



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA  
CAMPUS DE PATOS-PB

**DETECÇÃO DA PRESENÇA DE LEITE BOVINO NO LEITE CAPRINO POR  
IMUNOCROMATOGRÁFIA E ELISA**

**RENAULT VIDAL DE SOUZA SILVA**

PATOS - PB  
2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA  
CAMPUS DE PATOS-PB

**DETECÇÃO DA PRESENÇA DE LEITE BOVINO NO LEITE CAPRINO POR  
IMUNOCROMATOGRAFIA E ELISA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

**RENAULT VIDAL DE SOUZA SILVA**

**Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria das Graças Xavier de Carvalho**

**Co-Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Marcia Almeida de Melo**

PATOS - PB  
2010

FICHA CATALOGADA NA BIBLIOTECA SETORIAL DO CAMPUS DE PATOS -  
UFCG

S586p  
2010

Silva, Renault Vidal de Souza

Detecção da presença de leite bovino no leite caprino por imunocromatografia e ELISA./ Renault Vidal de Souza Silva. – Patos-PB: CSTR/UFCG, 2010.

34p.: il.

Inclui bibliografia.

Orientador (a): Maria das Graças Xavier de Carvalho

Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande.

1 – Leite de cabra – detecção – mistura – Dissertação. 2 – Leite de cabra – Imunocromatografia – ELISA – I – Título.

CDU: 637.1: 636.3

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA  
CAMPUS DE PATOS-PB

RENAULT VIDAL DE SOUZA SILVA

**DETECÇÃO DA PRESENÇA DE LEITE BOVINO NO LEITE CAPRINO POR  
IMUNOCROMATOLOGRAFIA E ELISA**

Dissertação aprovada em 25 de agosto de 2010.

BANCA EXAMINADORA:

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria das Graças Xavier de Carvalho  
UAMV da UFCG/ CSTR – Patos – PB  
(Orientadora)

---

Prof. Dr. Celso José Bruno de Oliveira  
Centro de Ciências Agrárias/UFPB – Areia - PB  
(Examinador I)

---

Prof. Dr. Sérgio Santos Azevedo  
UAMV da UFCG/ CSTR – Patos – PB  
(Examinador II)

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus pais Vidal e Francisca, pelo amor incondicional, e ao meu irmão Francisco Vidal “In memoriam”, um exemplo na minha vida.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me conceder a vida e estar sempre presente nela, me dando força e fé nos momentos difíceis.

Às pessoas mais importantes da minha vida, meus pais Vidal e Francisca, pelo amor e dedicação de sempre e por nunca medirem esforços para que eu conseguisse realizar este sonho.

Ao meu irmão Francisco Vidal “In memoriam”, que sempre foi um exemplo em tudo para mim, um espelho na minha vida estudantil e como ser humano.

À professora Graça Xavier, pela orientação neste trabalho, pelos ensinamentos e pela sua enorme paciência.

À professora Marcia Melo, pela imensa contribuição neste trabalho, estando sempre disposta a ajudar.

Aos professores Sérgio Azevedo e Paulo Andrade pela atenção e o auxílio nesta pesquisa.

Aos demais professores que compõem o curso de Medicina Veterinária do CSTR/UFCG, em especial, Eldinê, Sara, Gil, Pedro, Verônica, Antonio Flávio, Sônia, Norma, Carlos Peña e Moraes pela valiosa contribuição na minha formação profissional.

Às minhas grandes amigas Ana Lucélia e Tereza, pelo carinho e amizade sincera.

Aos meus amigos e colegas de mestrado Daniel, Clarice, Silvano, Tatiane, Dalva, Dalana, Islaine, Luana, Alan, Rose, Salomão, Vagner e Jucileide, pelos momentos que convivemos juntos.

Aos amigos Chico, Júlia e Vinícius pelo apoio no desenvolvimento do projeto.

Ao meu grande amigo Expedito, que sempre esteve à disposição quando precisei. Fico grato também à sua família pela amizade e o acolhimento.

A todos que de uma forma ou outra contribuíram para a realização desse trabalho o meu Muito Obrigado!!!

## SUMÁRIO

<b>Lista de tabelas.....</b>	<b>IX</b>
<b>Lista de figuras.....</b>	<b>IX</b>
<b>Capítulo I – Metodologias para detecção da adulteração do leite de cabra pela adição de leite de vaca – Revisão.....</b>	<b>9</b>
Resumo.....	10
Abstract.....	10
1. Introdução.....	11
2. Metodologias aplicadas à detecção da mistura entre leite de espécies diferentes – Revisão.....	12
2.1 Métodos eletroforéticos.....	12
2.2 Métodos cromatográficos.....	14
2.3 Métodos espectroscópicos.....	15
2.4 Métodos imunológicos.....	16
2.5 Métodos baseados em DNA.....	17
3. Considerações finais.....	19
Referências.....	20
<b>Capítulo II – Detecção da presença de leite bovino no leite caprino por imunocromatografia e ELISA.....</b>	<b>24</b>
Resumo.....	25
Abstract.....	25
1. Introdução.....	26
2. Material e Métodos.....	28
2.1 Amostragem e coleta.....	28
2.2 Análises.....	28
2.2.1 Teste Imunocromatográfico (IC-Bovino).....	28
2.2.2 Teste ELISA (RC-Bovino).....	29
2.3 Análise Estatística.....	30
3. Resultados e Discussão.....	30
Referências.....	33

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo II

Tabela 1 – Comparação entre os resultados obtidos por Imunocromatografia e ELISA ( $p > 0,05$ ).....	31
--	----

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo II

Figura 1 – Tiras reagentes do teste imunocromatográfico, apresentando resultado negativo à esquerda e positivo à direita.....	29
Figura 2 – Micro-placa do kit ELISA. A intensidade da reação em cada poço é proporcional à concentração de leite de vaca nas amostras (coluna 1 mostra a localização e concentração dos controles).....	30



## **CAPÍTULO I**

### **Metodologias para detecção da adulteração do leite de cabra pela adição de leite de vaca - Revisão**

## **Metodologias para detecção da adulteração do leite de cabra pela adição de leite de vaca - Revisão**

### **Resumo**

A mistura do leite de cabra com leite de vaca é uma prática fraudulenta na indústria láctea. As principais razões para esta adulteração, além do aspecto econômico, são o menor rendimento do leite de cabra e o fato do leite de vaca estar sempre disponível. Para garantir a autenticidade do leite e dos queijos de cabra, há necessidade da aplicação de testes analíticos específicos que permitam o controle deste tipo de adulteração. Dentre os métodos encontrados na literatura destacam-se aqueles baseados na análise das frações protéicas do leite, dos quais, os mais utilizados são os cromatográficos, eletroforéticos, imunológicos, a reação em cadeia da polimerase (PCR) e a espectroscopia de infravermelho. O objetivo desta revisão foi abordar os principais métodos, baseados em análise protéica, utilizados para detecção de adulteração do leite de cabra por adição de leite de vaca.

**Palavras-chave:** Adulteração, leite de cabra, leite de vaca.

### **Abstract**

The mixture of goat milk with cow's milk is a fraudulent practice in the dairy industry. The main reasons for this adulteration, besides the economic aspect, are the lowest yield of goat milk and the fact that cow's milk is always available. To ensure the authenticity of milk and goat cheeses, it is necessary the application of specific analytical tests that allow the control of this kind of fraud. Among the methods found in the literature stand out those based on analysis of protein fractions of milk, of which, the most used are chromatographic, electrophoretic, immunological, the polymerase chain reaction (PCR) and infrared spectroscopy. The purpose of this review was to address the main methods, based on protein analysis, used to detect adulteration of goat milk by the addition of cow's milk.

**Keywords:** Adulteration, goat's milk, cow's milk.

## 1. Introdução

A adulteração dos mais variados tipos de alimentos, tem sido uma prática constante há muito tempo, e em toda a cadeia produtiva, comprometendo a qualidade dos produtos e a segurança do consumidor. Com relação ao leite não é diferente, vários estudos têm demonstrado que este alimento e os seus derivados, durante décadas, vêm sofrendo adulterações de diferentes formas.

O mercado atual tem se preocupado em disponibilizar grande variedade de produtos adequados a interesses cada vez mais particulares, o que se observa também no setor lácteo pela crescente oferta de produtos específicos para certos nichos de mercado. Os consumidores buscam qualidade e alimentos mais saudáveis e prezam pela confiança de que estão levando o que é especificado no rótulo. Nas embalagens, a origem dos ingredientes utilizados para a fabricação deve ser relatada, pois a adição não mencionada de substâncias fere o direito do consumidor e a legislação em vigor (Congresso Nacional, Lei nº 8078 de 11 de setembro de 1990; Resolução RDC nº 259 de 20 de setembro de 2002).

O leite de cabra caracteriza-se como um produto diferenciado, convergindo propriedades nutricionais e funcionais. Comparado ao leite de vaca, apresenta maior proporção de ácidos graxos de pequena e média cadeia (6 a 14 carbonos) e menor proporção de caseína  $\alpha_1$ , que resultam em maior digestibilidade. Além disso, em função da menor proporção de caseína do tipo  $\alpha_1$  e da configuração de suas lactalbuminas, o leite de cabra é uma alternativa alimentar para indivíduos que desenvolvem intolerância e reações alérgicas ao leite de vaca, sendo utilizado, também, como substituto na dieta de crianças e idosos (Chapaval, 2007). Desse modo, a possibilidade de determinar a qualidade e autenticidade do leite entregue no laticínio, que será utilizado para o consumo *in natura* ou na produção de derivados lácteos caprinos, tem enorme importância.

A comercialização do leite caprino como uma especialidade, e até mesmo como alimento funcional, agrega valor ao produto e traz consigo um grande potencial de adulteração com o leite bovino, mais barato. A mistura, não mencionada, do leite de cabra com leite de vaca é uma prática fraudulenta na indústria láctea. As principais razões para esta adulteração, além do aspecto econômico, são o menor rendimento do leite de cabra e o fato do leite de vaca estar sempre disponível em maior quantidade.

O leite de cabra e o de vaca apresentam características físico-químicas e de composição bastante similares, o que impossibilita a detecção da sua mistura por testes convencionais de rotina. Para garantir a genuinidade do leite e dos queijos de cabra, há necessidade da aplicação de testes analíticos específicos que permitam o controle deste tipo de adulteração. Nesse intuito, diferentes metodologias têm sido desenvolvidas, algumas delas já bem estabelecidas e validadas, destacando-se aquelas baseadas na análise das frações protéicas do leite (Pereira, 2003; Veloso, Teixeira, & Ferreira, 2002b).

Dentre os métodos encontrados na literatura os mais utilizados são os cromatográficos, eletroforéticos, imunológicos, a reação em cadeia da polimerase (PCR) e a espectroscopia de infravermelho, que muitas vezes, além de identificarem a diferença entre os produtos, quantificam a mistura de forma confiável (Dias, Lobato, & Verruma-Bernardi, 2009).

Na União Européia, utiliza-se como método de referência para detectar caseína bovina em queijos fabricados com leite caprino, ovino e bubalino a focalização isoelétrica (IEF Isoelectric focusing) da caseína  $\gamma$  (Commission Regulation No. 273/2008 of 5 March 2008). No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), publicou no ano de 2000 a instrução normativa N°37 que fixou as condições de produção, identidade e os requisitos mínimos de qualidade do leite de cabra, proibindo também a mistura com leite de outras espécies ou classificando o produto, assim adicionado, como fraudado ou falsificado. Entretanto, a legislação sancionada pelo governo federal não prevê metodologia específica para o combate à esta adulteração. Sendo assim, por razões éticas, econômicas e de saúde pública, torna-se imperativo a aplicação de métodos sensíveis para a detecção da mistura do leite de cabra, e de seus derivados, com leite de outra espécie.

O objetivo desta revisão foi de abordar os principais métodos, baseados em análise protéica, utilizados para detecção de adulteração do leite de cabra por adição de leite de vaca.

## **2. Metodologias aplicadas à detecção da mistura entre leite de espécies diferentes**

### **2.1 Métodos eletroforéticos**

A eletroforese tem um papel muito importante no estudo das proteínas lácteas e foi utilizada na investigação de suas variantes genéticas, contribuindo para a

diferenciação do leite de várias espécies, sendo usada, também, na detecção da mistura destes (Strange, Malin, Van Hekken, & Basch, 1992).

Na eletroforese, as proteínas migram submetidas a um campo elétrico, em que as cargas positivas e negativas são atraídas para seus pólos contrários correspondentes, sendo possível sua separação e identificação. Além de sua carga, a forma, o tamanho e a associação com outros íons, podem alterar sua mobilidade (Silva, 2002).

A principal vantagem do método eletroforético é a de permitir a separação, quantificação e identificação simultânea das diferentes proteínas de uma mistura. Após a separação, as diferentes bandas resultantes podem ser identificadas com a utilização de corantes como o azul de Coomassie ou o nitrato de prata. Estes permitem não só uma identificação qualitativa dos grupos de proteínas, como também uma quantificação aproximada utilizando um densitômetro no comprimento de onda correspondente à absorção do corante (James, 1995).

A diferença entre os perfis eletroforéticos de proteínas caprinas e bovinas foi observada sobre gel de poliacrilamida (PAGE) ou gel de amido, podendo detectar-se 1% de mistura com ambos os suportes, da mesma forma que em géis alcalinos contendo uréia (Furtado, 1983; Ramos & Juárez, 1985; Szijarto & Van de Voort, 1983). O método PAGE pode ser usado na presença de SDS ou de uréia. A uréia e o ânion detergente dodecil sulfato de sódio (SDS) possuem a habilidade de dissolver vários tipos de proteínas e decompô-las em componentes de polipeptídeos. O Uréia-PAGE separa por diferença na carga elétrica, enquanto o SDS-PAGE pelo tamanho da molécula, ambos podem separar as proteínas tanto por grupos, como por variações genéticas (Amigo, Ramos, Martin-Alvarez, & Barbosa, 1991; Dennis, 1998). Egito et al.(2006) avaliaram as duas técnicas, sendo Uréia-PAGE o método mais apropriado na identificação da fraude, podendo detectar a adição de 2,5% de leite de vaca, baseado na presença da caseína  $\alpha_1$  com migração mais rápida no leite bovino.

Nos últimos anos, o desenvolvimento de uma técnica de eletroforese capilar, baseada na separação das proteínas através do fluxo em um tubo capilar, resultou na redução do tempo das análises, com uma alta resolução e o uso de quantias muito pequenas de amostras e tampões (Recio, Amigo, & López-Fandifio, 1997). A técnica permite a separação de caseínas e proteínas do soro das diferentes espécies e tem se mostrado eficiente na detecção de misturas de leite, identificando adulterações a partir de 1%. Os tipos de electroforese capilar mais utilizados são a electroforese capilar de zona, a electroforese capilar em gel e a focagem isoeléctrica capilar.

A separação de proteína de acordo com seus pontos isoelétricos é especialmente satisfatória para a análise de caseínas que formam muitas variantes genéticas. A focalização isoelétrica (IEF) é o método de referência da União Européia para a determinação da presença de leite de vaca e caseinato em queijos feitos de leite ovelha, cabra ou de búfala ou a mistura destes. Baseia-se na identificação de  $\gamma$ -caseínas depois de plasminólise. Usando dois padrões de referência (com 0 e 1% de leite de vaca), as amostras positivas para a presença de leite de vaca podem ser detectadas. No caso em que as concentrações de  $\gamma_2$ - e  $\gamma_3$ -caseína bovinas forem iguais ou maiores que no padrão a 1%, a presença de leite de vaca será confirmada. O método permite determinar 0.5% de adição (Commission Regulation No. 273/2008 of 5 March 2008).

## 2.2 Métodos cromatográficos

A cromatografia é fundamentalmente um processo de separação por migração diferencial entre duas fases, a fase móvel e a fase estacionária, sendo estabelecidas interações entre os solutos e a fase estacionária (eletrostática, hidrofóbica, de afinidade e estereoquímicas), conforme o tipo de cromatografia (Prazeres, 1995).

Métodos cromatográficos têm uma extensa aplicação na separação de proteínas do leite. Técnicas de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) estão entre os métodos mais empregados na detecção de adulterações por mistura, destacando-se a RP-HPLC (Reverse-phase High Pressure Liquid Chromatography ou cromatografia de fase reversa), onde as substâncias são separadas devido à diferença de hidrofobicidade, e a cromatografia de troca iônica (Ion Exchange HPLC / IE-HPLC), onde a separação se baseia na diferença de afinidade dos íons com a coluna, ou outro componente, como pH e a força iônica da coluna, que podem variar dependendo das proteínas analisadas (Borková & Snáselová, 2005; Mayer, 2005).

A detecção da adição de leite de vaca no leite de cabra pela análise de proteínas do soro ( $\alpha$ -La,  $\beta$ -Lg e BSA) foi descrita por Romero, Perez-Andújar, Olmedo, e Jiménez (1996) usando RP-HPLC. A determinação da adulteração resultou do tempo de retenção das proteínas do soro e variantes genéticas. Esta técnica possibilitou a detecção de mistura em quantias abaixo de 1%. Ferreira e Caçote (2003) trabalharam com a detecção e quantificação de misturas em leite e queijos de vaca, cabra e ovelha através da determinação de  $\beta$ -lactoglobulinas por meio de RP-HPLC em um limite de detecção de 2%.

Kaminarides e Anifantakis (1993) conseguiram a separação das diferentes frações de caseínas que compõem o leite de vaca, ovelha e cabra por HPLC com uma coluna de troca aniônica. Os leites de ovelha e cabra apresentaram perfis cromatográficos relativamente parecidos, mas que diferiram consideravelmente do leite de vaca. A eluição da  $\alpha$ 1-caseína bovina ocorreu mais tarde que a das  $\alpha$ 1-caseínas caprina e ovina, utilizando as mesmas condições cromatográficas. Deste modo, foi possível detectar e quantificar a presença de leite de vaca em leite de ovelha e cabra. A quantidade de leite de vaca adicionada em amostras adulteradas pôde, assim, ser calculada por integração da área dos picos de  $\alpha$ 1-caseína bovina, usando uma curva padrão preparada previamente com amostras adulteradas de composição conhecida.

### 2.3 Métodos espectroscópicos

A espectrometria de massa tem sido utilizada para determinar a massa molecular das proteínas do leite de vaca, ovelha e cabra, assim como na identificação de variantes genéticas, alterações na composição dos aminoácidos e modificações como fosforilação e glicosilação (Velo, Teixeira, Ferreira, & Ferreira, 2002).

A técnica para análise da mistura do leite de várias espécies baseia-se nos diferentes picos espectrais apresentados pelas proteínas distintas após sofrerem isolamento, com alteração de pH, dessa forma uma análise estrutural dos grupos funcionais presentes em determinadas regiões do espectro, a partir de seus perfis característicos, permite a quantificação através de curvas analíticas (Rodríguez-Otero, Hermida, & Centeno, 1997).

Alguns estudos aplicaram a espectrometria de massa em combinação com HPLC para a separação em linha, detecção e estudo da composição das proteínas de leite de cabra e de ovelha. Estas metodologias permitiram caracterizar cada um dos tipos de leite (Velo, Teixeira, Ferreira, & Ferreira, 2002).

Recentemente, o desenvolvimento da espectroscopia de infravermelho permitiu a identificação de diferentes compostos do alimento, assim como sua quantificação, tendo a vantagem de ser um método rápido, podendo chegar a 400 amostras/h, com custo moderado de equipamentos, facilidade de preparação da amostra, podendo ser realizada muitas vezes no alimento íntegro ((Rodríguez-Otero, Hermida, & Centeno, 1997; Pappas et al., 2008). Este método analisa vários parâmetros ao mesmo tempo, podendo separar proteína (caseína e proteínas do soro), lipídios, lactose, cinzas, entre outros, além de verificar vários tipos de adulteração (Dias, Lobato, & Verruma-

Bernardi, 2009). González-Martin et al. (2007), utilizando a espectroscopia de infravermelho, analisaram o percentual de leite de vaca, ovelha e de cabra em queijos ao longo de seis meses de maturação, sendo possível detectá-los com segurança após este período, se mostrando uma alternativa no combate a adulteração de queijos maturados em comparação com HPLC que analisa com limite de 4 a 8 semanas de maturação.

#### 2.4 Métodos imunológicos

Os ensaios imunológicos são frequentemente utilizados na indústria alimentícia para detecção qualitativa e quantitativa de componentes alimentares e contaminantes. A sua aplicação na análise de alimentos tornou-se possível com o desenvolvimento, no início dos anos 70, de ensaios imunoenzimáticos, onde os marcadores radioativos foram substituídos por enzimas, eliminando os perigos associados com a técnica anterior. Além disso, a relativa simplicidade destes ensaios e sua elevada sensibilidade, devido à especificidade das reações antígeno-anticorpo dão a estes métodos um grande potencial na indústria alimentícia (Grappin & Ribadeau-Dumas, 1992).

Diversas técnicas para detecção de mistura entre leites baseadas na interação antígeno-anticorpo foram desenvolvidas e entre elas destaca-se o método ELISA, (Enzyme-Linked Immunosorbent assay ou Ensaio de Imunoabsorção ligado à enzima) que em comparação a outros, como a imunoprecipitação e a imunodifusão em gel, mostra-se mais viável devido a sua simplicidade, menor tempo de elaboração, alta sensibilidade e especificidade, e por fornecer resultados quantitativos (Dias, Lobato, & Verruma-Bernardi, 2009).

O teste ELISA detecta ou mede a concentração de uma proteína de interesse em uma amostra que pode conter muitas proteínas diferentes. Usa-se um anticorpo associado a um suporte, que se liga especificamente com a proteína alvo. Um segundo anticorpo conjugado a uma enzima gera um produto cuja cor é visível pela adição de um substrato específico, e é facilmente mensurável por uma curva padrão da proteína de interesse (López, Mallorquín, & Veja, 2003). Essas análises empregam mono ou policlonais anticorpos específicos que podem reagir com proteínas do soro, frações individuais de caseína e peptídeos fragmentos de caseínas. Em comparação com as caseínas, as proteínas do soro ( $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactalbumina, imunoglobulina G) são mais antigênicas e apresentam maior resistência à proteólise, podendo ser utilizadas como marcadores em análises de queijos maturados. Em contrapartida, as caseínas apresentam maior estabilidade a tratamentos térmicos, o que possibilita a utilização



destas em análises de produtos lácteos tratados pelo calor, como leite UHT e esterilizado (Veloso, Teixeira, Peres, Mendonça, & Ferreira, 2004).

Existem duas variações para o teste ELISA, segundo Asensio, González, García, e Martín (2008): o ELISA indireto, utilizando dois anticorpos, um específico ao antígeno e outro conjugado a uma enzima, sendo este o responsável pela reação enzimática que, quando presente, poderá ser observada e quantificada por diferentes técnicas. Na segunda forma mais utilizada, o ELISA sanduíche, o antígeno é colocado entre dois anticorpos, um de captura e outro de detecção, esse estará conjugado a uma enzima ou ao complexo enzima-anticorpo produzindo uma reação bioquímica que poderá ser analisada por técnicas como cromatografia, fluorescência e densitometria. Desse modo, os testes ELISA podem apresentar resultados de forma qualitativa e quantitativa, com limites de detecção de até 0,01% de mistura.

Novas estratégias, baseadas em ensaios imunoquímicos, vem ganhando destaque como alternativa para o controle de rotina das adulterações. Um teste imunocromatográfico rápido, baseado na detecção da imunoglobulina IgG bovina, foi desenvolvido para o diagnóstico qualitativo da adição de leite de vaca no leite de cabra, com limite de detecção de 0,5%-1% e obtenção do resultado em apenas 5-10 minutos. O teste pode ser usado com leite fresco, pasteurizado, integral ou desnatado, lactosoro e queijo produzido com leite pasteurizado. As imunoglobulinas resistem às condições de pasteurização padrão (72-75 °C por 15-20 segundos). Porém, tratamentos térmicos mais severos podem desnaturar a IgG bovina e produzir resultados falso negativos (Anonymous, 2003).

## 2.5 Métodos baseados em DNA

O leite proveniente de glândulas mamárias saudáveis apresenta certo número de células somáticas (100.000-500.000/ml para a vaca), formado predominantemente por leucócitos, sendo cerca de 2% constituído por células epiteliais. A técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction ou Reação em Cadeia da Polimerase) baseia-se na análise de DNA, amplificando fragmentos do DNA das células somáticas (Reale, Campanella, Mergiolli, & Pilla, 2008).

É possível extrair DNA do leite e de produtos lácteos processados, como o queijo, e utilizá-lo como substrato para amplificação em PCR. Nesta técnica são utilizados *primers* que codificam a sequência desejada do gene da caseína, sendo os fragmentos amplificados e separados por eletroforese, permitindo a identificação da

espécie correspondente. A detecção de leite de vaca no leite e queijos de cabra foi possível com base no tamanho dos fragmentos de gene das  $\beta$ -caseínas, sendo os de bovino 253 pb (pares de base) e os de caprino 247 pb (Veloso, Teixeira, Ferreira, & Ferreira, 2002).

A técnica de PCR foi utilizada para a detecção de leite de vaca no leite (Bania, Ugorski, Polanowski & Adamczyk, 2001) e queijos de cabra (Maudet & Taberlet 2001) com limite de detecção de 0,1%. López-Calleja et al. (2004), encontraram o mesmo limite de detecção tanto em amostras de leite cru, como também em amostras de leite pasteurizado e esterilizado. A vantagem das técnicas de DNA está na sua elevada sensibilidade e possibilidade de aplicação em amostras muito deterioradas.

### **3. Considerações finais**

A cromatografia, a eletroforese e os ensaios imunológicos têm sido as técnicas mais utilizadas para se avaliar a autenticidade do leite e derivados. O desenvolvimento de cromatografias rápidas, como HPLC, e da eletroforese capilar, abriu novas perspectivas para a diminuição dos tempos de análise. Porém, ainda são técnicas de pouca aplicabilidade na rotina.

Mais recentemente, com o PCR, têm-se obtido resultados precisos, devido à sua elevada sensibilidade, sendo muito eficaz em análises de produtos deteriorados. Já a espectroscopia, por permitir a determinação de vários parâmetros ao mesmo tempo, também tem se destacado. Todavia, ambos são métodos onerosos e que requerem capacitação técnica e estrutura laboratorial complexa.

Métodos do tipo ELISA são muito sensíveis e tem a vantagem de apresentar resultados quantitativos, o que é importante em análises de queijos. Já os ensaios imunoquímicos, como os testes imunocromatográficos, são bastante práticos, dispensando equipamento laboratorial sofisticado, e têm apresentado resultados extremamente rápidos e seguros, podendo ser utilizados em análises de rotina pelos laticínios.

## Referências

- Amigo, L., Ramos, M., Martin-Alvarez, P.J., & Barbosa, M. (1991). Effect of technology parameters on electrophoretic detection of cow's milk in ewe's milk cheeses. *Journal Dairy Science*, 74, 1482-90.
- Anonymous (2003). Immunochromatographic test to detect cow's milk in sheep or goat's milk. Technical Report No.: G-COM-IC.05. *ZEU-Immunotec*, Zaragoza, Spain.
- Asensio, L., González I., García, T., & Martín, R. (2008). Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Food Control*, 19, 1-8.
- Bania J., Ugorski M., Polanowski A., & Adamczyk, E. (2001). Application of polymerase chain reaction for detection of goats' milk adulteration by milk of cow. *Journal of Dairy Research*, 68, 333–336.
- Borková M., & Snáselová J. (2005). Possibilities of different animal milk detection in milk and dairy products – a review. *Czech Journal Food Science*, 23, 41-50.
- Chapaval, L. (2007). Práticas para assegurar a qualidade do leite dentro da fazenda. Revista Berro. Disponível em: [http://www.zebus.com.br/berro/noticias\\_ver.php?CdNotici=6](http://www.zebus.com.br/berro/noticias_ver.php?CdNotici=6) Acessado em: 8 jul. 2010.
- Commission Regulation (EC) No. 273/2008 of 5 March 2008 laying down detailed rules for the application of Council Regulation (EC) No 1255/1999 as regards methods for the analysis and quality evaluation of milk and milk products. [Official Journal of the European Union L 88 of 29.3.2008].
- Congresso Nacional, Lei nº 8078 de 11 de setembro de 1990 (Código de Defesa do Consumidor). Dispõe sobre a proteção do consumidor e dá outras providências. [Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 12.9.1990].
- Dennis, M.J. (1998). Recent developments in food authentication. *Analyst*, 123, 151-156.
- Dias, S.S., Lobato, V., & Verruma-Bernardi, M.R. (2009). Metodologias para identificar adulteração em queijos produzidos com leite de diferentes espécies de animais. *Rev Inst Adolfo Lutz*, 68, 327-333.
- Egito, A.S., Rosinha, G.M.S., Laguna, L.E., Miclo, L., Girardet, J.M., & Gaillard, J.L. (2006). Método eletroforético rápido para detecção da adulteração do leite caprino com leite bovino. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 58, 932-939.
- Ferreira I.M.P.L.V.O., & Caçote H. (2003). Detection and quantification of bovine, ovine and caprine milk percentages in protected denomination of origin cheeses by reversed-phase high-performance liquid chromatography of beta-lactoglobulins. *Journal of Chromatography A*, 1015, 111–118.

- Furtado, M.M. (1983). Detection of cow milk in goat milk by polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Dairy Science*, 66, 1822-1824.
- González- Martín, I., Hernández-Hierro, J.M., Morón - Sancho, R., Salvador-Esteban, J., Vivar-Quintana, A., & Revilla, I. (2007). Determination of the percentage of milk (cow's, ewe's and goat's) in cheese with different ripening times using near infrared spectroscopy technology and a remote reflectance fibre-optic probe. *Analytica Chimica Acta*, 604, 191.
- Grappin, R. E., & Ribadeau-Dumas, B. (1992). Analytical methods for milk proteins. *Advanced dairy chemistry - 1: Proteins*. London: Blackie Academic & Professional, 1-62.
- Instrução Normativa nº 37 de 2000. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite de Cabra. Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Leis. Decretos. 2000. Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/sda/dipoa/instnorm37\\_leitecabra.htm](http://www.agricultura.gov.br/sda/dipoa/instnorm37_leitecabra.htm)>. Acesso em: 21 fev. 2003.
- James, C.S. (1995). *Principles of techniques used in food analysis*. Analytical chemistry of foods (pp. 18-35). New York: Blackie Academic & Professional, (Chapter 3).
- Kaminarides, S.E., & Anifantakis, E.M. (1993). Comparative study of the separation of casein from bovine, ovine and caprine milks using HPLC. *J. Dairy Res.*, 60, 495-504.
- López, M., Mallorquín, P., & Vega, M. (2003). Tecnologías moleculares de trazabilidad alimentaria. Informe de Vigilancia Tecnológica. Fundación Española para el Desarrollo de la Investigación em Genómica y Proteómica/Fundación General de la Universidad Autónoma de Madrid. Spainfo, 78p.
- López-Calleja I., González I., Fajardo V., Rodríguez, M.A., Hernández, P.E., García, T., et al. (2004). Rapid detection of cows' milk in sheeps' and goats' milk by a species-specific polymerase chain reaction technique. *Journal of Dairy Science*, 87, 2839–2845.
- Mayer, H.K. (2005). Milk species identification in cheese varieties using electrophoretic, chromatographic and PCR techniques. *International Dairy Journal*, 15, 595-604.
- Maudet, C., & Taberlet, P. (2001). Detection of cows' milk in goats' cheeses inferred from mitochondrial DNA polymorphism. *Journal of Dairy Research*, 68, 229–235.
- Pappas, C.S., Tarantiles, P.A., Moschopoulou, E., Moatsou, G., Kandarakis, I. & Polissiou, M.G. (2008). Identification and differentiation of goat and sheep milk based on diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy (DRIFTS) using cluster analysis. *Food Chemistry*, 106, 1271-7.

- Pereira, D.B.C. (2003). Utilização de técnicas de eletroforese em gel de poliacrilamida na identificação da adição de leite de vaca ao leite de cabra. Dissertação (Pós-Graduação “Stricto Sensu” em Ciência de Alimentos – Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 136p.
- Prazeres, P.M. (1995). Cromatografia de proteínas em biotecnologia. *Soc. Portuguesa de Bioquímica*, Boletim de Biotecnologia, 52, 15-24.
- Ramos, M., & Juárez, M. (1985). Estado actual de los metodos analiticos existentes para detector mezclas de leche de vaca, oveja y cabra. *Revista Española de Lecheria*, 4, 5-12.
- Reale, S., Campanella, A., Mergiolli, A., & Pilla, F. (2008). A novel method for species identification in milk and milk-based products. *Journal of dairy Research*, 75, 107-12.
- Recio, I., Amigo, L., & López-Fandifio, R. (1997). Assessment of the quality of dairy products by capillary electrophoresis of milk proteins. *Journal of Chromatography B*, 697, 231–242.
- Resolução RDC n 259 de 20 de setembro de 2002. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Aprova o Regulamento técnico sobre rotulagem de alimentos embalados. [Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil. Brasília, DF,23.9.2002].
- Rodriguez-Otero, J.L., Hermida, M., & Centeno, J. (1997). Análisis of dairy products by near infrared spectroscopy: A review. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 45, 2815-9.
- Romero, C., Perez-Andújar, O., Olmedo, A., & Jiménez, S. (1996). Detection of cow's milk in ewe's or goat's milk by HPLC. *Chromatographia*, 42, 181–184.
- Silva, C.L.S.P. (2002). Eletroforese Bidimensional: Princípios e Aplicações. *Ciências Agrárias e Saúde*, 2, 74-8.
- Strange, E.D., Malin, E.L., Van Hekken, D.L., & Basch, J.J. (1992). Chromatographic and electrophoretic methods used for analysis of milk proteins. *Journal of Chromatography A*, 624, 81–102.
- Szijarto, L., & Van de Voort, F.R. (1983). Determination of added water and bovine Milk to caprine milk. *Journal of Dairy Science*, 66, 620-623.
- Veloso, A.C.A., Teixeira, N., Ferreira, I.M.P.L.V.O., & Ferreira, M.A. (2002a). Detecção de adulterações em produtos alimentares contendo leite e/ou proteínas lácteas. *Quim. Nova*, 25, 609-615.
- Veloso, A. C. A., Teixeira, N., & Ferreira, I. M. P. L. V. O. (2002b). Separation and quantification of the major casein fractions by reverse-phase high-performance liquid chromatography and urea–polyacrylamide gel electrophoresis. Detection of milk adulterations. *Journal of Chromatography A*, 967, 209–218.

Veloso, A. C. A., Teixeira, N., Peres, A. M., Mendonça, A., & Ferreira, I. M. P. L. V. O. (2004). Evaluation of cheese authenticity and proteolysis by HPLC and urea-polyacrylamide gel electrophoresis. *Food Chemistry*, 87, 289–295.

## **CAPÍTULO II**

### **Detecção da presença de leite bovino no leite caprino por imunocromatografia e ELISA**



## **Detecção da presença de leite bovino no leite caprino por imunocromatografia e ELISA**

Silva, R.V.S., Carvalho, M.G.X.\* , Melo, M.A., Azevedo, S.S., Nardelli, M.J.  
Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, 58700-970, Santa Cecília, Patos, Brasil

\*Autor para correspondência: Tel.: 083 3511.3000 – 3022. e-mail:  
gxavier@cstr.ufcg.edu.br

### **Resumo**

A crescente valorização do leite de cabra e a sua semelhança com leite de vaca têm induzido uma frequente ocorrência de adulteração pela adição do leite mais barato. O Estado da Paraíba tem se destacado como o maior produtor de leite de cabra do Brasil, o que ressalta a importância de se avaliar a autenticidade desse produto, já que não há metodologia validada para fiscalização no país. O objetivo deste trabalho foi detectar a presença de leite bovino no leite caprino entregue por produtores em mini-usinas da região utilizando técnicas de imunocromatografia e ELISA. Foram analisadas 184 amostras de leite de cabra, sendo 65 (35%) delas positivas na imunocromatografia e 68 (37%) no ELISA, e observou-se concordância entre os métodos. Concluiu-se que há necessidade urgente do controle de rotina no combate às adulterações no leite de cabra da região.

**Palavras-chave:** Adulteração, leite de cabra, ELISA, imunocromatografia

### **Abstract**

The growing appreciation of goat's milk and its similarity to cow's milk have induced a high incidence of goat's milk adulteration and its derivatives with cow's milk that is cheaper. The state of Paraíba has emerged as the largest goat's milk producer in Brazil, which highlights the importance of evaluating the authenticity of the product, since there is no validated methodology for monitoring in the country. The aim of this paper was to detect the presence of cow's milk in goat's milk in mini-mills of milk in the county using immunochromatography and ELISA techniques. We analyzed 184 samples of goat's milk, 65 (35%) of them were found to be positive in immunochromatography and 68 (37%) were positive in ELISA tests, and, thus, there was agreement between the tests. It was concluded that there is urgent need for routine monitoring to detect and combat adulteration in goat's milk in the semi-arid region.

**Keywords:** Adulteration, goat's milk, ELISA, immunochromatography

## 1. Introdução

A produção de leite de cabra e derivados vem ganhando impulso nos últimos tempos, não apenas devido às suas propriedades físico-químicas que lhe conferem alto valor nutritivo, comparado ao leite de vaca, mas também por apresentar vantagens em relação a este, como alta digestibilidade, baixo teor de colesterol, e, sobretudo, hipoalergenicidade, conferida pela menor concentração de  $\alpha$ 1-caseína (Bevilacqua et al 2001), sendo considerado um alimento funcional e recomendado, principalmente, para indivíduos que apresentam alergia ao leite de vaca (Park, 1994).

Por ser um produto alternativo e que agrega características nutracêuticas, o leite de cabra e derivados, principalmente o queijo e o iogurte, vêm apresentando boa perspectiva mercadológica. A crescente valorização do leite de cabra em relação ao leite de vaca, aliada à semelhança na composição geral de ambos, têm induzido uma frequente ocorrência de adulteração pela adição do leite mais barato, corroborada ainda por outros fatores, como a sazonalidade, descentralização e pequena produção, característicos do leite caprino. A ocorrência dessa fraude implica no abuso contra a economia e à saúde pública, constituindo uma preocupação em vários países. O controle deste tipo de adulteração requer a disponibilidade de métodos analíticos rápidos e seguros que permitam vigilância constante dos órgãos de fiscalização e que possam ser usados para controle de rotina do leite recebido pela indústria.

Nos últimos anos, foram desenvolvidos vários métodos analíticos para detecção de misturas de leite de diferentes espécies. Entre esses métodos destacam-se os baseados na análise das frações protéicas, dos quais os principais são os métodos cromatográficos, eletroforéticos e imunológicos (Borková, & Snášelová, 2005; Costa, Ravasco, Miranda, Duthoit, & Roseiro, 2008). Mais recentemente, a técnica de PCR (*Polimerase Chain Reaction*), ao tornar possível identificar um pequeno fragmento de DNA numa complexa mistura de moléculas, sendo aplicável também à análise de amostras deterioradas, tem contribuído para a detecção de adulterações em diferentes produtos alimentares, inclusive no leite e no queijo (Velo, Teixeira, Ferreira, & Ferreira, 2002; López-Calleja et al., 2007).

Técnicas cromatográficas, eletroforéticas e genéticas, devido à sua morosidade, complexidade e, muitas vezes, ao custo elevado apresentam pouca aplicabilidade na utilização em análises de rotina pelos laticínios (Asensio, González, García, & Martín, 2008; Colak, Aydin, Nazli, & Ergun, 2006). Como alternativa, os ensaios imunológicos

podem ser usados para reduzir o tempo e o custo dessas análises. Testes imunocromatográficos, por exemplo, detectam 0,5% de leite de vaca no leite de ovelha ou cabra, não requerem nenhuma habilidade técnica ou equipamento laboratorial e permitem um resultado rápido e seguro (Anonymous, 2003a; Colak et al., 2006;). Já o teste ELISA, além de apresentar elevada sensibilidade e especificidade tem a vantagem da quantificação, ao contrário de muitos métodos baseados em DNA, sendo esta uma qualidade atraente para ensaios utilizados em rotina (Anonymous, 2003b; Hurley, Coleman, Ireland, & Williams, 2006).

Na União Européia, utiliza-se como método de referência para detectar caseína bovina em queijos fabricados com leite caprino, ovino e bubalino a focalização isoelétrica da  $\gamma$ -caseína (EC regulation, No.213/2001)). No Brasil, tem-se observado a adulteração do leite caprino, principalmente, por adição de leite bovino, porém, até o momento, nenhum método oficial foi validado para detecção desta fraude (Egito et al., 2006).

Nos últimos anos, o estado da Paraíba tem se destacado no cenário nacional como maior produtor de leite de cabra do país, com 18.000 litros de leite/dia, o que tem contribuído para o seu desenvolvimento sócio-econômico. A maior parte desta produção tem como destino os programas governamentais de merenda escolar e de combate à desnutrição infantil, reconhecidamente a parcela da população mais susceptível a desenvolver alergia ao leite bovino (Junior, Medeiros, Monte, Costa, & Filho, 2008; Maria, 2001). Nesse sentido, torna-se imprescindível a necessidade de se avaliar e garantir a qualidade do leite de cabra produzido, principalmente quanto à sua autenticidade, considerando a falta de fiscalização e de pesquisas sobre a adulteração com leite bovino, além da crescente exigência por alimentos mais seguros.

Neste estudo, objetivou-se detectar a presença de leite bovino no leite caprino entregue em mini-usinas por produtores de leite de cabra do Estado da Paraíba. Para tanto, utilizou-se testes comerciais baseados em imunocromatografia e ELISA.

## 2. Material e Métodos

### 2.1 Amostragem e coleta

O cálculo da amostra foi efetuado considerando-se um nível de confiança de 95%, a possibilidade de detecção da mistura de 50% (referente à prevalência usada quando não se tem conhecimento da frequência do evento na população estudada) e um erro estatístico de 5%. Foram coletadas, ao todo, 354 (100%) amostras em dez mini-usinas de leite de cabra localizadas na região semi-árida do Estado da Paraíba. Desse universo, selecionaram-se de forma aleatória 184 (52%) amostras por sorteio de frações amostrais de cada mini-usina. Dois desses laticínios processavam, também, leite de vaca.

As alíquotas foram retiradas de baldes dos produtores, com leite individual ou de conjunto, no momento da recepção do mesmo na plataforma das usinas, utilizando-se recipientes plásticos de 1 ml sendo, posteriormente, acondicionadas em caixas isotérmicas com gelo para envio ao laboratório, onde permaneceram congeladas até o momento da análise. Cada amostra foi submetida a testes de imunocromatografia e ELISA, respectivamente, para detecção e quantificação da presença de leite de vaca.

### 2.2 Análises

Foram utilizados dois kits de diagnóstico fabricados pela empresa ZEU-Immunotec S.L.-Espanha, um imunocromatográfico qualitativo, denominado IC-Bovino, e um teste ELISA, que além de detectar a presença da mistura pode também quantificá-la, denominado RC-Bovino. Ambos são baseados na detecção da imunoglobulina IgG bovina presente em amostras de leite caprino adulteradas.

#### 2.2.1 Teste Imunocromatográfico (IC-Bovino)

Inicialmente as amostras foram analisadas pelo teste imunocromatográfico IC-Bovino. De acordo com as instruções do fabricante, retirou-se uma gota (25µl) de cada amostra do leite de cabra, colocando-as em tubos de ensaio e adicionando 05 (cinco) gotas (150µl) da solução tampão de diluição. Agitou-se ligeiramente e introduziu-se a fita reativa, deixando em contato com a amostra durante 5 a 10 minutos. Em seguida, o resultado foi interpretado como **negativo**, quando apareceu uma linha transversal de cor

azul na zona branca central da tira, ou **positivo** quando apareceu neste local duas linhas transversais, uma de cor azul e outra de cor vermelha (Fig. 1). Todas as 184 amostras foram submetidas, posteriormente, ao teste ELISA para confirmação da presença de leite bovino e sua quantificação.

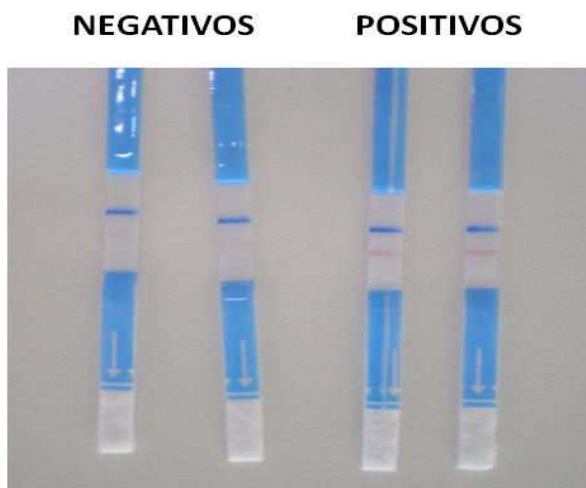


Fig. 1. Tiras reagentes do teste imunocromatográfico, apresentando resultado negativo à esquerda e positivo à direita.

### 2.2.2 Teste ELISA (RC-Bovino)

O segundo teste usado nesse estudo foi um ensaio ELISA do tipo sanduíche que, assim como o teste anterior, utiliza anticorpos específicos contra imunoglobulinas (IgG) bovinas, que impedem a reação cruzada com imunoglobulinas de cabra, evitando-se resultados falso-positivos (Anonymous, 2003b).

Cada kit utilizado era composto por: micro-placa de tiras individuais, quatro padrões de leite de vaca em leite de cabra (0%, 1%, 5%, 10%), solução de conjugado, conjugado de diluição, substrato e solução de parada. A realização dos testes ELISA procedeu-se também de acordo com as instruções do fabricante, com a leitura da absorbância feita por um espectrofotômetro de placas a um comprimento de onda de 450 nm (Fig. 2).

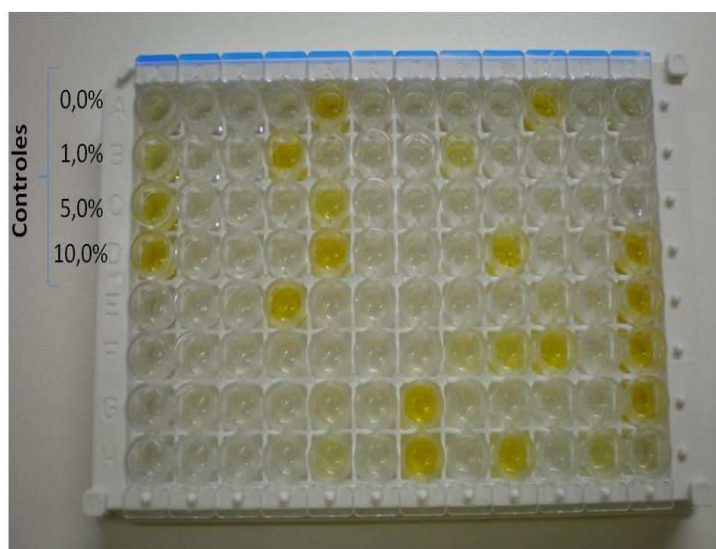


Fig. 2. Micro-placa do kit ELISA. A intensidade da reação em cada poço é proporcional à concentração de leite de vaca nas amostras (coluna 1 mostra a localização e concentração dos controles).

Para se calcular a porcentagem de mistura em cada amostra, representou-se graficamente a absorbância dos padrões (Eixo Y) em função da porcentagem de leite bovino em cada padrão (Eixo X), obtendo-se uma curva de calibração. Baseado nessa curva padrão determinou-se as concentrações de leite de vaca nas amostras de leite de cabra por meio de regressão linear.

### 2.3 Análise Estatística

Calculou-se as taxas de sensibilidade e especificidade de ambas as técnicas usadas nesse estudo e a sua comparação foi estabelecida pelo teste estatístico de Mc Nemar (Siegel & Castellan, 2006), adotando-se o nível de significância de 5% de probabilidade. O coeficiente de concordância dos resultados obtidos com as duas técnicas foi estimado utilizando-se o indicador Kappa (Thrusfield, 1995).

### 3. Resultados e Discussão

Os valores de absorbância obtidos no ELISA para os padrões 0%, 1%, 5% e 10% foram de 0,06; 0,281; 0,984 e 1,578, respectivamente. As amostras de leite de cabra que apresentaram absorbância igual ao padrão 0% (cut-off) foram consideradas puras, enquanto que aquelas com valores mais altos indicaram a presença de leite de vaca nas mesmas.

Conforme demonstrado na tabela 1, das 184 amostras de leite de cabra analisadas nesse estudo, 65 (35%) foram positivas para a presença de leite de vaca pelo teste imunocromatográfico, sendo 119 (65%) negativas no mesmo, que apresentou uma sensibilidade de 95,6% (87,6% - 99,1%) e especificidade de 100% (96,9% - 100%). Todas as amostras positivas no teste imunocromatográfico foram posteriormente confirmadas pelo teste ELISA. Este detectou adulteração em 68 (37%) e descartou a mistura em 116 (63%) do total de amostras analisadas, com sensibilidade de 100% (94,5% - 100%) e especificidade de 97,5% (92,8% - 99,5%).

Os valores de *Kappa* calculados para comparar as duas técnicas diagnósticas variaram de 0,965 a 1, indicando uma concordância de ótima a perfeita. Houve discordância em apenas três amostras, devido à maior sensibilidade do teste ELISA (RC-Bovino), que detecta até 0,01% de leite bovino em amostras de leite caprino, enquanto o teste imunocromatográfico (IC-Bovino) apresenta limite de detecção de 0,5%, de acordo com o laboratório ZEU-Immunotec. Porém, a análise estatística dos resultados discordantes não revelou diferença significativa ( $P = 0,248$ ). Portanto, ambos os testes podem ser utilizados com eficiência no diagnóstico qualitativo da adulteração do leite caprino com leite bovino.

Tabela 1. Comparação entre os resultados obtidos por Imunocromatografia e ELISA ( $p > 0,05$ ).

Imunocromatografia	ELISA		Total (%)
	Positivas (%)	Negativas (%)	
Positivas	65	0	65 (35%)
Negativas	3	116	119 (65%)
Total	68 (37%)	116 (63%)	184 (100%)

Das 68 amostras positivas no teste ELISA, 13 (7,1%) apresentaram concentrações de leite de vaca muito baixas, entre 0,01% e 1%. Esse resultado sugere a possibilidade de mistura accidental do leite de cabra com leite residual de vaca presente em latões utilizados para o armazenamento do leite de ambas as espécies, já que é comum na região a sua exploração conjunta, além disso, o fato de algumas usinas locais processarem os dois tipos de leite aumentaria a chance de isso ter ocorrido. Para Song et al. (2011), a adulteração menor que 2% ocorre sem fins lucrativos.

Observaram-se quatro amostras (2,2%) no intervalo entre 1% e 5%, treze (7,1%) entre 5% e 10% e a maioria das amostras positivas, 38 (20,7%), com porcentagem de

leite de vaca acima de 10%. Isso significa um enorme risco à saúde pública, principalmente com relação às crianças, principais consumidoras do leite caprino produzido na região, além de representar prejuízo econômico para o setor, comprometendo o desenvolvimento e a credibilidade dessa atividade.

Dado semelhante ao obtido neste trabalho foi encontrado por Rodrigues (2011), que utilizando uma técnica de PCR duplex, analisou amostras de leite de cabra também provenientes de produtores do Estado da Paraíba, encontrando 38% (24) delas adulteradas com leite bovino. O método usado por Rodrigues (2011) permitiu o diagnóstico qualitativo da mistura, com limite de detecção de 0,5%.

O teste ELISA, usado neste estudo, apresenta algumas vantagens quando comparado à PCR na análise de rotina: é mais rápido, confiável, barato, sensível e requer menos treinamento. Além disso, ao contrário de muitos métodos baseados em DNA, o teste ELISA tem a vantagem da quantificação, uma qualidade atraente para ensaios usados em análises de rotina de produtos lácteos (Hurley et al., 2006).

Com relação aos métodos imunocromatográficos, estes são capazes de detectar, de forma rápida e confiável, as adulterações do leite em exames de rotina e, pela sua praticidade, dispensam equipamento laboratorial e qualquer habilidade técnica. Cordeiro e Cordeiro (2005) testaram o kit imunocromatográfico IC-Bovino em amostras de leite de cabra fraudadas experimentalmente com a adição de 0,5%, 1% e 5% de leite bovino, e todas elas apresentaram resultados positivos. Colak et al. (2006), utilizando outro kit imunocromatográfico (R Biopharm-GmbH), investigaram 100 amostras de queijos de ovelha e encontraram leite de vaca em 48% delas. Stanciuc e Rapeanu (2010), usando a mesma técnica, testaram amostras de queijos de ovelha e de cabra encontrando, respectivamente, 67,3% e 79,7% delas adulteradas com leite bovino.

Os métodos imunológicos aplicados neste trabalho apresentam-se como alternativa a outras técnicas de detecção de misturas devido à sua simplicidade, menor tempo de elaboração e elevadas especificidade e sensibilidade. Por serem testes baseados na detecção de proteínas do soro (IgG bovinas), não apresentam eficácia no exame de leite e derivados submetidos à elevadas temperaturas, como leite UHT e esterilizado, devido a desnaturação dessas proteínas (Asensio et al., 2008). Porém, podem ser perfeitamente utilizados nos laticínios como testes de triagem da matéria-prima e de produtos pasteurizados.

Conclui-se que há necessidade urgente do controle de rotina para garantir a autenticidade do leite de cabra produzido no Estado da Paraíba, bem como no Brasil, já



que, até o momento, nenhum método oficial para detecção da mistura com leite bovino foi validado no país.

## Referências

- Anonymous (2003a). Immunochromatographic test to detect cow's milk in sheep or goat's milk. Technical Report No.: G-COM-IC.05. *ZEU-Inmunotec*, Zaragoza, Spain.
- Anonymous (2003b). ELISA assay for the cow's milk detection in goat and sheep's milk or cheese. Technical Report No.: G-COM-IC.05. *ZEU-Inmunotec*, Zaragoza, Spain.
- Asensio, L., González I., García, T., & Martín, R. (2008). Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Food Control*, 19, 1-8.
- Bevilacqua, C., Martin, P., Candalh, C., Fauquant, J., Piot, M., Roucayrol, A.M., Pilla, F., & Heyman, M. (2001). Goats' milk of defective alpha (s1)-casein genotype decreases intestinal and systemic sensitization to beta-lactoglobulin in guinea pigs. *Journal of Dairy Research*. 68, 217–227.
- Borková M., & Snáselová J. (2005). Possibilities of different animal milk detection in milk and dairy products – a review. *Czech Journal Food Science*, 23, 41-50.
- Colak, H., Aydin, A., Nazli, B., & Ergun, O. (2006). Detection of presence of cow's milk in sheep's cheeses by immunochromatography. *Food Control*, 17, 905–908.
- Cordeiro, A.G.P.C., & Cordeiro, P.R.C. (2005). Detecção de leite de vaca no leite de cabra usando imunocromatografia. *42º Reunião da Sociedade Brasileira de Zootecnia*. Goiânia, Brasil.
- Costa, N., Ravasco, F., Miranda, R., Duthoit, M., & Roseiro, L.B. (2008). Evaluation of a commercial ELISA method for the quantitative detection of goat and cow milk in ewe milk and cheese. *Small Ruminant Research*, 79, 73-79.
- EC Regulation No. 213/2001 of the Commission January 9th. (2001). Reference method for detection of cow's milk and cow's milk casein in cheese made from ewes, goats and buffalo milk or mixtures of ewes, goats and buffalo milk. *Official Journal of the European Commission*, L037, 51-60.
- Egito, A.S., Rosinha, G.M.S., Laguna, L.E., Miclo, L., Girardet, J.M., & Gaillard, J.L. (2006). Método eletroforético rápido para detecção da adulteração do leite caprino com leite bovino. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 58, 932-939.
- Hurley, I. P., Coleman, R. C., Ireland, H. E., & Williams, J. H. H. (2006). Use of sandwich IgG ELISA for the detection and quantification of adulteration of milk and soft cheese. *International Dairy Journal*, 16, 805-812.

- Junior, E.V.H., Medeiros, H.R., Monte, H.L.B.D., Costa, R.G., & Filho, E.C.P. (2008). Custo de produção de leite de cabra na região Nordeste. Associação Brasileira de Zootecnistas, *Zootec.* João Pessoa, Brasil.
- López-Calleja, I.M., Gonzalez, I., Fajardo, V., Hernandez, P.E., García, T., & Martín, R. (2007). Application of an indirect ELISA and a PCR technique for detection of cows' milk in sheep's and goats' milk cheese. *International Dairy Journal*, 17, 87–93.
- Maria, B. (2001). Cow's milk protein allergy and possible means for its prevention. *Nutrition*, 17, 642-651.
- Park, Y. (1994). Hypo-allergenic and therapeutic significance of goat milk. *Small Ruminant Research*, 14, 151-159.
- Pizzano R., Nicolai M.A., Padovano P., Ferranti P., Barone F., Addeo F. (2000). Immunochemical evaluation of bovine  $\beta$ -casein and its 1-28 phosphopeptide in cheese during ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4555–4560.
- Rodrigues, N.P.A. (2011). Utilização da Reação em Cadeia da Polimerase para detecção de leite bovino em leite caprino. *Dissertação (Pós-Graduação “Stricto Sensu” em Ciências da Nutrição – Universidade Federal da Paraíba)*. João Pessoa, Brasil. 46p.
- Siegel, S., & Castellan J.N.J. (2006). Estatística não-paramétrica para as ciências do comportamento. (2ª ed.) Porto Alegre: *Artmed*, 448p.
- Song, H., Xue, H., & Han, Y. (2011). Detection of cow's milk in Shaanxi goat's milk with an ELISA assay. *Food Control*, 22, 883-887.
- Stanciuc, N., Rapeanu, G. (2010). Identification of adulterated sheep and goat cheeses marketed in Romania by immunocromatographic assay. *Food and agricultural immunology*, 21, 157-164.
- Thrusfield, M. (1995). Veterinary epidemiology. (2ª ed.) Cambridge: *Blackwell Science*, 479p.
- Veloso, A.C.A., Teixeira, N., Ferreira, I.M.P.L.V.O., & Ferreira, M.A. (2002a). Detecção de adulterações em produtos alimentares contendo leite e/ou proteínas lácteas. *Quimica Nova*, 25, 609-615.