

LÍLIAN VIANA TEIXEIRA

**IDENTIFICAÇÃO ESPÉCIE-ESPECÍFICA E DE PUREZA EM PRODUTOS DE
ORIGEM BUBALINA POR MEIO DE TÉCNICAS MOLECULARES**

Tese apresentada à Escola de Veterinária da UFMG,
como requisito para obtenção do grau de Doutora
em Zootecnia.

Área de concentração: genética e melhoramento
animal

Orientadora: prof^a. Denise Aparecida Andrade de
Oliveira

**Belo Horizonte – MG
Escola de Veterinária – UFMG
Março de 2009**

T266i Teixeira, Lílían Viana, 1977-
Identificação espécie-específica e de pureza em produtos de origem bubalina por meio de técnicas moleculares / Lílían Viana Teixeira. – 2009.
44 p. : il.

Orientadora: Denise Aparecida Andrade de Oliveira
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Alimentos de origem animal – Análise – Teses. 2. Alimentos de origem animal – Inspeção – Teses. 3. Reação em cadeia de polimerase – Teses. I. Oliveira, Denise Aparecida Andrade de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 664.07

Tese defendida e aprovada em 09/03/2009, pela Comissão Examinadora constituída por:



Profa. Denise Aparecida Andrade de Oliveira



Dr. Eduardo Geraldo Alves Coelho



Dr. Miguel Hourí Neto



Profa. Ângela Maria Quintão Lana



Dr. Marcelo Yukio Kuabara

“A sabedoria não nos é dada. É preciso descobri-la por nós mesmos, depois de uma viagem que ninguém nos pode poupar ou fazer por nós”.

Marcel Proust

Dedico este trabalho à minha família: meus pais, Mary Miranda Viana e José Eustáquio Teixeira de Abreu, meu irmão, Leandro, e meus tios; que são o esteio da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À toda minha família: meus pais, Mary Miranda Viana e José Eustáquio Teixeira de Abreu, meu irmão, Leandro, meus avós (*in memoriam*) meus tios e primos queridos. Obrigada por tudo que sou e tenho.

Aos grandes amigos: Gyanini Parzanini, Janaína de Pina e família, Liz Adhara (*in memoriam*), Shara Regina, Vanessa Aglaê, Kátia Guimarães, Loreane de Ana, Sílvia Kanadi, Cristiane Vital, Liliane Miranda, Fabrícia Lima, Camila Valgas, Olívia Didier, Paula Cambraia, Daniela Resende, Ana Caldeira, Frederico Queiroz e Marília Rubino.

À professora e orientadora Denise Aparecida Andrade de Oliveira, pela orientação e por acreditar em meu trabalho em um momento crucial de minha vida.

Aos doutores e amigos Cláudia Salviano Teixeira e Ivan Barbosa Machado Sampaio pela co-orientação.

À Universidad Nacional de La Plata (UNLP), em especial Diogo e Giovambattista, pelo estágio e auxílio no desenvolvimento do experimento.

Ao Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno (IZSM), sezione Salerno, em especial à Serena Astarita, pelo estágio.

Aos doutores Miguel H Neto, Eduardo G Alves Coelho, Ângela L Quintão, Marcelo Y Kuabara e Denise A A de Oliveira por participarem da minha banca de defesa.

À Associação Mineira de Bubalinocutores (AMB), em especial ao Sr. Elcio Reis e Dr. Eduardo Bastianetto pelo apoio à pesquisa.

À CAPES, ao CNPq (INCT projeto 573899/2008-8) e à FEP/MVZ pelo apoio financeiro.

Aos colegas de laboratório Cláudia, Daniela, Juliana, Sandra, Daniel, Arno, Renatinha, Bruna, Eduardo, Ângelo, Henrique, Denise, Marcelo e Ronaldo, pelo apoio e convívio diário, que tornou esse trabalho uma maravilhosa experiência de vida.

À Cláudia Teixeira, Juliana Nobre e Renata Pina que me auxiliaram na execução do experimento.

Aos professores e funcionários do departamento de zootecnia e da FEP/MVZ, em especial à Heloisa, ao César Alexandre Borges Rocha e ao Paulo César dos Santos.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho

LISTA DE ABREVIACÃO

UFC – unidades formadoras de colônias
CCS – contagem de células somáticas
NaCl – cloreto de sódio
°C – graus Celsius
°D – graus Dornic
pH- potencial hidrogenionico
CPATU – Unidade Embrapa Amazônia Oriental
CBT - contagem bacteriana total
CPP - contagem padrão em placa
PCR – polymerase chain reaction (reação em cadeia da polimerase)
dNTP – dinucleotídeo trifosfato (2 deoxynucleoside 5-triphosphate)
RFLP – restriction fragment length polymorphism (polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição)
nm - nanometro
pb – pares de base
μL – microlitro
DNA – Desoxiribo Nucleic Acid (Ácido desoxidorribonucléico)
GuSCN - tiocianato de guanidina
BSE - Bovine Spongiform Encefalopathy – Encefalopatia espongiforme bovina
RIISPOA – Regulação da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal

SUMÁRIO

	RESUMO.....	9
	ABSTRACT.....	9
	INTRODUÇÃO GERAL.....	9
Capítulo 1	REVISÃO DE LITERATURA: O AGRONEGÓCIO DE CARNE E DE LEITE DE BÚFALOS NO BRASIL	11
	Introdução.....	11
	Situação mundial.....	11
	Situação no Brasil.....	12
	Comércio internacional.....	13
	O leite de búfala e seus derivados.....	13
	A importância da qualidade do leite na produção do queijo de búfala.....	14
	Os queijos de origem italiana: a mozzarella e a ricotta.....	16
	Outros queijos	17
	Outros lácteos	17
	A carne de búfalo <i>versus</i> a carne bovina.....	18
	Aspectos econômicos do mercado cárneo.....	21
	Referências	22
Capítulo 2	IDENTIFICAÇÃO ESPÉCIE-ESPECÍFICA EM CARNE VERMELHA E DERIVADOS CÁRNEOS PELA TÉCNICA PCR-RFLP	24
	Resumo.....	25
	Abstract.....	25
	Introdução.....	25
	Material e métodos.....	26
	<i>Amostras e extração de DNA.....</i>	26
	<i>Amplificação por PCR.....</i>	27
	<i>Análise do RFLP dos produtos de PCR.....</i>	27
	Resultados e discussão.....	28
	Conclusões.....	29
	Referências	30
Capítulo 3	EXTRAÇÃO DE DNA E AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO ESPÉCIE-ESPECÍFICA DE QUEIJOS	31
	Resumo.....	32
	Abstract.....	32
	Introdução.....	32
	Material e métodos.....	33
	<i>Amostras e extração de DNA.....</i>	33
	<i>Amplificação por PCR.....</i>	34
	<i>Análise do RFLP dos produtos de PCR</i>	34
	Resultados e discussão.....	34
	Conclusões.....	37
	Referências.....	37
	CONCLUSÕES GERAIS.....	39
	ANEXOS.....	41
	1- Regulamento do Selo de Pureza.....	41
	2- Referências de artigos publicados durante este trabalho.....	43

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1	Tabela 1. Rendimento industrial de leite de búfala e vaca	14
	Tabela 2. Resultado da análise da composição físico-química e microbiológica do leite de búfala oriunda de oito propriedades diferentes em Junho de 2005.....	15
	Tabela 3. Composição de carcaça de bovinos e búfalos.....	19
	Tabela 4. Composição comparativa entre carnes de búfalo e bovina.....	20
	Tabela 5. Composição físico-química em carnes de diferentes espécies.....	20
	Tabela 6. Composição de minerais em carnes de diferentes espécies.....	20
	Tabela 7. Composição centesimal, Colesterol e Energia fornecida por cortes e carnes cozidas de diferentes espécies.	21
Capítulo 2	Tabela1: Resultados dos testes com amostras de carne bubalina e bovina após a digestão com enzimas de restrição <i>HinfI</i> e <i>TaqI</i> , em ensaio realizado na EV/UFMG em 2007.	29
	Tabela2: Resultados dos testes em fraudes controladas de carne bovina misturada à carne bubalina, após a digestão com enzimas de restrição <i>HinfI</i> e <i>TaqI</i> , em ensaio realizado na EV/UFMG em 2007.	29
Capítulo 3	Tabela 1: Resultados da comparação das metodologias de extração de DNA em queijos, em ensaio realizado na EV/UFMG em 2008.	35
	Tabela 2- Resultados dos testes com amostras de queijo comerciais rotulados como fabricados com leite de búfala ou de vaca, em ensaio realizado na EV/UFMG em 2008.	37

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2	Figura 1: Gel de poliacrilamida a 8% corado com prata. Produto de restrição enzimática com <i>TaqI</i> e <i>HinfI</i> em amostras 1 a 5 (5% de carne de boi misturada à carne de búfalo).	29
Capítulo 3	Figura 1: gel de poliacrilamida em 8% corado com prata, em ensaio realizado na EV/UFMG em 2008.	36

RESUMO

A pesquisa realizada no laboratório de genética da Escola de Veterinária da UFMG teve como objetivos a avaliação de técnicas e a implementação de procedimentos laboratoriais que permitissem certificar a autenticidade de produtos oriundos de búfalos (*Bubalus bubalis*), bem como a detecção de adição não declarada de material bovino, utilizando métodos de biologia molecular. Por meio do teste de *qui-quadrado*, foi possível comparar diferentes formas de extração de DNA de produtos alimentícios, além de testar a efetividade da técnica de PCR-RFLP (reação em cadeia da polimerase - polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição). Os resultados mostraram que a técnica pode ser estendida para outras espécies, sendo viável para aplicação na rotina laboratorial e para inspeção da autenticidade de alimentos de origem animal

ABSTRACT

The research conducted at the UFMG genetics laboratory seeks the implementation of product authenticity test originating from buffalo (*Bubalus bubalis*) and addition detection not-declared of bovine material based on molecular biology. For the performance of this study, it was used the chi-square statistical test comparing different forms of DNA extraction from food products, in addition to testing the effectiveness of PCR-RFLP technique (polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism), which presents very high specificity and good sensibility. This technique can also be extended for other species and it is viable for application in the laboratorial routine and it is indicated for inspection of the authenticity of animal foods origin.

INTRODUÇÃO GERAL

A qualidade dos produtos alimentícios inclui a autenticidade do alimento, sendo um importante conceito para os consumidores modernos, resultando em crescente pressão nas políticas governamentais e diferentes níveis de proteção da cadeia de produção de alimentos. Por exemplo, inspetores de alimentos verificam a exatidão dos rótulos dos produtos alimentícios por razões econômicas (a substituição fraudulenta de produtos mais caros por produtos mais baratos), religiosas ou de saúde. Para a detecção de ingredientes animais nos alimentos e a identificação de sua origem (espécie), são necessárias ferramentas adequadas para esta análise (Verkaar et al, 2002; Lopez-Andreo et al, 2005).

A técnica da PCR (*polymerase chain reaction* ou reação em cadeia da polimerase) oferece a possibilidade de detectar ingredientes animais em alimentos e identificar de que espécies são derivados (Partis et al, 2000). Este método não é eficaz apenas em carne crua, mas também em produtos fermentados, cozidos ou autoclavados (Gouli et al, 1999).

Em relação à carne de búfalos, este é um mercado crescente no Brasil e já consolidado em várias partes do mundo. A taxa de crescimento do rebanho bubalino no país é bem superior à do rebanho bovino. As qualidades nutricional e sensorial da carne bubalina é considerada por alguns autores superior à bovina (Lira et al, 2003; Rodrigues e Andrade, 2004; Merle et al, 2004), sendo que ambas apresentam um

rendimento de carcaça semelhante (Oliveira, 2005). Uma alternativa para se otimizar o rendimento de carcaça é a produção de derivados elaborados a partir de carne mecanicamente separada, como o hambúrguer. Contudo, a garantia ao consumidor de que o produto é realmente derivado exclusivamente de carne bubalina, só será possível com a certificação do produto por meio de um selo de garantia (Documento de Origem Comprovada), obtido após análise laboratorial acurada (O búfalo, 1991; Jorge, 2001; Oliveira, 2005). Atualmente, a Itália, dentro do programa de valorização da espécie bubalina, trabalha na identificação de marcadores moleculares para comprovação de autenticidade de produtos cárneos derivados de búfalos (Paleari et al, 1997; Chianese, 2007), que receberam um selo IGP (Indicação Geográfica Protegida).

A mozzarella de búfalo é um típico queijo Italiano dotado da certificação de PDO (produto com denominação de origem) européia com a designação 'Mozzarella Búfala Campana' (Comissão Regulamento 1107/96/EC). Vislumbrando uma expansão para o mercado internacional e inspirado pelo governo italiano, o Brasil instituiu o “Selo de Pureza” para produtos lácteos derivados de búfala. Conforme o “Art. 1º do regulamento, fica instituído, no âmbito da Associação Brasileira de Criadores de Búfalos, (ABCB) o “Selo de Pureza” (Selo), cuja utilização será regida por este regulamento, sendo exclusiva dos respectivos associados, mediante assinatura e registro do ‘Termo de Autorização e Compromisso’” (anexo 4). Para ter o “Selo de Pureza” na embalagem, o produtor deve documentar na garantia de fabricação a utilização apenas do leite de búfala, e o produto deve passar por testes (Selo de..., 2004), atualmente realizados apenas pelo Departamento de Física e Biofísica do Instituto de Biociências da UNESP Botucatu, onde se aplica a técnica de eletroforese.

O objetivo deste trabalho foi verificar a sensibilidade, especificidade e aplicabilidade de técnicas de biologia molecular em rotina laboratorial, para identificação espécie-específica de produtos alimentícios produzidos a partir de bovídeos, como ferramenta auxiliar para a inspeção de produtos de origem animal.

Referências

- CHIANESE, L. *Conservazione e trasformazione dei prodotti di origine animale: carne e derivati*, 2005. Disponível em: <http://www.agraria.unina.it/Ricerca/vetrina/ScienzeTecAgroAl/CTPA/TotCTPA.htm>. Acessado em 25 nov 2007.
- GOULI, Z; Mingguang, Z; Zhijiang, Z; Hongsheg, O; Qiang, L. Establishment and application of a polymerase chain reaction for the identification of beef. *Meat Sci.* v.51, p.233-236, 1999.
- JORGE, A M. *Produção e qualidade da carne bubalina*. Anais do II Simpósio Paulista de Bubalinocultura. Pirassununga-SP, 2001.
- LIRA, G M; Mancini-Filho, J; Torres, R P; Oliveira, A C; Vasconcelos, A M A; Omena, C M B; Almeida, M C S. Composição centesimal, valor calórico, teor de colesterol e perfil de ácidos graxos da carne de búfalo (*Bubalus bubalis*) da cidade de São Luiz do Quitunde-AL. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*; 64(1):31-38, 2005.
- LOPEZ-ANDREO, M; Lugo, L; Garrido-Pertierra, A; Prieto, M I; Puyet, A. Identification and quantification of species in complex DNA mixtures by real-time polymerase chain reaction. *Analytical Biochem*, v.339, p.73-82, 2005.
- MERLE S., Sencleer J., Rodas-Gonzalez A., Gonzalez J., Mansutti D. , Huerta-Leidenz N. Comparación de machos enteros búfalos de

agua (*Bubalus bubalis*) VS vacunos acebuados en características al sacrificio, de la canal, rendimiento carnicero y palatabilidad del *longissimus*. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* 12(3): 112-120, 2004.

O BÚFALO. Brasília:Ministério da Agricultura/São Paulo: Associação Brasileira de Criadores de Búfalos, 1991. XIII+320p. (FAO. Série Produção Animal e Saúde, 4).

OLIVEIRA, AL. Búfalos: produção, qualidade de carcaça e de carne. Alguns aspectos quantitativos, qualitativos e nutricionais. *Revista Brasileira Reprodução Animal*, v.29, n.2, p.122-134, abril/jun. 2005. Disponível em www.cbra.org.br 134.

PALEARI, M.A; Camisasca, S.; Bereta, G.; Renon, P.; Tessuto, L.; Benedetti, G.; Bertolo, G. Comparison of the physico-chemical characteristics of buffalo meat and bovine meat. *Fleischwirtschaft International. Beef Quality*, n.6, p.11-13, 1997.

PARTIS, L; Croan, S; Guo, Z; Clark, T; Coldham, T; Murby, J. Evaluation of a DNA fingerprinting method for determining the species origin of meats. *Meat Sci*, v.54, p.369-376, 2000.

RODRIGUES V C, Andrade I F. Características Físico-Químicas da Carne de Bubalinos e de Bovinos Castrados e Inteiros R. Bras. Zootec., v.33(Supl. 1), n.6, p.1839-1849, 2004.

VERKAAR, E.L.C.; Nijman, I.J.; Boutaga, K., Lenstra, J. A. Differentiation of cattle species in beef by PCR-RFLP of mitochondrial and satellite DNA. *Meat Sci*. v.60, p.365-369, 2002.

SELO DE PUREZA DIFERENCIA MOZARELA FEITA DE LEITE DE BÚFALA de. Folha Online. São Paulo, 11 jul. 2002. Disponibilidade e acesso: <<http://www1.folha.uol.com.br/folha/equi>

librio/ noticias/ult263u1373.shtml> acessado em 15 jul. 2004.

Capítulo 1

REVISÃO DE LITERATURA: O AGRONEGÓCIO DE CARNE E DE LEITE DE BÚFALOS NO BRASIL

Introdução

Os búfalos (*Bubalus bubalis*) tiveram sua origem na Ásia e provavelmente foram domesticados no quarto milênio aC. Atualmente são reconhecidas, dezoito raças de búfalos no mundo. No Brasil, apenas quatro raças são exploradas: Murrah, Jafarabadi, Mediterrâneo e Carabao. Os primeiros exemplares foram introduzidos oficialmente através da ilha de Marajó em 1895, dando início à formação do rebanho brasileiro. O búfalo encontra-se no país há pouco mais de cem anos, iniciando uma caminhada em um terreno onde o bovino já está estabelecido há quinhentos anos. Sua proporção, devido a este fato, é ainda pequena nas propriedades agropastoris do país. De maneira geral, a demanda por produtos derivados do leite e da carne do búfalo é crescente e a produção atual não atende ao mercado interno o que favorece investimentos no setor.

Situação Mundial

O búfalo, também chamado de búfalo de água (*water buffalo*) e búfalo de rio (*river buffalo*), atualmente é criado nos cinco continentes, propiciando, em todos eles, importante subsídio às populações aí existentes.

Nas regiões mais pobres, tais como Ásia e África, eles prestam-se às mais diversas funções, proporcionando-lhes, além de alimentos, trabalho, tração de veículos e de implementos para o cultivo do solo.

Colaboram na dieta alimentar fornecendo leite e carne, bem como couro, chifres e outros subprodutos, os quais se destinam ao vestuário, calçado, adornos e inúmeras outras utilidades. Nesses locais, onde os recursos são escassos, o búfalo é criado sob condições áridas e com pouca alimentação (Federacite et al., 1994; Marcantonio, 1998; Jorge, 2001; FAO, 2005).

Na Oceania a situação é semelhante à existente na Ásia. Em alguns locais o búfalo é criado extensivamente e em estado semi-selvagem, como na Austrália. Nesse país, os animais são usados para a produção de carne e sua exploração é feita em condições precárias, mas praticamente sem custo (Federacite et al, 1994).

No Continente Europeu, a criação da espécie oferece contornos completamente diversos dos até então citados. Nessa região lhes são destinadas áreas de difícil aproveitamento, onde se procura rusticidade e adaptabilidade. Sua produção, no entanto, é conseguida com elevada tecnologia e a obtenção de produtos de alta qualidade destina-se às populações de elevado poder aquisitivo. O leite e seus derivados, dentre os quais se destaca a mozzarella, constituem-se em produtos de maior destaque e predileção. Nos países desse continente, onde a Itália representa papel relevante, a carne não se mostra com importância maior, e geralmente provêm de bezerros de criatórios para produção de leite (Federacite et al, 1994; FAO, 2005; Chianese, 2007). Entretanto atualmente, a carne de búfalo e seus derivados fazem parte do projeto de valorização da espécie promovido pelo governo italiano.

Nas Américas, os bubalinos tiveram implantação mais recente e no século atual tem se desenvolvido com muita rapidez. A carne mostra-se importante e suas qualidades são destacadas. O leite também tem tido crescente exploração, com ênfase aos subprodutos cujas qualidades são universalmente reconhecidas. Dessa forma,

países como Venezuela, Peru, Argentina, Equador, Trinidad e Tobago e Estados Unidos tem atualmente explorações prósperas, contudo muito novas. O Brasil, com uma atividade criatória mais antiga, já tem uma situação bastante sólida, e começa a exportar tecnologia e material genético desta espécie (Federacite et al, 1994; Marcantonio, 1998; Jorge, 2001; FAO, 2005).

Situação no Brasil

A espécie bubalina cresceu de maneira relevante no Brasil no século XX, evoluindo de alguns animais que entraram no país por volta de 1870, para os atuais 1.140.000 (IBGE, 2008). Este rebanho está crescendo em diversas regiões aonde as circunstâncias vinham antes dificultando a produção da pecuária bovina.

A região Norte, com 705.000 animais (IBGE, 2008), de clima quente e úmido, onde essa espécie tem sido uma opção de exploração pecuária, abriga atualmente o maior rebanho de búfalos em nosso país. A região Nordeste, com 110.000 animais, já apresenta uma situação diversa. A região apresenta temperaturas altas, baixa umidade e é predominantemente seca. Do calor e da seca resultam graves restrições ao desenvolvimento da vegetação, fato que gera pobreza de pastagens e carência alimentar de grandes proporções. O búfalo cresce baseado nessas dificuldades, colocando-se como alternativa para a produção animal que pretende se estabelecer nessa região (Federacite et al, 1994).

As regiões Centro-Oeste, com 65.000, e a Sudeste com 110.000 são as mais ricas e férteis do país, onde prosperam as raças zebuínas, algumas raças européias especializadas, além de seus cruzamentos, os quais se desenvolvem nas diversas áreas dependendo das condições e da capacidade de adaptação de cada uma delas (Federacite et al, 1994; IBGE, 2008).

A região Sul, com 150.000 búfalos, tem sido o local onde a pecuária bovina de corte é mais conhecida e expressiva. No entanto, é aí que rebanho bubalino mais cresce, apesar de muitos criarem o bovino, que nesse ambiente apresenta algumas limitações ao seu crescimento. O búfalo, mais rústico, chega a produzir até o dobro do bovino em situações idênticas nestas pastagens. Isso pode ser explicado, tendo em vista sua origem, em ambientes adversos no médio e extremo oriente. (Federacite et al, 1994; IBGE, 2008).

Devido à sua boa adaptabilidade, em geral o búfalo apresenta boa fecundidade, as fêmeas bubalinas têm a característica de concentrarem osaios numa época bem restrita do ano, isto é, naquela que lhes é mais favorável. Suspeita-se que a estacionalidade reprodutiva das búfalas é devida a uma queda na atividade reprodutiva decorrente da alta temperatura ambiente ou ao binômio temperatura-umidade dos trópicos e subtropicos, durante os meses de verão. As coberturas se concentram nos meses de abril a junho, os nascimentos nos meses de fevereiro a abril e, conseqüentemente, a desmama é feita no início do ciclo de boas pastagens, favorecendo o crescimento dos animais até aos 12 meses de idade e preparando-os para enfrentar o estresse das secas (O búfalo, 1991; Federacite, 1994).

O crescimento é outro fator fundamental para a produção de carne. O búfalo é rústico, e cresce bem mesmo em regiões com situações adversas.

Comércio Internacional

O potencial de comercialização para produtos originários do búfalo mostra-se muito promissor. A demanda de produtos lácteos, tais como a mozzarella, evidenciam alta tanto na Itália como nos Estados Unidos. O primeiro, apesar de ter alta produção, tem potencial no mercado bem maior do que aquele que atualmente abastece com sua

produção nacional, sendo por isso possível consumidora desses produtos, caso eles venham a ser disponíveis no mercado internacional. Os Estados Unidos atualmente não apresentam produção própria, mas são consumidores, importando da Venezuela. Seu potencial de consumo, no entanto, é bem maior que o atual. Outros países como o Brasil consomem internamente sua produção tendo, contudo, um mercado interno ainda pouco explorado e, portanto, bastante amplo antes que existam excedentes exportáveis. Grande número de países onde estes produtos são pouco conhecidos podem ainda criar mercados potenciais a serem explorados (O búfalo, 1991; Federacite, 1994; FAO, 2005).

A carne por sua vez é intensamente aproveitada no continente americano, ocorrendo também produção na Austrália e consumo na Europa, onde destacam-se qualidades como maciez, sabor, valor nutricional e baixo índice de colesterol. Nos mercados, tanto brasileiro como americano, sempre que esta é oferecida com boa apresentação e ênfase para suas qualidades, é bem aceita pelos consumidores. A carne de búfalo australiano é exportada para a Europa, que não tem conseguido suprir a demanda existente (O búfalo, 1991; Federacite, 1994).

Além do leite e da carne e seus respectivos derivados, o couro, trabalhado adequadamente, é muito apreciado pela sua plasticidade para a confecção de certos tipos de calçados e de móveis (O búfalo, 1991; Federacite, 1994).

O leite de búfala

A produção de leite de búfala gira em torno de 10,5% de todo o leite produzido no mundo. Desse montante, 92,12% são produzidos na Índia, China e Paquistão, que possuem aproximadamente 78% da população mundial de búfalos. O continente asiático é responsável por 96% da produção mundial de leite de búfala, com destaque

para a Índia, onde 55% do leite produzido são de búfala (Silva *et al.*, 2003).

O leite de búfala é cerca de 40-50% mais produtivo na elaboração de derivados (queijos, iogurte, doce de leite, etc.) que o leite bovino (Tab. 1). Por conter um teor de gordura maior, são necessários apenas 14 litros de leite de búfala para produzir 1 kg de manteiga, ao passo que para obter a mesma quantidade de manteiga com leite de vaca bovina, são necessários mais de 20 litros. Da mesma forma, com apenas 5,0 litros de leite de búfala pode-se obter 1 kg de queijo Mozzarella de alta qualidade (Silva *et al.*, 2003). A FAO (2004) reconheceu a importância do leite da búfala devido à superioridade da composição química em relação ao de vaca.

Tabela 1. Rendimento industrial de leite de búfala e vaca.

Derivado	Volume de leite/quilo de produto		Rendimento comparado Búfala/Vaca (%)
	Búfala	Vaca	
Iogurte	1,20	2,0	40
Mozzarella	5,50	8,0-10,0	39
Provolone	7,43	8,0-10,0	20
Queijo Marajó	6,00	10,0-12,0	41
Doce de leite	2,56	3,5	29

Fonte: Adaptado de Silva *et al.*, 2003.

Características marcantes do leite de búfala são: a sua coloração totalmente branca, devido à ausência total de pigmentos carotenóides, o que também confere coloração branca a manteiga e ao queijo produzidos, e o sabor levemente adocicado. (Benevides, 1998; Bernardi et al, 2000; Mozzarella ..., 2004).

Físico-quimicamente, a composição do leite de búfala apresenta características próprias, que variam conforme o período da lactação, a raça e a alimentação, entre outros fatores. Mas, como linha geral, apresenta densidade entre 1,025 a 1,047 g/ml; pH entre 6,41 e 6,47; acidez entre 14 a 20 °D (que se deve ao elevado teor de proteínas, em especial a

caseína); crioscopia entre - 0,531 e - 0,548 °C; sólidos totais em torno de 15,64 - 17,95%, gordura variando entre 5,4 e 8%; proteína entre 3,6 e 5,26%; minerais entre 0,79 e 0,83 % (sendo até 25% deste o conteúdo de cálcio), segundo Furtado (1980), Kosikowski (1979), e Cunha Neto (2003). Amaral (2005), em estudo realizado na região do Alto São Francisco - Minas Gerais encontrou valores semelhantes (17,21% para sólidos totais, 6,85% para gordura, 4,19% para proteínas e 4,93% para lactose) que confirmam os dados anteriores. Relatou, ainda, a contagem de células somáticas nos rebanhos da região, que apresenta média de 24000 células/ml.

Microbiologicamente, a qualidade do leite de búfala está intimamente relacionada aos hábitos do animal e ao manejo de ordenha. Um fator de relevância é o comportamento do animal de imergir em coleções de água à procura de conforto térmico. Tal hábito dificulta a higienização do úbere da búfala. Cunha Neto (2003) cita a presença de microorganismos mesófilos no leite de búfala *in natura*, de acordo com a estação do ano, encontrando valores entre $1,3 \times 10^3$ a $5,0 \times 10^4$ UFC/ml no inverno, e $1,5 \times 10^5$ a $3,2 \times 10^7$ UFC/ml no verão. Uma alta contagem microbiológica, além apresentar risco potencial para a saúde pública, reduz a vida útil do leite, e resulta em perda na qualidade dos produtos derivados deste.

Importância da qualidade do leite na produção do queijo de búfala

A qualidade da matéria prima é essencial para a fabricação de um bom produto. Com os queijos feitos com leite de búfala não é diferente, pois um leite com baixas contagens microbiológicas e teores adequados dos constituintes físico-químicos garante características sensoriais adequadas, refletindo na maior aceitabilidade pelo consumidor, boa durabilidade do produto e, por fim, maior rendimento industrial.

O leite com alta contagem microbiológica altera a coagulação da massa e conseqüentemente a textura do queijo. Essa alteração na formação do queijo se reflete diretamente no rendimento da produção, que apresentará onerosa queda no rendimento. A durabilidade e as características organolépticas (como o sabor) do queijo também ficam prejudicados, fazendo com que o consumidor não seja fiel ao produto (Amante *et al.*, 2001). Ainda segundo o mesmo autor, a contagem total de bactérias no leite destinado à fabricação de Mozzarella deve estar entre $5,0 \times 10^3$ a $5,0 \times 10^5$ UFC/ml.

A contagem de células somáticas também interfere no processamento do queijo, e pode ser um bom indicativo da qualidade do leite.

Teramoccia (2001) verificou que a presença de até $2,0 \times 10^5$ células somáticas/ml no leite de búfala não interfere no processo de coagulação, e leites com mais de $4,0 \times 10^5$ células somáticas/ml não coagulam bem. Análises de leite de búfala de diferentes propriedades, realizadas no laboratório de análise da qualidade do leite da Escola de Veterinária da UFMG, demonstraram a grande variação na qualidade microbiológica do leite em uma mesma época do ano (Teixeira et al, 2005).

A variação na composição físico-química e microbiológica do leite observada na Tab. 2 ocorre em função de diferentes técnicas nutricionais do rebanho e do manejo das búfalas no momento da ordenha.

Tabela 2. Resultado da análise da composição físico-química e microbiológica do leite de búfala oriunda de oito propriedades diferentes em Junho de 2005

Amostra	Gordura	Proteína	Lactose	Sólidos Totais	CCS (x 1.000)	UFC (x 1.000)
1	6,20	3,82	5,03	15,97	185	138
2	6,42	3,74	4,97	16,01	76	138
3	5,83	3,58	5,06	15,37	85	816
4	5,94	3,77	5,02	15,65	16	1331
5	7,78	4,03	4,89	17,51	164	1480
6	5,79	3,4	5,1	15,71	343	1623
7	6,95	3,98	4,94	16,76	127	1946
8	7,9	3,6	4,76	16,95	73	4090

Fonte: Teixeira et al, 2005.

O leite destinado à fabricação de Mozzarella deve ser pasteurizado, não só por exigência legal, mas porque a teoria de que o processo de filagem em água quente equivaleria à pasteurização, é errônea. Durante o processo de filagem, bactérias, enzimas, etc., são protegidas pela caseína e pelos glóbulos de gordura, sendo que estes últimos possuem uma notável capacidade de isolamento térmico. Há comprovação científica de que bactérias do gênero *Coli*, adicionadas no momento da coalhada, sobreviveram bem ao processo de filagem, no interior da massa. Se o leite não é devidamente pasteurizado antes da coagulação, a microbiota patogêna presente no leite tem tempo e temperatura

propícios para multiplicar-se. A temperatura de pasteurização de 72 °C durante 15 segundos é ideal para este tipo de queijo (Del Prato, 1998).

De acordo com o decreto-lei 54/97 (Legge..., 2005) que estabelece os padrões de contagem bacteriana total (CBT) do leite pasteurizado ou cru na Itália, desde dezembro de 1999 a CBT deve ser no máximo $5,0 \times 10^5$ /ml² para leite, produzido em propriedades livres de brucelose e tuberculose, que será usado cru na produção de queijo, e de até $1,5 \times 10^5$ /ml² para leite que será pasteurizado antes de ser processado. Assim como a lei 54/97, a Instrução

Normativa 51 - IN 51(Instrução..., 2005) estipula parâmetros de qualidade para o leite no Brasil. A IN 51 determina que a contagem bacteriana total (contagem padrão em placa – CPP) deve ser de $1,0 \times 10^6$, desde julho de 2005, para as regiões sul, sudeste e centro-oeste. Para as regiões norte e nordeste este parâmetro entrou em vigor em 2007. A IN 51 utilizará como valor de referência a contagem de $1,0 \times 10^5$ UFC/ml para leite individual e $3,0 \times 10^5$ UFC/ml para leite em conjunto, a partir de 2011 para as regiões sul, sudeste e centro-oeste e 2012 para o norte e nordeste. A contagem máxima de células somáticas (CCS) permitida atualmente é de $1,0 \times 10^6$ CS/ml. O valor máximo de $4,0 \times 10^5$ CS/ml passará a vigorar em 2011 para as regiões sul, sudeste e centro-oeste e 2012 para as demais.

Os queijos de origem italiana: a mozzarella e a ricotta

Dois dos principais queijos suaves e não maturados originários da Itália são a Mozzarella e a Ricotta. A Mozzarella é um tipo de queijo tradicionalmente feito a partir de leite bubalino integral, com alto teor de gordura, o que lhe confere paladar delicado. É um tipo de queijo fresco de massa filada, originário do sul da Itália (região de Campana), perto de Nápoles, no século XVI. A região da Campana hoje possui o selo de origem da autêntica Mozzarella.

A fabricação da Mozzarella é feita com a adição do fermento láctico, método tradicional de fabricação, ou ácidos orgânicos, metodologia recente, ao leite de búfala integral. Posteriormente são realizadas as seguintes etapas:

- adição do coalho e após a formação do coágulo
- corte da massa em grãos (3x3 cm)
- drenagem do soro.
- filagem, massa com pH entre 5,2 e 5,4, com água a 85 °C.

- molde e salga (opcional) da massa em solução a 2% de NaCl

A acidificação da massa é uma etapa muito importante e deve ser cuidadosamente controlada, pois a conversão da dicálcio-paracaseína em monocálcio-paracaseína, realizada pelo ácido láctico durante a exposição à alta temperatura da água, é que dará a elasticidade adequada ao queijo. A Mozzarella feita com leite de búfala que tenha, por exemplo, 3% de gordura, apresentará cerca de 18% de gordura, 53,6% de umidade, 22,1% de proteína total e 0,3% de lactose em sua composição (Kosikowski, 1979), ao passo que a Mozzarella produzida com leite de búfala integral apresenta umidade entre 55-60%; 23 a 27% de gordura e 19 a 20 % de proteína total (Del Prato, 1998).

Pedaços, fatias, tranças, tiras e as tradicionais bolas são as diferentes formas de comercialização da Mozzarella. Ela pode ser encontrada em líquido de conservação (que contém sal e ácido cítrico), em embalagem plástica a vácuo, ou com atmosfera modificada (com nitrogênio e dióxido de carbono), sendo que essas duas últimas apresentações aumentam a meia vida do produto (Kosikowski, 1979).

A Ricotta é um queijo popular no sul da Itália e pode ser feita de leite de vários mamíferos e também de frações do leite. A forma mais tradicional de fabricação é feita a partir da acidificação do soro de queijo. Porém, com a demanda do consumidor por um queijo mais suave e cremoso, a Ricotta passou a ser elaborada com adição de cerca de 10% leite integral ou parcialmente desnatado, e não mais somente de soro de queijo. Quando elaborada exclusivamente com o soro de queijo a Ricotta também é conhecida como ricottone. É um queijo fresco, não curado, macio e geralmente sem sal, de cor esbranquiçada, textura fina e sabor suave. Adicionalmente ao processo tradicional pode-se defumar e condimentar a Ricotta.

Seu processamento deve ser cuidadoso devido à complexidade do processo de precipitação e de sua massa frágil:

- aquecimento do soro de queijo a 70 °C
- adição de solução acidificante (ácido láctico ou acético) até pH 6,0 a 5,9
- aquecimento a 85 °C e retirada da fonte de calor
- aguardar a flutuação dos coágulos de proteínas e retirá-los suavemente

A flutuação depende de se atingir o pH ou acidez titulável ideal da massa. A Ricotta produzida somente com soro de queijo pode apresentar, em média, 0,5% de gordura, 82,5% de umidade, 11,3% de proteínas totais e 1,5% de lactose. Quando produzida com 3% de gordura, a Ricotta pode apresentar-se com 12,7% de gordura, 72,2% de umidade, 11,2% de proteínas totais e 3% de lactose (Kosikowski, 1979).

Outros queijos

Outro queijo tradicionalmente feito com leite de búfala é o saboroso Cheddar, fabricado na Índia (Kosikowski, 1979). Na Itália podemos encontrar o Caciocavallo, que tem este nome por assemelhar-se ao casco de cavalo, também feito com este leite.

Outro queijo mundialmente conhecido que pode ser feito utilizando-se leite de búfala é o provolone, pois seu processamento seria como uma continuação ao da Mozzarella, quando, após a salga, este queijo é maturado por cerca de 50 dias (quando o teor de gordura é alto) e defumado. Quando feito com leite de búfala, o provolone demanda mais tempo para sua maturação devido ao maior teor de gordura, se comparado ao de vaca. O provolone tem sabor picante e pode ser encontrado em diversos formatos e tamanhos. As atuais embalagens a vácuo evitam o excessivo ressecamento de sua superfície e aumentam a vida média deste produto (Kosikowski, 1979, Silva *et al.*, 2003).

A maioria dos demais queijos que conhecemos também pode ser produzida a partir do leite de búfala, como queijo frescal e requeijão (Yunes e Benedet, 2000). Estes produtos apresentam muito boa aceitabilidade e bom rendimento, o que pode ser comprovado no mercado nacional, inicialmente do norte do país e mais recentemente do sudeste. Encontramos até mesmo queijos originalmente desenvolvidos no Brasil utilizando-se o leite de búfala, como o CPATU (desenvolvido pela Embrapa), que é um queijo frescal, branco e macio, e o queijo Marajoara, que é branco, leve e cremoso (Silva *et al.*, 2003). Porém uma dificuldade que se encontra na indústria, para a utilização do leite de búfala, é a produção de queijos maturados, devido ao alto teor de gordura deste leite, necessitando um tempo maior de maturação do produto, ou padronização da gordura (Kosikowski, 1979).

Outros lácteos

Outros derivados lácteos também podem ser produzidos tendo como matéria-prima o leite de búfala, como doce de leite e manteiga. Este leite possibilita a formação de texturas mais firmes e cremosas, sem a necessidade da utilização de espessantes como o leite em pó, devido ao seu alto teor de gorduras, proteínas e à elevada retenção de água dessas últimas. É o caso da fabricação, por exemplo, de iogurtes e creme de leite (Benevides, 1998; Cunha Neto, 2003).

Os produtos fabricados com leite de búfala como matéria-prima, em especial os queijos, apresentam ótima qualidade sensorial e nutricional, devido ao seu maior teor de cálcio e vitamina A. O consumidor tem procurado os produtos de leite de búfala devido à sua maciez e paladar suave. Além disso, os proprietários de laticínios têm oferecido um preço diferenciado pelo leite da búfala, em função do excelente rendimento no seu processamento. O mercado, tanto interno quanto externo,

encontra-se em expansão, e o Brasil apresenta condições propícias para a criação de búfalas leiteiras.

A carne de búfalo *versus* a carne bovina

Por muitos séculos, os búfalos foram criados e mantidos para o trabalho e isso levou à evolução dos animais para um maior desenvolvimento muscular. A maior parte da carne de búfalo foi, e ainda é procedente de animais abatidos em emergência, ou no fim de uma profícua e produtiva vida de trabalho. Nessas condições a carne passa a ter qualidade sensorial pobre, e muitas vezes uma aparência pouco atrativa (O búfalo, 1991; Jorge, 2001; Oliveira, 2005) o que limita a inserção deste produto no mercado. Para o sucesso da produção da carne de búfalo e de sua aceitação no mercado consumidor, se faz urgentes programas modernos de produção, criação e engorda de búfalos visando a colocar ao alcance do público uma carne de animal jovem e de ótimo aspecto (O búfalo, 1991).

Não se pode mais ignorar a tendência mundial em manter a saúde, procurando consumir alimentos ricos em proteínas de alto valor, com baixos teores de colesterol e livres de resíduos químicos. Em trabalho pioneiro, realizado nos Estados Unidos, verifico-se que há um grande mercado emergente para a produção do hambúrguer *light* (Oliveira, 2005). Por outro lado, o rápido crescimento das populações no mundo incrementa a demanda alimentar sendo premente que se procure alternativas para a produção de proteína de uma forma mais racional e barata. Em 1990 a média de consumo de carne era de 12 kg/pessoa/ano na África sub-Saara, 18 kg/pessoa/ano na Ásia e 45 kg/pessoa por ano na América Latina. Em comparação, a taxa de consumo nos países desenvolvidos é de 76 kg/pessoa/ano. Pelo número de fatores que afetam as estimativas para demanda per capita de produtos cárneos, o cenário mostra uma tendência de aumento no consumo

destes produtos na África e na Ásia, tendo perspectiva de atingir 30 kg/ pessoa em 2025. Levando isso em consideração, a carne de búfalo tem um forte potencial para o incremento deste consumo (FAO 2005).

A produção de carne de búfalo tem alta possibilidade de crescimento e um nível mínimo de riscos advindos de pesticidas e drogas veterinárias, devido à sua resistência natural a diversos parasitas, quando comparado com a produção de carne bovina em países desenvolvidos. A carne de búfalo era inicialmente produzida na Ásia. A contribuição desta carne na produção mundial de carne é de 1,3 %. A Índia produz 1,43 milhões de toneladas de carne de búfalo anualmente e contribui com 36 % do total da produção de carne. A demanda pela carne de búfalo é alta, principalmente por seu conteúdo de gordura abaixo de 2% e por ser livre da Encefalopatia Espongiforme Bovina (FAO, 2005).

O Brasil, sendo um país de dimensões continentais, oferece regiões com as mais diferentes condições para a produção de animais para corte. O búfalo mostra seu valor em áreas alagadas, a exemplo da ilha de Marajó, onde sua criação se desenvolve de maneira intensa e bem sucedida. Mas também é criado no nordeste, sob clima árido, no sudeste e no sul onde o clima apresenta grandes variações (Jorge, 2001; Oliveira, 2005).

São características inerentes ao búfalo: longevidade, rusticidade, prolificidade, precocidade e adaptabilidade. É necessário entender que a espécie bubalina não veio para ocupar o espaço da bovina, ou concorrer com o mesmo na produção de carne. Veio, sim, como mais uma opção de aproveitamento de áreas não favoráveis ou menos indicadas à produção de bovinos (Federacite, 1994).

Crescente atenção vem sendo direcionada ao potencial de animais até agora pouco

explorados para a produção de carne. O búfalo é uma espécie que se mostra consideravelmente promissora. A população mundial de búfalos já alcança 1/9 da população bovina. Na bacia amazônica, eles estão aumentando numa taxa de 10% ao ano. A qualidade sensorial da carne é semelhante à do bovino, inclusive, pode ser preferida em algumas áreas. Apresentando menos gordura, a carne de búfalo está de acordo com as tendências atuais. O búfalo se desenvolve bem nos trópicos úmidos - uma área extensa na qual os bovinos sofrem muito (Lawrie, 2005; FAO, 2005).

Em relação aos búfalos, a qualidade e a quantidade de carne dependem de alguns fatores, sendo os mais importantes a espécie, o cruzamento, idade, alimentação, sistema de manejo e condições de melhoramento genético (FAO, 2005; Lawrie, 2005).

Os músculos bubalinos apresentam menor teor de gordura intramuscular (1,47 a 2,59%) do que a encontrada em bovinos

(2,77 a 4,47%). Em experimento com a carne de búfalo, verificou-se que a textura (cisalhamento) da carne bubalina apresentou índices superiores à bovina ($p < 0,01$), porém não houve relação significativa com o teor de colágeno. As perdas de peso por cozimento também não foram influenciadas pelos tipos de cortes e animais (Espírito Santo, 1996).

Os cortes em músculos de búfalos mais velhos demonstraram uma aparência mais grosseira que aquela de músculos de búfalos jovens, uma textura mais firme e uma coloração mais escura (O búfalo, 1991; Jorge, 2001).

Comparando-se com carcaças de carne bovina nobre, mais gordura acumula-se nas paredes do tórax e da cavidade abdominal dos búfalos (Tab 3), menos gordura entre os grupos musculares, e igualmente menos no interior dos músculos. Há também menos marmorização (O búfalo, 1991).

Tabela 3: Composição de carcaça de bovinos e búfalos

Idade em semanas	20		28		36		52		64	
	Bov.	Buf.	Bov.	Buf.	Bov.	Buf.	Bov.	Buf.	Bov.	Buf.
Peso de meia carcaça (kg)	43.7**	39.0	59.2***	50.7	71.7*	65.3	108.5**	97.5	125.0	117.3
Carne (%)	65.0**	67.6a	64.16**	66.36b	64.35	63.80C	62.34	61.41d	61.67	62.00d
Osso (%)	26.4**	24.9a	23.16	22.09b	21.38*	19.5C	19.48***	17.7d	20.20***	16.87d
Gordura total (%)	8.6	7.51d	12.68	11.55c	14.37*	16.70B	18.19*	21.02a	18.12**	21.13a
Outros tecidos (%)					0.91	0.99	0.86	0.92	1.17	1.22
Subcutâneo (%)					4.56***	7.28	5.20***	8.86	5.25***	9.41
Gordura do subcutâneo (%)					6.48	6.78	9.52	9.13	8.57	8.26
Gord. perineal (%)	1.9**	0.7	2.23***	0.87	2.42*	1.65	2.61	2.11	3.13**	2.23

(* $p \leq 5\%$, ** $p \leq 1\%$, *** $p \leq 0.1\%$ entre as espécies da mesma idade)

Diferentes letras representam diferenças entre as idades ($p < 0.05$)

Fonte: FAO, 2005.

A carne de búfalo é considerada alimento nobre para o homem, tanto pelo seu valor nutricional, como pelos aspectos sensoriais extremamente desejáveis (Oliveira, 2005). Neste novo milênio, a saúde e a qualidade de vida passaram a ser objetivos para um segmento de consumidores que já têm a maior parte de suas demandas básicas atendidas e buscam, agora, uma vida

saudável e uma dieta adequada. Assim, a inclusão da carne nos cardápios e o apelo para o seu consumo estão ligados não somente às características sensoriais como também à adequação nutricional, dando-se preferência às carnes que apresentem baixos teores de gorduras (totais e saturadas). Nesse sentido, a carne de búfalo se destaca dentre às demais espécies, de acordo com os

resultados de composição nutricional disponibilizados em outubro de 2005 pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA/ARS, 2005).

Segundo estudo do RIRD (Rural Industries Research & Development, da Austrália, 2001), a carne de búfalo poderia ser definida como "densamente nutritiva", isto é, possui um menor teor de gordura total e de calorias/100g que outras carnes vermelhas, apesar de conter importante quantidade de nutrientes essenciais (Tabelas: 4, 5 e 6). Caracteriza-se, não só por ter menos gordura, mas por ter uma "gordura mais adequada", sendo talvez a fonte de proteína animal (domésticos) com menor teor de gorduras (Tab. 7), bem como o menor teor de

colesterol dos animais domésticos, com menor teor de gorduras saturadas (que contribuem para doenças coronárias) que a carne de bovinos ou ovinos. Contém ainda quantidade significativa de gorduras poliinsaturadas Omega-3 consideradas importantes na prevenção de doenças cardíacas e outras desordens inflamatórias. A carne de búfalos é também importante fonte de minerais (Tab. 4) como zinco e ferro, sendo que sua carne é a que mais possui ferro, e também possui quantidades de zinco necessárias para adequada resposta imunológica. Além de tudo isso, o búfalo, depois dos peixes, é a espécie que possui maior conteúdo de Omega-3 (Jorge, 2001; Rodrigues et al, 2004; Oliveira, 2005; Lira et al, 2005).

Tabela 4. Composição comparativa entre carnes de búfalo e bovina

Componente/100 g de carne	Búfalo	Bovino
Caloria (cal)	131,00	289,00
Proteína bruta (%)	26,83	24,07
Lipídios totais (g)	1,80	20,69
Ácido graxo		
Saturado (g)	0,60	8,13
Monoinsaturado (g)	0,53	9,06
Poliinsaturado (g)	0,36	0,77
Colesterol (mg)	61,00	90,00
MINERAL (mg)		
Ca, Fe, Mg, P, K, Na, Zn, Cu e Mn	641,80	583,70
VITAMINA (mg)		
Ácidos ascórbico, pantotênico e fólico, tiamina, riboflavina, niacina, B ₆ e B ₁₂	20,95	18,52

Fonte: Silva et al, 2003

Tabela 5. Composição físico-química em carnes de diferentes espécies

Espécie	Nutriente				
	Umidade	Proteína	Gordura	Cinzas	Colesterol (100g)
Búfalo	76,90	21,93	0,48	1,09	61
Bovino	71,6	20,94	6,33	1,03	90

Fonte: Silva et al, 2003

Tabela 6. Composição de minerais em carnes de diferentes espécies

Espécie	Mineral (mg/100 g)					
	Zinco	Cálcio	Potássio	Magnésio	Ferro	Fósforo
Búfalo	-	7,50	324	-	2,70	213,0
Bovino	4,30	7,00	350	20,00	2,10	180,0

Fonte: Silva et al, 2003

Tabela 7 - Composição centesimal, Colesterol e Energia fornecida por cortes e carnes cozidas de diferentes espécies.

Característica avaliada (média)	Búfalos	Bovinos	Suíños	Frango	Ovinos	Coelhos
Água (g)	68,81	66,03	60,31	63,79	59,95	60,61
Proteína (g)	26,83	26,29	29,27	28,93	29,59	29,06
Lipídios (g)	1,80	6,55	9,66	7,41	8,86	8,05
Cinzas (g)	1,39	1,06	1,18	1,02	1,60	1,04
Colesterol (mg)	61	76	86	89	109	82
Energia (Kcal)	131	171	212	190	206	197

Fonte: obtido de NDB- Nutrient Databank USDA/ARS, 2005 citado por Oliveira, 2005

No estado do Pará, já existem estudos sobre caracterização físico-química, bem como a viabilidade de elaboração, conservação e vida de prateleira de derivados processados a partir da carne de búfalos (tais como carne-de-sol, mortadela com ervas finas, hambúrguer, lingüiça defumada, carne maturada, carne defumada, entre outros) objetivando transferência de tecnologias, o que permitiria estimular a indústria de beneficiamento na Amazônia (Silva et al, 2003).

A carne de búfalo tem excelentes qualidades para fabricação de produtos resfriados ou congelados, para a manufatura de salsicha, hambúrguer e bolo de carne. Esta carne foi considerada tão adequada quanto à carne bovina, para a fabricação de salsichas alemãs tipo *frankfurter* (O búfalo, 1991; Paleari et al, 2000; Oliveira, 2005).

Produtos nobres, como o *Gabrovi*, altamente apreciado e consumido nos Bálcãs, são produzidos com carne de búfalo, aumentando sua qualidade e agregando valor ao produto (O búfalo, 1991).

Na Turquia, na Grécia e em outros países, salsichas são feitas de carne de búfalo, e alguns tipos são preparados de carne seca com temperos. A carne de búfalo fresca é usada nas Filipinas para substituir acima de 70% da carne de porco em lingüiças, sem diminuir o seu sabor. As salsichas bolonhesas de carne de búfalo foram consideradas como sendo melhores do que as de carne bovina (O búfalo, 1991; Paleari et al, 2000).

O bolo de carne, feito de carne de búfalo, registrou marcas superiores em todas as características sensoriais, e o *corned beef* de búfalo foi semelhante ao de bovinos (O búfalo, 1991; Paleari et al, 2000).

A carne seca ao sol (*jerked, biltong* e charque) é popular em outros países, e com a carne de búfalo fazem-se excelentes produtos. O estudo da qualidade do charque é altamente avaliado no Brasil (O búfalo, 1991; Paleari et al, 2000).

Mais pesquisas são necessárias quanto ao processamento industrial da carne de búfalo. Fazem-se necessárias modernas instalações de comércio com resfriamento, congelamento e acondicionamento da carne e dos produtos cárneos, em muitas áreas de desenvolvimento de búfalos (O búfalo, 1991).

Aspectos econômicos do mercado cárneo

O mercado da carne de búfalo está em franca ascensão, devido às diversas características favoráveis. Uma dessas características é o rendimento econômico da carne, que é de cerca de R\$ 500,00/ha/ano, o que é aproximadamente oito vezes superior à média brasileira no segmento recria-engorda para bovídeos, adotando baixa, média e alta tecnologias, de R\$ 12,00/ha/ano, R\$50,00/ha/ano e R\$188,00/ha/ano, respectivamente. O preço de comercialização, anteriormente praticado por R\$0,60/kg de peso vivo, foi aumentado para R\$1,10/kg de peso vivo e até para R\$1,40/kg de peso vivo, dependendo do rendimento de carcaça (Silva et al, 2003).

Segundo os dados da FAO (2005) o Brasil apresentava um rebanho bubalino de 1.200.700 cabeças em 2004. Já os dados do Censo agropecuário (IBGE, 2008), relativo ao ano de 2007, apresentavam valores do efetivo do rebanho bubalino de 1.140 mil cabeças, sendo que esses animais se distribuíam pelas cinco regiões do país. Entretanto, segundo outras estimativas (Jorge, 2004; Oliveira, 2005), o rebanho nacional de búfalos atinge cerca de 3,5 milhões de cabeças. Desse rebanho nacional, 15% se destinam à produção de leite e 85% para corte, sendo estimado um abate de 600.000 búfalos por ano, o que resultaria na produção de cerca de 150.000 toneladas de carne. A taxa anual de crescimento do rebanho chegou a 10% na década passada, mais de cinco vezes a de bovinos no Brasil (Silva et al, 2003; IBGE, 2003, Oliveira, 2005).

Em relação ao rendimento de carcaça, vários autores de diversas partes do mundo concluíram que o búfalo tem um rendimento ligeiramente menor que o bovino (tanto machos castrados, quanto inteiros e fêmeas) principalmente por apresentar pele mais grossa e cabeça, chifres, cascos e intestinos grandes (O búfalo, 1991; Jorge et al, 1997, Oliveira, 2005). Grandes variações são encontradas em relatos provenientes de diferentes fontes. Em alguns casos, as variações são devido às diferentes formas de esfolia. Por exemplo, línguas e chifres podem ser pesados com as cabeças ou separadamente. A porcentagem de gordura varia com o grau de terminação de engorda e poderá variar de 0,5 a 5,0 ou mais. Os quartos traseiros de búfalos machos italianos selecionados constituem 42,64% do peso total de carcaça: de fêmeas 44,45% e de castrados 45,07% (Federacite, 1994; Jorge, 2004).

Especialmente quanto à carcaça e à carne do búfalo deverá haver uma adequada identificação do produto, não só pela marca de um determinado produtor ou frigorífico,

mas também pela rastreabilidade, permitindo diferenciá-la da carne bovina, em relação a aspectos ligados a origem, produção, qualidade sensorial e benefícios à saúde do consumidor (Lara e Soares, 2003).

Ultimamente o mercado da carne vem apresentando sinais de mudança. Agora há uma grande variação em supermercados e restaurantes de produtos direcionados a grupos específicos de consumidores. A preocupação com a saúde, o bem-estar animal e o meio ambiente são pesos cada vez mais significativos na escolha desses produtos. Os produtores e revendedores já perceberam isso. E os setores de tecnologia e inspeção destes produtos devem acompanhar essas tendências.

Agradecimentos

Ao Núcleo de Bubalinocultura da Escola de Veterinária da UFMG;

À Associação Mineira de Bubalinocultores;

Ao Comitê organizador do Núcleo de Estudos em Bovinocultura.

Referências

AMANTE L, DE ROSA C, FAZANO L, BANCHELLI L, MEDEA D, DE PALO R. Valutazione dei puti critici della mungitura in aziende di bufale di pianura e di collina del basso Lazio. In: Congresso Nazionale sull'Allevamento del Búfalo, 1, 2001, Salerno. *Annali...* Salerno: [s.n.], 2001. p. 251-255.

AMARAL FR. *Fatores que interferem na contagem de células somáticas e constituintes do leite de búfalas*. 2005. 46f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.

BENEVIDES, C. M. Leite de búfala – qualidades tecnológicas. *Rev Hig Alim*. n.54,

1998.

BERNARDI, M R V, DAMASIO M H, VALLE J L E, OLIVEIRA A J. Elaboração do queijo mozzarella de leite de búfala pelos métodos tradicional e da acidificação direta. *Ciênc Tecnol Alim*, v.20, p.138-144, 2000.

CHIANESE, L. *Conservazione e trasformazione dei prodotti di origine animale: carne e derivati*, 2005. Disponível em: <http://www.agraria.unina.it/Ricerca/vetrina/ScienzeTec_AgroAl/CTPA/TotCTPA.htm>. Acessado em 25 nov 2007.

CUNHA NETO O C. *Avaliação do iogurte natural produzido com leite de búfala contendo diferentes níveis de gordura*. 2003. 71f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2003.

DEL PRATO O S. *Trattato di tecnologia casearia*. Bologna: [s.n.], 1998. 1070p. Embrapa. Disponível em <http://www.cnpqg.embrapa.br/informa/dez_embro2001/rastreabilidade.html>. Acessado em 24 set 2005.

ESPIRITO SANTO, MILTON L. P.; SHIMOKOMAKI, MASSAMI & SOARES, GERMANO J. D. Correlação Entre Colágeno e Textura de Carne Bubalina e Bovina. *Revista Brasileira de Agrociência*. v. 2, n. 2, 1996.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. *Buffalo production and research*. Rome, 2005.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Disponível em <[HTTP://www.fao.org](http://www.fao.org)>. Acessado em 27 ago 2004.

FEDERACITE et al. *O búfalo e sua rentabilidade*. Guaíba:Agropecuária, 1994. 91p.

FURTADO M M. Composição centesimal do leite de búfala na zona da mata mineira. *Rev Inst Candido Tostes*, v.35, n.211, p.43-47, 1980.

IBGE Rebanho bubalino brasileiro – MAPA/ IBGE. 26 nov. 2003. Disponível em:< www.agricultura.gov.br>. Acessado em 10 jul. 2008.

JORGE, A M. *Produção e qualidade da carne bubalina*. Anais do II Simpósio Paulista de Bubalinocultura. Pirassununga-SP, 2001.

JORGE, A.M. *Produção de Carne bubalina*. ZOOTEC2004– Brasília, DF, 2004.

JORGE, A.M.; FONTES, C.A.A. *Feedlot performance of buffalo and cattle bulls, slaughtered at two stages of maturity*. In: V th WORLD BUFFALO CONGRESS. october, 13 to 16th, Caserta, Italy, Proceedings..., p.428-432, 1997.

KOSIKOWSKI F V. *Cheese and fermented milk foods*. 3. ed. Ann Arbor, MI: Westport Brothers, 1979. 2v.

LARA J A F; SOARES A L; Rastreabilidade da carne bovina: uma exigência para a segurança alimentar. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 24, n. 1, p. 143-148, 2003.

LAWRIE, R A. *Ciência da carne*. 6ª ed. Porto Alegre:Artmed, 2005. 384p.

LIRA, G M; MANCINI-FILHO, J; TORRES, R P; OLIVEIRA, A C; VASCONCELOS, A M A; OMENA, C M B; ALMEIDA, M C S. Composição centesimal, valor calórico, teor de colesterol e perfil de ácidos graxos da carne de búfalo (*Bubalus bubalis*) da cidade de São Luiz do

Quitunde-AL. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*; 64(1):31-38, 2005.

MARCANTONIO, G. *A carne do futuro – búfalo*. Guaíba:Agropecuária, 1998. 108p.

MOZZARELLA di bufala campana d.o.p. Itália. Disponível em <<http://www.Mozzarelladibufala.org>>. Acessado em 08 ago 2004.

O BÚFALO. Brasília:Ministério da Agricultura/São Paulo: Associação Brasileira de Criadores de Búfalos, 1991. XIII+320p. (FAO. Série Produção Animal e Saúde, 4).

OLIVEIRA, AL. Búfalos: produção, qualidade de carcaça e de carne. Alguns aspectos quantitativos, qualitativos e nutricionais. *Revista Brasileira Reprodução Animal*, v.29, n.2, p.122-134, abril/jun. 2005. Disponível em <<http://www.cbra.org.br> 134>.

PALEARI, M.A; CAMISASCA, S.; BERETA, G.; RENON, P.; TESSUTO, L.; BENEDETTI, G.; BERTOLO, G. Comparison of the physico-chemical characteristics of buffalo meta and bovine meat. *Fleischwirtschaft International. Beef Quality*, n.6, p.11-13, 1997.

MARIA ANTONIETTA PALEARI A*, G. BERETTA A, F. COLOMBO A, S. FOSCHINI A,G. BERTOLO B, S. CAMISASCA. Buffalo meat as a salted and cured product. *Meat Science*, n. 54, p. 365-367, 2000.

RIRDC - Rural Industries Research and Development Corporation. Maximising marketing opportunities for buffalo products. *A report for the Rural Industries Research and Development Corporation*.17 p., 2001.

RODRIGUES, V C; BRESSAN, M C; CARDOSO, M G; FREITAS RILKE, T F. Ácidos Graxos na Carne de Búfalos e

Bovinos Castrados e Inteiros. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.33, n.2, p.434-443, 2004.

SILVA M S T, LOURENÇO JR JB, MIRANDA HÁ, ERCHESEN R, FONSECA RFSR, MELO JA, COSTA JM. *Programa de incentivo a criação de búfalos por pequenos produtores – PRONAF*. Belém, PA: CPATU, 2003. Disponível em <<http://www.cpatu.embrapa.br/bufalos>> Acessado em 15 ago. 2004.

TEIXEIRA. L V, BASTIANETTO, E., OLIVEIRA, D A A. Leite de búfala na indústria de produtos lácteos. *Revista Brasileira de rep. Animal*, v. 29 n° 2, p.96-100, 2005.

USDA/ARS. US Department of Agriculture, Agricultural Research Service. *Nutrient Data Laboratory. Search The USDA National Nutrient Database for standard national nutrient database for Standard Reference*, Release 18. Disponível em <<http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp>>. Acessado em 11 nov 2005

YUNES VM, BENEDET HD. Desenvolvimento experimental de queijo fresco de leite da espécie bubalina. *Ciência Tecnol Alim* v.20, p.285-290. 2000.

Capítulo 2

Identificação espécie-específica de búfalos e bovinos em carne vermelha e derivados cárneos pela técnica PCR-RFLP

Lílian Viana Teixeira⁽¹⁾, Juliana Nobre Vieira⁽¹⁾, Cláudia Salviano Teixeira⁽¹⁾ e Denise Aparecida Andrade de Oliveira⁽¹⁾

⁽¹⁾ Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Av. Antônio Carlos, no 6627, Caixa Postal 567, CEP 30123-970 Belo Horizonte, MG. E-mail: viana.lilian@gmail.com, jujunobre@gmail.com, clasalt@gmail.com, denise@vet.ufmg.br

Resumo – Para avaliar a viabilidade da técnica de PCR-RFLP na identificação de fraude intencional e contaminação acidental em produtos cárneos de origem bubalina, *in natura* e processados, foram testadas amostras puras e amostras de fraudes controladas, produzidas em laboratório, com adição de 1%, 5%, 10% e 50% de carne bovina em carne de búfalo, homogeneizada crua e autoclavada. Foram comparados, ainda, diferentes métodos de extração, usando um kit comercial e a técnica clássica de Sambrook et al., 1989. O resultado estatístico foi obtido por tabela de contingência, analisada pelo método do teste do qui-quadrado (χ^2) e teste exato de Fisher. A especificidade encontrada foi altamente significativa ($p < 0,0001$). Observou-se também sensibilidade altamente significativa na diluições a partir de 10% ($p < 0,0001$). A técnica tem alta especificidade e sensibilidade para detectar até mesmo contaminação de 1%, mas a repetibilidade desse resultado impede a aplicação oficial desse método para a inspeção de contaminação acidental, sendo recomendada somente para inspeção de fraude a partir de 10% de substituição. É possível obter a especiação, estatisticamente significativa, até mesmo de material autoclavado. A técnica também pode ser empregada para certificação de produto específico (selo de identidade de espécie).
Termos para indexação: *Bos taurus* e *Bos taurus indicus*, *Bubalus bubalis*, carne de búfalos, carne bovina, certificação.

Title: Identification specie-specific of water buffalo and bovine red-meat and its meat derivative products with the PCR-RFLP technique

Abstract – To evaluate the viability of the PCR-RFLP technique in the identification of intentional fraud or accidental contamination in water buffalo meat and its processed products by beef meat, tests were conducted

and analyzed using the chi-square (χ^2) statistical method. Samples of *in natura* products, samples of contamination-free processed products, and samples of laboratory-made controlled contamination processed products, homogenized and treated in autoclave, with additions of 1%, 5%, 10% and 50% of beef meat were used in the analyses. The PCR-RFLP technique presents a high-significance of the meat species ($p < 0,0001$). Also, this technique presents high sensibility. More specifically, water buffalo meat processed products samples prepared with 10%, and above, levels of contamination by beef meat very high sensitivity presented ($p < 0,0001$). Despite its accuracy and precision, capable to detect a contamination level of 1%, the PCR-RFLP technique is not recommended for inspection in cases of accidental contamination. This is due to the need of test repetition in levels of contamination lower than 10%. The PCR-RFLP technique was capable to detect the meat specie, with statistic significance, even for samples treated in autoclave. The PCR-RFPL technique can also be used for certification of specific species (species identification certification stamp).

Index terms: *Bos taurus* e *Bos taurus indicus*, *Bubalus bubalis*, water buffalo meat, bovine meat, certification.

Introdução

A qualidade dos produtos alimentícios inclui a autenticidade do alimento, sendo um importante conceito para os consumidores modernos, resultando em crescente pressão nas políticas governamentais e diferentes níveis de proteção da cadeia de produção de alimentos. Um exemplo é a verificação da exatidão dos rótulos dos produtos alimentícios, prevenindo fraudes, como a substituição de carnes nobres por carnes de pior qualidade, que lesam o consumidor não só economicamente, mas também se deve levar em conta a saúde e até as questões

religiosas (Branciani et al., 2000; Maccabiani et al., 2005; Lopparelli et al., 2007; Zhang et al., 2007; Tanabe et al., 2007; Corona et al., 2007). Para a detecção de ingredientes animais nos alimentos e a identificação de sua origem (espécie animal) são necessárias ferramentas adequadas (Verkaar et al., 2002; Lopez-Andreo et al., 2005; Zhang et al., 2007).

A PCR (*polymerase chain reaction* ou reação em cadeia da polimerase) oferece a possibilidade de detectar ingredientes animais em alimentos e identificar de quais espécies são originários (Partis et al., 2000; Herman, 2001; Verkaar et al., 2002; Myers, 2003; Lopez-Calleja et al., 2005; Zhang et al., 2007). Em relação à carne, este método é eficaz tanto em matéria crua, como também em produtos fermentados, cozidos ou autoclavados (Gouli et al., 1999; Pascoal et al., 2005; Corona et al., 2007; Zhang et al., 2007). A análise de produtos oriundos de PCR-RFLP tem sido amplamente utilizada para discriminação de espécies, pois um único par de *primers* produz um fragmento que pode identificar múltiplas espécies por meio da utilização de enzimas de restrição apropriadas (Lockley and Bardsley, 2000).

A carne de búfalos tem encontrado mercado crescente no Brasil e já consolidado em várias partes do mundo. A qualidade nutricional e sensorial da carne bubalina é superior à bovina e apresenta rendimento de carcaça semelhante. Destaca-se como alternativa para se otimizar o rendimento de carcaça, a produção de derivados elaborados a partir de carne mecanicamente separada, como o hambúrguer. Contudo, a garantia ao consumidor de que o produto é realmente derivado exclusivamente de carne bubalina só será possível com a certificação por meio de selo de garantia obtido após análise laboratorial acurada (Jorge, 2001; Oliveira, 2005).

As técnicas mais comuns para identificação da espécie são a eletroforese e o

imunoensaio (ELISA ou ORBIT). A Eletroforese oferece resolução melhor que a cromatografia líquida de alto-desempenho (HPLC) e é mais adequada à separação simultânea de vários componentes de químicas diferentes dentro de uma única matriz. Além disso, a eletroforese requer procedimentos de limpeza de amostra menos rigorosos que HPLC, enquanto oferece o mesmo grau de automatização. Os imunoensaios, como o ORBIT e o ELISA, consistem em anticorpos anti-bovino e de outras espécies (suíno, aves, etc.) em ágar-gel de imunodifusão que entram em contato com a amostra preparada para o teste. O inconveniente é que na identificação de espécies filogeneticamente próximas, como o búfalo e o bovino, nem sempre permite a visualização e identificação satisfatória por meio dessas técnicas. O aquecimento da carne também prejudica principalmente os imunoensaios, por destruir os epítomos, inviabilizando a reação antígeno-anticorpo, que é a base do imunoensaio (Herman, 2001; Bellis et al., 2003; Lopez-Calleja et al., 2005; Mayer, 2005;).

O objetivo deste trabalho foi a sensibilidade, especificidade e aplicabilidade da técnica de PCR-RFLP em rotina laboratorial, na especiação de produtos cárneos, como ferramenta auxiliar para a inspeção de produtos de origem animal.

Material e Métodos

Amostras e extração de DNA

Foi utilizada musculatura da face de 60 animais, sendo 30 bovinos (*Bos taurus* e *Bos taurus indicus*) e 30 bubalinos (*Bubalus bubalis*), provenientes de abatedouros da grande Belo Horizonte – MG. Também foram coletados pêlos dos mesmos animais para utilização como controle positivo de amplificação e tamanho de fragmento de cada espécie, por meio da técnica de extração rotineira do laboratório. Todas as

análises foram realizadas no Laboratório de Genética da Escola de Veterinária da UFMG, no período entre 2006 e 2008.

Foram testadas extrações com o kit EZ-DNA, da Biological Industries, conforme instruções do fabricante, e com a técnica descrita por Sambrook et al.(1989).

O DNA da amostra de carne foi extraído, após de digestão com proteinase K, utilizando-se as técnicas do Fenol/clorofórmio/álcool-isoamílico), e precipitação e purificação com etanol, método de Sambrook et al., 1989. Além da extração de DNA das 30 amostras puras de cada espécie, foi feita extração do DNA de fraudes controladas com valores conhecidos, adicionando-se 1%, 5%, 10% e 50% de carne bovina em carne de búfalo, cada qual com um par de indivíduos diferentes. Para as amostras com 1% de carne bovina em carne de búfalo foram feitas 79 repetições, e para as amostras com 5% fraude foram feitas 41 repetições. Para as demais foram realizadas 30 repetições. Para testar o limite de sensibilidade para detecção em amostras com contaminação acidental ($\leq 1\%$), foram executadas análises em seis réplicas de cada uma das 30 amostras de contaminação conhecida com 1% de material bovino em material bubalino. Foram testadas também 30 amostras puras autoclavadas (de búfalos e de bovinos) para extração de DNA pela mesma metodologia.

As amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro para determinar sua concentração e qualidade (Shimadzu – UV-160), na faixa de 260 a 280 nm. Após a quantificação, o DNA foi diluído em água estéril para concentração de 0,5 ng/ μ l. As diluições de DNA e as soluções estoque foram armazenadas a -20 °C, até o momento do uso.

Os controles foram feitos a partir da extração de DNA de bulbos pilosos de

bovinos e bubalinos por método utilizado como rotina no laboratório.

Os dados foram analisados pelo programa SAS versão 8.0(SAS Institute, 2002), como tabela de contingência 2x2, usando o teste de qui-quadrado (χ^2), teste de McNemar (para numero de analises acima de 30, cujas amostras apresentavam alguma dependência) e teste exato de Fisher (apenas para comparação entre métodos de extração).

Amplificação por PCR

Foram empregados iniciadores universais de citocromo b de artiodátilos, o que dispensa a necessidade de controle interno para monitorar a amplificação de DNA (Partis et al., 2000). Iniciadores modificados por Verkaar et al. (2002) foram utilizados para amplificar fragmentos de DNA de 271 pares de base (pb), por meio de PCR. O sistema de amplificação da PCR foi realizado conforme protocolo adaptado de Verkaar et al. (2002), em reação contendo 5 mM de cada iniciador, 0,2 mM de cada dNTP's, 2 unidades de *Taq*DNApolimerase, 1X de tampão (a base de Tris HCl 10mM; 15mM MgCl₂. 50mM KCl) 10ng de DNA amostral e água Milli-Q autoclavada, perfazendo um total de 20 μ L.

Análise do RFLP dos produtos de PCR

Foi feita análise de restrição de endonuclease com *TaqI* (T↓GGA AGC↑T) para detecção da espécie bubalina e com *HinfI* (G↓ANT C C TNA↑G) para detecção da espécie bovina, 5 μ L de produto de PCR foram acrescido de 1X de tampão e 5 a 10 U de enzima de restrição (Invitrogen), submetendo-se a 3 horas de digestão a 65°C a *TaqI* e a 37°C a *HinfI*.

Os produtos da restrição foram diluídos em solução de *tampão de corrida* 2X e, então, submetidas à corrida eletroforética (200 volts, 30 miliamperes por 2 horas), juntamente ao padrão de peso molecular

(*pGEM*[®] Promega), em gel de poliacrilamida 8%. Foram incluídos um controle positivo para búfalo e um para bovino, extraídos de pêlos, e um controle negativo (branco). A visualização dos produtos, tanto após PCR quanto após digestão, se deu pela coloração dos géis com nitrato de prata.

Resultados e Discussão

A utilização da técnica clássica de extração pelo método do fenol (Sambrook et al, 1989) apresentou diferença estatisticamente significativa, quando comparado ao kit comercial (EZ-DNA, Biological Industries) para extração de DNA ($p=0,0153$, pelo teste exato de Fisher).

Neste experimento, a maior importância está na especificidade do teste com o uso de duas enzimas de restrição, o que permitiu identificar espécies filogeneticamente próximas como *Bos taurus* e *Bubalus bubalis* (tab. 1) neutralizando o efeito de polimorfismos intra-específicos (Partis et al., 2000; Bottero et al, 2002; Verkaar et al., 2002; Bellis et al., 2003; Myers, 2003; Girish et al., 2005).

Porém a sensibilidade também se faz importante, uma vez que, quanto mais sensível, maior a capacidade do teste em detectar pequenas porcentagens de adição de carne de espécies diferentes (contaminação). No caso específico deste experimento, a sensibilidade fica comprometida pela natureza do material, que é sólido e não permite uma mistura tão homogênea como se é possível obter de matéria prima líquida. Com relação a derivados cárneos faz-se

necessária a realização da coleta de, no mínimo, quatro amostras (réplicas) para a análise e detecção com sensibilidade de até 1% de material clandestino (com 80% de probabilidade de sucesso), e sugere-se a coleta de três amostras (réplicas) para a análise e detecção com sensibilidade de até 10% de material clandestino (Tab. 2). Essa diferença na sensibilidade se dá não ao teste, mas devido à natureza do material analisado (Partis et al, 2000). As réplicas são utilizadas quando a mensuração de uma resposta está sujeita a erros de manipulação e/ou humana, justificando que o seu valor médio retrataria melhor aquela resposta para um produto (Sampaio, 2002). Por tal motivo deve-se, também, estudar outras formas de homogeneização de amostras, de modo a contornar esse problema. A escolha de fragmentos do citocromo *b* mitocondrial para amplificação de DNA foi importante, uma vez que o DNA mitocondrial é mais abundante que o genômico, o que aumenta a sensibilidade da técnica (Parson et al., 2000; Partis et al., 2000; Herman, 2001; Lopez-Calleja et al., 2005; Arslan et al., 2006). As porcentagens de tecidos de outros animais presentes também interferem na detecção pela RFLP, como já mencionado por Partis et al. (2000) e Myers (2003).

Após a digestão com enzima *TaqI* o produto de PCR apresentou 108 e 163 pb para a carne bubalina e 271 pb para carne bovina. Enquanto que após a digestão com enzima *HinfI*, os fragmentos foram de 101 e 170 pb para a carne bovina e 271pb para a bubalina, conforme encontrado também por Verkaar et al. (2002) (fig. 1).

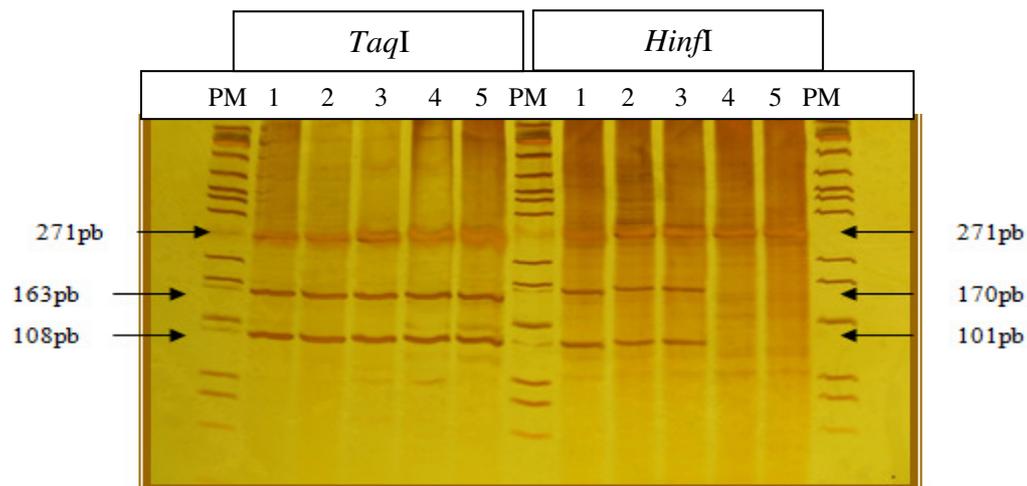


Figura 1: Gel de poliacrilamida a 8% corado com prata. Produto de restrição enzimática com *TaqI* e *HinI* em 5 fraudes (amostras de 1 a 5) de 5% (5% de carne de boi misturada à carne de búfalo), em ensaio realizado na EV/UFMG em 2007

A amplificação de DNA proveniente de material autoclavado foi viável, mas com diferença estatisticamente significativa, pelo teste do *qui-quadrado*, quando comparada ao material *in natura* ($p=0,0076$). A amplificação de um fragmento relativamente pequeno de DNA (271pb) viabiliza a aplicação da técnica em produtos termicamente processados, pois o DNA da carne quebra-se em pequenos pedaços após tratamento térmico. Assim sendo, quanto menor o fragmento a ser amplificado, maiores as chances de sucesso da técnica, sendo o ideal fragmentos menores que 200pb (Partis et al., 2000; Pascoal et al., 2005; Arslan et al., 2006).

Tabela 1: Resultados dos testes com amostras de carne bubalina e bovina após a digestão com enzimas de restrição *HinI* e *TaqI*, em ensaio realizado na EV/UFMG em 2007.

Amostra	n Total	Cortes com enzimas (%)			
		<i>TaqI</i> positivo	<i>TaqI</i> negativo	<i>HinI</i> positivo	<i>HinI</i> negativo
boi	30	0	100	100	0
búfalo	30	100	0	0	100

pPCR = produto de PCR, sem ação de enzima de restrição.

n= número total de amostras analisadas

Tabela 2: Resultados dos testes em fraudes controladas de carne bovina misturada à carne bubalina, após a digestão com enzimas de restrição *HinI* e *TaqI*, em ensaio realizado na EV/UFMG em 2006 e 2007.

Mistura	n Total	Cortes com enzimas (%)			
		<i>TaqI</i> positivo	<i>TaqI</i> negativo	<i>HinI</i> positivo	<i>HinI</i> negativo
1%	79	100	0	36,7	63,3
5%	41	100	0	29,3	70,7
10%	30	100	0	100	0
50%	30	100	0	94	6

pPCR = produto de PCR, sem ação de enzima de restrição.

n= número total de amostras analisadas

Conclusões

1. A técnica tem alta especificidade ($p<0,0001$), e por isso pode ser empregada na certificação de identidade/autenticidade de produtos cárneos.
2. A técnica tem alta sensibilidade ($p<0,0001$) para detectar adições a partir de 10% de produto cárneo não rotulado.

3. A técnica detecta seqüências de DNA em amostras cárneas autoclavadas, viabilizando a aplicabilidade dessa técnica em produtos termicamente processados.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
Ao CNPq/Projeto INCT 573899/2008-8

Referências

ARSLAN, A; ILHAK, O I; CALICIOGLU, M. Effect of method of cooking on identification of heat processed beef using polymerase chain reaction (PCR) technique. *Meat Science*, v.72, p. 326-330, 2006.

BELLIS, C; ASHTON, K J; FRENEY, L; BLAIR, B., GRIFFITHS, L R. A molecular genetic approach for forensic animal species identification. *Forensic Sci. Int.* v.134, p.99-103, 2003.

BOTTERO, MT; CIVERA,T; ANASTASIO, A; TURI, R.M; ROSATI, S. Identification of cow's milk in "buffalo" cheese by duplex polymerase chain reaction. *J Food Prot*, v.65, n. 2, p. 362-366, 2002.

BRANCIARI, R.; NIJMAN, I. J.; PLAS, M. E.; DI ANTONIO, E.; LENSTRA, J. A. Species origin of milk in italian mozzarella and greek feta cheese. *J Food Prot*, v.63, n. 3, p. 362-366, 2000.

CORONA, B; LLEONARD, R; CARPIO, Y; UFFO, O; MARTINEZ, S. Short communication. PCR detection of DNA of bovine, ovine-caprine and porcine origin in feed as part of a bovine spongiform encephalopathy control program. *Spanish J agric res*, v.5, n.3, p.312-317, 2007.

GIRISH, P S., ANJANEYULU, A S R, VISWAS, K N, SHIVAKUMAR, B M, ANAND, M., PATEL, M., SHARMA, B.

Meat species identification by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) of mitochondrial 12S rRNA gene. *Meat Sci.* v.70, p.107-112, 2005.

GOULI, Z; MINGGUANG, Z; ZHIJIANG, Z; HONGSHEG, O; QIANG, L. Establishment and application of a polymerase chain reaction for the identification of beef. *Meat Sci.* v.51, p.233-236, 1999.

HERMAN, L. Indetermination of the animal origin of raw food by species-specific PCR. *J Dairy Res.* v.68, p.429-439, 2001.

JORGE, A M. Produção e qualidade da carne bubalina. In: II SIMPÓSIO PAULISTA DE BUBALINOCULTURA. *Anais*. Pirassununga-SP, 2001.

LOCKLEY, A K & BARDSLEY, R G. DNA-based methods for food authentication. *Trends in food Sci. & Techn.* v. 11, p.67-77, 2000

LOPEZ-ANDREO, M; LUGO, L; GARRIDO-PERTIERRA, A; PRIETO, M I; PUYET, A. Identification and quantification of species in complex DNA mixtures by real-time polymerase chain reaction. *Analytical Biochem*, v.339, p.73-82, 2005.

LOPÉZ-CALLEJA, I; ALONSO, G; FAJARDO, V; RODRIGUES, M A; HERNÁNDEZ, P E; GARCÍA, T; MARTIN, R. PCR detection of cow's milk in water buffalo milk and mozzarella cheese. *I. Dairy J.* v.15, p.1122-1129, 2005.

LOPPARELLI, R M., CARDAZZO, B., BALZAN, S., GIACCONE, V., NOVELLI, E. Real-time TaqMan polymerase chain reaction detection and quantification of cow DNA in pure water buffalo Mozzarella cheese: method validation and its application on commercial samples. *J. Agric. Food Chem.* v.55, p. 3429-3434, 2007.

MACCABIANI G., PAVONI E., TILOLA M, AGNELLI E., SIMONI M., D'ABROSCA F., BONI P. Setting-Up a PCR-Based Method for Species Identification in Milk Products. *Vet Res Communications*. v. 29, Supplement 2, p.327-329, 2005.

MAYER, H. K., Milk species identification in cheese varieties using electrophoretic chromatographic and PCR techniques. *Int. Dairy J.* v.15, p.595-604, 2005.

MYERS, M J; YANCY, H F; FARREL, D E. Characterization of a polymerase chain reaction-based approach for the simultaneous detection of multiple animal-derived materials in animal feed. *J food prot.* v.66, n.6, p.1085-1089, 2003.

OLIVEIRA, AL. Búfalos: produção, qualidade de carcaça e de carne. Alguns aspectos quantitativos, qualitativos e nutricionais. *Rev Bras Rep Animal.* v.29, n.2, p.122-134, abril/jun. 2005. Disponível em:<[http:// www.cbra.org.br](http://www.cbra.org.br) 134>. Acesso em: 30 jun. 2005.

PARSON, W; PEGORARO, K; NIEDERSLATTER; FOGER, M. Species identification by means of the cytochrome b gene. *I J Legal Med.* v.114, p. 23-28, 2000.

PARTIS, L; CROAN, S; GUO, Z; CLARK, T; COLDHAM, T; MURBY, J. Evaluation of a DNA fingerprinting method for determining the species origin of meats. *Meat Sci*, v.54, p.369-376, 2000.

PASCOAL, A.; PRADO, M.; CALO, P.; CEPEDA, A.; BARROS-VELÁZQUEZ, J. Detection of bovine DNA in raw and heat-processed foodstuffs, commercial foods and specific risk materials by a novel specific polymerase chain reaction method. *Eur. Food Res. Technol.* v.220, p.444-450, 2005.

SAMBROOK, J; FRITSCH, E F; MANIATIS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual.* 2ªEd. Cold Spring Harbor, 1989. 3V

SAMPAIO, I B M. *Estatística aplicada à experimentação animal.* 2ª ed. – Belo Horizonte:Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária, 2002. 265p.

SAS INSTITUTE (Cary, Estados Unidos). **SAS/STAT user's guide.** Version 8.0. Cary, 2002. 5v.

TANABE, S. MIYAUCHI, E., MUNESHIGE, A., MIO K., SATO, C., SATO, M. PCR method of detecting pork in foods for verifying allergen labeling and for identifying hidden pork ingredients in processed foods. *Biosc Biotechnol biochem.* v.71, n.7, p.1663-1667, 2007.

VERKAAR, E.L.C.; NIJMAN, I.J.; BOUTAGA, K., LENSTRA, J. A. Differentiation of cattle species in beef by PCR-RFLP of mitochondrial and satellite DNA. *Meat Sci.* v.60, p.365-369, 2002.

ZHANG, CL, FOWLER, M R; SCOTT, N W; LAWSON, G; SLATER, A. A taqMan real-time PCR system for the identification and quantification of bovine DNA in meats, milks and cheeses. *Food control.* v.18. p. 1149-1158, 2007.

Capítulo 3

Extração de DNA e avaliação da composição espécie-específica de queijos

Lílian Viana Teixeira⁽¹⁾, Juliana Nobre Vieira⁽¹⁾, Cláudia Salviano Teixeira⁽¹⁾ e Denise Aparecida Andrade de Oliveira⁽¹⁾

⁽¹⁾ Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Av. Antônio Carlos, no 6627, Caixa Postal 567, CEP 30123-970 Belo Horizonte, MG. E-mail: viana.lilian@gmail.com, jujunobre@gmail.com, clasalt@gmail.com, denise@vet.ufmg.br

Resumo- foram testados três métodos de extração de DNA em amostras de queijo. O objetivo deste estudo foi identificar uma técnica eficiente para extração de DNA em amostras com várias limitações como: alto teor de gordura, alto grau de degradação do DNA e grande concentração de impurezas. A técnica que faz uso do Tiocianato de Guanidina se mostrou mais adequada para identificação de adição intencional não declarada de leite bovino em queijos bubalinos, podendo ser empregada para certificação de produto específico (selo de Identidade de Espécie).

Termos para indexação: extração de DNA, queijos de búfalos, fraude, certificação.

Title: DNA extraction and evaluation of the specie-specific composition of cheeses.

Abstract - three methods of DNA extraction were tested in cheese samples. The objective of this study is to identify an efficient technique for DNA extraction in different samples with several limitations as high fat tenor, high degree of DNA degradation and great sludge's concentration. The technique that uses Guanidine thiocyanate was more appropriate for identification of intentional addition of bovine milk not declared in buffalo cheeses. This technique can be used for certification of specific product (stamp of Identity of Species).

Index terms: DNA extraction, water buffalo's cheeses, fraud, certification.

Introdução

A identificação da espécie animal na área de alimentos tem sido aplicada principalmente para detecção de fraude comercial, envolvendo substituição de matéria-prima por outras de baixo valor. É usada também como ferramenta para detectar material que ofereça perigo ao homem, como no caso da BSE (Bovine Spongiform Encefalopathy – Encefalopatia espongiforme bovina) (Dalmaso *et al.*, 2004; Pascoal *et al.*, 2005; Fumière *et al.*, 2006; Corona *et al.*, 2007;

Schönenbrücher *et al.*, 2007; Lopparelli *et al.*, 2007; Tanabe *et al.*, 2007). A qualidade dos produtos alimentícios inclui a autenticidade do alimento, sendo um importante conceito para os consumidores modernos, resultando em crescente pressão nas políticas governamentais e diferentes níveis de proteção da cadeia de produção de alimentos. Por exemplo, a verificação da exatidão dos rótulos dos produtos alimentícios, por razões econômicas, religiosas ou de saúde (Branciari *et al.*, 2000; Bottero *et al.*, 2002; Lopez-Calleja *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2007). Para a detecção de ingredientes animais nos alimentos e a identificação de sua origem (espécie animal) são necessárias ferramentas adequadas (Verkaar *et al.*, 2002; Lopez-Andreo *et al.*, 2005). Métodos baseados em DNA são amplamente aceitos por serem menos afetados pelos processos industriais, como aquecimento e fermentação (Pascoal *et al.*, 2005; Arslan *et al.*, 2005; Lopparelli *et al.*, 2007; Corona *et al.*, 2007). O DNA mitocondrial tem bons resultados nas análises em alimentos submetidos a tratamentos com pressão e temperatura elevados, onde o DNA é parcialmente degradado (Pascoal *et al.*, 2005; Arslan *et al.*, 2005; Lopparelli *et al.*, 2007; Corona *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007).

A PCR (*polymerase chain reaction* ou reação em cadeia da polimerase) oferece a possibilidade de detectar ingredientes animais em alimentos e identificar de quais espécies são originários (Partis *et al.*, 2000; Herman, 2001; Verkaar *et al.*, 2002; Myers, 2003; Lopez-Calleja *et al.*, 2005). Em relação à carne, este método é eficaz tanto em matéria crua, como também em produtos fermentados, cozidos ou autoclavados (Gouli *et al.*, 1999; Pascoal *et al.*, 2005; Lopparelli *et al.*, 2007; Corona *et al.*, 2007). Porém, em relação a produtos lácteos, a extração de DNA se torna uma etapa crítica dessa metodologia, pois este é obtido das poucas células somáticas originárias da parede do úbere presentes no leite de vacas

saudáveis (Branciarri *et al.*, 2000; Herman, 2001; Rea *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2007). O aquecimento e manipulação do leite ou queijo também prejudicam a obtenção de fragmentos de DNA em quantidade e com qualidade (Zhang *et al.*, 2007).

Não há no Brasil legislação que caracterize produtos de búfalo. Em relação aos queijos que também poderiam ser fabricados com leite de búfala, a legislação vigente (RIISPOA) apresenta somente os artigos 621 (mussarela), 622 e 627 (provolone), 628 (cacciocavallo), 610 (ricota), 608 (gorgonzola), onde somente o artigo 608 especifica que o queijo gorgonzola deve ser confeccionado integralmente com leite de vaca. Visando possibilitar a diferenciação de produtos feitos a partir de leite de búfala, a ABCB instituiu o selo de pureza para tais produtos, que têm legislação própria instituída pela associação (anexo 1). Por sua vez, em relação à rotulagem de produtos de origem animal compostos, o RIISPOA (art. 801 item 2) estipula que os rótulos devem indicar sua composição qualitativa e quantitativa (inclusive em relação às espécies animais). Na Itália, país onde a produção e consumo de produtos oriundos de búfalos é relevante, há um programa de valorização desses, com legislações que regulamentam e protegem tais produtos (*Denominazione di Origine Protetta alla Carne di Bufalo Campana* - Reg. 628/2008; leite e mozzarella: leis 54/97 e 107/96), que são identificados por selos.

O objetivo deste trabalho foi analisar diferentes métodos de extração de DNA a partir de queijos, bem como verificar a sensibilidade, especificidade e aplicabilidade desta técnica em rotina laboratorial, na identificação de adição não declarada de leite de vaca em queijos de búfala, como ferramenta auxiliar para a inspeção de produtos de origem animal.

Material e Métodos

Amostras e extração de DNA

Foram utilizadas amostras de queijos, de marcas e tipos variados, que possuíam registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, coletados em supermercados da cidade de Belo Horizonte, durante o ano de 2008, perfazendo um total de 30 amostras, dentre as quais sete rotuladas como “puro búfalo” e 23 tradicionalmente rotuladas como produzidas a partir de leite (sem identificação da espécie proveniente). Para cada método de extração foram utilizadas 30 repetições. Foram coletados pêlos de bovinos (*Bos taurus* e *Bos taurus indicus*) e bubalinos (*Bubalus bubalis*), para utilização como controle positivo de amplificação. Todas as análises deste experimento foram realizadas em 2008, nos laboratórios de Genética da Escola de Veterinária da UFMG (Universidade Federal de Minas Gerais - Brasil) e da UNLP (Universidad Nacional de La Plata - Argentina).

Os dados foram analisados pelo programa SAS (SAS Institute, 2002), como tabela de contingência 2x2, usando os teste de qui-quadrado (χ^2)

Foram testadas três técnicas de extração de DNA: extrações com o kit QIAMP DNA Stool mini kit (da Qiagen), conforme instruções do fabricante; a técnica descrita por Sambrook *et al.* (1989); e a técnica de Boom *et al.* (1990).

Método de Sambrook *et al.* (1989) - o DNA da amostra de queijo foi extraído, após de digestão com proteinase K, utilizando-se as técnicas do Fenol/clorofórmio/álcool-isoamílico, e precipitação e purificação com etanol.

Método de Boom *et al.* (1990) - o DNA das amostras foi extraído utilizando-se solução a base de Tiocianato de guanidina, e empregando o uso de sílica preparada com carga elétrica adequada para se prender aos

fragmentos de DNA. O restante do material que não era de interesse para análise foi descartado. Posteriormente o DNA foi separado da sílica precipitando-o por meio de etanol e acetona.

Método utilizando QIAMP DNA Stool mini kit– a extração foi executada conforme instruções do fabricante.

As amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro para determinar sua concentração e qualidade (Shimadzu – UV-160), na faixa de 260 a 280 nm. Após a quantificação, o DNA foi diluído em água estéril para concentração de 0,5 ng/μl. As diluições de DNA e as soluções estoque foram armazenadas a -20 °C, até o momento do uso.

Os controles foram feitos a partir da extração de DNA de bulbos pilosos de bovinos e bubalinos por método utilizado como rotina no laboratório. O protocolo usado para a extração foi fornecido pelo Laboratório de Genética Veterinária da Universidade da Califórnia-Davis (uso sob licença).

Amplificação por PCR

Foram empregados iniciadores universais de citocromo *b* de artiodátilos, o que, por si só, dispensa a necessidade de controle interno para monitorar a amplificação de DNA (Partis *et al.*, 2000), para comprovar a eficiência das técnicas e identificar possíveis fraudes. Iniciadores modificados por Verkaar *et al.* (2002) foram utilizados para amplificar fragmentos de DNA de 271 pares de base (pb), por meio de PCR. O sistema de amplificação da PCR foi realizado conforme protocolo adaptado de Verkaar *et al.* (2002), em reação contendo 5 mM de cada iniciador, 0,2 mM de cada dNTP, 2 unidades de *Taq*DNApolimerase, 1X de tampão (a base de Tris HCl 10mM; 15mM MgCl₂. 50mM KCl), no mínimo 10ng de DNA amostral e

água Milli-Q autoclavada, perfazendo um total de 20μL.

Análise do RFLP dos produtos de PCR

Foi feita análise de restrição de endonuclease com *TaqI* (T↓GGA AGC↑T) para detecção da espécie bubalina e com *HinfI* (G↓ANT C TNA↑G) para detecção da espécie bovina, 5μL de produto de PCR foram acrescido de 1X de tampão e 5 a 10 U de enzima de restrição (Invitrogen), submetendo-se a 3 horas de digestão a 65°C a *TaqI* e a 37°C a *HinfI*.

Os produtos, tanto da PCR quanto os fragmentos resultantes do corte com a enzima de restrição foram diluídos em solução de Tampão de corrida 2X e, então, submetidas à corrida eletroforética (200 volts, 30 miliamperes por 2 horas), juntamente ao padrão de peso molecular (*pGEM*[®] Promega), em gel de poliácridamida 8%. Foi incluído um controle positivo para búfalo e um para bovino, extraídos de pêlos, e um controle onde não é adicionado DNA, para verificar se não houve contaminação dos reagentes utilizados para a amplificação. A visualização dos produtos, tanto após PCR quanto após digestão, se deu pela coloração dos géis com nitrato de prata.

Resultados e discussão

A utilização da técnica com tiocianato de guanidina (Boom, 1990), bem como o uso do kit QIAMP DNA Stool para extração de DNA, apresentaram diferença estatisticamente significativa pelo método do qui-quadrado ($p < 0,006$) em relação a extração clássica com fenol-clorofórmio (Sambrook *et al.*, 1989). Esta foi a etapa mais crítica do experimento. Teoricamente o leite e o queijo possuem pouco teor de DNA, pois este provém das células de descamação do úbere da vaca. Além de possuir pouco DNA o queijo ainda apresenta diversos inibidores de PCR, como alto teor de proteínas e alta degradação do DNA por

microorganismos presentes nos fermentos, a partir dos quais se faz os queijos. O método de extração de DNA por guanidina está baseado nas propriedades de ligação de partículas de sílica ao DNA na presença de tiocianato de guanidina (GuSCN), que tem ação caotrópica e de inativação de nucleases (Boom *et al.*, 1990; Mafra *et al.*, 2004; Corona *et al.*, 2007). A técnica se baseia na alteração de pH. Em condições de pH baixo (obtido pela adição de HCl), a sílica tem carga positiva para aderir à estrutura principal de ácidos nucleicos, carregados negativamente. Proteínas e outros contaminantes não se aderem à sílica e são simplesmente eliminados com o tampão de lavagem. Para retirar os ácidos nucleicos a carga na superfície sílica é neutralizada aumentando o pH para 8,5, usando o tampão de eluição com baixo teor de sal. O DNA purificado dilui instantaneamente no tampão e está pronto para uso em diversas aplicações. Por isso a PCR apresentou melhores resultados após a extração de DNA pelo método que usa a guanidina. O método do fenol:clorofórmio apenas precipita o DNA, mantendo os demais inibidores.

Tabela1: Resultados das metodologias de extração de DNA em queijos, em ensaio realizado na EV/UFGM em 2008

Técnica de extração	n Total	Amplificação	
		pPCR positivo (%)	pPCR negativo (%)
Tiocianato de guanidina	30	93,3	6,7
Fenol-clorofórmio	30	60	40
Kit comercial	30	93,3	6,7

pPCR = produto de PCR, sem ação de enzima de restrição.

n= número total de amostras analisadas

Para identificar espécies filogeneticamente próximas como *Bos taurus* e *Bubalus bubalis*, foram usadas duas enzimas de restrição (tab. 2), o que permitiu neutralizar o efeito de polimorfismos intra-específicos (Partis *et al.*, 2000; Parson *et al.*, 2000; Verkaar *et al.*, 2002; Bellis *et al.*, 2003; Myers, 2003; Girish *et al.*, 2005).

Após a digestão (fig. 1) com enzima *TaqI* o produto de PCR apresentou 108 e 163 pb para lácteos de origem bubalina e 271 pb para os de origem bovina. Enquanto que após a digestão com enzima *HinfI*, os fragmentos foram de 101 e 170 pb para lácteos de origem bovina e 271pb para os de origem bubalina, confirmando o mencionado por Verkaar *et al.* (2002).

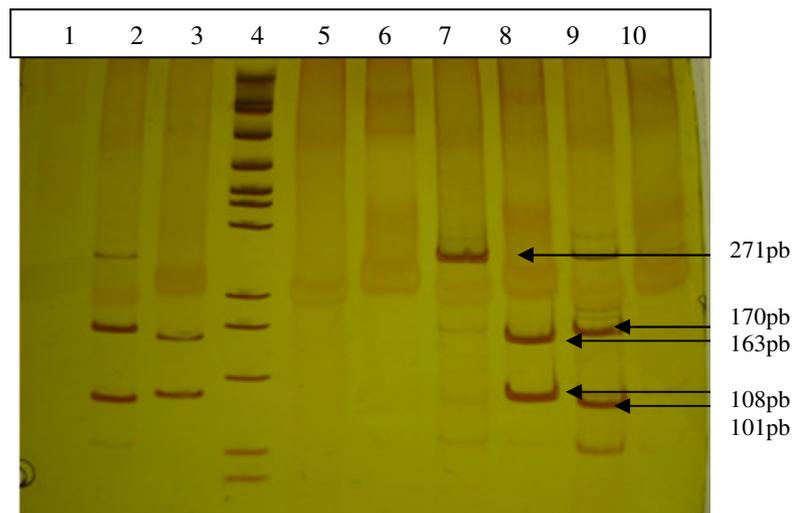


Figura 1: gel de poliacrilamida a 8% corado com nitrato de prata.

Coluna 1: controle branco; coluna 2: controle bovino digerido com enzima *HinfI*; coluna 3: controle bubalino digerido com enzima *TaqI*; coluna 4: marcador molecular; colunas 5 e 6: amostras não amplificadas; colunas 7 e 8: amostra de queijo bubalino digerido com enzimas *HinfI* e *TaqI* respectivamente; colunas 9 e 10: amostra de queijo bovino digerido com enzimas *HinfI* e *TaqI* respectivamente.

A amplificação de um fragmento relativamente pequeno de DNA (271pb) viabiliza a aplicação da técnica em produtos termicamente processados, pois o DNA quebra-se em pequenos pedaços após tratamento térmico ou degradação bacteriana (Partis *et al.*, 2000; Pascoal *et al.*, 2005; Arslan *et al.*, 2006). Assim sendo, quanto menor o fragmento a ser amplificado, maiores as chances de sucesso da técnica, sendo o ideal fragmentos menores que 200pb (Arslan *et al.*, 2006).

A escolha de fragmentos do citocromo *b* mitocondrial para amplificação de DNA foi importante, uma vez que este é mais abundante que o genômico, o que aumenta a sensibilidade da técnica, levando em consideração que as amostras de DNA são obtidas de poucas células somáticas provenientes da descamação natural do úbere de vacas saudáveis (Parson *et al.*, 2000; Partis *et al.*, 2000; Herman, 2001; Girish *et al.*, 2005; Arslan *et al.*, 2006).

A sensibilidade também se faz importante, uma vez que, quanto mais sensível, maior a capacidade do teste para detectar pequenas

porcentagens de adição de produtos de espécies diferentes (contaminação). Por isso, e também pela utilização de iniciadores espécie-específicos, nos diversos estudos já realizados sobre adulteração de queijos de búfala com leite de vaca, é possível a discriminação de adição de até 0,5% de leite de espécie diferente da declarada em queijos processados (Partis *et al.*, 2000; Herman, 2001; Lopez-Calleja *et al.*, 2005). Para tanto se faz necessária a realização da coleta de, no mínimo, três amostras (réplicas) para a análise e detecção com maior sensibilidade (Partis *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2007). As réplicas são utilizadas quando a mensuração de uma resposta está sujeita a erros de manipulação humana, ou à variação intrínseca que existe entre medidas numa mesma amostra, justificando que o seu valor médio retrataria melhor aquela resposta para um animal (Sampaio, 2002; Zhang *et al.*, 2007).

Como a utilização de kits comerciais gera certa dependência do laboratório com as empresas fabricantes e/ou importadoras, o uso da extração pela técnica da sílica apresenta um custo-benefício altamente

favorável a sua adoção na rotina laboratorial. A disponibilidade de um método analítico rápido e sensível para detecção de materiais derivados de espécies animais, proibidos ou não declarados, representa uma poderosa ferramenta para aumentar a confiabilidade da rotulagem dos produtos e o cumprimento das legislações correspondentes.

A pesquisa de mercado (Tab. 2) apresentou correspondência esperada entre o rótulo e a composição espécie-específica encontrada, exceto em uma amostra de mozzarella de búfala, onde foi encontrada contaminação com leite de vaca. A atual legislação não

exige a diferenciação de produtos obtidos de leite de vaca ou de búfala. No entanto, o uso do termo Mozzarella já indica que o produto deve ser produzido a partir do leite de búfalas, e quando se acrescenta à especificação na identificação do produto como “de búfala”, dá-se ao consumidor a falsa idéia de um derivado fabricado integralmente com o leite de búfala. Por isso faz-se necessário o estabelecimento pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, do perfil de identidade e qualidade dos produtos feitos exclusivamente a partir de leite de búfala.

Tabela 2- Resultados dos testes com amostras de queijo comerciais rotulados como fabricados com leite de búfala ou de vaca, em ensaio realizado na EV/UFMG em 2008.

Amostra	n Total	Amplificação		Cortes com enzimas para determinação espécie-específica			
		pPCR positivo	pPCR negativo	TaqI positivo	TaqI negativo	HinfI positivo	HinfI negativo
	30						
Queijo de búfala	7	7 (23,3%)	0	6 (20%)	0	1 (3,3%)	6
Queijo de vaca	23	23 (76,7%)	0	0	23 (76,7%)	23 (76,7%)	0

pPCR = produto de PCR, sem ação de enzima de restrição
n= número total de amostras analisadas

Conclusões

1. A extração de DNA de amostras de queijos baseada em solução de tiocianato de guanidina e sílica apresentou igual resultado obtido pelo kit comercial (não houve diferença significativa estatisticamente) e melhores resultados do que extrações feitas com fenol-clorofórmio ($p=0,006$).
2. A técnica de PCR-RFLP tem alta especificidade ($p<0,0001$), e por isso pode ser empregada na certificação de identidade/autenticidade de produtos lácteos.
3. A técnica PCR-RFLP detecta seqüências de DNA em amostras de derivados lácteos feitos a partir de leite pasteurizado, e produtos com adição de fermentos, viabilizando sua aplicabilidade em produtos termicamente processados e queijos diversos.

Agradecimentos

Ao Instituto de Genética Veterinária (IGEVET) – CONICET –(UNLP) – em especial aos Drs. Diego M Posik, Guillermo Giovambattista e Pilar Peral-Garcia;
Ao Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, em especial à Dra. Serena Astarita
À Associação Mineira de Criadores de Búfalos (AMB);
À (CAPES);
À FEP/MVZ.

Referências

ARSLAN, A; ILHAK, O I; CALICIOGLU, M. Effect of method of cooking on identification of heat processed beef using polymerase chain reaction (PCR) technique. *Meat Science*, v.72, p. 326-330, 2006.

- BELLIS, C; ASHTON, K J; FRENEY, L; BLAIR, B., GRIFFITHS, L R. A molecular genetic approach for forensic animal species identification. *Forensic Sci. Int.* v.134, p.99-103, 2003.
- BOOM, R; SOL, C J; SALIMANS, M M; JANSEN, C L; WERTHEIM-VAN DILLEN, P M; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* v.28, p. 495-503, 1990.
- BOTTERO, MT; CIVERA,T; ANASTASIO, A; TURI, R.M; ROSATI, S. Identification of cow's milk in "buffalo" cheese by duplex polymerase chain reaction. *J Food Prot*, v.65, n. 2, p. 362-366, 2002.
- BRANCIARI, R.; NIJMAN, I. J.; PLAS, M. E.; DI ANTONIO, E.; LENSTRA, J. A. Species origin of milk in italian mozzarella and greek feta cheese. *J Food Prot*, v.63, n. 3, p. 362-366, 2000.
- CORONA, B; LLEONARD, R; CARPIO, Y; UFFO, O; MARTINEZ, S. Short communication. PCR detection of DNA of bovine, ovine-caprine and porcine origin in feed as part of a bovine spongiform encephalopathy control program. *Spanish J agric res*, v.5, n.3, p.312-317, 2007.
- DALMASSO, A.; FONTANELLA, E.; PIATTI, P.; CIVERA, T.; ROSATI, S.; BOTTERO, M. T. A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs. *Mol. Cell Probes.* v.18, p. 81-87, 2004.
- FUMIÈRE, O.; DUBOIS, M.; BAETEN, V.; VON HOLST, C.; BERBEN, G. Effective PCR detection of animal species in highly processed animal by products and compound feeds. *Anal. Bioanal. Chem.* V.385, p.1045-1054, 2006.
- GIRISH, P S., ANJANEYULU, A S R, VISWAS, K N, SHIVAKUMAR, B M, ANAND, M., PATEL, M., SHARMA, B. Meat species identification by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) of mitochondrial 12S rRNA gene. *Meat Sci.* v.70, p.107-112, 2005.
- GOULI, Z; MINGGUANG, Z; ZHIJIANG, Z; HONGSHEG, O; QIANG, L. Establishment and application of a polymerase chain reaction for the identification of beef. *Meat Sci.* v.51, p.233-236, 1999.
- HERMAN, L. Idetermination of the animal origin of raw food by species-specific PCR. *J Dairy Res.* v.68, p.429-439, 2001.
- LOPEZ-ANDREO, M; LUGO, L; GARRIDO-PERTIERRA, A; PRIETO, M I; PUYET, A. Identification and quantification of species in complex DNA mixtures by real-time polymerase chain reaction. *Analytical Biochem*, v.339, p.73-82, 2005.
- LOPÉZ-CALLEJA, I; ALONSO, G; FAJARDO, V; RODRIGUES, M A; HERNÁNDEZ, P E; GARCÍA, T; MARTIN, R. PCR detection of cow's milk in water buffalo milk and mozzarella cheese. *I. Dairy J.* v.15, p.1122-1129, 2005.
- LOPPARELLI, R M., CARDAZZO, B., BALZAN, S., GIACCONE, V., NOVELLI, E. Real-time TaqMan polymerase chain reaction detection and quantification of cow DNA in pure water buffalo Mozzarella cheese: method validation and its application on commercial samples. *J. Agric. Food Chem.* V.55, p. 3429-3434, 2007.
- MAFRA, I., FERREIRA, I M P L V O., FARIA, M A., OLIVEIRA, B P P. A novel approach to the quantification of bovine Milk in ovine cheeses using a duplex polymerase chain reaction method. *J. Agric.food Chem.* V.52, p. 4943-4947, 2004.

MYERS, M J; YANCY, H F; FARREL, D E. Characterization of a polymerase chain reaction-based approach for the simultaneous detection of multiple animal-derived materials in animal feed. *J food prot.* v.66, n.6, p.1085-1089, 2003.

PARSON, W; PEGORARO, K; NIEDERSLATTER; FOGER, M. Species identification by means of the cytochromo b gene. *I J Legal Med.* v.114, p. 23-28, 2000.

PARTIS, L; CROAN, S; GUO, Z; CLARK, T; COLDHAM, T; MURBY, J. Evaluation of a DNA fingerprinting method for determining the species origin of meats. *Meat Sci*, v.54, p.369-376, 2000.

PASCOAL, A.; PRADO, M.; CALO, P.; CEPEDA, A.; BARROS-VELÁZQUEZ, J. Detection of bovine DNA in raw and heat-processed foodstuffs, commercial foods and specific risk materials by a novel specific polymerase chain reaction method. *Eur. Food Res. Technol.* v.220, p.444-450, 2005.

REA, S; CHIKUNI,K; BRANCIARI, 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, n. 4, p. 689-698, 2001.

SAMBROOK, J; FRITSCH, E F; MANIATIS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual.* 2ªEd. Cold Spring Harbor, 1989. 3V

SAMPAIO, I B M. *Estatística aplicada à experimentação animal.* 2ª ed. – Belo Horizonte:Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária, 2002. 265p.

SAS INSTITUTE (Cary, Estados Unidos). **SAS/STAT user's guide.** Version 8.0. Cary, 2002. 5v.

SCHÖNENBRÜCHER, H., ABDULMAWJOOD, A., GÖBEL, K A., BÜLTE, M. Detection of central nervous system tissues in meat products: Validation and standardization of a real-time PCR-based detection system. *Vet Microb.* v. 123, p.336-345, 2007.

TANABE, S. MIYAUCHI, E., MUNESHIGE, A., MIO K., SATO, C., SATO, M. PCR method of detection pork in foods for verifying allergen labeling and for identifying hidden pork ingredients in processed foods. *Biosc Biotechnol biochem.* v.71,n.7, p.1663-1667, 2007.

VERKAAR, E.L.C.; NIJMAN, I.J.; BOUTAGA, K., LENSTRA, J. A. Differentiation of cattle species in beef by PCR-RFLP of mitochondrial and satellite DNA. *Meat Sci.* v.60, p.365-369, 2002.

ZHANG, CL, FOWLER, M R; SCOTT, N W; LAWSON, G; SLATER, A. A taqMan real-time PCR system for the identification and quantification of bovine DNA in meats, milks and cheeses. *Food control.* v.18. p. 1149-1158, 2007;

CONCLUSÕES GERAIS

A técnica de PCR-RFLP tem alta especificidade ($p < 0,0001$), e por isso pode ser empregada na certificação de identidade/autenticidade de produtos de origem animal.

Esta técnica apresenta alta sensibilidade ($p < 0,0001$) para detectar adições acima de 10% de produto cárneo não rotulado, sendo possível a aplicação da técnica na inspeção de fraudes intencionais de produtos cárneos.

A extração de DNA de amostras de queijos baseada em solução de tiocianato de guanidina e sílica apresentou igual resultado obtido pelo kit comercial (não houve diferença estatisticamente significativa) e

melhores resultados do que extrações feitas com fenol-cloroformio ($p=0,006$).

A técnica de PCR-RFLP detecta seqüências de DNA em amostras cárneas autoclavadas, derivados lácteos feitos a partir de leite pasteurizado, e produtos com adição de fermentos, viabilizando a aplicabilidade dessa técnica em produtos termicamente processados e queijos diversos.

ANEXOS

Anexo 1

Regulamentos do Selo de Pureza

Art. 1o Fica instituído, no âmbito da Associação Brasileira de Criadores de Búfalos, (ABCB) o “Selo de Pureza” (Selo), cuja utilização será regida por este regulamento, sendo exclusiva dos respectivos associados, mediante assinatura e registro do “Termo de Autorização e Compromisso”, conforme minuta anexa e parte integrante do presente Regulamento, devidamente registrado no Cartório de Registro de Títulos e Documentos, para conhecimento de terceiros.

Art. 2o O Selo será exclusivamente aplicado aos derivados do leite de búfala, produzidos exclusivamente com leite de búfala, de origem conhecida da ABCB e sujeitos ao regime de controle e análise de pureza estabelecido neste Regulamento.

Art. 3o O Selo corresponderá ao modelo depositado pela ABCB junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial, observando as características e dimensões previstas na anexa Arte Final do logotipo, que fica fazendo parte integrante do presente Regulamento.

Art. 4o A autorização para a utilização do Selo, contida no acima mencionado “Termo de Autorização e Compromisso”, vigorará pelo tempo em que o produtor se mantiver associado à ABCB e cumulativamente cumprir integralmente suas obrigações previstas no presente Regulamento, devendo a utilização cessar imediatamente, caso o produtor, por qualquer motivo, deixe de ser associado à ABCB, renuncie ou tenha sua autorização cassada por descumprimento de quaisquer de suas obrigações previstas no presente Regulamento.

Art. 5o Até 30 (trinta) dias após a assinatura do “Termo de Autorização e Compromisso” o associado deverá apresentar, para exame e aprovação da ABCB, a arte final de seus rótulos, com a inclusão do Selo, devendo ater-se à forma aprovada até que qualquer alteração seja examinada e aprovada pela ABCB.

Art. 6o O controle permanente da fabricação dos derivados do leite de búfala, e da utilização do Selo, conforme prevista neste Regulamento, será feito através do Grupo Técnico de Controle (GTC), constituído dos técnicos da ABCB, presidido pelo presidente do Conselho Deliberativo Técnico (CDT) e composto, no mínimo de três e no máximo de dez membros, nomeados pela Diretoria da ABCB, mediante indicação dos associados, tendo por base os seus conhecimentos da criação de búfalas leiteiras e produção de derivados do leite de búfala. Os membros do GTC terão mandato de 2 (dois) anos, podendo ser reconduzidos. As reuniões do GTC terão periodicidade trimestral, devendo constar da agenda da reunião o exame dos relatórios de visita e análises, realizados no período. Das reuniões do GTC serão lavradas atas, que serão encaminhadas à consideração da Diretoria da ABCB, incluindo as recomendações, sugestões e medidas punitivas aprovadas pelo GTC .

Art. 7o Compete ao presidente do GTC selecionar o técnico para efetuar a visita ao laticínio, bem como contratar de forma terceirizada o Laboratório e o apoio técnico necessário ao serviço de análises dos produtos e controle da utilização do Selo, conforme previsto no presente Regulamento.

Art. 8o As práticas de controle e as análises para a confirmação da pureza dos produtos serão feitas com base nos métodos aprovados pelas autoridades italianas para a “mozzarella di bufala campana” com as modificações e adaptações que forem aprovadas pelo GTC. Garantida a pureza do produto, os produtores não serão obrigados a revelar segredos de produção ou alterar seus métodos, desde que estes sejam compatíveis com as exigências do SIF/DIPOA, do Ministério da Agricultura.

Art. 9º As vistorias nos laticínios e as análises dos produtos serão feitas com a periodicidade considerada adequada pelo GTC, devendo os técnicos conferir a origem do leite utilizado, anotar a quantidade de leite recebida e colher amostras de leite e/ou seus derivados, para posterior análise laboratorial. A critério e com a periodicidade que o GTC julgar adequada, a coleta de material para análise poderá ser feita nos pontos de venda ou consumo dos produtos.

Art. 10 Constatada em análise a presença de proteínas de leite bovino ou de origem diversa do leite de búfala em produtos autorizados a utilizar o Selo, o produtor será imediatamente notificado do laudo, sendo os técnicos deslocados para o laticínio produtor para determinar a origem da mistura. O deslocamento será feito às expensas do produtor, que, além de arcar com os custos adicionais, deverá colaborar com os técnicos para que o problema seja sanado o mais cedo possível. Uma vez sanado o problema e ainda às expensas do produtor, o GTC, a seu critério, aumentará a frequência das vistorias e das análises a serem feitas no laticínio do produtor, até que se certifique de que a mistura cessou.

Art. 11 O GTC desenvolverá e recomendará aos produtores métodos práticos de controle de pureza do leite recebido na plataforma, de forma a permitir suspeita de mistura do leite recebido. Em tal caso, a pedido do produtor, o GTC dará apoio técnico para a confirmação e origem da eventual mistura. Constatada a mistura por denúncia do próprio produtor, não será esta contada para o efeito de reincidência.

Art. 12 Constatada a reincidência de mistura, dentro do prazo de seis meses da mistura anterior, o GTC julgará, dando ao produtor ampla defesa, se o produtor agiu com culpa ou dolo, devendo, em ambos os casos, cancelar a autorização para o uso do Selo, bem como ser aplicada multa no valor de R\$5.000,00. Se o GTC entender que o produtor agiu com dolo ou má fé, proporá à Diretoria da ABCB a sua expulsão dos quadros associativos da ABCB. Art. 13 Além da contribuição associativa devida à ABCB, os produtores autorizados ao uso do Selo deverão arcar com as despesas e custos necessários ao serviço de controle de pureza dos derivados do leite de búfala através de uma contribuição adicional, de periodicidade mensal, proporcional à quantidade de leite recebida em seus laticínios. Anualmente, o GTC juntamente à Diretoria da ABCB, preparará o orçamento das despesas e custos necessários à manutenção dos serviços, determinando o valor a ser cobrado dos produtores autorizados e fixando a respectiva contribuição, acrescida de 10%, para constituição de fundo de reserva. Para a determinação da quantidade de leite recebida, será utilizada a declaração do produtor, sujeita a confirmação durante as visitas técnicas aos laticínios, observada a sazonalidade da produção do leite de búfala.

Art. 14 Os recursos provenientes da contribuição adicional dos produtores autorizados serão mantidos pela ABCB em conta bancária à parte.

Art. 15 O presente Regulamento está em vigor, devidamente aprovado pela Assembléia Geral Extraordinária da ABCB do dia 05 de agosto de 2000.

Art. 16 Como medida transitória, a autorização para o uso do Selo entrará em vigor imediatamente, mediante assinatura do compromisso dos produtores de respeitar a pureza dos derivados do leite de búfala de sua produção e declaração da quantidade de leite recebida em sua plataforma, ficando a critério do primeiro GTC escolhido iniciar as vistorias e análises com a periodicidade adequada, tão logo os recursos das contribuições adicionais o permitam, sem ônus para o Caixa da ABCB.

Art. 17 Competirá à Diretoria da ABCB resolver os casos omissos.

Art. 18 O presente Regulamento será periodicamente revisto, à luz da experiência obtida com a sua aplicação, ficando a primeira revisão prevista para agosto de 2001.

Disponível em <<http://www.criareplantar.com.br/pecuaria/bubalino/zootecnia.php?tipoConteudo=texto&idConteudo=83>>.

Anexo 2

Referências de artigos publicados durante este trabalho

A buffalo meat products certification by DNA test

L.V. Teixeira¹; C. S. Teixeira¹; E. Bastianetto²; D. A. A. Oliveira¹

Publicado em: **Italian Journal of Animal Science**. Milano-Bologna: Edizioni Avenue media, 2007. v.6. p.1207 - 1209

O leite de búfala na indústria de produtos lácteos

The water buffalo milk in milky industry

Lílian Viana Teixeira¹, Eduardo Bastianetto¹, Denise A. A. Oliveira²

Publicado em: Rev Bras Reprod Anim, Belo Horizonte, v.29, n.2, p.96-100, abril/jun. 2005.

Disponível em www.cbra.org.br.

O agronegócio de carne e de leite de búfalos no Brasil.

Bastianetto, E. 1, Teixeira, L.V.

Publicado em: ANAIS do V Simpósio do Núcleo de Estudos em Bovinocultura – 2008 – UFRRJ p.106-115.

Anexo 3

Tabela de amostragens para inspeção (MAPA)

PRODUTO	UNIDADE	QUANTIDADE	% DE UNIDADES A INSPECIONAR	PESO TOTAL DAS AMOSTRAS(kg)
INDUSTRIALIZ. (CATEGORIA 1)	Caixa	001 a 500	0,2% a 0,4%	NÃO COLETA AMOSTRA
	Fardo	501 a 2000	0,1% a 0,2%	
	Saco	2001 a 5000	0,04% a 0,1%	
	Tonel	5001 a 20000	0,02% a 0,04%	
	Granel	mais de 20001	0,01%	
PRODUTO	UNIDADE	QUANTIDADE (unidades)	% A INSPECIONAR	PESO TOTAL DAS AMOSTRAS (kg)
ENSACADOS (CATEGORIAS 2 e 3)	Saco	001 a 500	5% a 10%	1 a 3
		501 a 2000	2% a 5%	3 a 5
		2001 a 5000	1% a 2%	5 a 10
		5001 a 20000	0,5% a 1%	15 a 30
		mais de 20001	0,50%	30 a 40
PRODUTOS 'IN NATURA' (CATEGORIA 3)	Caixa	001 a 500	0,5% a 1,0%	1 a 5 ou 1 unid.
		501 a 2000	0,2% a 0,5%	5 a 10 ou 2 unid.
		2001 a 5000	0,1% a 0,2%	10 a 15 ou 3 unid.
		5001 a 20000	0,05% a 0,1%	15 a 20 ou 4 unid.
		mais de 20001	0,05%	20 a 30 ou 5 unid.
PRODUTO	UNIDADE	QUANTIDADE (ton)	NÚMERO DE SUB-AMOSTRAS	PESO TOTAL DAS AMOSTRAS (kg)
GRANÉIS (CATEGORIA 2)	Ambiente	1 a 30	20	5
		30 a 100	20 a 30	5 a 10
		100 a 1000	30 a 40	15 a 20
		1000 a 10000	40 a 50	20 a 25
		mais de 10000	50 a 60	25 a 30
PRODUTO	UNIDADE	QUANTIDADE	% A INSPECIONAR	Nº DE MUDAS
MATERIAL DE PROPAGAÇÃO VEGETATIVA (CATEGORIA 4)	MUDA Unidade	001 a 100	100%	3 a 5
		101 a 500	50% A 100%	5 a 10
		501 a 2000	25%	10 a 15
		2001 a 10000	12,5%	15 a 20
		mais de 10000	5%	20 a 30

OBSERVAÇÃO: PARA CÁLCULO DA AMOSTRAGEM DEVE SER CONSIDERADO O LOTE TOTAL