

# Metodologias para identificar adulteração em queijos produzidos com leite de diferentes espécies de animais

## Methodologies for identifying the adulterants in cheese manufactured with milk from different animal species

RIALA6/1226

Sabrina da Silva DIAS<sup>1\*</sup>, Verônica LOBATO<sup>2</sup>, Marta Regina VERRUMA-BERNARDI<sup>3</sup>

\*Endereço para correspondência: Rua Geraldo Matos Moreira, 50 - Campo Grande, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, CEP: 23087-170

<sup>1</sup>UFRRJ, Seropédica, RJ, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Tecnologia de Alimentos, UFRRJ, Seropédica, RJ, Brasil.

<sup>3</sup>Departamento de Tecnologia Agroindustrial e Sócio-Economia Rural, DTAiSER/CCA/UFSCar, Araras, SP, Brasil.

Recebido: 27.05.2009 – Aceito para publicação: 08.11.2009

### RESUMO

A adulteração de produtos lácteos pode ocorrer de diferentes formas. A diversidade de produtos e os seus valores agregados estimulam a fraude, que lesam os consumidores em relação as características sensoriais, nutricionais e preço. Diversos métodos podem ser utilizados para identificar as fraudes, pela avaliação dos distintos componentes do leite. O objetivo da presente revisão é de apresentar e discutir os métodos de referência utilizados na análise de adulteração de queijos baseados na avaliação de diferentes proteínas do leite e de suas respectivas espécies de animais dos quais originam o leite.

**Palavras-chave.** vigilância sanitária de produtos, controle e fiscalização de alimentos e bebidas, alimento, laticínios, queijo.

### ABSTRACT

Dairy products adulteration may be done by different ways. The diversity of products and their compound values favor to be deceived, and consequently cheat the consumers as for their sensory and nutritional characteristics and price. Several methodologies can be used for identifying adulterants in cheeses based on varied milk components. This review aimed to comment upon and discuss the reference methodologies employed for analyzing adulterated cheese based on the different milk proteins and the respective animal species from which the milk was originated.

**Key words.** sanitary surveillance of products, control and surveillance of foods and drinks, food, dairy products, cheese.

### INTRODUÇÃO

Estudos têm demonstrado que produtos lácteos durante décadas vêm sofrendo adulterações de diferentes formas: adição de água, soro, retirada de componentes, mistura de leite de diferentes espécies, adição de espessantes e etc. O mercado oferece uma infinidade de produtos atendendo aos interesses específicos de cada consumidor, com preços variados. Esses consumidores buscam qualidade e produtos mais saudáveis e prezam pela confiança de que estão levando o que é especificado no rótulo. Nas embalagens, a origem dos ingredientes utilizados para a fabricação deve ser relatada, pois a adição não mencionada de ingredientes fere o direito do consumidor e a legislação vigente.

São considerados matérias-primas ou produtos fraudados aqueles que apresentem “modificações espontâneas ou propositais de natureza física, química ou biológica que alterem características sensoriais, ou sua composição

intrínseca, comprometendo seu valor nutritivo. Assim, o produto pode ser considerado adulterado quanto tenha sido empregada substância de qualquer qualidade, tipo ou espécie diferente das expressas na formulação original”<sup>1</sup>.

O Código Penal Brasileiro especifica a definição de adulteração no capítulo III “Dos crimes contra a saúde pública”, no artigo 272, “Corromper, adulterar, falsificar ou alterar substâncias de produtos alimentícios destinados ao consumo, tornando-o nocivo à saúde ou reduzindo-lhe o valor nutritivo”, com pena de reclusão, de 4 a 8 anos e multa<sup>2</sup>.

O Ministério da Agricultura (MAPA), Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Código de Defesa do Consumidor respaldam o consumidor na hora de exigir as características dos produtos oferecidos no comércio do país. A RDC (Resolução da Diretoria Colegiada) n° 259, de 20 de setembro de 2002<sup>3</sup>, o Decreto-lei n° 986, de 21 de outubro de 1969<sup>4</sup>, e Portaria n° 157, de 19 de agosto de 2002<sup>5</sup>, discriminam os componentes presentes nos rótulos das embalagens de produtos de origem animal e lácteos. A rotulagem deve estar de acordo com a elaboração do produto, sua origem, peso, marca, denominação de venda, sendo obrigatórios a lista de ingredientes, a validade e o lote. Dessa forma a lei n° 8078, de 11 de setembro de 1990<sup>6</sup>, que se refere ao código de defesa do consumidor, ampara o consumidor de possíveis alterações provocadas pelo produtor na rotulagem, levando a interpretações duvidosas quanto aos componentes originais, sendo um direito básico do consumidor, a informação clara, adequada, com especificações corretas da quantidade

e qualidade do produto, além da proteção contra a publicidade enganosa no produto final.

Os produtos lácteos de caprinos, ovinos e bubalinos, além de representarem iguarias especiais, em relação às características sensoriais, como aroma e sabor, apresentam relação com razões nutricionais, econômicas e religiosas<sup>7</sup>.

As flutuações na disponibilidade do leite de outras espécies e o preço mais elevado em comparação ao bovino incentivam os produtores a fraudarem produtos como queijos<sup>8</sup>.

Para detectar as possíveis fraudes, métodos de referência podem ser utilizados se baseando na análise das diferentes proteínas do leite, caseínas e proteínas do soro. São mencionados na literatura métodos de eletroforese, imunologia, cromatografia e espectroscopia de infravermelho, que muitas vezes, além de identificarem a diferença entre os produtos, quantificam a mistura de forma confiável e sensível.

A caseína, principal proteína do leite, pode ser separada em quatro grupos: caseínas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\kappa$  e  $\gamma$ , apresentando diferenças simples na sua cadeia base de ácidos nucleicos<sup>9</sup>, segundo a espécie de origem, como pode ser exemplificado na Figura 1.

Esta revisão teve como objetivo abordar os métodos para identificação de adulteração por adição de leite de diferentes espécies em queijos, baseados nas diferenças das caseínas entre as espécies, como representado na Tabela 1, visando garantir a qualidade e segurança dos produtos adquiridos pelos consumidores.

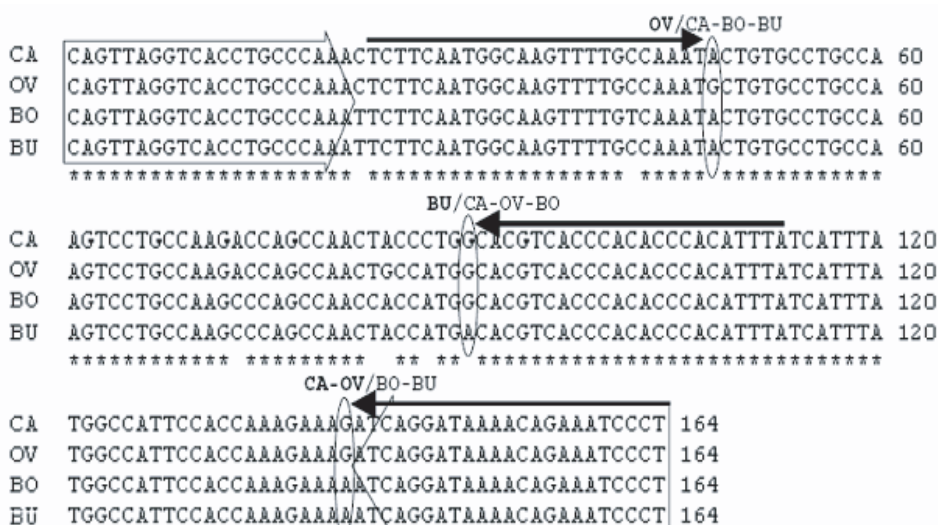


Figura 1. Diferenças na seqüência multiplex da  $\kappa$  caseína no leite segundo a espécie de origem. Fonte: REALE *et al*, 2008<sup>19</sup>

**Tabela 1.** Métodos aplicados à análise de adulteração por técnicas protéicas

Métodos de identificação		Proteína analisada	Referência
Eletroforéticos	Gel de Poliacrilamida com sódio dodecil sulfato (SDS - PAGE)	$\beta$ - caseína	47, 45,32
	Gel de Poliacrilamida com Uréia (Uréia - PAGE)	$\alpha_{\sigma_1}$ - caseína	
	Bidimensional (2D-PAGE)	$\alpha_{\sigma_2}$ - caseína	
	Focagem isoelétrica (IEF)	$\gamma$ - caseína Para- $\kappa$ - caseína	
Imunoenzimático ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)	Elisa Indireto	Anticorpos Monoclonais	10, 12, 17, 18, 48
	Elisa Sanduíche	Anticorpos Policlonais	
		$\beta$ - caseína	
		$\gamma$ - caseína	
Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	Multiplex Simplex	DNA mitocondrial	24, 28, 19, 26, 23, 21, 22, 27, 25
	Duplex	Células Somáticas Leucócitos	
	SYBR Green Real -Time (restrição enzimática)	Epitéliomamário	
	SSCP ( Single- Stranded Conformation Polymorphism)	$\beta$ - caseína	
	RFLP ( Restricion Fragment Length Polymorphism)		
Espectroscopia Infravermelho	Near Infrared spectroscopy		44, 39, 40, 38
HPLC (High-performance Liquid Chromatography)	IE-HPLC (Íon Exchange HPLC)	$\beta$ - caseína	45, 47, 46
	RP-HPLC (Reverse -phase HPLC)	$\alpha_{\sigma_1}$ - caseína	
		$\alpha_{\sigma_2}$ - caseína	
		$\gamma$ - caseína $\kappa$ - caseína	

## MÉTODOS IMUNOLÓGICOS

Diversos métodos imunológicos, para detecção de caseína bovina, podem ser encontrados na literatura<sup>10</sup>. No início dos anos 70, o desenvolvimento de técnicas imunológicas que utilizavam a enzima como marcador tornou esses testes aplicáveis a alimentos<sup>8</sup>.

A técnica imunológica está baseada na presença de antígenos e anticorpos em uma amostra, no caso, frações específicas de proteínas do leite bovino. Como anticorpos, são utilizados os monoclonais, (células homogêneas derivadas de uma célula produtora de anticorpos, onde todos os anticorpos possuem a mesma especificidade necessária para um antígeno), ou policlonais (clones de células únicas propagadas em meio de cultura com uma única especificidade), altamente específicos, que ao reagirem formam um complexo antígeno-anticorpo precipitado<sup>11</sup>. Segundo Hurley (2004)<sup>12</sup> o tipo de anticorpo

utilizado pode alterar a eficiência do ELISA: os anticorpos policlonais podem ser menos específicos que os anticorpos monoclonais. Segundo Benjamini (2002)<sup>11</sup>, esse fato pode ser devido à reação cruzada de anticorpos policlonais, onde essas células, tendo especificidade um pouco menor, reagem com duas moléculas que apresentam o mesmo antígeno, mas que são diferentes em outros aspectos.

Embora haja outras técnicas para análise de adulteração baseada na determinação de proteínas, o método imunológico ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent assay ou Ensaio de Imunoabsorção ligado à enzima) mantém-se como alternativa viável devido a sua simplicidade, baixo tempo de elaboração, especificidade e sensibilidade<sup>13</sup>, além de não requerer equipamentos especializados<sup>14</sup>. Para Richter (1997)<sup>10</sup>, o ELISA indireto apresenta sensibilidade de 1 – 10% em leite ou queijo, e o ELISA sanduíche apresenta limite de detecção de 0,5% na mistura desses mesmos produtos.

O teste ELISA está caracterizado como imunoen-saio de fase sólida e aproveita a propriedade dos plásticos de adsorver proteínas na superfície em forma de camada única, permitindo que a maioria do antígeno possa reagir com anticorpos correspondentes, marcados com uma enzima que poderá ser detectada por colorimetria quando adicionado substrato<sup>11</sup>.

Existem duas variações para o teste ELISA, segundo Asensio *et al.* (2008)<sup>14</sup>: o ELISA indireto, utilizando dois anticorpos, um específico ao antígeno e outro conjugado à enzima. Neste, o segundo anticorpo dará a reação enzimática, que quando presente poderá ser observada e quantificada por diferentes técnicas. Na segunda forma mais utilizada, o ELISA sanduíche, o antígeno é colocado entre dois anticorpos, para detecção e captura do anticorpo e um dos anticorpos estará conjugado com a enzima para que possa ser analisada a formação do complexo, por técnicas como cromatografia, fluorescência e densitometria. Dessa forma, os testes ELISA podem apresentar resultados de forma qualitativa e quantitativa.

Os testes imunológicos são baseados, principalmente, na caseína como antígeno, devido a sua estabilidade a tratamentos térmicos<sup>15,16</sup>, o que possibilita a utilização destes em análises de produtos lácteos pasteurizados<sup>12</sup>. As principais frações da caseína analisadas são as  $\beta$ -caseína,  $\alpha_2$ -caseína,  $\kappa$ -caseína e a imunoglobulina IgG<sup>10,12,17,18</sup>. O limite de detecção desses marcadores pode detectar até 0,1% de antígeno bovino em leite de outras espécies<sup>12</sup>.

## MÉTODOS BASEADOS EM DNA

A técnica de PCR (Polymerase chain Reaction ou Reação em cadeia da polimerase) baseia-se na análise de DNA, amplificando fragmentos de DNA mitocondrial de células somáticas, leucócitos, células mamárias e  $\beta$ -caseína<sup>19</sup>.

É possível extrair DNA de produtos lácteos processados utilizando *primers* (Oligonucleicos específicos), codificando a sequência do gene desejado, amplificando e identificando por eletroforese<sup>8</sup>.

Essa técnica possibilita que sequências de DNA sejam multiplicadas em milhões de cópias, facilitando sua análise genética, aumentando a sensibilidade, especificidade e analisando um grande número de amostras simultaneamente. Esse processo se assemelha ao processo de replicação de células vivas<sup>20</sup>.

Os *primers* padrões, para análise da sequência amplificada podem ser produzidos através de análise do sangue dos animais alvos ou consultando bibliotecas virtuais como GenBank Database, no site (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)<sup>21,19,22</sup> e “HUSAR” (<http://genome.dkfz-heidelberg.de/menu/husar>)<sup>23</sup>.

Essa técnica apresenta sensibilidade alta, de acordo com Feligini *et al.* (2005)<sup>21</sup>, no nível de 0,5% de mistura de espécies, podendo chegar a 0,1% de limite de detecção<sup>22</sup>, para Masková & Paulicková (2006)<sup>7</sup> essa sensibilidade não ultrapassa o limite de 1% de mistura. Sua alta sensibilidade e especificidade na análise de adulterações compensam o preço alto da técnica, sendo amplamente utilizada na Europa.

Diferentes técnicas podem ser utilizadas na ampliação desses fragmentos de DNA como: Multiplex-PCR<sup>24,22,21,19</sup>, Simplex-PCR<sup>24</sup>, SSCP-PCR (Single-Stranded Conformation Polymorphism, analysis)<sup>23,25</sup>, Duplex-PCR<sup>26,27</sup>, SYBR-Green Real-Time-PCR<sup>21</sup> e RFLP-PCR (Restriction Fragment Length Polymorphism)<sup>24,25</sup>.

A identificação dessas espécies utiliza a técnica de eletroforese, mas comumente, com gel de agarose<sup>24,22,21,19,26,28</sup> e em alguns casos gel de poliacrilamina<sup>23</sup>.

Técnicas como SSCP e RFLP-PCR, possibilitam analisar sequência de DNA que podem sofrer polimorfismo genético como no caso da  $\beta$ -caseína e  $\kappa$ -caseína, que apresentam formas distintas, a  $\beta$ -caseína A e B e  $\kappa$ -caseína K2 e KY, que apresentam corrida diferente na análise por eletroforese. No leite de búfala esta variação é rara, porém abundante no leite bovino<sup>29,30</sup>.

## MÉTODOS ELETROFORÉTICOS

A eletroforese vem do grego “transporte por eletricidade”, onde as proteínas migram submetidas a um campo elétrico, as cargas positivas e negativas são atraídas para seus pólos contrários correspondentes e assim sendo possível sua separação e identificação. Além de sua carga, sua forma, tamanho e associação com outros íons, podem alterar sua mobilidade<sup>31</sup>.

Essa técnica apresenta alta sensibilidade, porém com percentuais distintos conforme o tipo, segundo Egito *et al.* (2006)<sup>32</sup>, o método Ureia-PAGE (Gel de poliacrilamina contendo ureia) pode detectar em torno de 2,5% de adição de leite bovino em outras espécies e 1% de leite misturado através do método de IEF (Isoelectric Focusing ou Focalização Isoelétrica). Dennis (1998)<sup>33</sup>, utilizando EC (Eletroforese Capilar) relata limite de

detecção de fraude ao redor de 2,5%, empregando o modo de separação Ureia-PAGE e Borková & Snaselová (2005)<sup>13</sup>, através de IEF, relataram a possibilidade de detecção de 0,5% e 1% de adição de leite por fraude. Esta diferença de sensibilidade está no tipo de separação das proteínas nos diferentes meios, dessa forma o objetivo da separação indicará o tipo de eletroforese selecionado.

O método de Ureia-PAGE separa por diferença na carga elétrica e o SDS-PAGE (Gel de Poliacrilamida com sódio dodecil sulfato) por tamanho da molécula, esses dois tipos podem separar por grupos de proteínas e variações genéticas<sup>32,34</sup>. Na IEF, os diferentes pontos isoeletrônicos, onde a carga dos compostos é nula, determinam a individualidade das caseínas em gradiente de pH desejado. Sendo este um método oficial para a União Europeia, onde a EC 213/2001<sup>35</sup>, anexo XV, especifica a metodologia para identificação de adulteração analisando - caseína, podendo ser utilizada em produtos lácteos processados e crus<sup>13</sup>.

Na eletroforese capilar, a separação é feita por diferença na carga das proteínas analisadas, técnica também conhecida como Eletroforese Capilar em Zona (CZE)<sup>36,37</sup>. Na eletroforese bidimensional, há separação das proteínas de idêntico massa molar, porém com diferentes pontos isoeletrônicos, e vice-versa, pois soma a separação pelo método SDS-PAGE com a IEF<sup>31</sup>.

## MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS

Nos últimos anos, uma nova técnica para determinação de proteínas se apresentou como alternativa para análise na indústria de alimentos. A espectroscopia de infravermelho pode ser utilizada para identificação de componentes do alimento, assim como sua quantificação, tendo a vantagem de ser um método rápido, podendo chegar a 400 amostras/h, com custo moderado de equipamentos, facilidade de preparação da amostra, podendo ser realizada muitas vezes no alimento íntegro<sup>38,39</sup>.

Este método analisa vários parâmetros ao mesmo tempo, podendo separar proteína, caseína e proteína do soro<sup>40</sup>, lipídios, lactose, cinzas, entre outros<sup>41</sup>, além de verificar vários tipos de adulteração, como no relato de Sato et al (1990)<sup>42</sup> onde a mistura de gordura animal e vegetal puderam ser analisadas em manteiga, Frankheizen (1992)<sup>43</sup> analisou o tempo de maturação de queijo Edam e Gouda com até sete meses, já que estes são vendidos com preço decorrente do seu tempo de maturação. González-Martin et al. (2007)<sup>44</sup> analisaram o percentual de adição

de leite de diferentes espécies ao longo de seis meses de maturação, sendo possível detectá-los com segurança, após este período, se mostrando uma alternativa no combate a adulteração de queijos maturados em comparação com HPLC que analisa com limite de 4 a 8 semanas de maturação.

A técnica para análise das matérias-primas de diferentes espécies se baseia nos diferentes picos espectrais apresentados pelas proteínas das distintas espécies após sofrerem isolamento, com alteração de pH, dessa forma uma análise estrutural dos grupos funcionais presentes em determinadas regiões do espectro, a partir de seus perfis característicos, podem ser quantificados através de curvas analíticas<sup>38</sup>.

## MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

Técnicas de cromatografia líquida (HPLC) estão entre as técnicas para separação de proteínas, as mais utilizadas são RP-HPLC (Reverse-phase High Pressure Liquid Chromatography ou cromatografia de fase reversa), onde as substâncias são separadas devido a diferença de hidrofobicidade, e IE-HPLC (Íon Exchange HPLC ou Cromatografia de troca iônica), onde a separação se baseia na diferença de afinidade dos íons com a coluna, ou outro componente, como pH, força iônica da coluna, que podem variar dependendo das proteínas analisadas<sup>45,13</sup>.

Borvoká & Snaselová (2005)<sup>13</sup> em sua revisão apresentaram as duas técnicas com finalidade de identificar e quantificar a presença de proteínas do soro,  $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactoglobulina, com detecção da origem do leite adicionado na quantidade mínima de 2%<sup>13</sup>, ou 1%<sup>46</sup>.

Mayer (2005)<sup>45</sup> utilizou a IE-HPLC para separar proteínas do leite, como a  $\alpha_{s1}$ -caseína e para-k-caseína, em leites e queijos frescos. Haza *et al* (2005)<sup>47</sup> relatou as duas técnicas de HPLC para separação das proteínas e posterior caracterização por ELISA.

Desta forma podemos concluir, que as técnicas de detecção de adulteração de queijos com leite de diferentes espécies são muito pertinentes e sensíveis, na função de garantir a segurança do consumidor em relação aos produtos adquiridos no comércio varejista.

## REFERÊNCIAS

1. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952. Aprova o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Diário Oficial [da] União, Brasília, DF, 2007; p.10785, 07 de jul de 1952 Seção 1.
2. Constituição Federal. Lei 11.101, de 9 fevereiro de 2005. Capítulo III Dos crimes contra saúde pública, art. 272. Código Penal. Código de Processo Penal Organização Luiz Flávio Gomes, 9 Ed. Ver., ampl., e atual. SP. Editora Revista dos Tribunais, RT minicódigos; 2007: 310.
3. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC n 259 de 20 de setembro de 2002. Aprova o Regulamento técnico sobre rotulagem de alimentos embalados. Diário Oficial [da] Republica Federativa do Brasil. Brasília, DF, 23 de set. de 2002, Seção 1.
4. Brasil. Ministério da Marinha de Guerra, Ministério do Exército, Ministério da Aeronáutica Militar. Decreto-lei n 986 de 21 de outubro de 1969. Institui normas básicas sobre alimentos. Diário Oficial [da] Republica Federativa do Brasil. Brasília, DF, p. 8935 de 21 out. de 1969.
5. Brasil. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comercio Exterior. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). Portaria n 157, de 19 de agosto de 2002. Aprova o Regulamento técnico metroológico estabelecendo a forma de expressar o conteúdo líquido a ser utilizado nos produtos pré-medidos. Diário Oficial [da] Republica Federativa do Brasil. Brasília, DF, 20 de ago 2002, Seção 1.
6. Brasil. Congresso Nacional. Lei nº 8078 de 11 de setembro de 19990 (Código de Defesa do Consumidor). Dispõe sobre a proteção do consumidor e dá outras providencias. Diário Oficial [da] Republica Federativa do Brasil. Brasília, DF, 12 de set de 1990, Suplemento.
7. Mosková E, Paulicková I. PCR-Based detection of cow's milk in goat and sheep cheeses marketed in the Czech Republic. *Czech Journal Food Science* 2006; 24(3): 127-32.
8. Veloso ACA. Detecção de Adulteração em produtos alimentares contendo leite e/ou proteínas lácteas. *Química Nova* 2002; 25(4): 609-15.
9. Sgarbieri VC. Revisão: Propriedades Estruturais e Físico-Químicas das Proteínas do Leite. *Brazilian Journal of Food Technology* 2005; 8(1): 43-56.
10. Richter W, Krause I., Graf C, Sperrer I., Schwarzer C, Klostermeyer H. An indirect competitive ELISA for the detection of cow's milk and caseinate in goat's and ewes' milk and cheese using polyclonal antibodies against bovine  $\gamma$  - caseins. *Z Lebensm Unters Forsch A* 1997; 204 : 21-6.
11. Benjamini E, Coico R, Sunshine G. Interações Antígeno-Anticorpo, Imunoensaios e Sistemas Experimentais. In: *Imunologia*. 4ª ed. São Paulo: Ed Guanabara Koogan S.A; 2002. p. 51-68
12. Hurley IP, Coleman RC, Ireland HE, Williams HH. Measurement of bovine IgG by indirect Competitive ELISA as a means of detection milk adulteration. *Journal Dairy Science* 2004; 87: 543-9.
13. Borková M, Snáselová J. Possibilities of different animal milk detection in milk and dairy products – a review. *Czech Journal Food Science* 2005; 23(2): 41-50.
14. Asensio L., González I., García T, Martín R. Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Food Control* 2008; 19(1): 1-8.
15. Douglas FW, Greenberg R, Farrell Jr HM, Edmondson LF. Effects of ultra-high-temperature pasteurization on milk proteins. *Food Agriculture Food Chemistry* 1981; 29(1):11-5.
16. Pintado ME, Malcata FX. Effect of thermal treatment on the protein profile of whey from ovine and caprine milk throughout lactation. *International Dairy Journal* 1996; 6: 497-518.
17. Haza AI, Morales P, Martín R, García T, Anguita G, Sanz B, Hernández PE. Detection and Quantification of goat's cheese in ewe's cheese using a monoclonal antibody and two ELISA formats. *Journal of the Science of food and agriculture* 1999; 79: 1043-7.
18. Haasnoot W, Smits NGE, Kemmers-Voncken AEM, Bremer MGEG. Fast Biosensor immunoassays for the detection of cow's milk in the milk of ewes and goats. *Journal of Dairy Research* 2004; 71: 322-9.
19. Reale S, Campanella A, Mergiolli A, Pilla F. A novel method for species identification in milk and milk-based products. *Journal of dairy Research* 2008; 75:107-12.
20. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária [EMBRAPA]. Fundamentos teórico-prático e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio de reação em cadeia de polimerase [Recurso Eletrônico]. São Carlos: EMBRAPA Pecuária Sudeste. Disponível em: <http://www.cppse.embrapa.br/publicacaogratis/e-books/LVFundDNA.pdf>. 2007.
21. Felligini M, Bonizzi I., Curik VC, Parma P, Greppi GF, Enne G. Detection of Adulteration in Italian Mozzarella Cheese Using Mitochondrial DNA Templates as Biomarkers. *Food Technology Biotechnology* 2005; 43(1): 91-5.
22. López-Calleja I, González -Alonzo I, Fajardo V, Rodríguez, MA, Hernández PE., García T, Martín R. PCR detection of cow's milk in water buffalo milk and Mozzarella cheese. *International Dairy Journal* 2005; 15: 1122-9.
23. Plath A, Krause, I., Einspanier, R. Species Identification in dairy products by three different DNA-based techniques. *Z Lebensm Unters Forsch A* 1997; 205: 437-41.
24. Bottero, M.T., Civera, T., Nucera, D., Rosati, S., Sacchi, P., Turi, R.M. A multiplex polymerase chain reaction for the identification of cow's, goat's and sheep's milk in dairy products. *International Dairy Journal* 2003; 13: 277-82,.
25. Bania, J.; Ugorski, M.; Polanowski, A.; Adamczyk, E. Application of polymerase chain reaction for detection of goat's milk adulteration by milk of cow. *Journal of Dairy Research* 2001; 68: 333-6.
26. Rea, S., Chikuni, K., Branciarri, 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* 2001; 68: 689-98.
27. 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. *Journal of agricultural and food chemistry* 2004; 52: 4943-7.
28. Feligini, M., Alim, N., Bonizzi, I., Enne, G., Aleandri, R. Detection of cow milk in water buffalo cheese by SYBR Green Real-Time PCR: Sensitivity Test on Governing Liquid Samples. *Pakistan Journal of Nutrition* 2007; 6(1): 94-8.
29. Aschaffenburg, R.; Sen, A.; Thompson, P. The Casein of Buffalo Milk. *Comp. Biochem. Physiol.* 1968; 27: 621 – 3.
30. Otaviano, A.R.; Tonhati, H.; Sena, J.A.D.; Muñoz, M.F.C. Kappa –casein gene study with molecular markes in female buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Genetics and Molecular Biology* 2005; 28(2): 237-41.

31. Silva, C.L.S.P. Eletroforese Bidimensional: Princípios e Aplicações. *Ciências Agrárias e Saúde* 2002; 2(1): 74-8.
32. Egito, A.S., Rosinha, G.M.S., Laguna, L.E., Miclo, L., Girarder, J.M., Gaillard, J.L. Método eletroforético rápido para detecção da adulteração do leite caprino com leite bovino. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 2006; 58(5): 932-9.
33. Dennis, M.J. Recent developments in food authentication. *Analyst* 1998; 123: 151R-156R.
34. Amigo, L.; Ramos, M.; Martin-Alvarez, P.J. Effect of technology parameters on electrophoretic detection of cow's milk in ewe's milk cheeses. *Journal Dairy Science* 1991; 74: 1482-90.
35. European Commission. EC 213/2001 Methods for the analysis and quality evaluation of milk and milk products. *Official Journal of the European Communities* 2001; 44:L.37/1 –L37/99.
36. Silva, J.A.F Da. Terminologia para técnicas analíticas de eletromigração em capilares. *Química Nova* 2007; 30(3): 740-4.
37. Molina, E.; Frutos, M. De; Ramos, M. Capillary electrophoresis characterization of the casein fraction of cheeses made from cow's, ewes' and goats' milks. *Journal of Dairy Research* 2000; 67: 209-16.
38. Rodriguez-Otero, J.L.; Hermida, M.; Centeno, J. Análisis of dairy products by near infrared spectroscopy: A review. *Journal Agriculture Food Chemistry* 1997; 45(8): 2815-9.
39. Pappas, C.S.; Tarantiles, P.A.; Moschopoulou, E.; Moatsou, G.; Kandarakis, I. Identification and differentiation of goat and sheep milk based on diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy (DRIFTS) using cluster analysis. *Food Chemistry* 2008; 106: 1271-7.
40. Qiaoqian, L.; Puhon, Z. Determination of protein and casein in milk by fourth derivative UV spectrophotometry. *Analytica Acta* 1999; 393: 227-34.
41. Barbano, D.M.; Dellavalle, E. Rapid method for determination of milk casein content by infrared analysis. *Journal of Dairy Science* 1987; 70:1524-8.
42. Sato, T.; Kawano, S. Detection of Foreign fat adulteration of milk fat by near infrared spectroscopic method. *Journal of Dairy Science* 1990; 73: 3408-13.
43. Frankhuizen, R. Near infrared analysis of dairy products. In: Burns, D.A, Churczak, E.W. *Handbook of near infrared analysis*. EUA: Ed Marcel Dekker; 1992.
44. González- Martín, I., Hernández-Hierro, J.M., Morón - Sancho, R., Salvador- Esteban, J., Vivar- Quintana, A., Revilla, I. Determination of the percentage of milk (cow's, ewe's and goat's) in cheese with different ripening times using near infrared spectroscopy technology and a remote reflectance fibre-optic probe. *Analytica Chimica Acta* 2007; 604:191-6.
45. Mayer, H.K. Milk species identification in cheese varieties using electrophoretic, chromatographic and PCR techniques. *International Dairy Journal* 2005;15: 595-604.
46. Romero, C.; Perez-Andújar, O.; Olmedo, A.; Jiménez, S. Detection of cow's milk in ewe's or goat's milk by HPLC. *Chromatographia* 1996; 42(3/4): 181-04.
47. Haza, A. I., Morales, P., Martín, R., García, T., Anguita, G., Gonzalez, I., Sanz, B.; Hernandez, P.E. Immunoreactivity of Goat's Milk Casein Fractionated by Ion-Exchange Chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 2005; 43: 2025-9.
47. Basch, J.J., Douglas, Jr, F.W., Procino, L.G., Holsinger, V.H., Farrell, Jr, H.M. Quantitation of caseins and whey proteins of processed milks and whey protein concentrates, application of gel electrophoresis, and comparison with Harland-Ashorth Procedure. *Journal Dairy Science* 1985; 68(1): 23-31.
48. Anguita, G., Martín, R., García, T., Morales, P., Haza, A.I., González, I., et al. Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Bovine Milk in Ovine and Caprine Milk and Cheese Using a Monoclonal Antibody against Bovine -Casein. *Journal of Food Protection* 1997; 60(1): 64-6.