



NOVA METODOLOGIA PARA DETECÇÃO DE FRAUDES EM LEITE DE CAPRINOS

Hiago Polli¹; Bianca Tainá Azevedo²; Felipe Seabra Cardoso Leal³; Rodrigo Giglioti⁴; Anibal Eugênio Vercesi Filho⁵

Nº 21712

RESUMO – O aumento do consumo de derivados do leite de caprinos nos últimos anos tem destacado a busca por esses animais na pecuária brasileira. Esses produtos têm maior valor agregado em comparação com os laticínios de bovinos. Consequentemente, a adição de quantidades variáveis de leite de vaca durante a fabricação pode ocorrer, o que constitui fraude por adulteração do produto. Assim, o presente estudo desenvolveu um novo método baseado em PCR em Tempo Real quantitativa (qPCR) para detectar e quantificar DNA bovino em amostras de leite e derivados lácteos de caprinos. As reações de qPCR foram baseadas em primers que flanqueiam o gene da região do DNA mitocondrial (mtDNA) de bovinos e caprinos. As curvas de calibração para cada primer-específico foram padronizadas, assim como, os limites de detecção foram estabelecidos e permitiram a quantificação de cada espécie e o limite de detecção foi de 0.016 ng para ambas as espécies.

Palavras-chaves: produtos lácteos, genética molecular, fiscalização, adulteração.

1 Autor, CNPq (PIBIC): Graduação em Medicina Veterinária – FACICA – Campos Gerais-MG; hiagopolivet@gmail.com

2 Colaborador, Mestranda de Produção Animal Sustentável do Instituto de Zootecnia, Nova Odessa-SP.

3 Colaborador, Inspetor técnico de registro da Associação Brasileira de Criadores de Caprinos, Teresópolis - RJ

4 Pesquisador do CPGRA Instituto de Zootenia, Nova Odessa -SP

5 Orientador: Pesquisador do CPGRA Instituto de Zootenia, Nova Odessa -SP; aefilho@sp.gov.br



ABSTRACT – *The increased consumption of goat milk derivatives in recent years has highlighted the search for these animals in Brazilian livestock. These products have greater added value compared to dairy products from cattle. Consequently, the addition of varying amounts of cow's milk during manufacturing can occur, which constitutes fraud by product tampering. Thus, the present study developed a new method based on Real-Time PCR to detect and quantify bovine DNA in milk samples and detonators of goats. The qPCR reactions were based on primes that flank the same gene of the mitochondrial region (mtDNA) of the two evaluated species, cattle and goats*

Keywords: dairy products, molecular genetics, inspection, adulteration.

1. INTRODUÇÃO

O rebanho caprino vem apresentando crescimento no Brasil, assim como a produção de leite desses animais. O mercado está dividido entre a produção de leite fluido, leite em pó e derivados lácteos como queijos, doces, iogurtes, etc (DUARTE, OCCULATI e MANFRÉ, 2019). O leite de cabras possui elevado valor nutricional, além de possuir como beta caseína, apenas a do tipo A2. Além disso, possui triacilgliceróis em sua composição (98% da proporção de lípidos), com traços de fosfolípidos, colesterol e ácidos graxos livres. Os glóbulos de gordura são menores e com maior presença de ácidos graxos de cadeia média e curta, o que facilita o processo digestivo, que também é justificado pela composição dos ácidos graxos. Os ácidos cáprico, caprílico e capróico representam em torno de 15% dos ácidos graxos no leite de cabra, enquanto no leite bovino representam 7%, fato este também associado ao odor característico do leite caprino (TAYLOR & MACGIBBON, 2011).

As proteínas, assim como no leite de vaca, são divididas em caseínas e proteínas do soro do leite (*whey proteins*). A maior parte das proteínas do leite bovino é composta pela α_{s1} -caseína, enquanto no leite caprino, as proteínas majoritárias são β -caseína e α_{s2} -caseína. (VERRUCK, DANTAS & PRUDENCIO, 2019). A α_{s1} -caseína, associada a processos de digestão mais difícil, é presente no leite bovino em cerca de 12 a 15 g/L, enquanto no leite caprino, este valor chega a, no máximo, 7 g/L. A alergia ao leite de vaca atinge cerca de 6% de crianças brasileiras, e a substituição por leite caprino demonstra resultados satisfatórios em até 40% dos casos. (HODGKINSON *et al.*, 2017). A β -lactoglobulina do leite de cabra apresenta diferenças com relação



à presente no leite de vaca. Durante a sua digestão e processamento, gera peptídeos bioativos que possuem efeitos anti-hipertensivos, antimicrobianos, antioxidantes e imunomoduladores (BALTHAZAR *et al*, 2017).

Além da lactose, outros tipos de carboidratos presentes no leite de cabra são oligossacarídeos, glicopeptídeos e glicoproteínas. Os oligossacarídeos do leite caprino exibem uma série de efeitos benéficos à saúde humana, como propriedades antigênicas e efeitos anti-inflamatórios na região intestinal. Ainda, os ácidos linoleicos conjugados presentes no leite, definidos como uma família de isômeros do ácido linoleico tem importância comprovada na inibição do câncer e aterosclerose e melhora das funções imunológicas (ELWOOD *et al.*, 2010).

Com relação ao conteúdo mineral, sabe-se que além do leite caprino ter maiores níveis de cálcio, fósforo, magnésio, ferro e cobre comparativamente ao leite de vaca, suas biodisponibilidades são aumentadas. O conteúdo de vitamina A também se mostra mais elevado em relação ao leite de vaca, pois as cabras são capazes de converter carotenos em vitamina A (VERRUCK, DANTAS & PRUDENCIO, 2019).

Produtos oriundos do leite de caprinos, assim como os de búfalos e ovinos, possuem valor agregado e maior valor comercial em relação ao leite de vaca, o que faz com que eventualmente, esses produtos sejam adulterados pela adição do leite de vaca.

De acordo com AZEVEDO *et al* (2021), existem vários métodos para detectar fraudes em leite como cromatografia, eletroforese, imunológico, fluorescência. Os autores descrevem nesse artigo, metodologias baseadas em técnicas de genética molecular, para detectar fraude em leite e produtos lácteos de bubalinos por adição de leite de vaca.

Assim, o presente estudo desenvolveu um novo método baseado em PCR em Tempo Real para detectar e quantificar DNA bovino em amostras de leite e derivados lácteos de caprinos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostras experimentais e processamento

As amostras de DNA usadas nesse estudo foram provenientes do banco de DNA do Laboratório de Biotecnologia do Instituto de Zootecnia-IZ, Nova Odessa, São Paulo, Brasil, obtido através da coleta de leite de três cabras da raça Saanen. Os produtos comerciais (amostra de leite e duas amostras de queijo, foram adquiridas em lojas comerciais).



2.2. Extração de DNA

A extração de DNA dos produtos lácteos foi realizada de acordo com o método de Reale et al. (2008), com algumas modificações: 20 mL de solução PBS (pH 7.8) foram adicionados a 20 mL de leite fresco e centrifugados a 1500 × g a 4 °C por 20 min. Uma lavagem adicional foi realizada adicionando 10 mL de PBS e as amostras foram então centrifugadas a 1500 × g a 4 °C por 10 min. O pellet obtido foi ressuspensão em 60 µL de PBS e em seguida submetido à extração de DNA utilizando o kit Easy-DNA™ (cat. n. K1800-01 - Protocolo nº 1 – pequenas mostras de sangue ou folículos capilares; Invitrogen, Carlsbad, EUA), conforme recomendado pelo fabricante. O pellet de DNA foi diluído em 60 µL de Tris-EDTA. A concentração e pureza das amostras de DNA foram determinadas por meio de espectrofotômetro BioDrop (BioDrop uLITE, Integrated Scientific Solutions Inc., Walnut Creek, CA, USA). As concentrações de DNA de todas as amostras avaliadas foram ajustadas para 5 ng / µL.

2.3. PCR e Sequenciamento do DNA

Um conjunto de oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados usando as sequências que flanqueiam o gene do DNA mitocondrial (*mtDNA*) para cada espécie (Tabela 1). As amostras de DNA extraídas das amostras de leite (3 de bovino e 3 de caprino) foram submetidas a reações de PCR. Os ensaios foram realizados para um volume final de 50 µL, utilizando 0,2 µL de Platinum™ Taq DNA Polimerase High Fidelity (5 U / µL; Invitrogen), 1,5 µL de MgSO₄ 50 mM (Invitrogen), 5 µL de tampão de PCR 10 × Taq DNA Polimerase [(600 mM Tris-SO₄ (pH 8,9), 180 mM (NH₄)₂SO₄; Invitrogen)], 1 µL de mistura de dNTP 10 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), 2 µL de cada 10 µM de iniciadores diretos e reversos (Tabela 1) e 2 µL de DNA (10 ng). As condições de amplificação da PCR foram: 95 °C por 5 min (ativação enzimática), seguida de 35 ciclos a 95 °C por 30 s (desnaturação), 55 °C por 45 s (anelamento) e 72 °C por 1 min (extensão), com extensão final de 68 °C por 10 min. Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2,0%, corados com brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta. Os produtos de PCR foram purificados usando um kit de purificação PureLink®PCR (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante e foram submetidos as reações de sequenciamento.

A reação de sequenciamento foi realizada usando o kit BigDye Termi-nator v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e então analisados por meio do equipamento ABI Prism 3730XL (Applied Biosystems). As sequências de DNA obtidas foram alinhadas com o software CLUSTAL / W (Thompson, Higgins, & Gibson, 1994) e comparadas com as já depositadas no GenBank. As



15º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2021
01 a 02 de setembro de 2021
ISBN 978-65-994972-0-9

similaridades também foram avaliadas pelo BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). As sequências de nucleotídeos de ambas espécies avaliadas neste estudo foram depositadas no banco de dados GenBank.

Tabela 1. Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores usados nos ensaios de PCR e qPCR.

Ensaio	espécie	Primer	Sequência (5'-3')	Tamanho do produto (bp)
PCR sequenciamento	<i>B. taurus</i>	mt-PCR-bov-F mt-PCR-bov-R	F: CTACTCTCGCTCCCTGTAT R: CATAGTGGAAATGTGCGACAA	553
	<i>C. hircus</i>	mt-PCR-cap-F mt-PCR-cap-R	F: CCTAGCAGGCATCTCTTCAAT R: TCCGTGGAGTGTTGCTAATC	535
	<i>B. taurus</i>	mt-qPCR-bov-F mt-qPCR-bov-R	F: TTAATCTTACCTGGGTTTGGGA R: GAAACCTAGAAATCCGATTGAC	120
	<i>C. hircus</i>	mt-qPCR-cap-F mt-qPCR-cap-R	F: CTTATTTTACCTGGATTGGA R: CAATAAATCCTAGAAACCCGA	124

2.4. Reações qPCR

Um conjunto de oligonucleotídeos iniciadores específicos para a PCR quantitativa (qPCR) foi desenhado usando as regiões que flanqueiam parte do gene *mtDNA* delimitadas pelos oligonucleotídeos desenhados para PCR convencional (Tabela 1). As reações de qPCR foram realizadas em volumes final de 10 µL usando um o equipamento Rotor-Gene Q (Qiagen, Venlo, Holanda). Cada reação continha 5,4 µL de água ultra-pura, 2 µL de máster mix 5 × HOT FIREPol EvaGreen® HRM (Solis Biodyne, Tartu, Estônia), 0,3 µL de cada primer (10 µM) e 2 µL de DNA (10 ng). Uma amostra de controle negativo foi incluída em cada ensaio de qPCR. A qPCR foi realizada utilizando as seguintes condições: 95 ° C por 12 min (ativação enzimática), seguida de 35 ciclos de 95 ° C por 15 s (desnaturação), 63 ° C por 20 s (anelamento) e 72 ° C por 20 s (extensão). A curva de dissociação foi produzida em ciclo único adotando-se a variação de temperatura entre 60 - 95 °C com incremento de 0,5°C com 5 segundos para cada passo. As corridas de qPCR foram realizadas de acordo com os oligonucleotídeos específicos para bovinos e caprinos, utilizadas para cada reação de qPCR foram aquelas previamente sequenciadas (seção 2.3).



2.5 Testes de especificidade e sensibilidade

As especificidades de cada oligonucleotídeo específico foram verificadas quanto à presença ou ausência de amplificações não específicas e pela temperatura da curva de dissociação (°C). A sensibilidade analítica foi avaliada usando diluições seriadas na base 5 (5^1 a 5^{-5} , ou 10 ng a 0,0032 ng) de controles de amostra de DNA de cada espécie, usando cinco repetições técnicas de cada amostra e foram submetidas as reações de qPCR.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A qualidade, certificação e rastreamento de alimentos tem ganhado cada vez mais atenção do setor produtivo, principalmente dos consumidores. Alimentos seguros e com garantia de origem e conteúdo, tem ganhado cada vez mais espaço e agregado valor ao produto. Por ter valor agregado maior, propriedades nutricionais específicas e dar origem a produtos lácteos mais valorizados, o leite e derivados lácteos de caprinos podem sofrer adulteração, principalmente por leite de vaca (CHENG, CHEN e WENG, 2006). Em estudo com pequenos produtores na região Nordeste do Brasil, RODRIGUES et al (2012) encontraram que 41,2% das 160 amostras analisadas possuíam algum grau de contaminação com leite bovino. Técnicas de PCR tem sido relatadas para detecção de fraudes por adição de leite bovino em búfalos (AZEVEDO et al, 2021) e caprinos (CHENG, CHEN e WENG, 2006 e RODRIGUES et al, 2012).

3.1 Sequenciamento de DNA

Os fragmentos de PCR foram específicos para cada oligonucleotídeo específico permitindo seu uso para reações de sequenciamento (Fig. 1). As amostras sequenciadas foram depositadas no GeneBank e foram utilizadas como controles para as reações qPCR (Fig. 2).

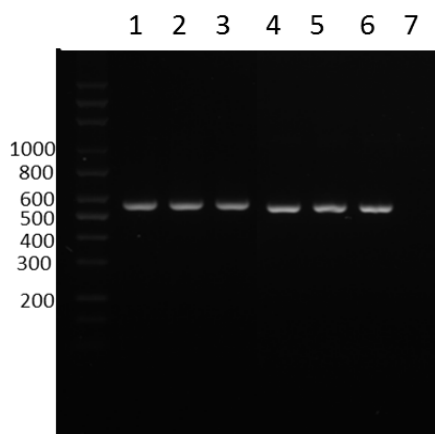


Figura 1. Fragmentos de PCR de bovinos (1 a 3), caprinos (4 a 6) e controle negativo (7).

<i>B. taurus</i>	TTT TAATCTTACCTGGGTTTGA ATAATCTCTCATATCGTGACCTACTACTCAGGAAAAAAA	62
<i>C. hircus</i>	T TCTTATTTTACCTGGATTGGA ATAATCTCTCATATCGTAACCTACTACTCAGGAAAAAAA	62
	** * ** ***** ***** ***** ***** *****	
<i>B. taurus</i>	GAACCATTCGGATATATGGGAATAGTTGGGCTATAAT GTCAATCGGATTTC AGGTTTCATCG	126
<i>C. hircus</i>	GAACCATTCGGGTACATAGGAATAGTGTGAGCCATAATATCAA TCGGGTTTCTAGGATT TATG	126
	***** ** * ** ***** ** * ** ***** ***** ***** ** *	

Figura 2. Alinhamento de sequência do DNA do gene mitocondrial (*mtDNA*) de bovinos (120 pb) e cabra (124 pb), e localização de oligonucleotídeos (em negrito) utilizados nos ensaios qPCR. Os asteriscos representam a similaridade entre as duas sequências.

3.2 Reações de qPCR

3.2.1 Especificidade e sensibilidade

Cada conjunto de oligonucleotídeos desenhados para cada espécie foi específico não apresentando amplificações inespecíficas quando contrastadas com amostras inespecíficas (bovino x cabra) (Fig. 3). Cada conjunto de oligonucleotídeos também mostrou temperaturas de curvas de dissociação distintas (Fig. 3).

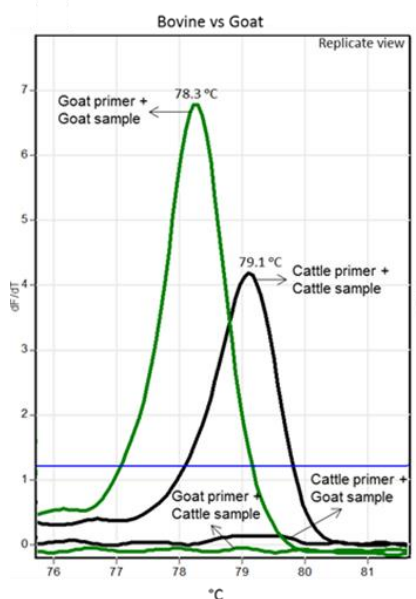


Figura 3. Temperatura da curva de dissociação do ensaio de PCR em Tempo Real.

O limite de detecção encontrado para cada espécie foi o mesmo, 0,016 ng (Fig. 4). As curvas de calibração usando as diluições seriadas de cada amostra específica permitiram quantificar e estimar os limites de detecção de cada espécie-específica. As curvas de calibração foram analisadas conjuntamente entre bovinos e cabras. As concentrações de 10 ng utilizadas para cada espécie permitiram que as curvas de amplificação apresentassem ciclos quantitativos (Cq) semelhantes e, assim, permitiram a quantificação conjunta de ambas as espécies (Fig 4).

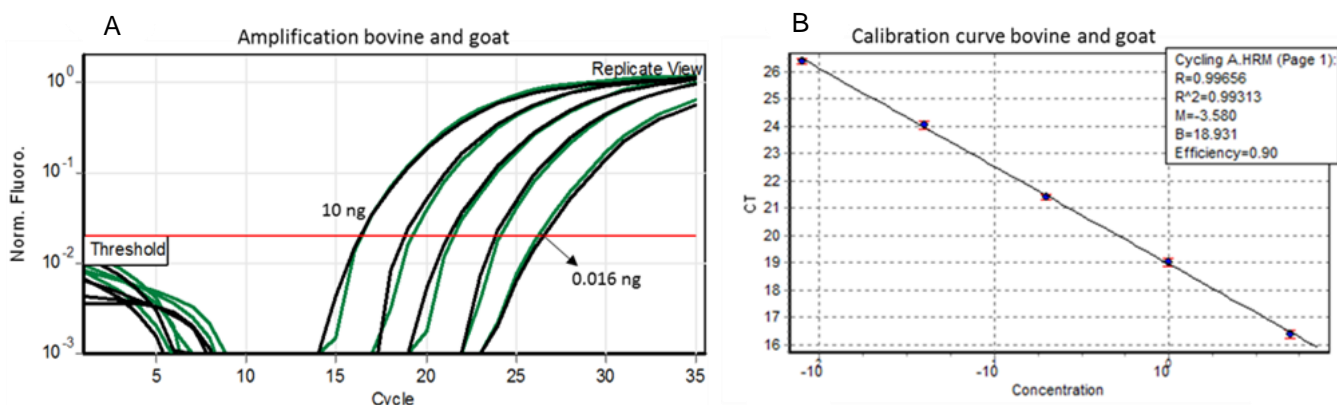


Figura 4. Curvas de amplificação e eficiência de reação a partir de análises comparativas específicas de espécies. A: bovino (linha preta) e caprinos (linha verde).



4. CONCLUSÃO

A metodologia proposta se mostrou eficiente em detectar fraudes com leite bovino em leite e produtos lácteos de caprinos tendo sensibilidade de detecção a partir de 0,016ng de DNA bovino na amostra analisada.

5. AGRADECIMENTOS

Agradecimento a CNPq e Instituto de Zootecnia pela oportunidade da realização do PIBIC e ao Capril CAPRIMAVA pela cessão do material genético que possibilitou a realização deste projeto.

6. REFERÊNCIAS

AZEVEDO, B. T.; VERCESI FILHO, A. E.; GUTMANIS, G.; VERISSIMO, C. J.; KATIKI, L. M., OKINO, C. H.; OLIVEIRA, M. C. S.; GIGLIOTI, R. New sensitive methods for fraud detection in buffalo dairy products. **International Dairy Journal** 117, 2021.

BALTHAZAR, C. F.; PIMENTEL, T. C.; FERRÃO, L. L.; ALMADA, C. N.; SANTILLO, A.; ALBENZIO, M.; MOLLAKHALILI, N.; MORTAZAVIAN, A. M.; NASCIMENTO, J. S.; SILVA, M. C.; FREITAS, M. Q.; SANT'ANA, A. S.; GRANATO, D.; CRUZ, A. G. Sheep Milk: Physicochemical Characteristics and Relevance for Functional Food Development. **Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety**, v. 16, n. 2, p.247-262, 2017.

CHENG, Y.H.; CHEN, S.D.; WENG, C.F. Investigation of goats milk adulteration with cows milk by PCR. **Asian-Aust. J. Anim. Sci.**, v.19, n. 10, p. 1503-1507, 2006.

DUARTE, L.P.B.; OCCULATI, R.M.; MANFRÉ, R.M. Comercialização de leite e derivados de leite de cabra no Brasil. In: SIMPOSIO NACIONAL DE TECNOLOGIA EM AGRONEGOCIO, 11.. 2019, Ourinhos. **Anais Ourinhos**, 2019. P 138-144.

ELWOOD, P. C.; PICKERING, J. E.; GIVENS, D. I.; GALLACHER, J. E. The Consumption of Milk and Dairy Foods and the Incidence of Vascular Disease and Diabetes: An Overview of the Evidence. **Lipids**, v. 45, n. 10, p.925-939, 2010.

HODGKINSON, A. J.; WALLACE, O. A. M.; BOGGS, I.; BROADHURST, M.; PROSSER, C. G. Gastric digestion of cow and goat milk: Impact of infant and young child in vitro digestion conditions. **Food Chemistry**, v. 245, p.275-281, 2017.

SHARMA, V., SHARMA, N., JAWED, B., CHANDRA, S., NAUTIYAL, S. C., & SINGH, R. K. High resolution melt curve analysis for the detection of A1, A2 β -casein variants in Indians cows. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, 3(1), 144–148, 2013.

TAYLOR, M. W.; MACGIBBON, A. K. H. Milk Lipids: General Characteristics. **Encyclopedia of Dairy Sciences**, p.649-654, 2011.



15º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2021

01 a 02 de setembro de 2021

ISBN 978-65-994972-0-9

RODRIGUES, N.P.A.; GIVISIEZ, P.E.N.; QUEIROGA, R.C.R.E.; AZEVEDO, P.S.; GEBREYES, W.A.; OLIVEIRA, C.J.B. Milk adulteration: Detection of bovine milk in bulk goat milk produced by smallholders in northeastern Brazil by a duplex PCR assay. **J. Dairy Sci.** v. 95 p. 2749-2752, 2012

VERRUCK, S.; DANTAS, A.; PRUDENCIO, E. S. Functionality of the components from goat's milk, recent advances for functional dairy products development and its implications on human health. **Journal of Functional Foods**, v. 52, p.243-257, 2019.