de base; 1 – *mozzarella* pura de búfala; 2 – *mozzarella* de búfala fraudada com 0,01% leite de vaca; 3-0,025% leite vaca; 4 – 0,050% leite de vaca; 5 – 0,075% leite de vaca; 6 – 0,1% leite de vaca; 7 – 0,75% leite de vaca; 8 – 0,50% leite de vaca; 9 – 1% leite de vaca; 10 – 1,5% leite de vaca; 11 – 2% leite de vaca; 12 – 4% leite de vaca; 13 – 6% leite de vaca; 14 – 8% leite de vaca; 15 – 10% leite de vaca; 16 – *mozzarella* pura de vaca; 17 – controles negativo; L – peso molecular 100 pares de base.

No presente estudo, foi possível detectar 0,01% e 0,05% de DNA bovino na *mozzarella* de búfala, (utilizando, respectivamente, a técnica de extração com Fenol / Clorofórmio e Kit Nucleospin Food), mostrando maior sensibilidade que o reportado na literatura. A maioria dos trabalhos que investigaram a presença de leite de vaca em queijos de búfala, cabra ou ovelha, utilizando a técnica da PCR com *primer* que codificam o citocromo b específico para mamíferos, relatam limite de detecção variando entre 0,1 e 1,5% (REA et al., 2001; MAUDET; TABERLET, 2001; DI PINTO et al., 2004; FELIGINI et al., 2005; LÓPEZ-CALLEJA, 2005; MASKOVA; PAULICKOVA, 2006).

Chama atenção o fato de que a PCR foi mais sensível para detectar a fraude na *mozzarella* do que no leite fluido, independentemente do protocolo de extração de DNA empregado (figuras 8 e 4 e figuras 10 e 6, respectivamente). Esse fato provavelmente está associado à concentração de sólidos no queijo.

Alguns trabalhos empregaram focalização isoelétrica da caseína como método para detecção de fraude por mistura de leite bovino ao de búfala nas concentrações de 0, 1,2, 5, 8, 12 e 100% Otaviano et al. (2008) reportam a detecção de leite de vaca à *mozzarella* de búfala de 1% em gel agarose de 3% já utilizando os RFLPs não mostraram qualquer diferença entre fragmentos de bovinos e bubalinos.

Rea et al. (2001) empregaram PCR duplex para detectar mistura de leite bovino com leite bubalino em amostras de leite fluido e de *mozzarella*. A mínima concentração testada foi de 1% e esse teor de mistura foi detectado tanto nas amostras de leite fluido quanto nas de *mozzarella*.

Maudet e Taberlet (2001) utilizaram a PCR como um método rápido e fácil de detecção de leite de vaca em queijos de cabra utilizou *primer* específico para DNA de vaca, fabricaram cinco séries de queijo de cabra com sete níveis diferentes de leite de vaca (0, 0,1, 1, 5, 10, 25 e 50%) e detectaram a presença de DNA bovino no queijo de cabra de 0,1%.

Di Pinto et al. (2004) avaliaram a sensibilidade da PCR para detecção de leite de vaca em *mozzarella* de búfala. Amostras de queijo foram feitas com mistura de leite de vaca variando de 50% a 0,5%. A sensibilidade encontrada foi de 1,5%. É interessante apontar que esses autores também utilizaram os *primers* descritos por Bottero et al. (2002), os mesmos que foram empregados na presente pesquisa, porém o método de extração foi o Kit QIAGEN (Hilden, Germany).

Feligini et al., (2005) fabricaram *mozzarella* de búfala com misturas de leite de vaca variando de 0,5 a 30% e detectaram a adição em todas as amostras. Ressalta-se que foram utilizados os

mesmos protocolos de extração empregados no presente trabalho (fenol/clorofórmio e Kit NucleoSpin Food).

Mascova e Paulickova (2006) avaliaram o limite de detecção da PCR em amostras de queijo de cabra e de ovelha produzidas com mistura de leite de vaca. Observaram um limite de detecção de 1% para ambos os produtos, sendo que esse foi o menor teor de adição estudado.

Observou-se nesta pesquisa uma alta sensibilidade da técnica para detectar a presença de DNA de leite de vaca na *mozzarella* de búfala, mostrando o valor dessa ferramenta no controle da fraude. Salienta-se, no entanto, que a simples detecção do DNA bovino não indica necessariamente a fraude, mas que pode ser resultante da contaminação de utensílios/equipamentos quando se faz uso comum destes para armazenar/manipular o leite/queijo de vaca e de búfala no mesmo estabelecimento. Isso se deve ao fato da PCR ser capaz de amplificar mínimas quantidades de DNA (REA et al., 2001; MAUDET; TABERLET, 2001; DI PINTO et al., 2004; FELIGINI et al., 2005; LÓPEZ-CALLEJA, 2005; MASKOVA; PAULICKOVA, 2006).

5.4 Quantificação de DNA

A qualidade do DNA obtido pelos dois métodos de extração, nas amostras de leite e de *mozzarella* estão apresentados, respectivamente nas tabelas 2 e 3.

Tabela 2 – Resultados das leituras de absorbância feitas com os comprimentos de onda 260 e 280 nM para dois protocolos de extração de DNA, segundo diferentes porcentagens de adição de leite vaca ao de búfala – São Paulo – 2010

Porcentagens de adição de leite de vaca ao leite de búfala		**Protocolos de extração de DNA**	
Leite de búfala (%)	**Leite de vaca (%)**	**PK**	**Kit núcleo Spin Food**
100	0	1.00	1.02
99,99	0,01	1.00	1.05
99,975	0,025	0.98	1.00
99,95	0,05	1.01	1.01
99,9	0,1	1.01	1.11
99,25	0,75	1.01	1.00
99,5	0,5	0.99	1.00
99	1	1.01	1.01
98,5	1,5	1.00	1.00
98	2	0.99	1.00
96	4	1.00	0.99
94	6	1.00	1.01
92	8	1.01	1.00
90	10	1.01	1.01
0	100	1.01	0.99
	Média	1.00	1.01

Tabela 3 – Resultados das leituras de absorbância feitas com os comprimentos de onda 260 e 280 nM para dois protocolos de extração de DNA de *mozzarella*, segundo diferentes porcentagens de adição de leite bovino ao de búfalo – São Paulo – 2010

Porcentagens de adição de leite de vaca ao leite de búfala		**Protocolos de extração de DNA**	
Leite de búfala (%)	**Leite de vaca (%)**	PK	Kit núcleo Spin Food
100	0	1.05	0.99
99,99	0,01	1.01	0.97
99,975	0,025	1.01	1.01
99,95	0,05	0.99	0.99
99,9	0,1	0.99	0.98
99,25	0,75	1.01	0.99
99,5	0,5	0.99	1.00
99	1	0.99	0.99
98,5	1,5	0.98	0.98
98	2	0.99	1.02
96	4	0.99	1.02
94	6	0.99	0.99
92	8	0.99	0.97
90	10	0.99	0.99
0	100	0.99	0.99
	Média	0.99	0.99

Observa-se que independente do protocolo de extração empregado, tanto as amostras de leite quanto as de *mozzarella* mostraram valores de absorbância inferiores aos considerados ideais, conforme Moore et al. (1997). Os autores relatam que valores inferiores a 1,5 são decorrentes de excesso de proteína, o que poderia estar associado ao alto valor protéico das amostras estudadas. Essa hipótese é reforçada pelos valores da disorvância (apresentados nos APÊNDICES A, B, C e D) mais altos que os valores da absorvância.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

- Os *primers* testados foram capazes de diferenciar as espécies *Bos taurus*, *Bos indicus* e *Bubalus bubalis* nas amostras de sangue.
- Foram ainda eficazes em detectar o DNA bovino e o DNA bubalino tanto nas amostras de leite quanto nas de *mozzarella*.
- A PCR mostrou ser de grande aplicabilidade como teste de *screening* para detectar possível adulteração da *mozzarella* de búfala por adição de leite de vaca. O cuidado na interpretação do resultado deve nortear a decisão final, já que a produção da *mozzarella* de búfala em instalações que tenham sido previamente utilizadas para processamento de leite bovino pode ser classificada, pela PCR, como adulterado, já que mínimas quantidades de DNA bovino podem ser detectadas em amostras de queijo.

REFERÊNCIAS

7 REFERÊNCIAS

ABCB. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE BÚFALOS. **Búfalos participam pela primeira vez da Feileite. 2010** Disponível em: < http://www.bufalo.com.br/not00108.html>. Acesso em: 18 out. 2010.

ABCB. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE BÚFALOS. **Desempenho da produção dos laticínios com selo de pureza 100% búfalo. 2010** Disponível em: < http://www.bufalo.com.br/not00097.html>. Acesso em: 18 out. 2010.

ADDEO, F.; STINGO, C.; CHIANESE, L.; PETRILLI, P.; SCUDIERO, A.; ANELLI, G. Isoelectrofocusing of caseins for the identification of bovine milk in water buffalo mozzarella cheese**. Journal of Il Latte,** v**.** 8, p. 795-803, 1983.

ADDEO, F.; MOIO, L.; CHIANESE, L.; NOTA, G. Evaluation of bovine and water buffalo milk in mixtures of liquid milk and mozzarella cheese by gel isoelectric focusing. **Italian Journal of Food Science,** v. 1, p. 71-80, 1989.

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

AMARAL, F. R.; CARVALHO, L. B.; SILVA, N.; BRITO, J. R. F. Qualidade do leite de búfalas: composição. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v. 29, n. 2, p. 106-110, 2005.

AMARAL, F. R.; ESCRIVÃO, S. C. Aspectos relacionados à búfala leiteira, **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v. 29, n. 2, p. 111 – 117, 2005.

AVISE, J. C. **Molecular markers, natural history and evolution**. New York: Chapman & Hall, 1994.

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.

BERNARDES, O. Selo de Pureza**, Boletim do Búfalo**, n.1, p. 10, 2004. Disponível em: http://www.bufalo.com.br/boletim_01%20.pdf>. Acesso em: 07 abr. 2005.

BOTTERO, M. T.; CIVERA, T.; ANASTASIO, A.; TURI, R. M.; ROSATI, S. Identification of cow´s milk in buffalo cheese by duplex polymerase chain reaction**. Journal of Food Protection**, v. 65, p. 362-366, 2002.

BRUGNANO, F. M. L. **Identificação da espécie animal em amostras de carne através da reação em cadeia pela polimerase:** o método de controle de fraudes em alimentos**.** 2010. 113 f. (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

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

CGPAN – COORDENAÇÃO GERAL DA POLÍTICA DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO. Hipovitaminose A. Disponível em: < http://portalweb01.saude.gov.br/alimentacao/hipovitaminosea.cfm>. Acesso em: 20 Ago. 2009.

DARWISH, S. F.; ALLAM, H. A.; AMIN, A. S. Evaluation of PCR assay for detection of cow's milk in water buffalo's milk**. World Applied Sciences Journal**, v. 7, n.4, p. 461-467, 2009.

DI PINTO, A.; CONVERSANO, M. C.; FORTE, V. T.; NOVELLO, L.; TANTILLO, G. M. Detection of cow Milk in buffalo "MOZZARELLA" by polymerase chain reaction (PCR) assay. **Journal of Food Quality,** v. 27, p. 428-435, 2004.

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.

EMBRAPA. Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio de reação em cadeia da polimerase. Disponível em: <http://www.cppse.embrapa.br/080servicos/070publicacaogratuita/e-book/LivroProtMolecular.pdf> Acesso em: 20 out. 2010.

EMBRAPA. **Produção mundial de leite de diferentes espécies de animais - 1997/2007.** Disponível em: <http://www.cnpgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/tabela0210.php> Acesso em: 23 out. 2010.

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

GUIDO, M. C. **Detecção de DNA de Brucella abortus pela PCR em leite bubalino experimentalmente contaminado pela amostra 1119-3**. 2003. 46 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

GLASS, V. Pureza garantida: criação de um certificado para a mussarela de búfala busca combater as falsificações feitas de leite bovino, além de incentivar a bubalinocultura. São

Paulo, Globo Rural, v. 16, n. 191, p. 62-64, 2001. Edição 191, setembro 2001. Disponível em: <http;//globorural.globo.com/barra.asp?d=/edic/191/sumario.htm> Acesso em: 29 set 2009.

HALL, T. BioEdit: Biological sequence alignment editor for Win95/98/NT/2K/XP. Carlsbad: Ibis Therapeutics, 1999. Disponível em: http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html. Acesso em: 15 ago. 2010.

HERMAN, L. Determination of the animal origin of raw food by species-specific PCR**.** **Journal of Dairy Research**, v. 68, p. 429-436, 2001.

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

LÓPEZ-CALLEJA, I.; ALONSO, I. G.; FAJARDO, V.; RODRÍGUEZ, M. A.; HERNÁNDEZ, P. E.; MARTÍN, R. PCR detection of cow's milk in water buffalo milk and mozzarella cheese, **International Dairy Journal**, v. 15, p. 1122-1129, 2005.

LOURES, R. R. O prestígio da mussarela de búfala. **Revista Rural**, jan-fev, 2004. Disponível em: <http://www.laticinio.net/inf_tecnicas.asp?cod=38> Acesso em: 15 set. 2009.

MASKOVÁ, E.; PAULICKOVÁ, I. PCR-Based detection of cow's milk in goat and sheep cheeses marketed in the Czech Republic. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 24, n. 3, p. 127–132, 2006.

MATIOLI, S. R. **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos Editora, p. 202, 2001.

MAUDET, C.; TABERLET, P. Detection of cows' milk in goats' cheeses inferred from mitochondrial DNA polymorphism. **Journal of Dairy Research**, v. 68, p. 229-235, 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria 364. Data de publicação 08 de setembro de 1997. **Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de queijo Mozzarella (Muzzarella ou Mussarella) 1997.**

OTAVIANO, A. R.; LIMA, A. L. F.; LAURIANO, M. M. M.; SENA, J. A. D.; ALBUQUERQUE, L. G.; TONHATI, H. ß – casein gene polymorphism permits identification of bovine milk mixed with bubaline milk in mozzarella cheese. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 4, p. 902-905, 2008.

PELLEGRINO, L.; DE NONI, A.; TIRELLI, A.; RESMINI, P. Detection of bovine milk in cheese from minor species by HPLC of whey proteins**.** Note 1 – Application to water buffalo mozzarella cheese. **Scienzae Tecnica Lattiero-Casearia**, v. 42, p. 87-101, 1991.

REA, S.; AVELLINI, P.; CENCI, G.; PEZZOTTI, G.; DI ANTONIO, E. Impiego della focalizzazione isoelettrica con "phast system"per la valutazione di miscele di latte bovino e bufalino e di mozzarelle da esse ottenute**. Altavilla Milícia**, v. 45, p. 25-28, set. 1991.

REA, S.; CHIKUNI, K.; BRANCHIARI, R.; SANGAMAYYA, R. S.; 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. **Journal of Dairy Research,** v. 68, p. 689-698, 2001.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F. MANIATIS, T. **Molecular cloning:** a laboratory manual. 3. ed. New York: Cold Spring: Harbor Laboratory Press, 1989.

SENO, L. O.; CARDOSO, V. L.; TONHATI, H. Valores econômicos para as características de produção de leite de búfalas no estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 36, n. 6, p. 2016-2022, 2007.

SERPE, L.; GALLO, P.; FIDANZA, N.; SCARAMUZZO, A.; FENIZIA, D. Single-step method for rapid detection of *Brucella* spp. in soft cheese by gene-specific polymerase chain reaction, **Journal of Dairy Research**, v. 66, p. 313-317, 1999.

SILVA, M. S. T.; JUNIOR, J. B. L.; GONÇALVES, I. A.; MIRANDA, H. A.; ERCHSEN, R.; FONSECA, R. F. S. R.; MELO, J. A.; COSTA, J. M. **Pará:** programa de incentivo a criação de búfalos por pequenos produtores. Pará: PRONAF, 2003.

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

TONHATI, H. Resultados do controle leiteiro em bubalinos. In: **Bubalinos:** sanidade, reprodução e produção**.** TONHATI, H.; BARNABE, V. H.; BARUSELLI, P. S. – Jaboticabal: FUNEP: UNESP, 1999.

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

VERRUMA, M. R.; OLIVEIRA, A. J. Avaliaçao química e nutricional do queijo mozzarella e iogurte de leite de búfala. **Scientia Agricola**, v. 50, p. 438-443, 1993.

VERRUMA, M.R. Avaliação nutricional do leite de búfala em comparação ao leite de vaca. **Scientia Agricola**, v. 50, p. 444-450, 1993.

VERRUMA, M. R. Analise química do leite de búfala em comparação ao leite de vaca. **Scientia Agricola**, v. 51, p. 131-137, 1994.

VIEIRA, N. R. **Desenvolvimento de uma reação em cadeia pela polimerase (PCR) para detecção de *Brucella* spp. em amostras de sangue de cães naturalmente infectados.** 2004. 92 f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

ZICARELLI, L. Considerazione sull'allevamento bufalino. Napoli, Boccia, p. 25-27, 1990.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Tabela de quantificação de DNA em leite extraído com fenol

QUANTIFICAÇÃO DE DNA		
DNA DE LEITE – Fenol / Clorofórmio		
Identificação das amostras	**Absorvância**	**Disorvância**
1	1,8956	1,8829
2	1,8752	1,8694
3	1,7457	1,7672
4	2,5011	2,4627
5	1,4572	1,4407
6	1,7711	1,7518
7	1,8819	1,8829
8	2,6403	2,6054
9	1,8785	1,8672
10	2,6214	2,6302
11	1,8973	1,8899
12	1,8938	1,8922
13	2,8936	2,8607
14	0,8807	0,8144
15	1,7711	1,7655
16	2,8702	2,6432

APÊNDICE B – Tabela de quantificação de DNA em leite extraído com KIT

QUANTIFICAÇÃO DE DNA		
DNA DE LEITE – KIT Nucleospin Food		
Identificação das amostras	**Absorvância**	**Disorvância**
1	2,775	2,6993
2	1,3456	1,3395
3	1,1057	1,698
4	2,762	2,7145
5	1,7763	1,7569
6	1,8281	1,8252
7	2,5376	2,5182
8	1,0113	1
9	1,0755	1,0683
10	1,8887	1,8736
11	1,9061	1,9664
12	2,773	2,7303
13	1,9008	1,8992
14	2,8164	2,7638
15	1,9151	1,9162
16	0,8704	0,8594

APÊNDICE C - Tabela de quantificação de DNA em *mozzarella* extraído com fenol

QUANTIFICAÇÃO DE DNA		
DNA DE *MOZZARELLA* – Fenol / Clorofórmio		
Identificação das amostras	**Absorvância**	**Disorvância**
1	0,3916	0,373
2	0,6997	0,6886
3	2,6233	2,576
4	1,8744	1,877
5	1,8515	1,8526
6	2,742	2,6934
7	1,8711	1,8748
8	1,8694	1,8793
9	2,6048	2,6506
10	1,8951	1,9029
11	1,8744	1,891
12	2,684	2,7086
13	1,8221	1,8254
14	1,8499	1,8504
15	0,8417	1,0869
16	1,8563	1,86

APÊNDICE D - Tabela de quantificação de DNA em *mozzarella* extraído com Kit

QUANTIFICAÇÃO DE DNA		
DNA DE *MOZZARELLA* – Kit Nucleospin Food		
Identificação das amostras	**Absorvância**	**Disorvância**
1	1,3171	1,3195
2	2,7062	2,7756
3	0,7646	6,7566
4	1,9205	1,9253
5	2,1891	2,213
6	1,8531	1,8591
7	1,46	1,4577
8	1,8644	1,8725
9	2,4475	2,4897
10	1,9076	1,9253
11	0,5413	0,5299
12	1,889	1,9034
13	2,367	2,4234
14	1,3701	1,3705
15	1,8969	1,9103
16	2,5938	2,6506