UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

DETECÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DE CARNES DE ESPÉCIES DE AÇOUGUE POR PCR EM TEMPO REAL MULTIPLEX E ANÁLISE DE "HIGH RESOLUTION MELTING"

Thaís Alves Fernandes

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

DETECÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DE CARNES DE ESPÉCIES DE AÇOUGUE POR PCR EM TEMPO REAL MULTIPLEX E ANÁLISE DE "HIGH RESOLUTION MELTING"

Thaís Alves Fernandes

Orientadora

Profª Drª. Simone Pereira Mathias

Co-orientador

Prof. Dr. Márcio Reis Pereira de Sousa

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de Concentração em Tecnologia de Alimentos.

Seropédica, RJ

Maio de 2019.

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

F363d

FERNANDES, THAIS ALVES, 1985-
DETECÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DE CARNES DE ESPÉCIES DE AÇOUGUE POR PCR EM TEMPO REAL MULTIPLEX E ANÁLISE DE "HIGH RESOLUTION MELTING" / THAIS ALVES FERNANDES. - 2019.
46 f.

Orientadora: SIMONE PEREIRA MATHIAS.
Coorientador: MÁRCIO REIS PEREIRA DE SOUSA.
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2019.

1. multiplex. 2. fraude. 3. carnes. 4. autenticação. 5. molecular. I. MATHIAS, SIMONE PEREIRA, 1973-, orient. II. SOUSA, MÁRCIO REIS PEREIRA DE, 1972-, coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. IV. Título.

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001"

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

THAIS ALVES FERNANDES

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, área de Concentração em Tecnologia de Alimentos.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 08/05/2019

Dr. Márcio Reis Pereira de Sousa, UFRRJ

Dr. Huarrisson Azevedo Santos, UFRRJ

Dr. Ramon Loureiro Pimenta, Universidade de Vassouras

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, pela compreensão, pelas orações, pela paciência e pelo apoio.

Ao Luiz Cláudio Emiliano Alves (Fiota) *in memoriam*, por ser responsável pelos valores de vida que carrego comigo e por sempre ter acreditado na minha caminhada.

Ao Márcio Reis Pereira de Sousa pela confiança, dedicação, apoio e por demonstrar que a função de um professor pode ir muito além dos ensinamentos acadêmicos me fazendo enxergar e acreditar no meu potencial.

À Renatha Bárcia pela paciência, compreensão e incentivo.

À Patrícia Paulino, pelos ensinamentos, pelo tempo dedicado e pelo incentivo.

À Fabiana Fróes, irmã que sempre acreditou e sonhou junto comigo.

Ao Paulo Cezar da Cunha Júnior, amigo que encontrei durante o curso de pós-graduação, e que se tornou um ponto de apoio fundamental durante todo percurso.

E por fim, a todos os amigos pela compreensão devido minha ausência, pela força e pelo apoio dedicado, em especial: Anderson Saraiva, Raphael Ferreira, Jéssica Moreira, Kátia Mah Lee, Fabíola Cardoso, Maria da Conceição Gomez, Aline Peixoto e Wilson Pires.

“A persistência é o caminho do êxito”

Charles Chaplin

RESUMO

Fernandes, Thais Alves. **DETECÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DE CARNES DE ESPÉCIES DE AÇOUGUE POR PCR EM TEMPO REAL MULTIPLEX E ANÁLISE DE "HIGH RESOLUTION MELTING".** 2019. 46 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Ciência de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

As fraudes intencionais ou incidentais em carnes e produtos cárneos pela substituição de espécies de animais de açougue, ocorrem de forma recorrente, constituindo-se como uma preocupação premente de entidades governamentais voltadas para a garantia da qualidade de alimentos e direitos do consumidor. Esta prática pode causar prejuízos econômicos além de elevado impacto negativo para a indústria produtora de alimentos e para os consumidores, seja por questões, morais, éticas, religiosas ou relacionadas à saúde pública. O desenvolvimento de novas tecnologias permitiu aos estabelecimentos industriais a criação de produtos mais elaborados, diversificados e com características cada vez mais complexas. Diversos métodos analíticos vêm sendo desenvolvidos, com a intenção de detectar fraudes pela substituição de tipos de carne de uma espécie animal por outra de menor valor auxiliando no reconhecimento da autenticidade dos produtos cárneos. O presente trabalho teve como objetivo padronizar uma Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR) Multiplex e "High Resolution Melting" (HRM) para detectar e diferenciar tipos de carnes de animais de açougue e derivados. A reação *singleplex* da espécie *Gallus gallus* apresentou limite de detecção dez cópias do genoma, com um coeficiente de determinação (R^2) de 0,991 e uma eficiência de 105%. A reação da espécie *Sus scrofa* apresentou um limite de detecção de 1 cópia, com R^2 0,999 e eficiência de 105%. As reações das espécies *Equus caballus* e *Bos indicus* apresentaram limite de detecção de uma cópia do genoma, R^2 de 0,999 e 0,996 e eficiência de 98% e 94,8%, respectivamente. Os resultados obtidos demonstraram que as reações *singleplex*, foram específicas, sensíveis e aplicáveis na identificação de espécies animais em produtos cárneos. A reação *multiplex* pode ser utilizada para detecção e identificação de diferentes espécies de animais de açougue em uma única reação.

Palavras-chaves: multiplex, fraude, carnes, autenticação, molecular.

ABSTRACT

Fernandes, Thais Alves. **DETECTION AND DIFFERENTIATION OF MEAT OF SLAUGHTER'S SPECIES BY REAL TIME PCR MULTIPLEX AND HIGH RESOLUTION MELTING.** 2019. 46 p. Dissertation (Master Science in Food Science and Techonology, Food Science). Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

The intentional or incidental frauds in meat and meat products by the substitution of species of animals of butcher, occur in a recurring form, constituting as a pressing concern of governmental entities focused on the guarantee of the quality of food and consumer rights. This practice can cause economic losses as well as high negative impacts for the food producing industry and for consumers, whether for moral, ethical, religious or public health issues. The development of new technologies allowed industrial establishments to create more elaborate, diversified products with increasingly complex characteristics. Several analytical methods has been developed with the intention of detecting fraud by replacing types of meat from one animal species with another of smaller value, helping to recognize the authenticity of meat products. The aim of the present work was to standardize a Real Time Polymerase Chain Reaction (qPCR) Multiplex and High Resolution Melting (HRM) technique to detect and differentiate meat types from butchers and derivatives. The singleplex reaction of the specie *Gallus gallus* showed limit of detection of ten copies, with a coefficient of determination (R^2) of 0.991 and an efficiency of 105%. The reaction of the species *Sus scrofa* presented detection limit of 1 copie, with R^2 0.999 and an efficiency of 105%. Reactions of the species *Equus caballus* and *Bos indicus* showed limit of detection of 1 copy, R^2 of 0,999 and 0,996 and efficiency of 98 and 94,8%, respectively. The results showed that the singleplex reactions were specific, sensitive and applicable in the identification of animal species in meat and meat products. The multiplex reaction can be used to detect to identify different species of butcher animals in a single reaction.

Keywords: multiplex, fraud, meat, authentication, molecular.

LISTA DE ABREVIAÇÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS

CA – Califórnia

Cq – Ciclo de quantificação

Cyt b – Citocromo b

DE – Delaware

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

dsDNA – DNA double stranded (DNA fita dupla)

ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ensaio de imunoadsorção enzimática)

FAO – Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura

HRM – High Resolution Melting

IEF – Focalização isoelétrica

MA – Massachusetts

MIQE – Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments

NCBI – National Center for Biotechnology Information

ng – Nanogramas

nM – Nanômetro

OECD – Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico

PAGE – Polyacrylamide Gel Electrophoresis

PBS – Phosphate Buffered Saline (tampão fosfato-salino)

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

qPCR – PCR em tempo real

R^2 - Coeficiente de determinação

RIISPOA – Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal

RNA – Ácido Ribonucléico

RTIQ – Regulamento Técnicos de Identidade e Qualidade

SDS-PAGE – Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis

Tm – Melting Temperature

USA – United States of America

UV – Ultravioleta

µl – Microlitro

°C – Celsius

ΔRn – Variação intensidade do sinal de fluorescência

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Casos de fraudes de acordo com a categoria alimentar 06

Figura 2 – Curva de predição das curvas de fluorescência e dos perfis de desnaturação dos produtos da qPCR gerados pelos quatro pares de oligonucleotídeos.....19

Figura 3 – Gel de agarose 2% corado em brometo de etídio e visualização dos produtos amplificados sob luz UV para avaliação do gradiente de temperatura durante padronização e otimização da etapa de anelamento da qPCR.....21

Figura 4 – Curva padrão obtida pela regressão linear dos ciclos de quantificação (Cq) plotados a partir de diluições decimais em série do "amplicon", contendo o gene *Cyt b* da espécie *Gallus gallus*.....22

Figura 5 – Curva padrão obtida pela regressão linear dos ciclos de quantificação (Cq) plotados a partir de diluições decimais em série do "amplicon", contendo o gene *Cyt b* da espécie *Sus scrofa* 23

Figura 6 – Curva padrão obtida pela regressão linear dos ciclos de quantificação (Cq) plotados a partir de diluições decimais em série do "amplicon", contendo o gene *Cyt b* da espécie *Equus caballus*..... 24

Figura 7 – Curva padrão obtida pela regressão linear dos ciclos de quantificação (Cq) plotados a partir de diluições decimais em série do "amplicon", contendo o gene *Cyt b* da espécie *Bos indicus*.....25

Figura 8 – Curvas de dissociação realizada pela análise de "High Resolution Melting" (HRM) utilizada para análise dos produtos da qPCR.....27

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Participação brasileira no mercado mundial de carnes em 2016.....04

Quadro 2 – Combinações das concentrações de oligonucleotídeos iniciadores para otimização da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR) para detecção de carne de espécies de açougue.....16

Quadro 3 – Oligonucleotídeos iniciadores desenhados de acordo com cada espécie animal determinada para a reação multiplex.....18

Quadro 4 – Tm encontrada durante padronização da reação multiplex.....27

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO 1
2- OBJETIVOS 2
2.1- Objetivo Geral 2
2.2- Objetivos Específicos 2
3- REVISÃO DE LITERATURA 3
3.1- A produção e o consumo de carnes no Brasil e no Mundo 3
3.2- A carne na alimentação humana 4
3.3- Fraudes em alimentos 5
3.4- Legislação brasileira para fraudes em alimentos 8
3.5- Detecção de fraude (por substituição) em carnes e derivados 9
3.5.1- Métodos de análise de proteínas 10
3.5.1.1 - Métodos eletroforéticos 10
3.5.1.2- Métodos imunológicos 10
3.5.1.3 - Técnicas cromatográficas 11
3.5.2- Métodos da análise de DNA 11
4- MATERIAL E MÉTODOS 14
4.1- Determinação dos controles 14
4.2- Preparo das amostras, extração de DNA genômico, pureza e quantificação 14
4.3- Desenvolvimento e otimização da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real 15
4.3.1- Desenho dos oligonucleotídeos 15
4.3.2- Padronização da PCR em tempo real singleplex 15
4.4- Avaliação do desempenho da técnica 17
4.4.1- Análise da sensibilidade analítica da técnica singleplex 17
4.5- Ensaios multiplex 18
5- RESULTADOS E DISCUSSÃO 18
5.1- Determinação dos alvos e desenho dos primers 18
5.2- Extração do DNA: 21
5.3- Padronização e otimização da PCR em tempo real singleplex: 21
5.4- Especificidade e Limite de detecção 22
5.5 - Análise da reação multiplex 27
6- CONSIDERAÇÕES FINAIS 29
7- CONCLUSÃO 30
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 30

1- INTRODUÇÃO

O consumo mundial de carnes vem apresentando um aumento significativo *per capta*, passando de 23,1 kg nos anos 60 para 42,2 kg em 2011 (SANS; COMBRIS, 2015). Estimulada pela ampliação da demanda, a cadeia produtiva de carnes passa por uma "Revolução Agropecuária", onde o Brasil se destaca como um dos maiores produtores do mundo, com produção superior a 24 milhões de toneladas em 2016 (BRASIL, 2017a). O país ainda exerce importante papel no mercado internacional, destacando-se entre os principais exportadores mundiais e com potencial para atender à crescente demanda global por proteínas de origem animal (BRASIL, 2017a; OECD; FAO, 2015).

A carne é um alimento consumido a milhões de anos, ocupa um lugar de destaque na dieta diária de diversas comunidades humanas e está diretamente associado ao desenvolvimento de uma sociedade. Sendo considerada uma fonte de proteínas de elevado valor biológico, vitaminas e minerais, destaca-se como um importante componente de uma alimentação saudável e equilibrada. No entanto, as carnes são oriundas de diferentes espécies de animais e apresentam diferenças, por vezes sutis, dificultando a percepção dos consumidores quanto às possíveis adulterações. A intrincada cadeia produtiva de alimentos, a diversidade e a complexidade de processos tecnológicos utilizados na elaboração de novos produtos cárneos, podem dificultar o controle e o rastreamento de práticas fraudulentas, incluindo a substituição da carne de uma espécie animal por outra de menor valor. A adulteração destes produtos não acarreta apenas prejuízos econômicos, mas também se relaciona com aversões morais, estilo de vida, tabus religiosos, além de infringir os direitos dos consumidores e constituir um grave risco à saúde pública.

A identificação da carne das diferentes espécies animais e os constituintes dos produtos cárneos, constitui um desafio, visto que boa parte das técnicas convencionais utilizadas para o reconhecimento da autenticidade destes produtos baseiam-se na avaliação de proteínas. Como a indústria passou a desenvolver produtos que são submetidos à diferentes processamentos tecnológicos de fabricação como frio, salga e calor, estas acabam passando por alterações estruturais, limitando o desempenho e a acurácia. Além disso, métodos tradicionais como os cromatográficos, eletroforéticos e imunológicos podem ser laboriosos, de difícil reprodutibilidade, além de demandar maior tempo para obtenção de resultados. Com o desenvolvimento da biotecnologia, técnicas como a reação em cadeia da polimerase (PCR), passaram a demonstrar potencial para suprir a demanda de métodos rápidos, com alta sensibilidade, especificidade e de fácil reprodutibilidade. As técnicas modernas como a PCR

em tempo real quantitativa (qPCR) e a análise de “High Resolution Melting” (HRM) vêm proporcionando maior celeridade na obtenção de resultados das análises laboratoriais para a identificação de carnes, além de apresentarem não só a capacidade de detecção, mas também a de quantificação em produtos elaborados a partir deste tipo de matéria-prima. A utilização de análises moleculares apresenta a vantagem da diferenciação entre as espécies ser feita unicamente pela análise do DNA, que por sua estabilidade viabiliza a análise em produtos processados.

A garantia das condições de igualdade entre os produtores, assegurando a transparência na produção, processamento e comercialização, fixando a identidade e as características mínimas de qualidade de produtos cárneos são preocupações do mercado brasileiro e para se manter como um dos principais produtores e exportadores mundiais de carnes. Apesar de não possuir metodologias consideradas padrão-ouro de autenticação, estabelecidas em legislação nacional, o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) prevê a utilização de métodos moleculares em programas de controle oficial com o objetivo de avaliar a inocuidade, a identidade, a qualidade e a integridade dos produtos e de seus processos produtivos (BRASIL,2017).

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo Geral

Padronizar uma Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR) Multiplex e “High Resolution Melting” (HRM) para detectar e diferenciar tipos de carnes de animais de açougue e derivados.

2.2- Objetivos Específicos

- ✓ Padronizar um protocolo da qPCR multiplex associada à análise de “High Resolution Melting” (HRM) em uma única reação para detectar e diferenciar a presença de carnes de boi, cavalo, porco e frango.

3- REVISÃO DE LITERATURA

3.1- A produção e o consumo de carnes no Brasil e no Mundo

Nos últimos anos a mudança na dieta das populações, com o consumo de carnes vem apresentando um aumento significativo. De acordo com Sans e Combris (2015), o consumo mundial de carnes passou de 23,1 kg/pessoa/ano em 1961 para 42,20 kg em 2011. Dados estatísticos da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico / Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (OECD/FAO) demonstraram que a tendência é de que esta demanda permaneça subindo a uma taxa de 1,4% ao ano, resultando em um consumo adicional de 51 milhões de toneladas em 2024 (OECD; FAO, 2015).

O incremento do consumo de proteínas, vem ocorrendo principalmente nos países em desenvolvimento, visto que alguns fatores como o crescimento populacional, o contínuo processo de urbanização e o aumento da renda *per capita* permitiram a diversificação na dieta (HANSEN, 2018; ROBINSON; POZZI, 2011). O consumo nacional é um dos mais elevados, enquanto a média mundial foi de 67,9 kg *per capita* em 2016, a média brasileira foi de 91,5 kg (ABIEC, 2017; ABPA, 2017; OECD; FAO, 2016).

Segundo Delgado et al. (1999) o aumento na demanda por proteínas de origem animal vem proporcionando uma “Revolução Pecuária” nas últimas décadas. O crescimento produtivo vem sendo impulsionado, em grande parte, pelas economias em desenvolvimento, que apresentaram um aumento de 50 milhões de toneladas em 1980 para 180 milhões de toneladas em 2000, com Brasil e China exercendo um papel de destaque neste cenário. Excluindo-se a produção desses dois países, esse crescimento passa de 50 para 27 milhões de toneladas no mesmo período (OECD; FAO, 2016; SPEEDY, 2003).

Como um dos maiores produtores e exportadores de carnes do mundo, o Brasil apresentou, em 2016, uma produção total de 24,31 milhões de toneladas e foi responsável pela exportação de um volume total superior a 5,5 milhões de toneladas, sendo as cadeias de carne bovina, suína e avícola as principais cadeias produtivas no setor de carnes nacional (BRASIL, 2017a; OECD; FAO, 2015), conforme pode-se observar no Quadro 1.

Quadro 1: Participação brasileira no mercado mundial de carnes em 2016.

CARNES	PRODUÇÃO (MIL TON)	PARTICIPAÇÃO MUNDIAL (%)	EXPORTAÇÃO (MIL TON)	PARTICIPAÇÃO MUNDIAL (%)	CONSUMO (KG/HAB)
BOVINO	9100	13,8	1832	20,04	36
FRANGO	12900	14,54	4384	39,21	41,1
SUÍNO	3731	3,39	732	8,91	14,4

Fonte: ABPA, 2017; ABIEC, 2017.

Em relação a carne bovina, o rebanho brasileiro é o maior do mundo, com mais de 219 milhões de cabeças, o país figura como um dos principais produtores mundiais com 9,1 milhões de toneladas produzidas e 20,04% do total de carne bovina exportada em 2016 (ABIEC, 2017).

Já na cadeia avícola, principal setor responsável pelo aumento do consumo mundial, com 2/3 da carne adicional consumida, o Brasil é o segundo maior produtor com 12,9 milhões de toneladas, e maior exportador mundial com 4,4 milhões de toneladas, ou seja, 39% do total exportado, em 2016 (ABPA, 2017; OECD; FAO, 2016). Enquanto a produção suína é menos expressiva, com 3,7 milhões de toneladas produzidas e 732 mil toneladas exportadas em 2016 (ABPA, 2017). Deve-se ressaltar que esta proteína é a que possui menor quantidade comercializada internacionalmente, onde os maiores produtores mundiais são também os maiores consumidores, este fato pode ser explicado devido protecionismo baseado em segurança alimentar e restrições de natureza religiosa (GUIMARÃES et al., 2017).

As projeções para o mercado nacional são de que o setor de carnes ainda possua um aumento rápido e intenso nos próximos anos, com taxas de crescimento produtivo de 2,8%, 2,5% e 2,1% ao ano até 2026 nas carnes de frango, suína e bovina, respectivamente (BRASIL, 2017b; OECD; FAO, 2017).

Levando-se em conta as três principais proteínas de origem animal consumidas na alimentação humana, o país acabou exercendo um papel de destaque na economia mundial com cerca de 6,36 % de toda carne exportada mundialmente.

Considerado como o segundo maior produtor mundial de alimentos, o Brasil apresenta elevado potencial competitivo para continuar expandindo e atendendo a demanda global adicional, visto que as atividades ligadas à pecuária são responsáveis por 40% das produções agrícolas e contribuem com a segurança alimentar de quase 1,3 bilhão de pessoas (OECD; FAO, 2015). No entanto, para se manter como um dos principais produtores e exportadores mundiais o aumento produtivo deve vir acompanhado do ganho de qualidade, satisfazendo assim, as crescentes exigências dos consumidores (ABDI, 2011).

3.2- A carne na alimentação humana

De acordo com o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) entende-se como carne “as massas musculares e os demais tecidos que as acompanham, incluída ou não a base óssea correspondente, procedentes das diferentes espécies animais, julgadas aptas para consumo pela inspeção veterinária oficial” (BRASIL, 2017c).

Exercendo um papel crucial na evolução humana, como um importante componente de uma dieta saudável e equilibrada, a carne, assim como outros produtos de origem animal, está presente na alimentação humana a milhões de anos (MANN, 2018; PEREIRA; VICENTE, 2013). Considerada um alimento de elevada importância por ser uma fonte essencial de proteínas de elevado valor biológico e micronutrientes, como vitaminas do complexo B, ferro, zinco, selênio, fósforo, uma variedade de antioxidantes endógenos, gorduras poli-insaturadas de cadeia longa n-3 (PUFA), são elementos considerados fundamentais para manutenção de uma vida saudável segundo Bohrer (2017); Pearson; Gillett (2012); Williams (2007) e Wood et al. (2003), além de possuir uma quantidade baixa de carboidratos (WILLIAMS, 2007). Ressalta-se que os níveis de cada nutriente podem variar consideravelmente de acordo com a espécie animal e o regime alimentar a que estão sujeitos (MANN, 2018).

A carne além de ser consumida *in natura* pode servir ainda como matéria-prima para a elaboração de uma vasta gama de produtos cárneos processados de forma industrial, como embutidos e defumados. Com a ocorrência de uma transição nutricional à nível mundial e a procura cada vez maior por produtos convenientes e de rápido preparo, este alimento apresenta potencial para atender tal tendência mercadológica, auxiliando na diversificação da dieta e gerando alternativas para o consumo de proteínas, agregando valor aos produtos e ao mesmo tempo mantendo a qualidade nutricional, visto que o processamento não altera significativamente seu valor nutritivo (BENEVIDES; NASSU, 2018; ZHANG et al., 2017; PEARSON; GILLETT, 2012; GRUNERT, 2006;).

Ocupando um lugar de destaque na dieta de diversas comunidades, devido a fatores tais como: disponibilidade, tradição, preferência, valor nutricional e sabor, o consumo da carne está também diretamente associado como indicativo de desenvolvimento de uma sociedade (RIBEIRO; CORÇÃO, 2013; BENDER, 1992).

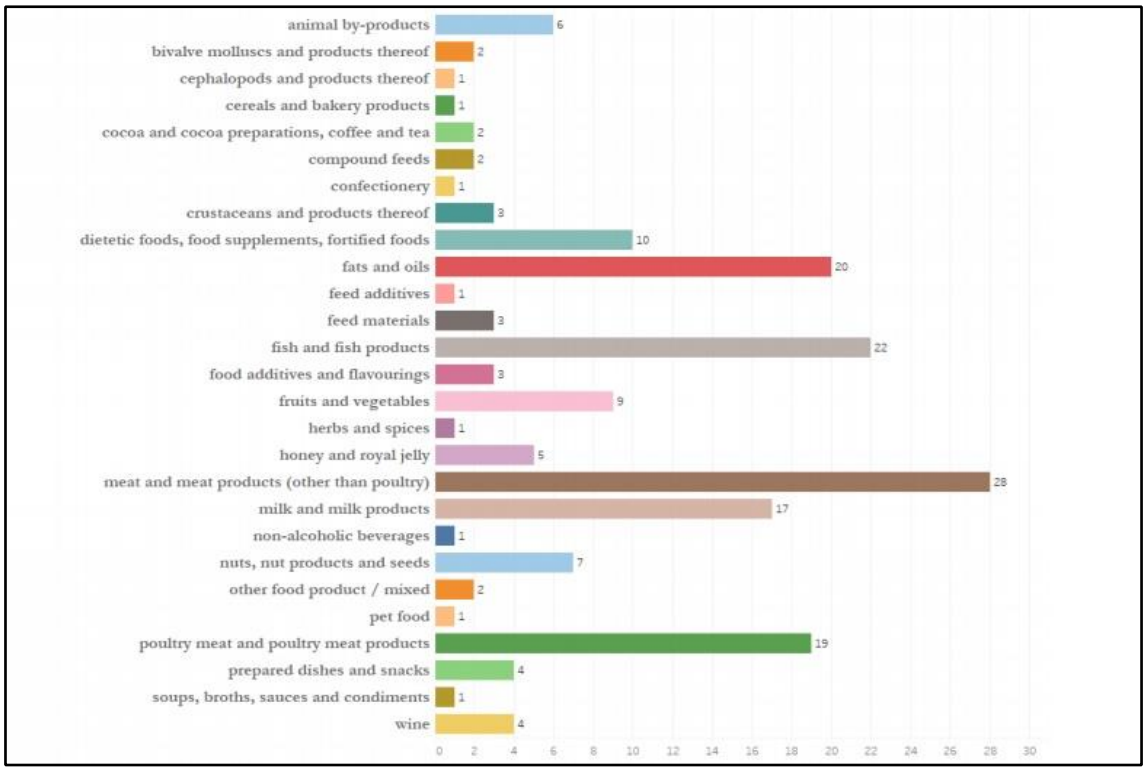
3.3- Fraudes em alimentos

A globalização, os acordos de livre comércio e o aumento nas importações e exportações permitiram um maior intercâmbio e acesso aos alimentos em todo o mundo (ESPINOZA et al., 2015). Entretanto, juntamente com esse processo, ocorre um aumento nas incidências globais de fraudes em alimentos, configurando-se como um sério problema emergente e frequentemente causando interrupções no comércio internacional relacionados com a segurança do alimento e a qualidade dos produtos (PREMANANDH, 2013). De acordo com estimativas da “Grocery Manufacturers Association” (GMA) as fraudes podem custar de U$ 10 a 15 bilhões

por ano para a indústria global de alimentos, afetando cerca de 10% de todos produtos alimentícios comercializados mundialmente (JOHNSON, 2014).

No setor produtivo de carnes, as fraudes caracterizam-se como um problema cada vez mais recorrente, não só no Brasil como em todo o mundo (RAHMATI et al., 2016). As fraudes mais comuns praticadas em produtos cárneos são quanto a origem da matéria prima, sobre o tratamento no processamento desses produtos, a adição de ingredientes não-cárneos e a substituição de carnes por espécie diferentes de menor valor comercial (BALLIN, 2010). As fraudes por substituição vêm suscitando cada vez mais a atenção dos consumidores e aumentando as pressões sobre as entidades governamentais, devido a casos recentes como o "Escândalo da Carne de Cavalo" na Europa e a "Operação Carne Fraca" no Brasil, (AMARAL et al., 2015; STANCIU, 2014; RODRÍGUEZ et al., 2004). No relatório da "Food Fraud Network" (FFN) divulgado em 2016, a carne e os produtos cárneos figuraram como o alimento que mais apresenta casos de fraude (EUROPEAN COMMISSION, 2016), conforme demonstrado na **Figura 1**.

Figura 1: Casos de fraudes de acordo com a categoria alimentar



Fonte: (EUROPEAN COMMISSION, 2016)

A GFSI (Global Food Safety Initiative) propôs a definição de fraude como “um termo abrangente que inclui a substituição deliberada e intencional, adição, adulteração ou falsificação de alimentos, ingredientes alimentares ou embalagens de alimentos, ou rotulagem, ou declarações falsas ou enganosas feitas sobre um produto, com fins lucrativos que possam afetar a saúde do consumidor” (GFSI, 2014). Entretanto, não existe uma definição universal oficial para fraude alimentar (TSIMIDOU et al., 2016).

Apesar de serem práticas relatadas na humanidade a milênios, em sociedades como Roma, Mesopotâmia e Grécia Antiga, as fraudes vêm ganhando reconhecimento, por oferecem uma ampliação do risco alimentar (TSIMIDOU et al., 2016; SPINK; MOYER, 2011). As práticas fraudulentas infringem os direitos de escolha do consumidor, podem gerar prejuízos econômicos para a indústria e para o país produtor devido à perda de confiança dos compradores, afetando a qualidade dos produtos, promovendo uma concorrência insalubre no mercado de carnes, podendo ainda desconsiderar questões religiosas como o consumo de carne suína por comunidades islâmicas e principalmente constituir um grave risco à saúde pública (RAHMATI et al., 2016; ALI et al., 2015; CARVALHO et al., 2015; KUMAR et al., 2015; TÄHKÄPÄÄ et al., 2015; DOOSTI et al., 2014).

A qualidade dos produtos alimentícios, incluindo sua autenticidade, se tornou uma preocupação constante para o consumidor moderno, tornando a fraude alimentar uma das novas questões desafiadoras das próximas décadas (HUCK et al., 2016; RODRÍGUEZ et al., 2004). A crescente complexidade de rastreabilidade da cadeia alimentar, os processos tecnológicos cada vez mais diversificados na elaboração de novos produtos, aliados às dificuldades de identificar prontamente as espécies de carne em produtos processados e do consumidor em detectar tais alterações, proporcionam maior potencial para a prática de fraudes, em que a carne de uma espécie animal é substituída por outra de menor valor (PERESTAM et al., 2017; AUNG; CHANG, 2014; SENTANDREU; SENTANDREU, 2014).

O Brasil como grande produtor mundial de carnes, com potencial para atender o aumento da demanda de consumo, deve também se preocupar com a qualidade e a integridade de seus produtos. Devido aos recentes escândalos na cadeia produtiva de carnes nacional, o país passou a sofrer pressões do mercado internacional, por produtos seguros e livres de fraude. No último Plano de Gestão da Comissão Europeia (DG SANTE 2018), determinou-se que os produtos de origem animal oriundos do Brasil, “seriam monitorados de perto” (EUROPEAN COMMISSION, 2018; CARVALHO et al., 2015;). Entretanto, métodos considerados padrão-

ouro de autenticação desses produtos ainda não foram estabelecidas no Brasil (CARVALHO et al., 2015).

3.4- Legislação brasileira para fraudes em alimentos

As leis antifraudes vem sendo estabelecidas em diversos países, como Estados Unidos, China e Reino Unido (ESPINOZA et al., 2015). No Brasil, além de salvaguardar a saúde pública, a identificação e controle de fraudes e adulterações de produtos de origem animal está dentre algumas das competências dos órgãos de serviços responsáveis pela fiscalização da produção e comercialização dos mesmos (BRUGNANO, 2010).

A alteração ou fraude de qualquer matéria-prima, ingrediente ou produto de origem animal caracteriza atividade de risco ou situação de ameaça de natureza higiênico-sanitária, estando estas práticas sujeitas a sanções tais como a apreensão ou condenação das matérias-primas e dos produtos de origem animal e a suspensão das atividades das indústrias processadoras, entre outras (BRASIL, 2017). A carne *in natura* e os produtos cárneos possuem Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade (RTIQ) específicos que determinam qual a composição dos produtos, ficando os fabricantes obrigados a indicar uma lista completa de todos os ingredientes nos rótulos dos mesmos (BRASIL, 2005).

A prática de fraudes em alimentos também está prevista no Código Penal Brasileiro, e no final dos anos 90, a lei nº 9677/98 passou a classificar esta modalidade de delito como crime hediondo contra a saúde pública, sob pena de reclusão, de quatro a oito anos e multa (BRASIL, 1998; BRASIL, 1940).

Além de constituir grave risco à saúde pública, as fraudes infringem os direitos dos consumidores previstos no Código de Defesa do Consumidor (Lei nº 8.078, de 11 de setembro de 1990), que dispõe sobre a proteção e defesa do consumidor, no qual consideram-se “os produtos deteriorados, alterados, adulterados, avariados, falsificados, corrompidos, fraudados, nocivos à vida ou à saúde, perigosos ou, ainda, àqueles em desacordo com as normas regulamentares de fabricação, distribuição ou apresentação” impróprios para consumo ou uso. Tratando como prática abusiva o ato de colocar à disposição do mercado consumidor, qualquer produto em desacordo com as normas expedidas pelos órgãos oficiais e reforçando em seu artigo 8° que os produtos e serviços colocados no mercado de consumo não podem acarretar riscos à saúde ou à segurança dos compradores (BRASIL, 1990a).

As fraudes também configuram crimes contra a economia popular previstos na Lei nº 1.521/51 que determina como delitos dessa natureza: “expor à venda ou vender mercadoria ou produto alimentício, cujo fabrico haja desatendido às determinações oficiais, quanto ao peso e composição e ministrar gêneros e mercadorias de espécies diferentes, expô-los à venda ou vendê-los como puros; misturar gêneros e mercadorias de qualidade desiguais para expô-los à venda ou vendê-los por preço marcado para os de mais alto custo” (BRASIL, 1951). As práticas fraudulentas em produtos alimentícios também infringem a Lei 8.137/90 que determina como crime contra a economia e as relações de consumo: “vender, ter em depósito para vender ou expor à venda ou, de qualquer forma, entregar matéria-prima ou mercadoria, em condições impróprias ao consumo”, sob pena de reclusão de dois a cinco anos (BRASIL, 1990b).

Sendo um país de grande extensão territorial e com uma produção volumosa, a fiscalização de toda cadeia produtiva acaba se tornando um desafio para os órgãos oficiais. A prática de abates clandestinos e a comercialização desses produtos são de difícil estimativa e podem ser observadas em diferentes regiões do Brasil, configurando-se como uma enorme adversidade para manutenção da qualidade do produto nacional (ABRAHÃO et al., 2005).

3.5- Detecção de fraude (por substituição) em carnes e derivados

A qualidade de um produto pode ser classificada em extrínseca ou intrínseca. A primeira trata da percepção do cliente quanto ao produto, enquanto a segunda é inerente ao produto de fato e pode ser avaliada e mensurada através da comparação com padrões e especificações. As carnes de diferentes espécies podem apresentar diferenças sutis em sua aparência e textura, tornando a identificação destas através da inspeção visual extremamente difícil, impossibilitando a percepção do consumidor quanto a possíveis perdas na qualidade do produto (BALLIN et al., 2009). Além disso, a dificuldade de identificar prontamente as carnes das espécies de animais utilizadas em produtos que tenham passado por processamento industrial é extremamente elevada, tornando as fraudes uma prática comum, prejudicando o cliente ao substituir total ou parcialmente a carne da espécie indicada no rótulo do produto por outra de menor valor (PERESTAM et al., 2017).

Na tentativa de se inibir tais práticas, foram desenvolvidas diversas técnicas ao longo dos anos, baseando-se nas características intrínsecas do produto. No entanto a identificação dos constituintes cárneos ainda se configura como um desafio, visto que nem sempre há a possibilidade de detectá-los por métodos convencionais (FELKL, 2014). De maneira geral, os

métodos de análise utilizados para identificação de espécies de carne são baseados na análise de proteínas ou de DNA (BALLIN, 2010).

3.5.1- Métodos de análise de proteínas

São métodos para detecção de proteínas ou suas proporções características para cada tipo de tecido muscular, diferenciando as espécies de acordo com os níveis encontrados nas amostras (RAHMATI et al., 2016). Algumas das técnicas utilizadas são: eletroforese, imunológicas e cromatográficas (BOTTERO; DALMASSO, 2011; MONTOWSKA; POSPIECH, 2007).

3.5.1.1 - Métodos eletroforéticos

Os métodos eletroforéticos baseiam-se na separação de proteínas em um campo elétrico, após sua extração do tecido muscular, sendo a carga destas, dependente do pH do meio (MEIRA, 2014; MONTOWSKA; POSPIECH, 2007). A separação das proteínas via eletroforese pode ser baseada na massa muscular das subunidades protéicas como no PAGE e no SDS-PAGE, ou de acordo com o ponto isoelétrico como na focalização isoelétrica (IEF). (MOLOTO et al., 2016; SINGH; NEELAM, 2011). O método de eletroforese bidimensional (2-DE) permite separar milhares de proteínas em um único gel simultaneamente, na primeira dimensão ocorre a separação de acordo com o ponto isoelétrico (IEF) e na segunda dimensão ocorre a separação de acordo com o peso molecular (SDS-PAGE) (ALIKORD et al., 2018; MOLOTO et al., 2016; MONTOWSKA; POSPIECH, 2007).

3.5.1.2- Métodos imunológicos

Os métodos imunológicos utilizam a interação antígeno-anticorpo e são indicados para a avaliação qualitativa e, em alguns casos semi quantitativas, de vários tipos de proteínas, sendo o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), uma das técnicas mais utilizadas para análise da identificação de espécies em carnes (ALIKORD et al., 2018; WALKER et al., 2013; BALLIN et al., 2009;). A especificidade e a simplicidade tornam os ensaios imunológicos adequados para fins regulatórios (HSIEH et al., 1996). Entretanto esta técnica apresenta algumas limitações como a necessidade de anticorpos específicos, podendo gerar problemas relacionados a reações cruzadas, principalmente quando da diferenciação de espécies intimamente relacionadas, resultando em falsos-positivos (SENTANDREU; SENTANDREU, 2014).

3.5.1.3 - Técnicas cromatográficas

As técnicas cromatográficas têm a capacidade de separar moléculas com características químicas semelhantes, segregando as substâncias de uma mistura em componentes individuais de acordo com as propriedades de cada constituinte ou proteína (FELKL, 2014). Algumas das técnicas mais comuns utilizadas na análise de fraudes são a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), a cromatografia gasosa (GC), a eletroforese capilar (CEP) e a HPLC em fase reversa (RP-HPLC). Tais métodos apresentam algumas vantagens por serem rápidos, simples, de alta resolução e permitirem boa reprodutibilidade dos resultados (ALIKORD et al., 2018).

Apesar de amplamente utilizadas, muitas dessas técnicas não são adequadas por apresentarem dificuldade em discriminar espécies relacionadas, baixa especificidade e sensibilidade em alimentos complexos, ou que tenham sido submetidos a processamento como salga, refrigeração, e, principalmente ao calor que pode desnaturar as proteínas provocando profundas modificações estruturais levando a modificações na atividade antigênica das moléculas e na sua mobilidade após eletroforese (ALIKORD et al., 2018; BOTTERO; DALMASSO, 2011; LENSTRA et al. 2001).

3.5.2- Métodos da análise de DNA

Embora os métodos tradicionais para identificação de carne e seus derivados tenham sido amplamente utilizados, passou-se a observar nos últimos anos, um desenvolvimento de técnicas moleculares, que já eram aplicadas com sucesso em outros campos como na medicina forense, e que passaram rapidamente a complementar ou substituir os métodos tradicionalmente utilizados (DANEZIS et al., 2016; BOTTERO; DALMASSO, 2011). Consideradas as técnicas mais inovadoras para detecção de adulterações em produtos cárneos, são metodologias que utilizam a análise de sequências específicas de DNA de cada espécie (HERNÁNDEZ-CHÁVEZ et al., 2007).

Tais métodos apresentam a vantagem da diferenciação entre as espécies ser feita unicamente através da análise do DNA (BALLIN, 2010). A estabilidade do ácido nucléico permite sua análise em produtos altamente processados. O DNA está presente em praticamente todas as células, permitindo a obtenção de informações idênticas oriundas de amostras da mesma fonte, independente do tecido ou origem, além do sequenciamento do código genético permitir obter mais informações do que as proteínas (DANEZIS et al., 2016; LOCKLEY; BARDSLEY, 2000).

Os métodos baseados nas análises de DNA estão relacionados à PCR e suas variações (ABBAS et al., 2018). A PCR é uma técnica baseada na amplificação de sequências de DNA através da reação em cadeia da polimerase, onde pequenas quantidades de sequências de ácidos nucléicos (DNA ou RNA) específicas são enzimaticamente amplificadas até que se obtenham milhões de cópias idênticas da sequência alvo em quantidades suficientes para permitir sua detecção (CONTRI, 2006; BARTLETT; STIRLING, 2003). Considerada uma técnica simples, rápida e de fácil reprodutibilidade (GANOPOULOS, 2013). A reação da PCR é um procedimento cíclico baseado em três fases: desnaturação pelo calor, anelamento / hibridização e extensão (BARTLETT; STIRLING, 2003). A amplificação da sequência alvo ocorrerá após múltiplos ciclos da PCR, onde inicialmente através da utilização de um termociclador as amostras são sujeitas a uma elevação na temperatura, que promoverá a desnaturação das duplas fitas de DNA em fitas simples (KUSHIDA, 2005). Em seguida a temperatura é reduzida, permitindo que os oligonucleotídeos iniciadores (ou *primers*) hibridizem com as fitas simples obtidas em seus respectivos alvos (PELT-VERKUIL; BELKUM; HAYS, 2008; BARTLETT; STIRLING, 2003). Por fim ocorrerá um novo aumento da temperatura para 72°C em média, onde esta condição permitirá que a polimerase promova a fase de extensão ao sintetizar a cópia nas regiões entre os dois oligonucleotídeo iniciadores *(ou "primer")* causando a extensão das fitas (KUSHIDA, 2005). Dessa maneira, ao final de cada ciclo, cada fita dupla de DNA replicada, chamada de *amplicon*, possuirá sequências terminais complementares às sequências dos oligonucleotídeo iniciadores utilizados, proporcionando uma amplificação exponencial a cada novo ciclo (POSTOLLEC, 2011; PELT-VERKUIL; BELKUM; HAYS, 2008).

Existe uma ampla variedade de técnicas moleculares descritas na literatura como multiplex PCR e "single sequence repeat" (SSP) também conhecido como microssatélite (RAHMATI et al., 2016; MAFRA et al., 2008). Algumas técnicas como a PCR-RFLP (Polimorfismo no Comprimento do Fragmento de Restrição) que utiliza enzimas de restrições que cortam o DNA em pontos específicos e permite identificar mudanças nas sequências genéticas que ocorrem no local onde a enzima é cortada (DOOSTI et al., 2014; HAIDER et al., 2013; GIRISH et al., 2005), e a PCR-RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA") que utiliza "primers" arbitrários que produzem uma gama de fragmentos amplificados que posteriormente serão separados de acordo com seu tamanho utilizando eletroforese em gel (ABBAS et al., 2018; BALLIN, 2010; FAJARDO et al., 2010) vêm sendo descritas com sucesso na literatura.

Métodos de análise que utilizam substratos altamente degradados, como alimentos altamente processados, devem basear-se na análise de fragmentos de DNA mais curtos, no entanto algumas técnicas necessitam de fragmentos maiores para aumentar a confiabilidade de seus resultados (BOTTERO; DALMASSO, 2011). Técnicas de PCR que utilizam "primers" espécie-específicos são direcionadas para a obtenção de fragmentos curtos de DNA, apresentando vantagens como a possível identificação de uma espécie alvo em matrizes complexas, boa adaptação para a análise de produtos termicamente processados ou que tenham passado por processos industriais que possam danificar o DNA, e ainda assim apresentam elevada especificidade e sensibilidade para análises de autenticação em carnes (FAJARDO et al., 2010).

A PCR em tempo real (qPCR) é uma técnica que faz o monitoramento dos produtos de amplificação ciclo a ciclo e determina a positividade através dos níveis de fluorescência na fase exponencial da reação, possibilitando a detecção, quantificação e confirmação simultânea dos fragmentos, aumentando a confiabilidade da técnica (TANAKA, 2018; BALLIN, 2010; FAJARDO et al., 2010; BUSTIN et al., 2009; KANG; MAFRA et al., 2008). O uso da fluorescência elimina a necessidade da eletroforese em gel, permitindo a análise em tempo real, enquanto restrições no tamanho do "amplicon" (máximo de 150 pb) promovem este sistema de detecção de DNA ótimo para produtos alimentícios altamente processados, fazendo com que esta técnica se torne uma das ferramentas moleculares mais promissoras para identificação em carnes (KÖPPEL et al., 2009; MAFRA et al., 2008; DOOLEY et al., 2004).

Algumas estratégias pós-PCR podem ser utilizadas no auxílio da identificação de espécies como "sensitive gel electrophoresis" (CSGE), análise de conformação de fita simples (SSCA) e "high resolution melting" (HRM) (LOPEZ-OCEJA et al., 2017; BALLIN, 2010). O HRM é uma técnica pós PCR, que utiliza corantes que se ligam ao DNA saturando os "amplicons" obtidos durante a reação. Após a amplificação se obtém uma curva de dissociação de acordo com a fluorescência de saturação do corante, específica para cada matriz analisada, conforme o conteúdo de bases nitrogenadas (GC), comprimento e características da sequência alvo, permitindo assim distinguir os diferentes produtos da PCR (RESENDE, 2016; OLIVEIRA, 2010; REED; KENT; WITTWER, 2007). Esta análise é uma alternativa a pós-processamentos da PCR como restrição enzimática, eletroforese e PCR em tempo real baseado em sondas TaqMan, realizada como uma PCR adicionada de corantes com condições levemente modificadas, sendo considerada uma técnica simples e não destrutiva, uma vez que permite análises subsequentes por eletroforese ou sequenciamento após análise de fusão (SAKARIDIS

et al., 2013; VOSSEN et al., 2009). Por ser realizada em um sistema fechado, apresenta menores chances de contaminação, além de ser considerada rápida e com menor custo quando comparada com outras técnicas que demandam a utilização de sondas ou separação (WITTWER, 2009).

O método de identificação ideal deve permitir a identificação de espécies de carne, tanto em matérias-primas quanto em produtos cárneos processados, inclusive sujeitos a tratamentos térmicos, além de ser simples e sensível (MONTOWSKA; POSPIECH, 2007). Com o aumento na complexidade dos produtos cárneos disponíveis no mercado, muitas das análises tradicionais tonaram-se obsoletas ou com baixa precisão (BOTTERO; DALMASSO, 2011). As técnicas moleculares são consideradas métodos confiáveis, rápidos, seguros, de baixo custo, com elevada sensibilidade e especificidade (ALTUNTAS et al., 2017). A capacidade de detectar práticas fraudulentas de maneira precoce não só garante a qualidade do produto como também resguarda a saúde do consumidor.

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1- Obtenção dos controles

Para obtenção dos controles positivos foram obtidas amostras de carnes de frango (*Gallus gallus*), suíno (*Sus scrofa*) e bovino (*Bos indicus*), comercializadas na cidade de Seropédica, e que apresentavam em seus rótulos a identificação da espécie de açougue as quais pertenciam, assim como o carimbo do serviço oficial de fiscalização sanitária. A carne de equídeo (*Equus caballus*) foi obtida por doação de fragmentos musculares pelo Departamento de Anatomia Patológica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. As amostras foram acondicionadas em temperatura de -80°C até o momento da extração do DNA total.

As análises foram realizadas no âmbito do Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública (DESP) do Instituto de Veterinária (IV) no Laboratório de Sanidade Avícola e Multiusuários (LASAVE/DESP/IV/UFRRJ).

4.2- Preparo das amostras, extração de DNA genômico, pureza e quantificação

Foram pesados um grama da amostra de cada espécie em estudo para preparação do lisado. Os tecidos inicialmente foram macerados com 1mL de tampão PBS individualmente, e posteriormente armazenados em temperatura de – 20°C até o momento da realização das análises.

A extração do DNA total das amostras foi realizada de acordo com as instruções do fabricante utilizando-se o kit comercial (Qiagen DNeasy-tissues-Blood, Valencia, CA, USA) para a extração de DNA de tecidos. A pureza do DNA total foi determinada por espectrofotometria (Nanodrop ND-2000 ®, Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) pela medição da absorbância a 260/230 nm, que correspondem ao pico de absorção de raios ultravioletas (UVs) de proteínas e contaminantes orgânicos, respectivamente. A concentração foi determinada por fluorimetria no aparelho Qubit utilizando o kit dsDNA BR Assay. Em seguida, as amostras extraídas foram padronizadas a uma concentração de 10ng/µL. A integridade do DNA obtido foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com Brometo de Etídio e visualizado sob luz UV.

4.3- Desenvolvimento e otimização da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

4.3.1- Desenho dos oligonucleotídeos

As sequências de DNA do gene mitocondrial *Cyt b* das espécies estudadas foram recuperadas a partir do banco de dados do "National Center for Biotechnology Information" (NCBI). Os oligonucleotídeos foram desenhados para as regiões alvos no software Primer Express® 3.0 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). As características dos oligonucleotídeos foram testadas no software Oligo Explores 1.2, a especificidade dos mesmos foram testadas utilizando-se a ferramenta primerBLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast/e) e o alinhamento de sequências de DNA no programa MEGA 7.0.

4.3.2- Padronização da PCR em tempo real singleplex

Foram realizadas a otimização e a padronização da reação singleplex de cada espécie proposta nesse estudo individualmente. Os oligonucleotídeos, senso e antisenso, específicos de cada espécie (*Gallus gallus*; *Sus scrofa*; *Bos indicus* e; *Equus caballus*) foram testados individualmente em diferentes concentrações em um experimento com 3 repetições de cada uma das 16 condições estabelecidas para o teste de concentração de acordo com o protocolo comercial (Quadro 2). Em seguida foram avaliadas diferentes concentrações de DNA (10 ng/µL; 1 ng/µl; 0,1 ng/µL; 0,01 ng/µL; e 0,001 ng/µl) de cada espécie. Água livre de Nuclease (Ambion®, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) foi usada como controle negativo.

Para determinar a temperatura ótima de anelamento dos oligonucleotídeos, foi realizado uma PCR com gradiente de temperatura tomando como referência a temperatura média de dissociação dos oligonucleotídeos (entre 57°C e 62°C) com variação de ±5°C.

As condições de termociclagem foram otimizadas utilizando o equipamento Veriti® (Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). As amostras foram avaliadas em um volume final de 12μL, contendo 1X Melt Doctor HRM Master Mix (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), 200nM de cada primer e 3μL (10 ng) de DNA.

Uma matriz de concentração foi realizada para determinar a concentração mínima necessária para obter o menor ciclo de quantificação (Cq) com sinal máximo de fluorescência de acordo com a linha de base (ΔRn) com ausência de picos inespecíficos de temperatura de dissociação.

Quadro 2: Combinações das concentrações de oligonucleotídoes inicadores para otimização da Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR) para detecção da de carne das diferentes espécies de açougue.

Oligonucleotídeo Iniciador	**Anti-senso**				
Senso		**200 Nm**	**400 Nm**	**600 Nm**	**800 Nm**
	200 Nm	200/200 Nm	200/400 Nm	200/600 Nm	200/800 Nm
	400 Nm	400/200 Nm	400/400 Nm	400/600 Nm	400/800 Nm
	600 Nm	600/200 Nm	600/400 Nm	600/600 Nm	600/800 Nm
	800 Nm	800/200 Nm	800/400 Nm	800/600 Nm	800/800 Nm

Os tempos de desnaturação, anelamento / extensão foram conduzidos de acordo com o tamanho do produto de PCR e no seu conteúdo de GC (guanina-citosina). As condições de termociclagem foram padronizadas em três estágios: primeiro estágio: 90°C por 10 min; segundo estágio: 40 ciclos de 95°C por 15s, 57°C por 30s e 72°C por 30s e terceiro estágio (curva de dissociação): 72°C a 90°C com variação de 0,3°C a cada 30 seg. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, em tampão de corrida TAE, durante 60 minutos, a 5V/cm. Os géis foram corados em Brometo de Etídeo e visualização dos produtos amplificados sob luz UV, utilizando-se transiluminador (Eletronic UV Transilluminator, L-PIX

TOUCH®). Em seguida, uma curva de dissociação foi gerada para verificar a especificidade das amplificações e a formação de dímeros.

4.4- Avaliação do desempenho da técnica

A especificidade do ensaio foi analisada usando o material genético das carnes de pato (*Anas platyrhynchos*), coelho (*Oryctolagus cuniculus*), ovelha (*Ovis aries*) e cabra (*Capra aegagrus hircus*) além das espécies utilizadas na técnica.

Foi realizada uma análise *in silico* utilizando o algoritmo primerBLAST (NCBI, Bethesda DM, EUA) como ferramenta para avaliar se os oligoiniciadores desenhados não seriam específicos para o DNA de outras espécies de animais produtores de carnes assim como, entre as espécies utilizadas neste estudo.

Para análise *in silico* da técnica de "High Resolution Melting" (HRM) foi utilizado o uMELT (DWIGHT; PALAIS; WITTWER, 2011) para predição das curvas de fluorescência de DNA de alta resolução e os perfis de desnaturação de produtos da PCR para garantir que perfis distintos possam ser gerados pelos quatro pares de oligonucleotídeos.

4.4.1- Análise da sensibilidade analítica da técnica singleplex

A sensibilidade analítica da qPCR foi avaliada pelo uso de diluições decimais seriadas do DNA total, baseando-se no tamanho do genoma de cada espécie individualmente. Para determinação do número de cópias de cada ponto de diluição foi realizado um cálculo de estimativa conforme a equação a seguir:

$$Número\ de\ cópias = \frac{6{,}02 \times 10^{23}\,(cópias\ por\ mol) \times Concentração\ de\ DNA(g)}{tamanho\ do\ alvo\ (pares\ de\ bases) \times 660\ ((g/mol)/bp)}$$

Foram realizadas cinco séries de diluições separadas para cada ponto da curva, em triplicata. O número de cópias variou de 1 a 1×10^4 por µL para as espécies suína e equina, enquanto para a espécie bovina variou entre 0,1 a 1×10^3 por µL e para entre 10 a 1×10^5 por µL para frangos. A regressão linear, juntamente com o coeficiente de determinação (R^2) formado após a determinação de cada ponto da curva, pode ser utilizado para avaliar se o ensaio de qPCR foi otimizado. A eficiência de cada reação foi determinada considerando o "slope" da curva padrão usando a seguinte fórmula: [Eficiência = $10^{(-1/slope)} - 1$] (SVEC et al., 2015).

4.5- Ensaios multiplex

Após a padronização e otimização da técnica de qPCR, HRM e singleplex para cada uma das espécies animais foram realizados os testes para otimização e padronização da reação multiplex. A concentração de oligonucleotídeos de cada espécie animal foi avaliada no sistema multiplex em diferentes concentrações variando entre 200 nM, 400 nM, 600 nM, e 800 nM em um experimento com 3 repetições de cada uma das 96 condições possíveis. A concentração de DNA total de cada espécie animal também foi novamente avaliada na reação executada no sistema de multiplex.

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1- Determinação dos alvos e desenho dos primers

Os oligonucleotídeos desenhados para qPCR no programa Primer Express® 3.0 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) estão apresentados no **Quadro 3**. Cada oligonucleotídeo iniciador, "forward" e "reverse", foi projetado para se ligar e amplificar especificamente apenas à sequência do gene *Cyt b* de cada uma das espécies de animais de açougue indicadas neste estudo. Sequências de genes de DNA mitocondrial vêm sendo utilizadas como alvo na identificação inequívoca de espécies, por possuírem as vantagens de permitir uma maior sensibilidade e especificidade à técnica garantindo um bom limite de detecção de pequena quantidade da amostra, uma vez que o DNA mitocondrial é altamente conservado entre indivíduos da mesma espécie, além de estar presente em grande quantidade. Apresentam maior diversidade genética interespecífica e são estáveis a processamentos tecnológicos aos quais os produtos cárneos possam ser submetidos, proporcionando maiores chances de detecção do alvo (ALI et al., 2015; CARVALHO et al., 2015; BALLIN, 2009).

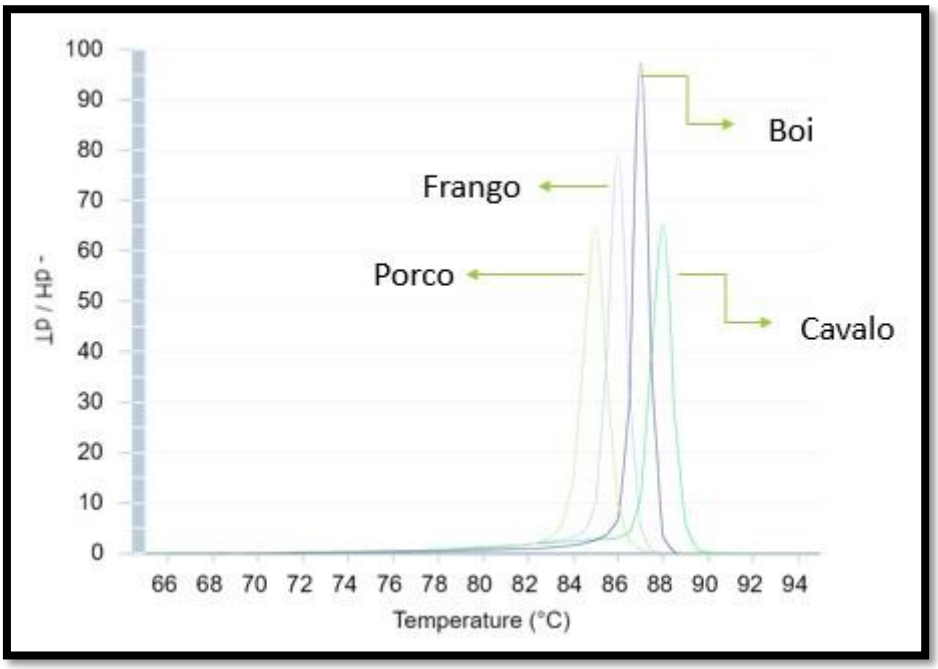
Quadro 3: Oligonucleotídeos iniciadores desenhados de acordo com cada espécie animal determinada para a reação multiplex

ESPÉCIE	**"FOWARD"**	**"REVERSE"**	**TAMANHO DO PRODUTO**
Sus scrofa	CTACACACATCCAAACAAC	AGGAAGTATAAGATGGAGG	161 pb
Gallus gallus	CCTCCACAAATCTAAACAAC	GTGGGGAAGAGGATAAGT	186 pb
Bos indicus	CGATCAATCCCCAACAAA	GAGGAGAAAGTATAGGACA	240 pb
Equus caballus	CCATCCTACGCTCCATTCCC	TGTTTTCGATGGTGCTTGCG	288 pb

Após análise de suas características no software Oligo Explores 1.2, os oligonucleotídeos apresentaram pouca força de atração entre si e ausência de auto-dimerização. Na avaliação do algoritmo BLAST (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/), os oligonucleotídeo iniciadores foram considerados específicos após análise *in silico* de especificidade.

Com o auxílio da ferramenta de bioinformática uMELT (DWIGHT; PALAIS; WITTWER, 2011), pode-se predizer que as curvas de fluorescência de DNA de alta resolução e os perfis de desnaturação de produtos da PCR garantiu que perfis distintos fossem gerados pelos quatro pares de oligonucleotídeos, conforme pôde-se observar (**Figura 2**). De acordo com Ali (2015), o desenho dos oligonucleotídeos iniciadores e a determinação dos alvos é uma etapa fundamental para o desenvolvimento de uma PCR multiplex adequada. Os mesmos devem conter sequências intra-espécies conservadas e apresentar polimorfismo interespécie que permitam a obtenção de uma temperatura de dissociação (Tm) relativamente próxima, garantindo o anelamento destes com o DNA da espécie alvo e não com outras espécies (reações cruzadas). Apesar do DNA mitocondrial ser altamente conservado, apresentando pouca variação entre as espécies, pôde-se observar uma Tm próxima entre todas as espécies, no entanto ainda assim, foi possível diferenciá-las.

Figura 2: Curva de predição das curvas de fluorescência e dos perfis de desnaturação dos produtos da qPCR gerados pelos quatro pares de oligonucleotídeos.



5.2- Extração do DNA:

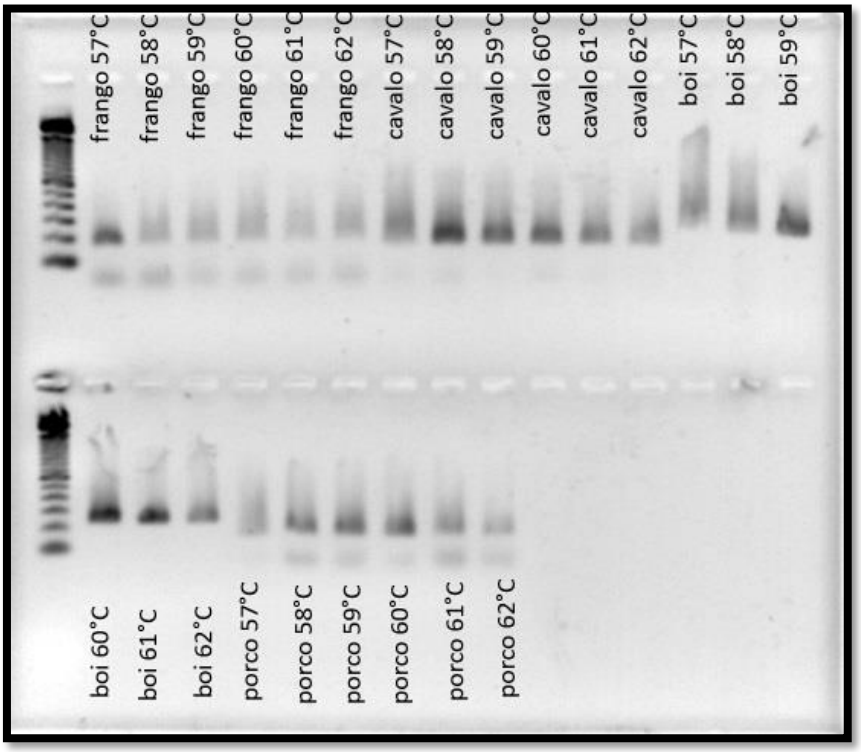
Após avaliação espectrofotométrica, o DNA total extraído apresentou valores próximos a 1.8 na razão 260/280, e dentro da faixa de 2.0 à 2.2 na razão 260/230, sendo portanto considerado puro de acordo com instruções do fabricante (Nanodrop ND-2000 ®, Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA).

Este DNA também pode ser considerado íntegro após realização da eletroforese em gel de agarose a 1%, corado por Brometo de Etídio e visualizado sob luz ultravioleta. Em seguida, as amostras puderam ser padronizadas a 10 ng/μL após quantificação no Qubit utilizando o kit dsDNA BR Assay.

5.3- Padronização e otimização da PCR em tempo real singleplex:

Durante a padronização e otimização da técnica singleplex estabeleceram-se as melhores condições de termociclagem e da reação. As condições de termociclagem otimizadas foram estabelecidas em uma etapa inicial de desnaturação 90°C por 10 minutos, seguida por um segundo estágio de 40 ciclos: desnaturação a 95 °C por 15 segundos, anelamento a 57°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos, e por fim o último estágio correspondente a curva de dissociação (HRM) de 72°C a 90°C com variação de 0,3% a cada 30 segundos. As reações foram estabelecidas em um volume final de 12 μL, contendo: 200 nM dos oligonucleotídeos (“forward” e “reverse”), 1X Melt Doctor HRM Master Mix (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) e 3 μL de DNA.

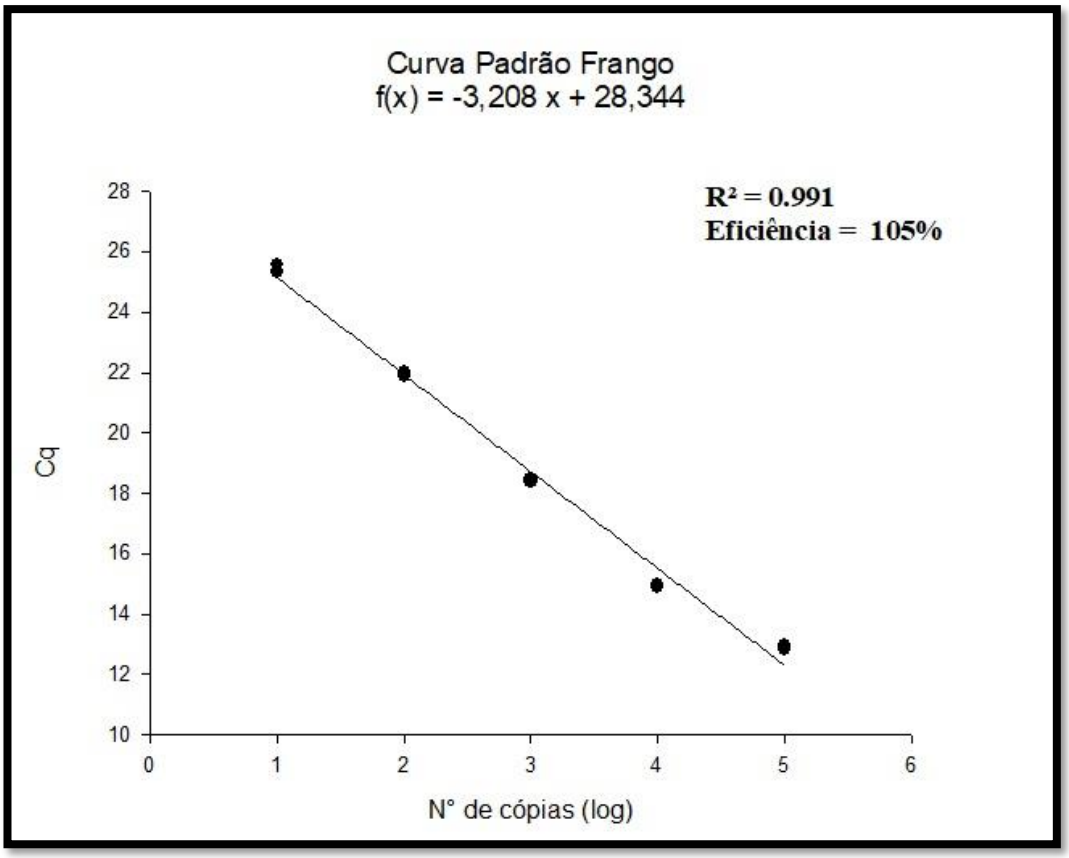
Figura 3: Gel de agarose 2% corado em Brometo de Etídio e visualização dos produtos amplificados sob luz UV para avaliação do gradiente de temperatura durante padronização e otimização da etapa de anelamento da qPCR.



5.4- Especificidade e Limite de detecção

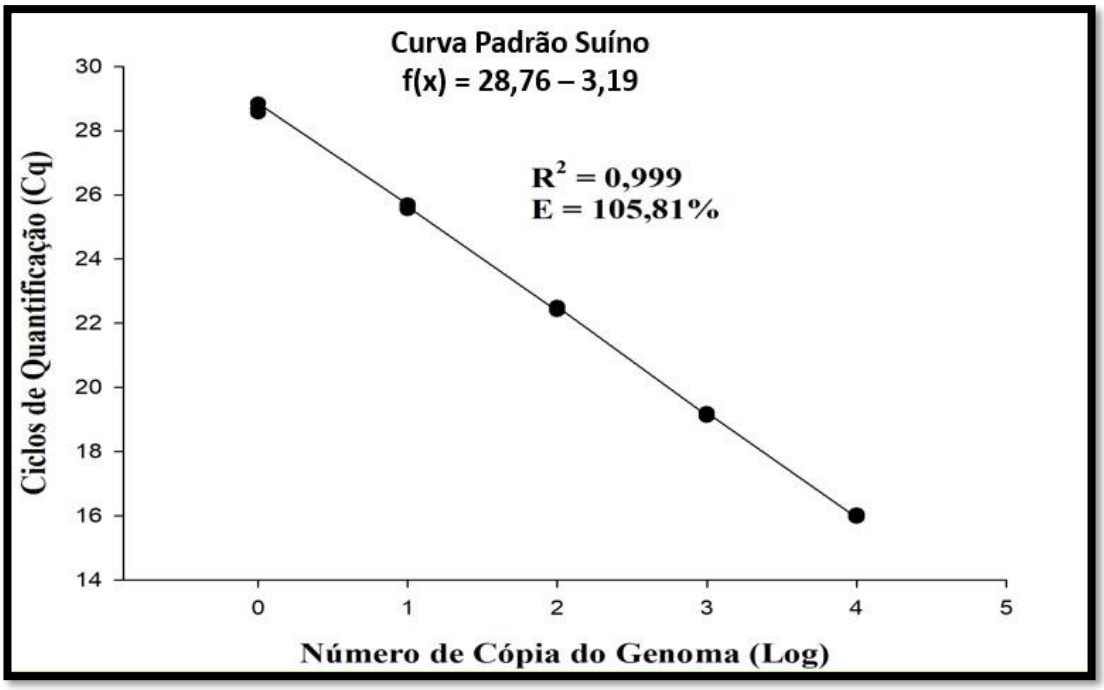
A curva padrão criada para a espécie *Gallus gallus* mostrou um limite de detecção de 10 cópias de alvo contendo o gene *Cyt b* (**Figura 4**). Após plotar o valor do Cq contra o log do número de cópias obteve-se um coeficiente de determinação (R^2) de 0,991 e uma eficiência de 105%. De acordo com as diretrizes do "Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments" (BUSTIN et al., 2009), estes valores encontram-se em consonância com o preconizado para uma reação ideal, com um R^2 próximo a 1,0 e eficiência dentro da faixa de 90 à 100%. Os cinco pontos de diluição testados apresentaram um Cq variando de 12,88 ciclos na primeira diluição (100.000 cópias de alvo) para 25,41 ciclos na última diluição (10 cópias de alvos). Demonstrando que este ensaio apresenta sensibilidade e robustez para utilização na identificação da presença da carne de frango.

Figura 4: Curva padrão obtida por regressão linear dos ciclos de quantificação (Cq) plotados a partir de diluições decimais em série do "amplicon", contendo o gene *Cyt b* da espécie *Gallus gallus*.



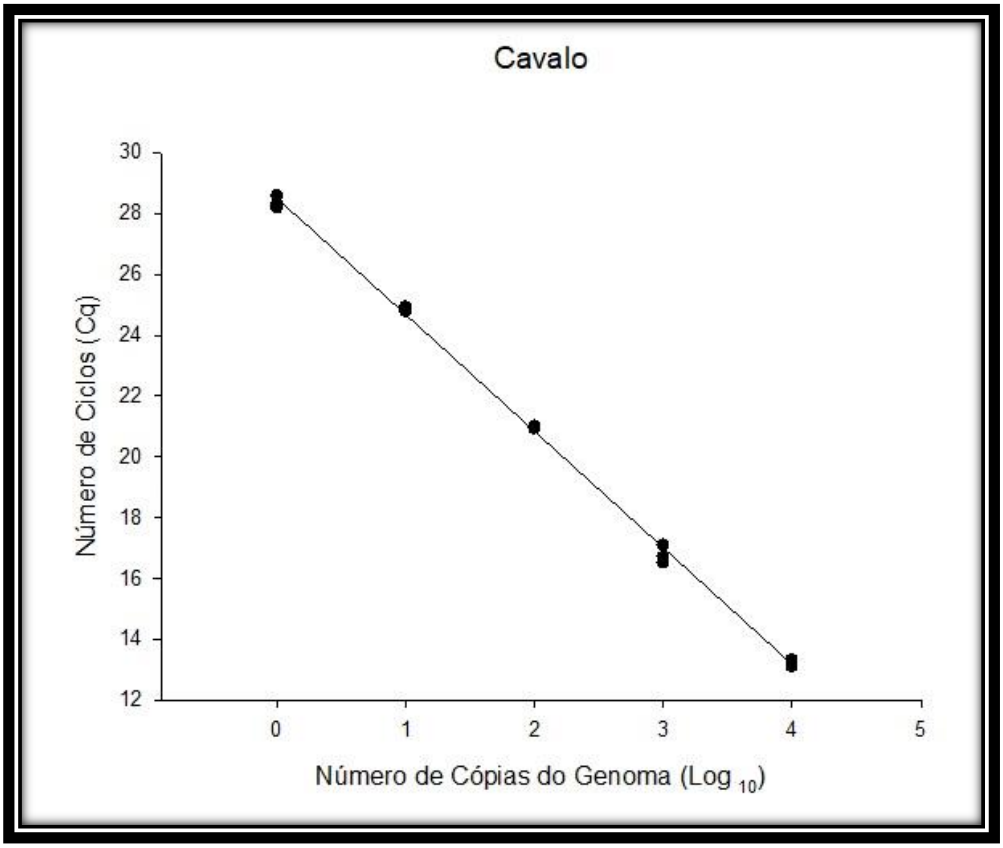
A curva padrão obtida para a espécie *Sus scrofa* **(Figura 5)** mostrou um limite de detecção de 1 cópia de alvo contendo o gene *Cyt b*. De acordo com a curva padrão obtida após plotar o Cq contra o log do número de cópias, obteve-se um coeficiente de determinação (R^2) e uma eficiência de 0,999 e 105%, respectivamente. Estes valores indicam a robustez e eficiência da reação, uma vez que encontraram-se dentro dos valores ideais preconizados pelo MIQE (BUSTIN et al., 2009). Os cinco pontos de diluição testados apresentaram um Cq variando entre 15,39 ciclos (10.000 cópias de alvo) e 28,12 ciclos (1 cópia de alvo).

Figura 5: Curva padrão obtida por regressão linear dos ciclos de quantificação (Cq) plotados a partir de diluições decimais em série do "amplicon", contendo o gene *Cyt b* da espécie *Sus scrofa*.



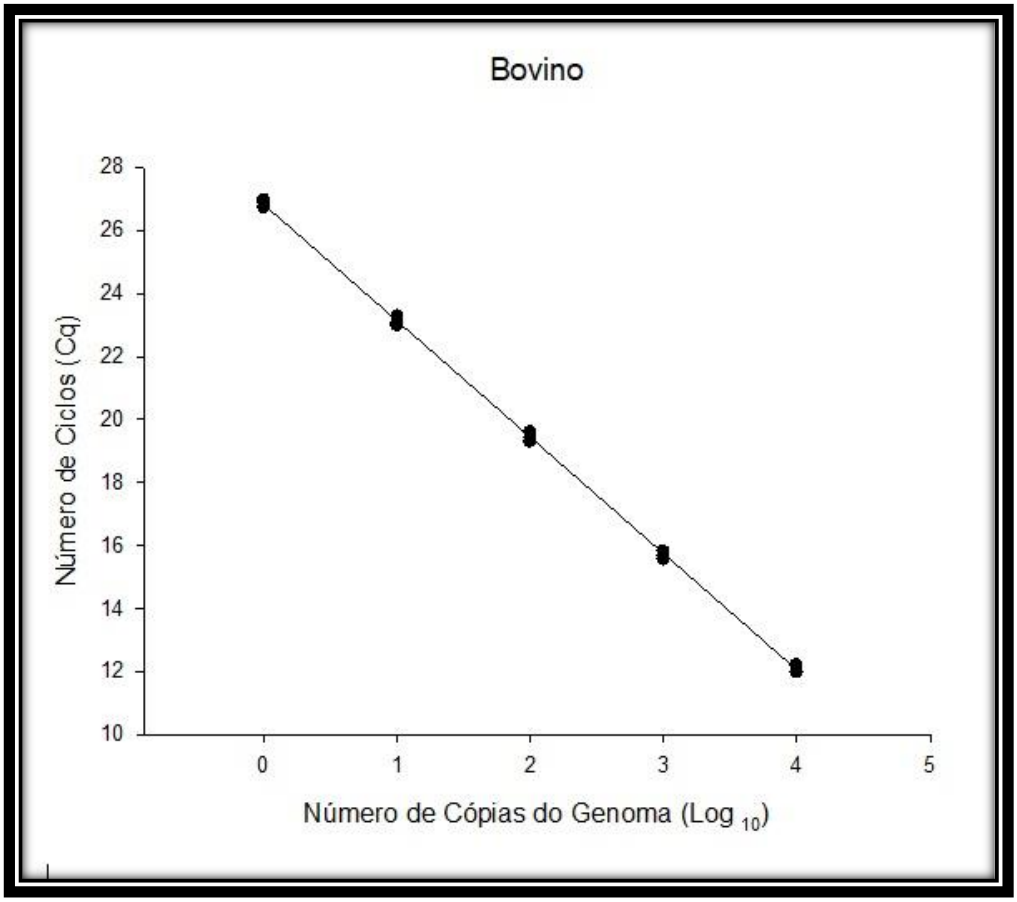
A reação padronizada para a espécie *Equus caballus* apresentou um limite de detecção de 1 cópia de alvo contendo o gene *Cyt b*. Com a análise da curva padrão (**Figura 6**), pode-se observar um coeficiente de determinação (R^2) de 0,999 e uma eficiência de 98%, valores estes dentro dos padrões recomendados pelo MIQE (BUSTIN et al., 2009) para se considerar a reação robusta e eficiente. Os cinco pontos de diluição testados apresentaram um Cq variando de 15,26 ciclos na primeira diluição (10.000 cópias de alvo) para 28,74 ciclos na última diluição (1 cópia de alvo).

Figura 6: Curva padrão obtida por regressão linear dos ciclos de quantificação (Cq) plotados a partir de diluições decimais em série do "amplicon", contendo o gene *Cyt b* da espécie *Equus caballus*.



A espécie *Bos indicus* apresentou um limite de detecção de 1 de alvo contendo o gene *Cyt b*. Após a determinação da curva padrão (**Figura 7**), obteve-se um coeficiente de determinação (R^2) de 0,996 e uma eficiência de 94,8%, caracterizando a eficiência e robustez da reação de acordo com a diretrizes determinadas pelo MIQE (BUSTIN et al., 2009). Os cinco pontos de diluição testados apresentaram um Cq variando de 15,51 ciclos na primeira diluição (1.000 cópias de alvo) para 30,12 ciclos na última diluição (1 cópia de alvo).

Figura 7: Curva padrão obtida por regressão linear dos ciclos de quantificação (Cq) plotados a partir de diluições decimais em série do "amplicon", contendo o gene *Cyt b* da espécie *Bos indicus* .



De acordo com os resultados das análises foi possível observar que todas as reações singleplex padronizadas para cada uma das espécies apresentaram especificidade, reprodutibilidade, robustez, sensibilidade, precisão e linearidade. De acordo com o MIQE (BUSTIN et al., 2009), as reações singleplex otimizadas possuem todos os padrões adequados para a identificação e quantificação de uma reação de qPCR. No entanto, apesar da técnica atender a todos os padrões determinados para uma reação padronizada e otimizada, alguns fatores podem dificultar a quantificação da carne contida nos produtos comercializados. Inicialmente as medições analíticas de DNA utilizadas na quantificação de espécies não são facilmente correlacionadas ao conteúdo em massa da carne expressa em peso (grama/grama) e podem passar por interferências de variados aspectos (BALLIN, 2009). A utilização do DNA mitocondrial, por exemplo, pode permitir um baixo limite de detecção, porém, como o número de cópias apresenta variações de acordo com o tecido, faz-se necessário que a composição deste seja conhecida para posterior correlação com o peso em gramas da amostra. Ainda levando-se

em consideração a utilização do DNA mitocondrial como alvo utilizado neste estudo, entendendo-se que a biogênese mitocondrial está sujeita a um complexo controle fisiológico, o número de cópias dessas organelas podem variar entre animais da mesma espécie, de acordo com diferentes respostas individuais quando submetidos as condições ambientais de estresse tais como o abate, condições de manejo e patologias pré-existentes (SHAUGHNESSY, 2014; SCARPULLA, 2008; LEE; WEI, 2005), dificultando portanto a precisão na quantificação em produtos de origem animal.

O tamanho da célula e o teor de gordura e água, ou seja, o número de células por grama de carne, também são variáveis de acordo com as amostras e podem afetar a precisão da quantificação neste tipo de análise (BALLIN, 2009).

A análise de "High Resolution Melting" empregada neste estudo, utiliza agentes intercalantes (fluoróforos), os quais apresentam baixa fluorescência quando livres na solução e exibem um aumento no nível de fluorescência quando intercalados em DNA dupla fita (dsDNA) (RESENDE, 2016). O aumento gradativo da temperatura durante a análise de HRM promove a dissociação da dupla fita, liberando o intercalante e consequentemente reduzindo a fluorescência, gerando assim uma curva de dissociação característica para cada "amplicon" (PELT-VERKUIL; BELKUM; HAYS, 2008; REED; KENT; WITTWER, 2007). No entanto, ao contrário da utilização de sondas de sequências específicas comumente utilizadas em técnicas de PCR em tempo real, os corantes intercalantes não possuem especificidade para uma sequência própria de DNA, ligando-se portanto, a qualquer dupla fita presente na reação, como dímeros e produtos inespecíficos, permitindo a sua detecção (OLIVEIRA, 2010; PELT-VERKUIL; BELKUM; HAYS, 2008). Contudo, este problema pode ser contornado com o desenho adequado dos oligonucleotídeo iniciadores, os quais conferem elevada especificidade tanto na detecção quanto na quantificação destes métodos (ALI et al., 2015; OLIVEIRA, 2010).

De acordo com a literatura (BUSTIN et al., 2009), as reações singleplex otimizadas neste trabalho, apresentaram-se específicas, sensíveis e aplicáveis na identificação de espécies animais em produtos cárneos.

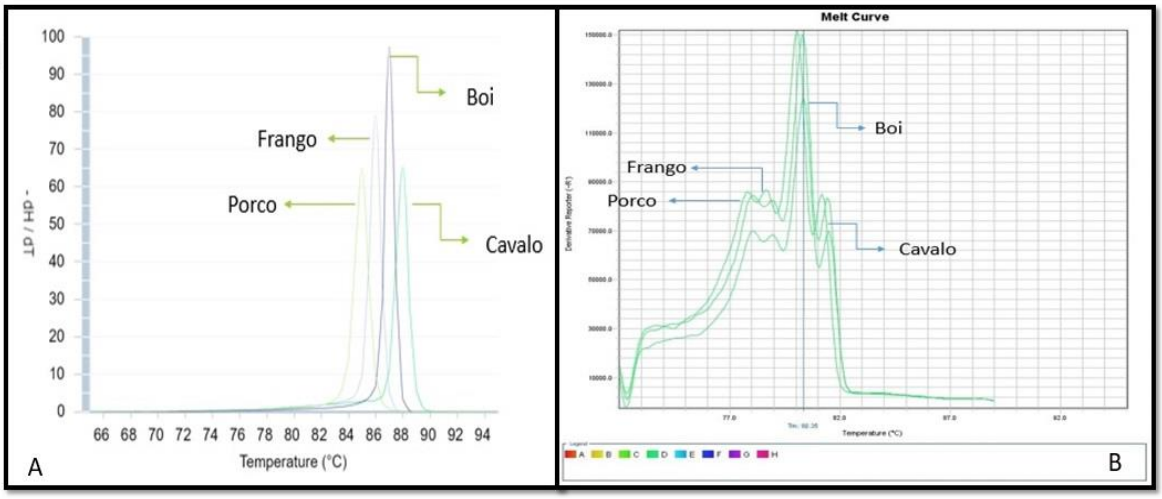
5.5 - Análise da reação multiplex

Durante a padronização e otimização da técnica multiplex estabeleceram-se as melhores condições da reação e de termociclagem. A reação foi estabelecida em um volume final de 12 μL, contendo 1X Melt Doctor HRM Master Mix (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), 200nM de cada oligonucleotídeo iniciador, "foward" e

“reverse”, das espécies bovina e equina, 800 nM de cada par de oligonucleotídeo iniciador, para frangos e suínos, e 3µL (10 ng) de DNA de cada espécie em estudo.

De acordo com a **Figura 8**, pode-se observar que a reação multiplex padronizada apresenta resultados similares aos esperados de acordo com a predição obtida durante a análise *in silico* da técnica de “High Resolution Melting” (HRM) com o auxílio da ferramenta de bioinformática uMELT. As Tms obtidas para cada espécie durante a reação (**Quadro 4**), encontram-se próximas, mas ainda é possível diferenciar cada uma das espécies.

Figura 8: Curvas de dissociação realizada pela análise de High Resolution Melting (HRM) utilizada para análise dos produtos da qPCR. A: Curva de predição das curvas de fluorescência e dos perfis de desnaturação dos produtos da qPCR gerados pelos quatro pares de oligonucleotídeo; B: Curva de fluorescência e dos perfis de desnaturação dos produtos da qPCR gerados pelos quatro pares de oligonucleotídeo iniciadores obtida a partir da padronização da reação multiplex.



Quadro 4: Tm encontradas durante padronização da reação multiplex

Espécie	Tm reação multiplex padronizada
Equus caballus	84,57 °C
Gallus gallus	83,21 °C
Bos indicus	83, 78 °C
Sus scrofa	81,87 °C

A reação multiplex padronizada no presente trabalho demonstrou a viabilidade da identificação de diferentes espécies.

Os parâmetros obtidos durante a padronização das técnicas singleplex demonstraram que as reações enquadram-se dentro dos limites estabelecidos para a realização da quantificação de forma adequada Bustin et al. (2009). Ganopoulos et al (2013) padronizaram um protocolo de PCR em tempo real para determinar a porcentagem de leite bovino, caprino e ovino em queijo Feta, utilizando regiões específicas de DNA mitocondrial associado com a técnica de HRM, obtendo uma precisão para detecção da presença de leite bovino em 0,1%, assim como determinou a capacidade da técnica em quantificar a proporção de mistura de leites de ovelhas e cabras em diferentes proporções em produtos comerciais de queijo Feta.

Segundo Kang e Tanaka (2018), a utilização de curvas padrões como as obtidas no presente estudo possibilitam a quantificação das espécies animais em produtos cárneos. No entanto, alguns fatores tais como: a utilização do método espectrofluorimétrico na quantificação do extrato de DNA e a utilização de um sistema de qPCR de referência adequado de acordo com o alvo analítico associado a normalização dos resultados podem aumentar a precisão da quantificação em produtos cárneos processados (KANG; TANAKA, 2018). Lopez-Oceja et al. (2017) padronizaram uma PCR em tempo real com análise de HRM utilizando um oligonucleotídeo iniciador universal para indicar a proporção de carnes, determinando a capacidade da técnica em quantificar a proporção de mistura de diferentes espécies com um nível de confiança > 84,9%. Sakaridis et al. (2013) utilizando dois pares de oligonucleotídeo iniciadores (específico e universal) para identificar e quantificar a carne de búfalo em produtos processados pela a análise de HRM, obteve um limite relativo de detecção e quantificação de 0,1% com alto coeficiente de correlação ($R^2 = 0,978$), indicando que a técnica possui capacidade em quantificar de forma proporcional.

6- CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em função dos resultados obtidos no presente estudo, que indicam que a técnica pode identificar as carnes de diferentes espécies, tanto individualmente quanto em produtos que possuem mais de uma espécie em sua composição, sugere-se que a técnica pode ser utilizada como forma de identificação de fraudes em carnes e produtos cárneos.

De acordo com o artigo 504, alínea c do RIISPOA (BRASIL,2017), são considerados produtos adulterados “os produtos que na manipulação ou na elaboração tenham sido empregados matérias primas ou ingredientes impróprios ou que não atendam ao disposto no RTIQ ou na formulação indicada no registro do produto”, determinando que a simples identificação de uma espécie diferente da indicada já classifica um produto como fraudado. No entanto, apesar da detecção ser fundamental para garantia da qualidade do produto e da segurança do consumidor, a quantificação pode ser um indicativo de intencionalidade ou de desvio tecnológico no processo produtivo (CARVALHO et al., 2015). Atualmente, o RIISPOA não apresenta especificações quanto a quantidades limites de carnes de diferentes espécies que poderiam diferenciar alterações e/ou adulterações provocadas por falhas nos processos produtivos ou fraudes intencionais (adição/substituição). Produtos comercializados em não-conformidade ocorrendo por imperícia, negligência ou imprudência, podem indicar falhas nos programas de controle de indústrias e oferecer os mesmos riscos daqueles adulterados de maneira dolosa. A determinação de limites de quantificação pela legislação podem auxiliar na coerção de práticas fraudulentas dolosas.

7- CONCLUSÃO

As reações singleplex padronizadas e otimizada no presente trabalho demonstraram viabilidade para detecção e identificação das espécies suína (*Sus scrofa*), bovina (*Bos indicus*), equina (*Equus caballus*) e de frangos (*Gallus gallus*) em carnes e produtos cárneos. Enquanto a reação multiplex padronizada demonstrou a viabilidade para identificação de diferentes espécies e pode ser utilizada para detecção e identificação de diferentes espécies de animais de açougue em uma única reação.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, O. et al. Analytical methods used for the authentication of food of animal origin. **Food Chemistry**, v. 246, p. 6-17, 2018.

ABRAHÃO, R.; NOGUEIRA, P.; MALUCELLI, M. O comércio clandestino de carne e leite no Brasil e o risco da transmissão da tuberculose bovina e de outras doenças ao homem: um problema de saúde pública. **Archives of Veterinary Science**, v. 10, n. 2, p; 1-17, 2005.

ALI, M. E. et al. Multiplex PCR assay for the detection of five meat species forbidden in Islamic foods. **Food Chemistry**, v. 177, p. 214-224, 2015.

ALIKORD, M. et al. Species identification and animal authentication in meat products: a review. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 12, p. 145-155, 2018.

ALTUNTAS, E. G. et al. Identification of meat species by using molecular and spectroscopic techniques. **Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology**, v. 5, n. 5, p. 488-492, 2017.

AMARAL, J. S. et al. Autenticação de produtos cárneos com a designação *Halal*: Detecção e quantificação de derivados de suíno (*Sus scrofa*). **Riscos e Alimentos**, n. 9, p. 11-13, 2015.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL (ABPA). **Relatório Anual 2017**. São Paulo: ABPA, 2017. Disponível em: <http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-anuais/2017>. Acesso em: 10 jul. 2018.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE (ABIEC). **Perfil da Pecuária no Brasil**: Relatório Anual 2017. Disponível em: <http://gtps.org.br/wp-content/uploads/2017/08/Sumario_2017_screen.pdf>. Acesso em: 09 Jul. 2018.

AGÊNCIA BRASILEIRA DE DESENVOLVIMENTO INDUSTRIAL (ABDI). **Relatório Setor de Carnes Brasileiro**. Junho, 2011. Disponível em: <http://www.abdi.com.br/Estudo/Relat%C3%B3rio_carnes_vf.pdf>. Acesso em: 12 jul. 2018.

AUNG, M. M.; CHANG, Y. S. Traceability in a food supply chain: Safety and quality perspectives. **Food control**, v. 39, p. 172-184, 2014.

BALLIN, N. Z.; VOGENSEN, F. K.; KARLSSON, A.H. Species determination - Can we detect and quantify meat adulteration? **Meat Science**, v. 83, n. 2, p. 165-174, 2009.

BALLIN, N. Z. Authentication of meat and meat products. **Meat Science**, v. 86, n. 3, p. 577-587, 2010.

BARTLETT, J.; STIRLING, B. **Methods in Molecular Biology**: PCR Protocols. 2° ed. Totowa: Humana Press, 2003. 519p.

BENDER, A. E. **Meat and meat products in human nutrition in developing countries**. Roma: FAO, 1992. 122p.

BENEVIDES, S. D.; NASSU, R. T. **Produtos Cárneos**. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/ovinos_de_corte/arvore/CONT000g3izohks02wx5ok0tf2hbweqanedo.html>. Acesso em: 10 jul. 2018.

BOHRER, B. M. Nutrient density and nutritional value of meat products and no-meat foods high in protein. **Trends in Food Science & Technology**, v. 65, p. 103-112, 2017.

BOTTERO, M. T.; DALMASSO, A. Animal species identification in food products: evolution of biomolecular methods. **The Veterinary Journal**, v. 190, n. 1, p. 34-38, 2011.

BRASIL. Decreto-Lei n° 2.848, de 7 de dezembro de 1940. Código Penal. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 31 dez. 1940. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Decreto-Lei/Del2848.htm>. Acesso em: 13 Jul. 2018.

BRASIL. Lei N° 1.521, de 26 de dezembro de 1951. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil,** Brasília, 26 dez. 1951. Disponível em: <http://www2.camara.leg.br/legin/fed/lei/1950-1959/lei-1521-26-dezembro-1951-362018-norma-pl.html>. Acesso em: 13 Jul. 2018.

BRASIL. Lei N° 8.078, de 11 de setembro de 1990. **Diário Oficial da União**, Brasília, 11 set. 1990a. Disponível em: <https://www2.senado.leg.br/bdsf/bitstream/handle/id/496457/000970346.pdf>. Acesso em: 13 Jul. 2018

BRASIL. Lei N° 8.137 de 27 dezembro de 1990. **Diário Oficial da União**, Brasília, 28 dez. 1990b. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/CCivil_03/Leis/L8137.htm>. Acesso em: 13 Jul. 2018.

BRASIL. Lei N° 9.677, de 02 de julho de 1998. **Diário Oficial da União**, Brasília, 03 jul. 1998. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L9677.htm>. Acesso em: 13 Jul. 2018.

BRASIL. MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 22, de 24 de novembro de 2005. Regulamento Técnico para Rotulagem de Produto de Origem Animal Embalado. **Diário Oficial da União**, Brasília, 25 novembro, 2005. Disponível em: < https://ambbrasilia.esteri.it/resource/2009/09/INTotale.pdf>. Acesso em: 13 Jul. 2018.

BRASIL. IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Estatística da Produção Pecuária** – junho 2017. Disponível em: <ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Fasciculo_Indicadores_IBGE/abate-leite-couro-ovos_201701caderno.pdf>. Acesso em: 02 jul. 2018.

BRASIL. MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Projeções do Agronegócio**: Brasil 2016/17 a 2026/27. Brasília: MAPA, 2017b. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/politica-agricola/todas-publicacoes-de-politica-agricola/projecoes-do-agronegocio/projecoes-do-agronegocio-2017-a-2027-versao-preliminar-25-07-17.pdf>. Acesso em: 07 jul. 2018.

BRASIL. MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto n° 9.013, de 29 de março de 2017. Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA). **Diário Oficial da União**, Brasília, 30 março, 2017c.

BRUGNANO, F. M. L. **Identificação da espécie animal em amostras de carne através da reação em cadeia pela polimerase**: o método de controle de fraudes em alimentos. 2010. 114f. Dissertação (Mestre em Ciências). Universidade de São Paulo. São Paulo.

BUSTIN, S. A. et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v. 54, n. 4, p. 611-622, 2009.

CARVALHO, A. C. S.; GENNARI, S. M.; PASCHOALIN, V. M. F. Consumption of animal products and frauds: DNA-based methods for the investigation of authenticity and traceability in dairy and meat-derived products - a review. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 52, n. 3, p. 183-194, 2015.

DANEZIS, G. P. et al. Food authentication: Techniques, trends & emerging approaches. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 85, p. 123-132, 2016.

DELGADO, C. et al. **Livestock to2020**: The next food revolution. Whashington: IFPRI; FAO; ILRI (Food, Agriculture and the Environment Discussion Paper, 28), 1999. 83p.

DOOLEY, J. J. et al. Detection of meat species using TaqMan real-time PCR assays. **Meat Science**, v. 68, n. 3, p. 431-438, 2004.

DOOSTI, A.; DEHKORDI, P. G.; RAHIMI, E. Molecular assay to fraud identification of meat products. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 1, p. 148-152, 2014.

ESPINOZA, T. et al. Tipos de fraudes en carnes y productos cárnicos: una revisión. **Scientia Agropecuaria**, v. 6, n. 3, p. 223-233, 2015.

EUROPEAN COMMISSION (EC). **The EU food fraud network and the system for administrative assistance & food fraud**: Annual Report 2016. Disponível em: <https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/foodfraud_network_activity_report_2016.pdf>. Acesso: 12 Jul. 2018.

EUROPEAN COMMISSION (EC). **Management Plan 2018**: DG Health and Food Safety (SANTE). Janeiro, 2018. Disponível em: <https://ec.europa.eu/info/sites/info/files/management-plan-sante-2018_en.pdf>. Acesso em: 15 Jul. 2018.

FAJARDO, V. et al. A review of current PCR-based methodologies for the authentication of meats from game animal species. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 8, p. 408-421, 2010.

FELKL, G. S. **Autenticidade molécular de produtos cárneos**. 2014. 65f. Dissertação (Mestre em Engenharia de Produção). Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Ponta Grossa.

GANOPOULOS, I. et al. A novel closed-tube method based on high resolution melting (HRM) analysis for authenticity testing and quantitative detection in Greek PDO Feta cheese. **Food Chemistry**, v. 141, p. 835-840, 2013.

GIRISH, P. et al. Meat species identification by polymerase chain reaction-restriction fragmente length polymorphism (PCR-RFLP) of mitochondrial 12S rRNA gene. **Meat Science**, v. 70, n.1, p. 107-112, 2005.

GLOBAL FOOD SAFETY INITIATIVE (GFSI). **GFSI position on mitigating the public health risk of food fraud**. Julho, 2014. Disponível em: <https://www.mygfsi.com/files/Technical_Documents/Food_Fraud_Position_Paper.pdf>. Acesso em: 12 jul. 2018.

GRUNERT, K. G. Future trends and consumer lifestyles with regard to meat consumption. **Meat Science**, v. 74, n. 1, p. 149-160, 2006.

GUIMARÃES, D. et al. Suinocultura: Estrutura da cadeia produtiva, panorama do setor no Brasil e no mundo e o apoio do BNDES. **BNDES Setorial**, n. 45, p. 85-136, 2017.

HAIDER, N.; NABULSI, I; AL-SAFADI, B. Identification of meat species by PCR-RFLP of the mitochondrial COI gene. **Meat Science**, v. 90, n. 2, p. 490-493, 2012.

HANSEN, A. Meat consumption and capitalist development: The meatificiation of food provision and practice in Vietnam. **Geoforum**, v. 93, p. 57-68, 2018.

HERNÁNDEZ-CHÁVEZ, J. F. et al. Técnicas analíticas para la determinación de la autenticidad de la carne y de los productos cárnicos procesados térmicamente. **Nacameh**, v. 1, n. 1, p. 97-109, 2007.

HSIEH, Y. H. P. et al. Detection of species adulteration in pork products using agar-gel immunodiffusion and enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of food quality**, v. 19, n. 1, p. 1-13, 1996.

HUCK, C. W.; PEZZEL, C. K.; HUCK-PEZZEI, V. A. Na industry perspective of food fraud. **Current Opinion in Food Science**, v. 10, p. 32-37, 2016.

JOHNSON, R. Food Fraud and "Economically Motivated Adulteration" of Food and Food Ingredients. **Congressional Research Service**. Whashington: Federation of American Scientists, 2014.

KANG, T. S.; TANAKA, T. Comparison of quantitative methods based on SYBR Green real-time qPCR to estimate pork meat adulteration in processed beef products. **Food Chemistry**, v. 269, p. 549-558, 2018.

KÖPPEL, R.; ZIMMERLI, F.; BRETENMOSER, A. Heptaplex real-time PCR for the identification and quantification of DNA from beef, pork, chicken, turkey, horse meat, sheep (mutton) and goat. **European Food Research and Technology**, v. 230, n. 1, p. 125-133, 2009.

KUMAR, A. et al. Identification of species origin of meat and meat products on the DNA basis: a review. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 55, n. 10, p. 1340-1351, 2015.

KUSHIDA, M. M. **Validação de Métodos Laboratoriais**: Avaliação do sistema BAX de análise de *Salmonella* spp. em alimentos por reação de polimerase em cadeia (PCR). 2005. 194f. Tese (Doutor em Ciência de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas. Campinas.

LEE, H. C.; WEI, Y. H. Mitochondrial biogenesis and mitochondrial DNA maintenace of mammalian cells under oxidative stress. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 37, p. 822-834, 2005.

LENSTRA, J. A.; BUNTJER, J. B.; JANSSEN, F. W. On the origin of meat-DNA techniques for species identification in meat products. **Veterinary Sciences Tomorrow**, Issue 2, 2001.

LOCKLEY, A.; BARDSLEY, R. DNA-based methods for food authentication. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, n. 2, p. 67-77, 2000.

LOPEZ-OCEJA, A. et al. Species identification in meat products: A new screening method based on high resolution melting analysis of cyt b gene. **Food Chemistry**, v. 237, p. 701-706, 2017.

MAFRA, I.; FERREIRA, I. M.; OLIVEIRA, M. B. P. Food authentication by PCR-based methods. **European Food Research and Technology**, v. 227, n. 3, p. 649-665, 2008.

MANN, N. J. A brief history of meat in the human diet and current health implications. **Meat Science**, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.06.008>. Acesso em: 09 jul. 2018.

MEIRA, L. C. **Desenvolvimento de metodologia de biologia molecular para a detecção de carne de cavalo (*Equus caballus*) em produtos cárneos**. 2014. 89f. Dissertação (Mestre em Segurança Alimentar). Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. Coimbra.

MOLOTO, K. W. et al. Protein separation by two different first dimension isoeletric point ranges in two-dimensional electrophoresis gels from Nguni breed m. longissimus lumborum using different staining methods. **Clinical Proteomics & Bioinformatics**, v. 1, n. 2, p. 28-31, 2016.

MONTOWSKA, M.; POSPIECH, E. Species identification of meat by electrophoretic methods. **Acta Sci. Pol. Technol. Alment.**, v. 6, n. 1, p. 5-16, 2007.

OLIVEIRA, T. M. S. **PCR em tempo real: métodos e aplicações**. 2010. 111f. Dissertação. Mestrado em Toxicologia e Ecotoxicologia. Universidade de Aveiro. Aveiro.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPETAION AND DEVELOPMENT/ FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (OECD/FAO). OECD-FAO Agricultural Outlook 2015-2024. Paris: OECD Publishing, 2015. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-i4738e.pdf>. Acesso em: 08 Jul. 2018.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPETAION AND DEVELOPMENT/ FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (OECD/FAO). OECD-FAO Agricultural Outlook 2016-2025. Paris: OECD Publishing, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1787/agr_outlook-2016-en>. Acesso em: 08 Jul. 2018.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPETAION AND DEVELOPMENT/ FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (OECD/FAO). OECD-FAO Agricultural Outlook 2017-2026. Paris: OECD Publishing, 2017. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-i7465e.pdf>. Acesso em: 08 Jul. 2018.

PEARSON, A. M.; GILLETT, T. A. **Processed meats**. 3° Edição. Springer Science Business Media, 2012. 459p.

PELT-VERKUIL, E.; BELKUM, A.; HAYS, J. P. **Principles and Technial Aspects of PCR Amplification**. Springer, 2008. 332p.

PEREIRA, P. M. D. C. C.; VICENTE, A. F. D. R. B. Meat nutritional composition and nutritive role in the human diet. **Meat Science**, v. 93, n. 3, p. 586-592, 2013.

PREMANANDH, J. Horse meat scandal – A wake-up call for regulatory authorities. **Food control**, v. 34, n. 2, p. 568-569, 2013.

PERESTAM, A. T. et al. Comparison of real-time PCR and ELISA-based methods for the detection of beef and pork in processed meat products. **Food Control**, v. 71, p. 346-352, 2017.

POSTOLLEC, F. et al. Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. **Food Microbiology**, v. 28, n. 5, p. 848-861, 2011.

RAHMATI, S. et al. Identification of meat origin in food products – A review. **Food Control**, v. 68, p. 379-390, 2016.

REED, G. H.; KENT, J. O.; WITTWER, C. T. High-resolution DNA melting analysis for simple and eficiente molecular diagnostics. **Pharmacogenomics**, v. 8, n. 6, p. 597-608, 2007.

RESENDE, R. R. **Biotecnologia aplicada à saúde fundamentos e aplicações**: Vol 3. Editora Blucher, 2016. 1077p.

RIBEIRO, C. D. S. G.; CORÇÃO, M. O consumo de carne no Brasil: entre valores socioculturais e nutricionais. **Demetra: alimentação, nutrição & saúde**, v. 8, n. 3, p. 425-438, 2013.

ROBINSON, T. P.; POZZI, F. Mapping supply and demand for animal-source foods to 2030. **Animal Production and Health Working Paper n° 2**. Roma: FAO, 2011. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/014/i2425e/i2425e00.pdf>. Acesso em: 08 Jul. 2018.

RODRÍGUEZ, M. A. et al. PCR identification of beef, sheep, goat, and pork in raw and heat-treated meat mixtures. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 1, p. 172-177, 2004.

SAKARIDIS, I. et al. A fast and accurate method for controlling the correct labeling of products containing buffalo meat using High Resolution Melting (HRM) analysis. **Meat Science**, n. 94, p. 84-88, 2013.

SANS, P.; COMBRIS, P. World meat consumption patterns: An overview of the last fifty years (1961-2011). **Meat Science**, v. 109, p. 106-111, 2015.

SCARPULLA, R. C. Transcriptional Paradigms in Mammalian Mitochondrial Biogenesis and Function. **Physiol Ver.**, v. 88, p. 611-638, 2008.

SENTANDREU, M. Á.; SENTANDREU, E. Authenticity of meat products: Tools against fraud. **Food Research International**, v. 60, p. 19-29, 2014.

SHAUGHNESSY, D. T. et al. Mitochondria, Energetics, Epigenetics, and Cellular Responses to Stress. **Environmental Health Perspectives**, v. 122, n. 12, p. 1271-1278, 2014.

SINGH, V.; NEELAM, S. Meat species specifications to ensure the quality of meat: a review. **International Journal of Meat Science**, v. 1, n. 1, p. 15-26, 2011.

SPEEDY, A. W. Global production and consumption of animal source foods. **The Journal of Nutrition**, v. 133, n. 11, p. 4048S-4053S, 2003.

SPINK, J.; MOYER, D. C. Defining the public health threat of food fraud. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 9, p. R157-R163, 2011.

STANCIU, S. Horse meat consumpition – Between scandal and reality. In: **2nd Global Conference on Business, Economics, Management and Tourism**. Praga – República Checa, 2014.

TÄHKÄPÄÄ, S. et al. Patterns of food frauds and adulterations reported in the EU rapid alert system for food and feed and in Finland. **Food Control**, v. 47, p. 175-184, 2015.

TSIMIDOU, A. Z. et al. Food Fraud. In: **Encyclopedia of Food and Health**. Thessaloniki: Elsevier, 2016. p. 35-42.

VOSSEN, R. H. A. M. et al. High-Resolution Meltig Analysis (HRMA) – More Than Just Sequence Variant Screening. **Human Mutation**, v. 30, n. 6, p. 860-866, 2009.

WALKER, M. J.; BURNS, M.; BURNS, D. T. Horse meat in beef products-species substitution 2013. **Journal of the Association of Public Analysts**, v. 41, p. 67-106, 2013.

WILLIAMS, P. Nutritional composition of red meat. **Nutrition & Dietetics**, v. 64, Suppl. 4, p. 113–119, 2007.

WITTWER, C. T. High-Resolution DNA Melting Analysis: Advancements and Limitations. **Human Mutation**, v. 30, n. 6, p. 857-859, 2009.

WOOD, J. D. et al. Effects of fatty acids on meat quality: a review. **Meat Science**, v. 66, n. 1, p. 21-32, 2003.

ZHANG, W. et al. Technological demands of meat processing – An Asian perspective. **Meat Science**, v. 132, p. 35-44, 2017.