

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PRODUÇÃO
MESTRADO EM ENGENHARIA DE PRODUÇÃO**

GABRIELA SARTORI FELKL

AUTENTICIDADE MOLECULAR DE PRODUTOS CÁRNEOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

PONTA GROSSA

2014

GABRIELA SARTORI FELKL

AUTENTICIDADE MOLECULAR DE PRODUTOS CÁRNEOS

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Produção, do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Produção, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Juliana Vitoria
Messias Bittencourt

Co-orientador: Prof. Dr. Sabrina Ávila
Rodrigues

PONTA GROSSA

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

F316a Felkl, Gabriela Sartori
Autenticidade molecular de produtos cárneos / Gabriela Sartori Felkl. —
2014.
65 f. : il. ; 30 cm

Orientadora: Juliana Vitoria Messias Bittencourt
Co-orientadora: Sabrina Ávila Rodrigues
Dissertação (Mestrado) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
Programa de Pós-graduação em Engenharia de Produção. Área de
concentração: Gestão Industrial, Ponta Grossa, 2014.
Bibliografia: f. 59-64

1. Alimentos – Indústria – Controle de qualidade. 2. Carne – Indústria.
3. Alimentos – Comércio. 4. Carne – Comércio. 5. Qualidade dos produtos.
6. Garantia de qualidade. 7. Reação em cadeia de polimerase. 8. Engenharia
de Produção – Dissertações. I. Bittencourt, Juliana Vitoria Messias, orient. II.
Rodrigues, Sabrina Ávila, co-orient. III. Universidade Tecnológica Federal do
Paraná. Programa de Pós-graduação em Engenharia de Produção. III. Título.

CDD (20. ed.) 670.42



Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Ponta Grossa
Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA DE PRODUÇÃO**



FOLHA DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação Nº 238 / 2014

AUTENTICIDADE MOLECULAR DE PRODUTOS CÁRNEOS

Por

GABRIELA SARTORI FELKL

Esta dissertação foi apresentada às **14 horas de 19 de fevereiro de 2014** como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRE em ENGENHARIA DE PRODUÇÃO, com área de concentração em Gestão Industrial, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Produção. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Prof. Dr. Luciano dos Santos Bersot (UTFPR)

Prof. Dr. Maria Helene Giovanetti Canteri
(UTFPR)

Prof. Dr. Sabrina Avila Rodrigues (UTFPR) –
Co-orientador

Prof. Dr. Juliana Vitoria Messias Bittencourt
(UTFPR) - *Orientador*

Prof. Dr. Aldo Braghini Junior (UTFPR)
Coordenador do PPGEP

A FOLHA DE APROVAÇÃO ASSINADA ENCONTRA-SE NO DEPARTAMENTO DE
REGISTROS ACADÊMICOS DA UTFPR – CÂMPUS PONTA GROSSA

Dedico esta dissertação a minha família pelo exemplo de dedicação, carinho, apoio e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me proporcionar força, persistência e coragem para consolidar um sonho, sempre iluminando meu caminho.

À professora Dr.^a Juliana V.M. Bittencourt, minha orientadora, pela dedicação e ensinamentos passados.

À professora Dr.^a Sabrina Avila Rodrigues pela co-orientação e cooperação para a realização dessa dissertação.

Aos meus pais, Mayro e Silvane, por serem sempre minha base, pela paciência, compreensão, carinho e apoio para a concretização dessa pesquisa.

Ao meu irmão, Diego, pelo companheirismo e pela ajuda sempre que necessária.

À equipe do Laboratório de Bioengenharia, especialmente Renata, Marjory e Andiará, pela amizade e por fazer parte dessa etapa tão importante na minha vida.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

À todos os colegas e professores que por algum motivo contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

RESUMO

FELKL, Gabriela S. **Autenticidade molecular de produtos cárneos**. 2014. 65f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Ponta Grossa, 2014.

A autenticidade adequada de um produto cárneo conforme seu padrão de identidade (rotulagem) é imprescindível, por questões econômicas, de saúde éticas e religiosas, além de ser uma exigência dos órgãos vigentes de alimentos. Contudo, a identificação dos constituintes cárneos em um produto ainda é um desafio considerável para as autoridades, visto que nem sempre é possível detectá-los através dos métodos convencionais, principalmente após o processamento do produto. Este fator limitante torna a fraude por substituição de uma espécie animal por outra de menor valor econômico um ato muito comum. O presente trabalho tem como objetivo determinar a presença de carne suína e de frango em produtos processados a partir do diagnóstico molecular por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Para tanto, realizou-se o diagnóstico molecular da espécie suína e de frango, primeiramente extraído-se o DNA alvo, seguido da amplificação do mesmo. Em seguida, os oligonucleotídeos iniciadores das espécies suína e aviária foram avaliados quanto a sua especificidade e sensibilidade, mostrando-se eficazes, com limite de detecção a partir de 0,1%. Ao analisar 27 amostras de produtos cárneos comerciais, a metodologia PCR se mostrou satisfatória e robusta, uma vez que detectou adulteração em três amostras, além de não demonstrar variação nos resultados em função do tratamento térmico utilizado no produto.

Palavras-chave: Adulteração. Espécie animal. PCR. DNA.

ABSTRACT

FELKL, Gabriela S. **Molecular authenticity of meat products**. 2014. 65f.
Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) - Federal Technology University
- Parana. Ponta Grossa, 2014.

Proper authenticity of a meat product as your identity standard (labeling) is essential by economic issues, health and religious as well as being a requirement in existing organs of food. However, the identification of constituents in a meat product is still a considerable challenge for the authorities, as it is not always possible to detect them by conventional methods, especially after processing the product. This limiting factor makes the fraud by replacement of one animal species by another of lower economic value a very common act. This study aims to determine the presence of pork and chicken in processed products from the molecular diagnostic by Polymerase Chain Reaction (PCR). For this, we carried out the molecular diagnosis of swine and chicken species, first extracting the target DNA, followed by amplification of the same. Thus, the primers of chicken and pork species were evaluated for specificity and sensitivity, showing effective, with a detection limit from 0.1%. By analyzing 27 samples of commercial meat products, the PCR method has proved satisfactory and robust, once adulteration as been detected in three samples. Besides not demonstrate variation us results regarding to heat treatment used in the product.

Keywords: Adulteration. Animal species. PCR. DNA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Autenticidade e sua relação com os produtos à base de carne	29
Figura 2 - Representação das três etapas de amplificação do DNA por PCR	33
Figura 3 - Exemplo de banda de DNA.....	34
Figura 4 - Perfil da banda de DNA da espécie suína	43
Figura 5 - Perfil da banda de DNA da espécie de frango	43
Figura 6 - Resultado da PCR gradiente para o <i>primer</i> da espécie suína em 227 pb	44
Figura 7 - Resultado do teste de especificidade para o <i>primer</i> da espécie suína em 227 pb.	45
Figura 8 - Resultado da PCR gradiente para o <i>primer</i> da espécie de frango em 422 pb	46
Figura 9 - Resultado do teste de especificidade para o <i>primer</i> da espécie de frango em 422pb	47
Figura 10 - Perfil da banda de DNA da amostra de linguiça suína.....	48
Figura 11 - Resultado do teste de validação da metodologia em linguiça suína.....	49
Figura 12 - Resultado do teste de sensibilidade para o iniciador da espécie de frango	52
Figura 13 - Resultado do teste de sensibilidade para o iniciador da espécie suína ..	52
Figura 14 - Resultado do teste de sensibilidade para o iniciador da espécie de frango	52
Figura 15 - Resultado do teste de sensibilidade para o iniciador da espécie suína ..	52
Figura 16 - Resultado do teste de sensibilidade para o iniciador da espécie suína ..	53
Figura 17 - Resultado do teste de sensibilidade para o iniciador da espécie de frango	53
Figura 18 - Resultado do teste de sensibilidade para o iniciador da espécie suína ..	54
Figura 19 - Resultado do teste de sensibilidade para o iniciador da espécie de frango	54
Figura 20 - Resultado da análise de produtos do mercado local para o iniciador da espécie de frango.....	56
Figura 21 - Resultado da análise de produtos do mercado local para o iniciador da espécie suína	56
Figura 22 - Resultado da análise de produtos do mercado local para o iniciador da espécie de frango.....	57
Figura 23 - Resultado da análise de produtos do mercado local para o iniciador da espécie suína	57

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 - Principais indicadores de desempenho do setor alimentício no Brasil em 2012	17
Quadro 2 - Consumo de cada espécie animal segundo a cultura dos países.....	21
Tabela 1 - Faturamento da indústria de produtos alimentares entre 2008 a 2012	18
Tabela 2 - Produção brasileira de carne suína, por estado, entre 2004 a 2013.....	18
Tabela 3 - Principais países consumidores de carne suína	19
Tabela 4 - Principais países consumidores de carne de frango.....	19
Tabela 5 - Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores da espécie suína e aviária	37
Tabela 6 - Concentrações e tratamentos térmicos para o teste de sensibilidade	39
Tabela 7 - Constituintes constatados na rotulagem de produtos cárneos.....	40
Tabela 8 - Componentes da reação de PCR para os oligonucleotídeos iniciadores da espécie suína e de	41
Tabela 9 - Condições de temperatura e tempo utilizadas na amplificação de DNA via PCR para os oligonucleotídeos iniciadores da espécie suína e de frango.....	41
Tabela 10 - Resumo dos resultados finais para o oligonucleotídeo iniciador da espécie suína e de frango	50
Tabela 11 - Resultado do Teste de Sensibilidade da Técnica PCR em diferentes concentrações e tratamentos térmicos.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS

2-DE	Eletroforese Bidimensional
APPCC	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
BPF	Boas Práticas de Fabricação
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay</i>
FIA	Injeção em Fluxo
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HTST	Alta Temperatura em Curto Tempo
IEF	Focagem Isoelétrica
NIR	<i>Near Infra-Red</i>
PB (pb)	Pares de Base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PIB	Produto Interno Bruto
SAG	Sistema Agroalimentar
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de Poliacrilamida com Dodecilsulfato de Sódio
UV	Ultra Violeta

LISTA DE SIGLAS E ACRÔNIMOS

ANVISA	Agência de Segurança Alimentar
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
MRE	Ministério das Relações Exteriores
SRI	Secretaria de Relações Internacionais do Agronegócio
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná
ABIA	Associação Brasileira das Indústrias de Alimentos
APEX	Agência Brasileira de Promoção de Exportação e Investimentos
CIBAL HALAL	Central Islâmica Brasileira de Alimentos <i>Halal</i>
FAMBRAS	Federação das Associações Muçulmanas do Brasil
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
SEAB	Associação Brasileira das Indústrias de Alimentos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 JUSTIFICATIVA.....	14
1.2 OBJETIVOS.....	15
1.2.1 Objetivo Geral.....	15
1.2.2 Objetivos Específicos	15
1.3 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO	16
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	17
2.1 PRODUTOS CÁRNEOS E A INDÚSTRIA ALIMENTÍCIA.....	17
2.1.1 Características dos Produtos Cárneos para o Mercado.....	20
2.1.2 Produto Carne: Definição e Classificação	23
2.2 CONTROLE DA QUALIDADE EM PRODUTOS CÁRNEOS	25
2.2.1 Rastreabilidade.....	25
2.2.2 Autenticidade	27
2.3 MÉTODOS PARA AUTENTICIDADE DE PRODUTOS CÁRNEOS PROCESSADOS ..	28
2.3.1 Métodos Convencionais	29
2.3.2 Diagnóstico Molecular via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	32
3 METODOLOGIA.....	35
3.1 CLASSIFICAÇÃO DA PESQUISA.....	35
3.2 EXTRAÇÃO DO DNA PARA UTILIZAÇÃO COMO CONTROLE POSITIVO	35
3.3 PADRONIZAÇÕES DA TÉCNICA PCR ESPECÍFICA PARA SUÍNO E FRANGO.....	36
3.3.1 Amplificação do DNA Alvo via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	37
3.4 VERIFICAÇÃO DA METODOLOGIA PCR EM UM EMBUTIDO	38
3.5 SENSIBILIDADE DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES.....	38
3.6 ANÁLISE DOS PRODUTOS CÁRNEOS ADQUIRIDOS NO COMÉRCIO LOCAL.....	40
3.7 VISUALIZAÇÃO DOS RESULTADOS	42
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
4.1 PADRONIZAÇÕES DA TÉCNICA PCR ESPECÍFICA PARA SUÍNO E FRANGO	43
4.1.1 Extração do DNA Alvo	43
4.1.2 Amplificação do DNA Alvo via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	44
4.1.2.1 Espécie suína	44
4.1.2.2 Espécie de frango.....	46
4.2 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA PCR EM UM EMBUTIDO	48
4.3 SENSIBILIDADE DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES.....	50
4.4 ANÁLISE DOS PRODUTOS CÁRNEOS ADIQUIRIDOS NO COMÉRCIO LOCAL	55
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	58
REFERÊNCIAS	59
ANEXO – preparação de reagentes e soluções.....	65

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a cadeia de carnes se tornou o segundo maior mercado de exportação do agronegócio brasileiro. O país alcançou a liderança como o maior exportador de carne de frango e de bovinos e é o quarto no ranking ao que se refere à carne de suínos (ABIA, 2013).

A qualidade da carne abrange seus atributos sensoriais (cor, sabor, odor), tecnológicos (pH, capacidade de retenção de água), nutricionais (proteínas, vitaminas e minerais), sanitários (ausência de agentes patogênicos), inocuidade quanto à presença de resíduos químicos e físicos (antibióticos e hormônios), veracidade (ausência de adulteração; produto condizer com sua rotulagem) e éticos (costumes, crenças e cultura do país) (BRIDI, 2008).

Derivados cárneos estão sob os mesmos padrões de qualidade intrínsecos e extrínsecos da carne *in natura*. Contudo, no que tange a composição proteica animal é onde se encontra a maior limitação tecnológica para autenticidade, uma vez que, em produtos processados ocorre a desnaturação progressiva da proteína, podendo interferir na maioria dos métodos biológicos e bioquímicos convencionais (BRUGNANO, 2010).

A autenticidade de um produto cárneo é de grande valia, visto que, após seu processamento, torna-se difícil a determinação dos constituintes proteicos pelos métodos convencionais. Derivados de carne apresentam impactos além da esfera econômica, abordando também, tabus religiosos, aversões morais, ou ainda, a alergia a carne de espécies excêntricas. A regularização adequada de produtos conforme seu padrão de identidade é uma exigência dos órgãos vigentes de regulamentação de alimentos. No entanto, a identificação das espécies animais contidas nos produtos cárneos ainda é um desafio considerável para as autoridades (BAI et al., 2009), uma vez que nem sempre é possível identificar a adulteração pelos métodos de rotina (HAUNSHI et al., 2009).

Portanto, devido às limitações dos métodos existentes, há grande necessidade do desenvolvimento de técnicas mais precisas, rápidas e fáceis de usar (ÍLHAK e ARSLAN, 2007). Neste sentido, diferentes métodos moleculares têm surgido para melhor identificar e autenticar as espécies animais, como a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) (HAUNSHI et al., 2009).

Atualmente tem-se ouvido inúmeros casos de adulteração da espécie carne em produtos *fast food* e prontos para o consumo, como o caso de lotes de lasanha das marcas *Picard*, *Carrefour* e *Systeme U*, retirados dos supermercados da França, perante a possibilidade de conter carne equina no lugar de carne bovina. Todos os produtos tinham em comum o mesmo fornecedor de carne em Luxemburgo (UOL, 2013). Ou ainda, como o caso do estabelecimento *Burger King*, o qual revelou a presença de DNA equino em amostras de carne bovina processada adquirida no frigorífico *Silvercrest* (fornecedor de carne), na Irlanda, (O POVO, 2013).

Deste modo questiona-se: *“Há possibilidade de autenticar produtos cárneos processados quanto às espécies animais utilizadas como matéria prima?”*

Sendo assim, tem-se que o método PCR é uma ferramenta possível de ser ajustada para a autenticidade de espécies animais em produtos cárneos após o seu processamento.

1.1 JUSTIFICATIVA

A identificação de espécies animais em produtos cárneos é uma questão importante para proteger o consumidor de adulteração. A fraude é indesejável por questões econômicas (substituição da espécie animal rotulada por uma de menor valor econômico), de saúde, religiosas e, também, pelo aspecto emocional. Nas questões de saúde, pois abrange a alergia a alguma espécie animal, ou seja, o consumidor ao procurar determinado produto, confia em sua rotulagem, adquirindo apenas aquele que não exerça riscos à sua saúde. Quanto às questões religiosas, no caso de populações que por tradição é proibido consumir carne de alguns animais, como no caso dos *Hindus*, para os quais a vaca é um animal sagrado ou para os muçulmanos, para quem o consumo de carne suína é pecado, de acordo com seu livro sagrado.

Neste sentido, os consumidores mais atentos e cuidadosos têm exigido, cada vez mais, a rotulagem correta desses produtos cárneos. Entretanto, os métodos convencionais apresentam difícil mensuração após processamento (HAUNSHI et al., 2009). Com isso, alguns métodos baseados na análise de DNA têm sido aplicados com sucesso para a detecção desse conteúdo proteico (HSIEH et al., 2005).

Recentemente, as aplicações da PCR em análise de alimentos têm aumentado devido à possibilidade de amplificação de regiões específicas de modo mais preciso e confiável (BAI et al., 2009). De acordo com diversos estudos, a PCR é um dos métodos mais indicados para a análise de rotina na identificação de espécies animais, por ser altamente sensível e específico, além da sua simplicidade (HSIEH et al., 2005; ÍLHAK e ARSLAN, 2007; KESMEN; SAHIN; YETIM, 2007; HAUNSHI et al., 2009; BAI et al, 2009; MANE; MENDIRATTA; TIWARI, 2009; ULCA et al., 2013).

Devido a estas características, a metodologia PCR abre a perspectiva de ser utilizada como método de autenticidade de produtos cárneos pela indústria ou mesmo como uma possibilidade de fiscalização pelos órgãos competentes, justificando esta pesquisa.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Determinar a presença de carne suína e de frango em produtos processados a partir do diagnóstico molecular por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

1.2.2 Objetivos Específicos

- Estabelecer um protocolo para isolamento de DNA a partir de um produto alimentício para diagnóstico molecular;
- Ajustar as condições para amplificação de DNA para diagnóstico das espécies de frango e suína;
- Verificar o sistema de autenticidade estabelecido (PCR) em um embutido;
- Avaliar a sensibilidade do método PCR em produtos com diferentes concentrações do constituinte cárneo alvo e, preparado sob diferentes tratamentos térmicos;

- Averiguar a autenticidade de produtos cárneos comerciais quanto ao uso de carne suína e de frango.

1.3 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

A dissertação está dividida em cinco capítulos. O capítulo 1 refere-se à introdução, dispostos o problema, a hipótese, a justificativa e os objetivos da pesquisa. No capítulo 2 encontra-se o referencial teórico, o qual engloba os produtos cárneos e a indústria de alimentos, suas características para o mercado nacional e internacional, assim como sua definição e classificação. Discorre, também, sobre o controle de qualidade em produtos cárneos, principalmente a rastreabilidade e a autenticidade. Finalizando com os métodos para autenticidade de produtos cárneos, os métodos convencionais e os métodos moleculares, como a PCR. O terceiro capítulo engloba a metodologia utilizada para a realização dos objetivos da pesquisa, a qual antecede os resultados e discussão no capítulo 4. O quinto capítulo refere-se às considerações finais da dissertação.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 PRODUTOS CÁRNEOS E A INDÚSTRIA ALIMENTÍCIA

A produção da indústria de alimentos e de bebidas equivale a 9,5% do PIB (Produto Interno Bruto) do Brasil, gerando um saldo comercial superior ao produzido pelo restante da economia. O faturamento das empresas desse segmento somou R\$ 431,9 bilhões em 2012, sendo R\$ 353,9 bilhões em alimentos. Este desempenho faz com que o setor seja o primeiro em valor bruto de produção da indústria de transformação. Do total de vendas, 20% ou US\$ 43,4 bilhões (R\$ 102 bilhões) foram para a exportação, fazendo do setor alimentício um dos mais relevantes para a geração de saldo comercial positivo, atingindo em 2012 US\$ 37,8 bilhões acima do saldo comercial da economia brasileira como um todo, de US\$ 19,4 bilhões (Quadro 1) (ABIA, 2013).

Faturamento	R\$ 431,9 bilhões
Exportação	US\$ 43,4 bilhões
Importação	US\$ 5,6 bilhões
Saldo da Balança Comercial	US\$ 37,8 bilhões
Contingente Produto	32,1 mil empresas formais

Quadro 1- Principais indicadores de desempenho do setor alimentício no Brasil em 2012
Fonte: Adaptado de ABIA, 2013.

Segundo Abia (2013) as indústrias brasileiras exportadoras de alimentos processados vêm alcançando posições de liderança no comércio mundial, em produtos como açúcar, carnes e derivados.

Tabela 1- Faturamento da indústria de produtos alimentares entre 2008 a 2012

Ranking dos principais setores	2008	2009	2010	2011	2012
Faturamento Líquido (R\$ Bi)					
Derivados de Carne	61,0	58,5	66,0	79,1	88,7
Beneficiamento de Café, Chá e Cereais	31,1	32,9	35,9	40,6	46,9
Açúcares	15,9	30,2	37,7	42,2	41,9
Laticínios	26,4	29,0	33,1	38,1	42,2
Óleos e Gorduras	32,0	29,0	29,3	34,5	40,9
Derivados de Trigo	18,7	18,9	19,9	21,4	23,5
Derivados de Frutas e Vegetais	14,8	14,9	15,6	18,2	20,4
Diversos (salgadinhos, sorvetes e temperos)	14,0	15,4	17,7	20,5	24,2
Chocolate, Cacau e Balas	9,1	9,9	10,5	11,5	12,4
Desidratados e Congelados (pratos prontos)	5,1	5,6	6,5	7,4	9,5
Conservas de Pescados	2,0	2,3	2,5	2,9	3,4

Fonte: Adaptado de ABIA, 2013.

O setor industrial da carne suína vem se qualificando como um dos grandes responsáveis pela sustentação do desenvolvimento econômico e social de muitos municípios brasileiros (Tabela 2) (ABIPECS, 2013).

Tabela 2- Produção brasileira de carne suína, por estado, entre 2004 a 2013

Estados	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2013
Produção Industrial (mil toneladas)									
Rio Grande do Sul	383.3	416.7	465.6	481.4	528.4	585.9	586.1	602.0	620.4
Santa Catarina	586.9	619.0	732.6	754.3	724.3	751.7	737.9	782.1	805.5
Paraná	376.1	389.6	430.8	437.2	444.3	487.9	491.1	529.7	529.7
São Paulo	171.2	168.1	170.0	176.6	147.0	147.4	156.0	155.7	151.3
Minas Gerais	213.1	251.8	314.9	335.5	348.1	375.0	397.1	428.0	455.2
Mato Grosso do Sul	67.4	71.7	68.5	70.2	70.9	80.5	102.1	102.3	109.1
Mato Grosso	79.1	104.7	111.5	116.2	140.0	152.3	175.0	187.0	214.7
Goiás	97.2	108.7	115.1	121.1	127.0	137.6	147.7	156.5	161.4
SUB TOTAL	1.974.3	2.130.4	2.408.8	2.492.4	2.529.9	2.718.3	2.792.9	2.943.3	3.047.3
Outros Estados	159.1	116.7	122.0	151.1	154.1	154.4	164.2	176.5	185.7
TOTAL INDUSTRIAL	2.133.4	2.247.0	2.530.9	2.643.6	2.684.0	2.872.7	2.957.0	3.119.8	3.233.0
Subsistência	487.9	462.2	412.3	354.0	342.4	317.3	280.5	278.0	250.0
BRASIL	2.621.3	2.709.3	2.943.1	2.997.6	3.026.4	3.190.0	3.237.5	3.397.8	3.483.0

Fonte: Adaptado de ABIPECS, 2013.

Ainda analisando o mercado de carnes, constata-se que a demanda vem aumentando de forma expressiva no Brasil e no mundo. Nos últimos quarenta anos, o consumo *per capita* mundial de carnes mais do que dobrou, passando de 23 kg em 1961, para 46,6 kg em 2009. As principais carnes consumidas mundialmente são: suína, frango, bovina, ovina, caprina e pescado, sendo a carne suína uma das carnes mais importantes globalmente, com produção mundial de 100.399 mil

toneladas em 2009. Já em relação ao setor avícola, Brasil, EUA e a China são os maiores produtores de carne de frango (MORAES e CAPANEMA, 2011).

Considerando o setor de derivados cárneos, o nível de consumo de proteínas de origem animal, não contempla informações sobre pescados, neste trabalho foi adotado o mesmo critério. Constata-se que a carne suína é a mais consumida no mundo. A FAO (Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação) informou que seu consumo teve crescimento acumulado superior a 20% entre os anos 1990 a 2009. Em 2010, foram consumidas mais de 100 milhões de toneladas de carne suína, sendo os chineses responsáveis por aproximadamente 50% desse volume. Na Tabela 3 estão distribuídos os principais consumidores de carne suína, com consumo total de 75 milhões de toneladas em 2010. Já quanto à carne de frango, esta é a segunda mais consumida mundialmente, sendo seus principais consumidores: EUA, China, União Europeia, Brasil e México (Tabela 4) (MORAES e CAPANEMA, 2011).

Tabela 3- Principais países consumidores de carne suína

País/Ano	2006	2007	2008	2009	2010	2011
	(mil toneladas)					
China	46.014	42.710	46.691	48.823	51.097	51.590
União Europeia	20.631	21.507	21.024	21.057	21.271	20.600
EUA	8.643	8.965	8.806	9.013	8.653	8.485
Rússia	2.639	2.534	2.789	2.688	2.773	3.159
Brasil	2.191	2.260	2.390	2.423	2.577	2.620
Mundo	95.453	93.489	97.853	100.268	102.953	103.115

Fonte Adaptado de MORAES e CAPANEMA, 2011.

Tabela 4- Principais países consumidores de carne de frango

País/Ano	2006	2007	2008	2009	2010	2011
	(mil toneladas)					
EUA	13.671	13.582	13.428	12.940	13.463	13.670
China	10.371	11.415	11.954	12.210	12.457	12.890
União Europeia	7.656	8.358	8.564	8.692	8.779	8.870
Brasil	6.853	7.384	7.792	8.032	9.132	8.301
México	3.010	3.061	3.281	3.264	3.344	3.388
Mundo	64.385	68.308	71.032	71.860	75.127	75.277

Fonte Adaptado de MORAES e CAPANEMA, 2011.

Moraes e Capanema (2011) afirmam ainda que o consumo mundial de carne deverá aumentar em médio e longo prazo. Subsidia essa afirmativa o aumento da população, em especial nos países em desenvolvimento, e do nível de renda, já que o consumo *per capita* de carne bovina, por exemplo, está altamente correlacionado com o crescimento econômico e com o processo rápido de urbanização desses países.

O Brasil dispõe de um grande mercado interno, que consome entre 60 e 80% de sua produção de proteína animal. Somado a esse fato, o país é influente no comércio mundial de carnes, como produtor ou consumidor. Entre elas, a carne de frango é a mais relevante, haja vista que o Brasil é o maior exportador mundial e o terceiro maior produtor. Entre as carnes mais consumidas no mundo, a suína ocupa o terceiro lugar na preferência dos brasileiros. Segundo Moraes e Capanema (2011), o consumo de suínos no Brasil totalizou 2,6 milhões de toneladas em 2010, aumentando 32% em relação a 2005. O país é o sexto maior consumidor de carne suína do mundo, com cerca de 3% do consumo global. Vale ressaltar que o consumo de carne suína no Brasil vem crescendo constantemente e, no ano de 2010, superou o consumo japonês.

2.1.1 Características dos Produtos Cárneos para o Mercado

A qualidade da carne e de seus derivados deve estar de acordo com requisitos estabelecidos pelos órgãos de normatização e ainda cumprir as altas reivindicações e exigências do mercado (SANTOS e PALMEIRA, 2006).

A qualidade da carne demanda seus atributos intrínsecos, como cor, sabor, quantidade de gordura, proteínas, vitaminas e minerais; como extrínsecos, características voltadas para a produção e comercialização do produto. Os derivados cárneos seguem as mesmas exigências da carne *in natura*, acrescentando a autenticidade quanto ao padrão de identidade do produto processado (ALBINO FILHO, 2006).

Questões relativas às exigências que envolvem assuntos de interesse do setor agropecuário brasileiro, assim como negociações de acordos sanitários e fitossanitários são atribuições da Secretaria de Relações Internacionais do Agronegócio (SRI). Cabe, também, a SRI promover produtos e serviços do

agronegócio para estimular a sua comercialização tanto no mercado interno como para exportação. Para tanto, periodicamente, o ministério organiza, em parceria com outros órgãos do governo, como o Ministério das Relações Exteriores (MRE) e a Agência Brasileira de Promoção de Exportação e Investimentos (APEX), a participação anual das companhias do setor do agronegócio brasileiro em feiras e eventos em países como Emirados Árabes, Indonésia, China, África do Sul, Arábia Saudita, Vietnã e Rússia (MAPA, 2012).

Nesses encontros, as companhias do setor alimentício podem constatar as diferenças de costume de cada cultura, que influenciam diretamente o comércio de alimentos. A escolha do que é considerado alimento, e de como, quando e por que será consumido está relacionada com uma classificação estabelecida culturalmente. Na maioria dos países, por exemplo, a carne de cachorro não é considerada comestível, porém, em alguns países é uma iguaria (BRUGNANO, 2010). O consumo de carne de diferentes espécies animais varia de acordo com a cultura e a região de cada país (Quadro 2).

ANIMAL	COMESTÍVEL	RESTRIÇÕES AO CONSUMO
Insetos	América Latina, Ásia, África	Parte da Europa e América do Norte
Cachorro	Coréia, China e Oceania	Europa, América do Norte e América do Sul
Cavalo	França, Bélgica, Japão	Grã-Bretanha, América do Norte
Coelho	França, Itália	Grã-Bretanha, América do Norte
Rã	França, Ásia	Europa, América do Norte
Frango	América Latina, América do Norte, Europa, Ásia, África, Oceania	-
Suíno	América Latina, América do Norte, Europa, Ásia	Judeus e Islâmicos
Bovino	América Latina, América do Norte, Europa, África	Índia e Ásia

Quadro 2– Consumo de cada espécie animal segundo a cultura dos países
Fonte: Adaptado de BRUGNANO, 2010.

A industrialização consiste na transformação da carne *in natura* em produtos cárneos, em um ciclo com início na produção de carnes com qualidade e seu fim em um produto com padrão de identidade. Para industrializar a carne há o emprego de aditivos, diferentes tratamentos térmicos (calor e frio) e diferentes formas de armazenamento. Essa ação visa aumentar a vida útil do produto cárneo processado,

utilizar partes do animal de difícil comercialização *in natura* e desenvolver diferentes sabores/produtos (elevar o valor do produto) (VEIGA, 2011).

Contudo, as indústrias alimentícias se deparam com entraves econômicos, sanitários e, ainda, as diferenças culturais. Em determinados espaços do mercado, a principal barreira encontrada por uma empresa são as crenças religiosas de determinados países. Como no caso da Índia, no que diz respeito ao consumo de carne bovina, pois a vaca é considerada um animal sagrado, proibida de ser maltratada ou abatida (GLAAB, 2012).

Nesse sentido, a preocupação desses consumidores por um produto cárneo adequadamente rotulado quanto ao seu padrão de identidade é intensificada. Os estudos mais avançados quanto a inovações em tecnologia nas análises que possam detectar fraudes em produtos cárneos são desenvolvidos nos países orientais (BAI et al., 2009). Encontram-se nesse mesmo cenário os muçulmanos, que por crenças, consumir carne suína é pecado. Nessas crenças e costumes, o mercado de produtos destinados a este público alvo, como o de produtos *Halal*, está se tornando cada vez maior. Atualmente este mercado abrange um bilhão e oitocentos milhões de consumidores muçulmanos no mundo. Nos EUA, encontram-se oito milhões, assim como na França, que conta com seis milhões de consumidores que seguem a religião islâmica. A crescente demanda por este tipo de alimento deve-se ao fato do consumidor muçulmano se alimentar apenas com produtos *Halal*, seguindo o que determina o Corão Sagrado e a Jurisprudência Islâmica. No setor de alimentos processados *Halal*, há um mercado estimado em 400 bilhões de dólares, o qual cresce a uma taxa de 15% ao ano (CIBALHALAL, 2012).

Desde a criação da Federação das Associações Muçulmanas do Brasil (FAMBRAS) e a Central Islâmica Brasileira de Alimentos *Halal* (CIBAL HALAL) em 1979, o Brasil vem demonstrando grande potencial de crescimento nesse mercado. Criaram-se mecanismos para acesso aos países islâmicos, principalmente o Oriente Médio, cooperando com a implantação do conceito *Halal* nas indústrias alimentícias brasileiras, inserindo tecnologia necessária para garantir transparência e credibilidade aos países islâmicos (CIBALHALAL, 2012).

Segundo Cibalhalal (2012), com o intuito de manter a excelência e credibilidade perante os consumidores, a produção de produtos destinados a essa

população específica deve evoluir juntamente com a biotecnologia, implantando análises e laudos que eliminem qualquer hipótese de produtos ilícitos.

Neste contexto, a regularização adequada de produtos cárneos conforme seu padrão de identidade deve ser uma exigência intensamente averiguada pelos órgãos vigentes de alimentos. No entanto, a identificação das espécies animais contidas em produtos cárneos ainda é um desafio considerável para as autoridades (BAI et al., 2009), uma vez que, após o processamento não é possível identificar a adulteração sensorialmente (HAUNSHI et al., 2009).

2.1.2 Produto Carne: Definição e Classificação

Processamento de um alimento é qualquer alteração nas propriedades do produto, intencionalmente induzida por meios físicos, químicos e/ou biológicos, procurando sempre manter, o máximo possível, as qualidades nutritivas e sensoriais do produto (PEREIRA, 2013).

Portanto, entendem-se como produto cárneo processado aquele em que as propriedades originais da carne *in natura* foram modificadas através de tratamento físico, químico e/ou biológico, ou através da combinação destes métodos. O processo envolve geralmente adição de condimentos, especiarias e aditivos diversos. Essa ação tem por objetivo principal o prolongamento do tempo de prateleira (validade) do produto final, atuando de modo a anular ou minimizar a ação de enzimas e microrganismos (VEIGA, 2011).

Segundo os autores Veiga (2011) e Pereira (2013), o produto cárneo pode ser classificado quanto aos seus princípios de conservação, em:

- Produto Carne Fresco: elaborado à base de carne com ou sem gordura, picada, acrescida ou não de condimentos, especiarias e aditivos. Não sofre tratamento de dessecação, cozimento ou de salga. Linguiça frescal, linguiça tipo calabresa, tipo toscana e mista são alguns exemplos;
- Produto Carne Cru Temperado: aquele elaborado com peça de carne inteira ou em pedaços identificáveis e submetidos à ação de sal, especiarias e condimentos que lhe confere aspectos e sabor característicos. Estes não são submetidos a nenhum tratamento térmico, como exemplo tem-se o hambúrguer;

- Produto Carneio Tratado pelo Calor (cozido ou pasteurizado): elaborado à base de carne e/ou miúdos comestíveis acrescidos ou não de especiarias e condimentos. Submetido à ação do calor, tendo que no interior do produto alcançar temperatura suficiente para a coagulação total das proteínas cárneas, geralmente 72°C. A mortadela, salsicha, presunto, apresuntado, patê, empanado e lasanha pronta para o consumo são exemplos;

- Embutido Cru Curado: produto elaborado com carnes e gorduras cortadas e picadas com ou sem miúdos, ao qual se incorpora especiarias, aditivos e condimentos autorizados. É submetido a um processo de maturação (secagem) e, opcionalmente, defumação. Tratam-se de produtos nos quais ocorre uma fermentação microbiana que leva ao acúmulo de ácido láctico, que conseqüentemente diminui o pH, o qual restringe o crescimento de microrganismos e as complexas reações químicas que ocorrem durante o processo de maturação. Como exemplo têm-se os salames tipo Italiano e Milano;

Produto Carneio Apertizado ou Esterilizado (envazado): este processo corresponde ao aquecimento do produto já elaborado e envasado (latas, vidros, plásticos ou outros materiais e relativamente isentos de ar). Consiste na aplicação de processo térmico a um alimento acondicionado em uma embalagem hermética, resistente ao calor, a uma temperatura (115 a 150°C), pressão e tempo suficientes para atingir a esterilização comercial do produto. Ou seja, inativar as enzimas e eliminar todos os microrganismos e esporos que poderiam se desenvolver em condições normais de armazenamento do produto cárneos. São exemplos os produtos provenientes de carne moída (carne enlatada, salsicha e almôndegas enlatadas e pasta de fígado) ou partes diferenciadas do animal (coxa e língua).

Para cada um dos princípios de conservação supracitados, ocorrem diferentes interações entre os componentes da carne, por exemplo, a oxidação de lipídeos, a desnaturação de proteínas por ação do pH ou do calor, a degradação das moléculas proteicas em função da cura ou da interação com aditivos, entre outros (BRIDI, 2008). Estas modificações químicas podem dificultar a identificação de espécies por métodos convencionais que se baseiam na estrutura proteica como forma de detecção (BRUGNANO, 2010).

2.2 CONTROLE DA QUALIDADE EM PRODUTOS CÁRNEOS

A gestão da qualidade no setor de alimentos é avaliada através de duas dimensões, uma objetiva e outra subjetiva. A primeira refere-se aos atributos intrínsecos do produto, ou seja, padrões microbiológicos, nutricionais, impurezas, adulterações e substâncias tóxicas, que são características não perceptíveis pelos consumidores, mas que comprometem a saúde dos mesmos. Já a segunda dimensão, engloba as características perceptivas, tais como: forma, cheiro, sabor, textura e aparência, que apesar de não comprometerem a saúde e segurança dos consumidores, interferem na decisão de adquirir ou não o produto (QUEIROZ; MACHADO; ZUIN, 2004).

Os consumidores mais conscientes e informados tendem a valorizar as características intrínsecas dos produtos, assim como as ferramentas que garantam a origem do produto e uma rotulagem informativa e confiável. As ferramentas da qualidade colaboram para estabelecer credibilidade aos produtos perante os consumidores (BARBOSA, 2010; REGO, 2010). Segundo Fiep (2010), confiança e conhecimento dos produtos representam 59% das razões de compra.

Nesse sentido, com a finalidade de criar padrões de qualidade, identidade e assegurar práticas adequadas na produção e comércio de alimentos e, assim, zelar pela saúde dos consumidores, foram instituídos requisitos e normas, como por exemplo: *Codex Alimentarium*, portarias, RDC e ISO. Para que essas exigências possam ser cumpridas com sucesso pelas empresas alimentícias, foram criadas ferramentas de garantia da qualidade, como APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle), BPF (Boas Práticas de Fabricação), rastreabilidade, autenticidade, entre outras (BELGA, 2007).

2.2.1 Rastreabilidade

Antigamente não era possível comprovar a qualidade de um alimento no momento em que chegava ao consumidor final. Contudo, essa percepção teve uma reviravolta depois dos atentados nas Torres Gêmeas, nos Estados Unidos, em 2001. Um ano depois, a FDA (*Food and Drug Administration*), órgão que monitora a

qualidade dos alimentos e dos remédios produzidos nos Estados Unidos, publicou a Lei de Segurança Pública e de Preparação e Reação ao Bioterrorismo. Esse marco legal estipulava que a FDA deveria receber antecipadamente informações sobre a origem dos alimentos para consumo nacional, inclusive os importados (BRASIL, 2012).

Esse cenário de exigências ganhou força quando, em janeiro de 2005, a União Europeia tornou obrigatória a rastreabilidade de todos os produtos agroalimentares (Regulamento CE 178/2002), por meio da obrigatoriedade de ações e procedimentos técnicos que permitam identificar e rastrear o produto final (BRASIL, 2012).

A rastreabilidade é, portanto, a capacidade de traçar o histórico do processo produtivo, ou seja, conseguir localizar um produto através de informações previamente registradas de todas as etapas do seu processo de produção, transformação e distribuição (FRANÇA, 2006).

Há inúmeras justificativas para a implantação da rastreabilidade na produção de alimentos cárneos. Primeiramente, para garantir a segurança alimentar frente a um mercado globalizado, em que os consumidores não se satisfazem apenas com informações genéricas da ausência de riscos ao consumir produtos cárneos. A indústria deve ser capaz de provar que estes riscos são inexistentes. Neste sentido, o sistema de rastreabilidade permite remontar uma investigação em busca da origem da disseminação ou dispersão de doenças por lotes (FRANÇA, 2006). Entretanto, para que isso seja possível, os requisitos do sistema devem ser respeitados por todos os elementos da cadeia produtiva (produtores, fabricantes, logística, entre outros). Além da obrigatoriedade de implementar um sistema de identificação e registro de dados para cada etapa do processamento, permitindo que as informações estejam disponíveis a qualquer momento, de maneira que a empresa deve ser capaz de identificar o produto vendido, a quem e quando, garantindo assim, a confiabilidade perante o consumidor (CUNHA e SAES, 2005).

No entanto, por mais que a rastreabilidade seja uma ferramenta importante, não é suficiente para garantir a segurança do alimento. Ou seja, é essencial o uso conjunto de outras ferramentas da qualidade, como por exemplo, as BPF ou APPCC (BRASIL, 2012).

O sistema de rastreabilidade pode se adaptar a múltiplas finalidades, disponibilizando informação ao longo de todo sistema agroalimentar (SAG). Com

isso, essa ferramenta da gestão da qualidade representa lucros competitivos, seja no sentido de agregar valor ao produto final, ou no sentido de reduzir custos de transação ao longo de toda cadeia produtiva (BERTHIER, 2007). A rastreabilidade pode ainda, solucionar pendências relativas a alegações de rotulagem falsa (CUNHA e SAES, 2005).

2.2.2 Autenticidade

Autenticidade é a certeza de que um produto provém das fontes divulgadas sem alterações ao longo de seu processo. Geralmente é utilizada a fim de atender à demanda dos clientes, melhorar a imagem dos produtos junto ao consumidor e/ou colaborador, ou ainda agregar valor ao produto ou serviço (PERETTI e ARAÚJO, 2010).

Os sistemas de autenticidade de produtos cárneos exigem uma cadeia transparente de ações para manter sua credibilidade, devendo conter um mecanismo confiável e que possa ser verificável, ou seja, onde se possa comprovar aquilo que se diz ser. Como por exemplo, o padrão de identidade de um embutido, a autenticação deve ser capaz de assegurar que nesse produto contenha apenas os constituintes cárneos indicados na sua rotulagem (BRASIL, 2012).

As metodologias analíticas normalmente utilizadas na determinação da autenticidade de produtos cárneos são: os métodos imunológicos e enzimáticos, análise sensorial, microscópica, química e instrumental, NIR (*Near Infra-Red*) e análise dos constituintes através do DNA, como a PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (PERETTI e ARAÚJO, 2010).

A técnica PCR, baseada na análise do DNA, vem se mostrando uma oportunidade concreta para autenticidade de produtos cárneos, tendo em vista que o DNA é único para cada animal, é um meio de identificação não invasivo, à prova de fraude e capaz de ser identificado em produtos processados (BRASIL, 2012).

A substituição dos constituintes cárneos por substâncias de valor inferior, como água, amido, gelatina, proteínas não cárneas e, até mesmo, espécies animais semelhantes é bastante comum. Observa-se na literatura estudos realizados a fim de desenvolver técnicas mais aptas para detectar essas adulterações em produtos cárneos industrializados. Ghovvati et al. (2009) descreve um ensaio com o método

molecular PCR para a detecção de carne bovina, suína e aves em produtos cárneos industrializados. O DNA extraído foi usado como molde para amplificação via PCR e os resultados demonstraram adulteração da espécie animal na fabricação de salsichas.

A autenticidade do padrão de identidade de produtos cárneos e seus derivados é de suma importância para detectar fraudes e, assim, resguardar os consumidores no que diz respeito às questões sanitárias, econômicas e religiosas (SOARES et al., 2010; NAKYINSIGE; CHE MAN; SAZILI, 2012).

2.3 MÉTODOS PARA AUTENTICIDADE DE PRODUTOS CÁRNEOS PROCESSADOS

A fraude por substituição da espécie animal em produtos cárneos é muito comum por questões econômicas e pelo fato de não serem utilizados métodos de análise capazes de detectar essa adulteração. A rotulagem precisa é fundamental para informar ao consumidor e auxiliar na sua escolha, além de valorizar e dar destaque à empresa que apresente uma rotulagem de acordo com a legislação (BALLIN, 2010).

Embora os regulamentos da legislação nacional e internacional sustentam a obrigatoriedade das informações corretas de rotulagem - Comissão Diretiva 2002/86/CE, onde produtos à base de carne necessitam ser rotulados em relação às espécies animais usadas como ingrediente, assim como sua quantidade, com efeitos desde julho de 2003 - esses regulamentos por si só não são suficientes para evitar a fraude. A falta de fiscalização, juntamente com a utilização de métodos convencionais ineficazes, acarreta na facilidade de substituir uma espécie animal por outra sem que isso seja diagnosticado (LAUBE; ZAGON; BROLL, 2007; BALLIN, 2010; MAYER e HOCHEGGER, 2011).



Figura 1- Autenticidade e sua relação com os produtos à base de carne
Fonte: SANTOS, 2011.

Na autenticidade de produtos cárneos devem ser consideradas várias questões (Figura 1): a substituição de ingredientes, normalmente por um de menor valor econômico; a utilização de constituintes de origem animal não declarado no rótulo, como por exemplo, vísceras ou plasma sanguíneo; a especificação e proporção de ingredientes incompatíveis com o rótulo; a rotulagem inadequada relativa à origem geográfica do produto, e, por fim, a substituição de carne de caça por carne de animais domésticos (SANTOS, 2011).

Segundo Santos (2011), para a autenticidade dos produtos cárneos, existem métodos convencionais baseados, essencialmente, na análise de proteínas específicas. Conjuntamente, vem sendo desenvolvidos estudos a fim de autenticar os produtos cárneos processados de maneira mais confiável e eficaz, como as metodologias moleculares baseadas no DNA.

2.3.1 Métodos Convencionais

Atualmente, algumas técnicas são utilizadas para a autenticidade de produtos cárneos através da identificação das espécies animais: métodos eletroforéticos, cromatografia gasosa, técnicas imunológicas, espectrometria de massa, microscopia, ressonância e ensaios enzimáticos (BALLIN, 2010; BRUGNANO, 2010).

As técnicas de eletroforese podem ser aplicadas na identificação de espécies animais, visto que os tecidos são constituídos essencialmente por proteínas. Na eletroforese ocorre a separação de moléculas através da migração de partículas sujeitas à aplicação de um campo elétrico, sendo que a carga depende do pH do meio. Focagem Isoelétrica (IEF), Eletroforese em gel de Poliacrilamida com Dodecilsulfato de Sódio (SDS-PAGE) e Eletroforese Bidimensional (2-DE) são exemplos de técnicas que se baseiam nesse princípio (MONTOWSKA e POSPIECH, 2011).

As técnicas cromatográficas foram desenvolvidas com o intuito de separar moléculas com características químicas similares. Este método se baseia na separação das substâncias de uma mistura em componentes individuais, dependentes das propriedades de cada constituinte ou proteína. Em seguida, é realizada a quantificação e, desta forma, é possível identificar quase todo tipo de molécula presente em um produto. Consoante o tipo de efluente utilizado, pode considerar-se para este tipo de técnicas, a cromatografia gasosa e a cromatografia líquida. A cromatografia líquida, geralmente a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), detecta proteínas e aminoácidos. Contudo, a análise por cromatografia gasosa é mais adequada para moléculas voláteis ou semi-voláteis (REID; O'DONNELL; DOWNEY, 2006; DAGUER et al., 2010).

Já os métodos enzimáticos são largamente utilizados na identificação de produtos cárneos, depende do teor em gordura, grau de processamento e nível de maturação das amostras. Aborda técnicas imunológicas, de forma a detectar a presença de um anticorpo em uma amostra. ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) e Tiras de Fluxo Lateral são os ensaios mais utilizados em análises de alimentos. O método ELISA tem como princípio a imobilização de um anticorpo numa superfície sólida (ASENSIO et al., 2008). Quanto às Tiras de Fluxo Lateral, baseiam-se na utilização de dois anticorpos imobilizados, específicos para a proteína alvo, que são agrupados por um reagente corado em uma tira de nitrocelulose (MAFRA e OLIVEIRA, 2005).

A espectrometria de massa é utilizada para determinar a massa molecular das proteínas, assim como na identificação de variantes genéticas, alterações na composição dos aminoácidos. Geralmente é empregada através da Injeção em Fluxo (FIA) ou em combinação com HPLC, para a separação em linha, detecção e estudo da composição das proteínas (VELOSO et al., 2002).

Os métodos baseados em proteínas podem ser qualitativos ou quantitativos. Contudo, estas técnicas sugerem que as proteínas específicas sejam previamente identificadas para a espécie em questão e que a sua estrutura seja o mais próximo possível do estado natural. Neste sentido, quando o produto é submetido a um processamento térmico, as proteínas são irreversivelmente desnaturadas e já não podem ser analisadas de maneira eficaz (NAU et al., 2009; SOARES et al., 2010).

Outra limitação é a possibilidade de ocorrerem reações cruzadas com proteínas de espécies relacionadas ou, com o fato de não ser possível detectar diferenças entre os aminoácidos e as proteínas (SANTOS, 2011).

Como já mencionado, essas técnicas não são as mais adequadas em análise de rotina, em virtude do custo, tempo necessário para obter resultado, complexidade de execução e limitação ao analisar proteínas, pois sofrem alterações com o uso de processos tecnológicos. Outro fator limitante dessas técnicas é a baixa sensibilidade (nível mínimo de detecção) (BRUGNANO, 2010).

Segundo Brugnano (2010), testes imunológicos não são capazes de detectar níveis baixos das espécies cárneas e não podem distinguir espécies relacionadas entre si, fator este acentuado após o processamento do produto, o que torna a detecção impossível.

Portanto, devido a esses limitantes deparados pelos métodos baseados em proteínas, há grande necessidade do desenvolvimento de métodos mais precisos, eficazes e específicos (ÍLHAK e ARSLAN, 2007; TANG et al., 2009; HAUNSHI et al., 2009).

Avanços na tecnologia molecular têm possibilitado o desenvolvimento de abordagens alternativas para a identificação das espécies animais em produtos cárneos. Ultimamente, as aplicações da técnica PCR em análise de alimentos têm aumentado devido à sua simplicidade, rapidez, especificidade e sensibilidade (BAI et al., 2009; KESMEN; SAHIN; YETIM, 2007). Por meio da PCR, pequenas quantidades de diferentes espécies animais podem ser identificadas em alimentos de composição complexa (BALLIN, 2010; BRUGNANO, 2010).

2.3.2 Diagnóstico Molecular via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A PCR é considerada uma técnica de biologia molecular revolucionária. Este método permitiu o rápido desenvolvimento do estudo de sequências de ácidos nucleicos (DNA). Foi desenvolvida em 1983, pelo pesquisador Kary Banks Mullis, o qual ganhou o prêmio Nobel de química pelo desenvolvimento dessa metodologia. Em 1988, Randy Saiki substituiu a polimerase de *Escherichia coli* pela *Taq* DNA polimerase, uma enzima obtida da bactéria *Thermus aquaticus*, encontrada em águas quentes de gêiseres e vulcões submersos, com atividade ótima de crescimento entre 70°C a 75°C. Esta substituição promoveu maior independência ao processo, além disso, aumentou a confiabilidade por redução de riscos de contaminação (CAMARGO e SILVA, 2011).

A PCR é uma técnica molecular que permite produzir um grande número de cópias de uma sequência específica de DNA por meio da ação da enzima termoestável *Taq* DNA polimerase e de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos sobre um DNA molde (GANDRA et al., 2008). É possível a replicação *in vitro* de sequências de DNA, não sendo necessário conhecer o DNA completo, apenas a estrutura da região que se deseja amplificar (RÜCKERT, 2006).

O conteúdo de informação presente no DNA é maior do que nas proteínas, devido à degeneração do código genético (vários codões codificam o mesmo aminoácido). Como o DNA é uma molécula relativamente estável, análises baseadas em ácidos nucleicos são menos susceptível a alteração por tratamento térmico. Além disso, a molécula de DNA pode ser extraída de qualquer tipo de tecido (SANTOS, 2011).

A PCR possui como princípio a capacidade da enzima polimerase em amplificar exponencialmente sequências de DNA, a partir de um par de pequenos fragmentos iniciadores da fita réplica (*primers*) que flanqueiam a sequência que se deseja, por meio de variações alternadas e cíclicas de temperatura. Estas permitem a desnaturação, hibridização e a extensão do DNA de organismos ou células (Figura 2) (CORTEZ, 2006; SANTOS, 2011).

Desta forma, esse processo ocorre em três etapas funcionais:

- 1) Desnaturação do DNA: nesta etapa ocorre a separação da dupla fita do DNA em duas fitas simples através da elevação da temperatura (90 a 95°C). Esse

processo se dá com a quebra das ligações por pontes de hidrogénio, aumentando o número de bases desemparelhadas. A reação termina quando todas as cadeias duplas se transformarem em cadeias simples;

2) Hibridização dos Iniciadores (*primers*): nesta fase acontece a ligação do iniciador às sequências dos pares de bases complementares, por meio de ligações por pontes de hidrogénio e temperatura inferior à da desnaturação (45 a 70°C). A polimerase transforma as fitas simples em fitas duplas, para isso necessita de um fragmento de DNA já ligado na região previamente escolhida. Por isso se adiciona à solução os iniciadores - são pequenos fragmentos sintéticos de DNA de fita simples, oligonucleotídeos de 20 a 30 bases nitrogenadas de comprimento, que são sintetizados *in vitro* baseados na sequência do DNA a ser amplificado. Nas duas fitas surge, assim, um pequeno fragmento de DNA de dupla fita intacta;

3) Extensão da Cadeia de DNA: é a polimerização propriamente dita. Os *primers* se ligam aos segmentos complementares e a *Taq* DNA polimerase liga os nucleotídeos entre si, completando assim, as fitas simples e tornando-as duplas (extensão). A temperatura ideal para a atuação da enzima é de aproximadamente 72°C e o tempo de atuação depende do tamanho do fragmento a ser amplificado (CORTEZ, 2006; SANTOS, 2011).

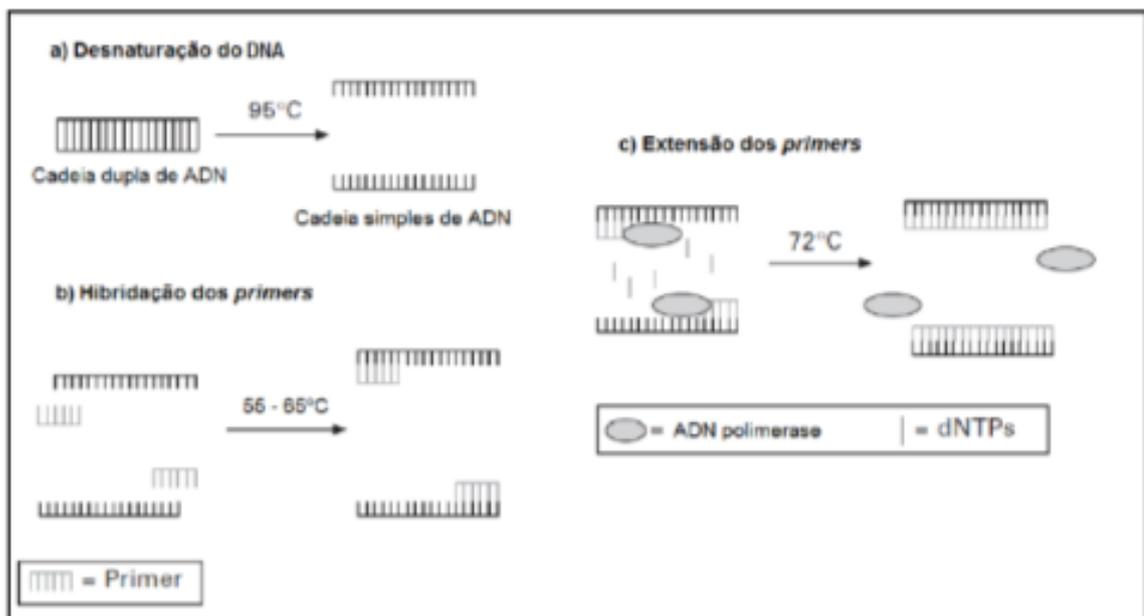


Figura 2 - Representação das três etapas de amplificação do DNA por PCR
Fonte: SANTOS, 2011.

Esse ciclo de três etapas é repetido de 25 a 40 vezes, dependendo da quantidade de DNA inicial. Vale ressaltar que essa técnica deve ser realizada com base em protocolos, para que atinja as condições ideais (PASSO, 2009).

Após a amplificação da sequência do DNA alvo, que ocorre ciclo após ciclo, é possível visualizar os fragmentos de DNA produzidos por meio da eletroforese em gel de agarose. Trata-se de uma técnica sensível e rápida que permite separar e identificar os fragmentos de DNA por migração das moléculas, sob a ação de um campo elétrico. No caso do DNA, a direção da migração ocorre do eletrodo negativo para o eletrodo positivo, mostrando os resultados na forma de banda (Figura 3) (CORTEZ, 2006).

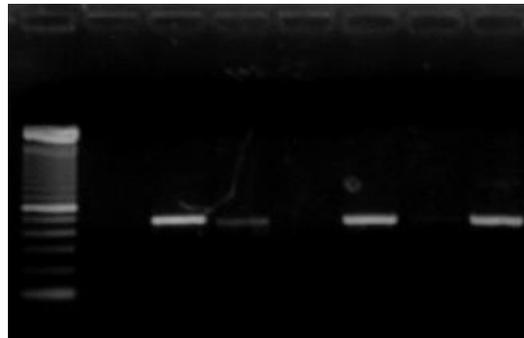


Figura 3 - Exemplo de banda de DNA
Fonte: ROCHA-REVILLA et al., 2009.

Vale ressaltar a importância do uso de controles positivos e negativos na realização da PCR, a fim de garantir a confiabilidade dos resultados. O controle positivo comprova a eficácia da extração e amplificação do DNA e, assim, demonstra que o resultado contém a sequência alvo desejada. Enquanto o controle negativo permite verificar a ocorrência de contaminações, seja durante a extração do DNA, ou na preparação da reação de amplificação por PCR (SANTOS, 2011).

A PCR tem sido largamente utilizada para fins de autenticidade de produtos cárneos. De acordo com diversas pesquisas realizadas, a PCR é um dos métodos mais indicados para esse fim, visto ser uma técnica simples, rápida, mais precisa e confiável, pois apresenta alta sensibilidade e especificidade (DALMASSO et al., 2004; HSIEH et al., 2005; ARRUDA, 2006; TANABE et al., 2007; ZHANG et al., 2007; ÍLHAK e ARSLAN, 2007; KESMEN; SAHIN; YETIM, 2007; HAUNSHI et al., 2009; BAI et al., 2009; MANE; MENDIRATTA; TIWARI, 2009; VALONES et al., 2009; SANTOS, 2011).

3 METODOLOGIA

3.1 CLASSIFICAÇÃO DA PESQUISA

O método científico empregado no presente estudo é o indutivo. Conseqüentemente, do ponto de vista do objeto de pesquisa, esta pode ser classificada como pesquisa de campo. Do ponto de vista da sua natureza é uma pesquisa aplicada, pois, de acordo com Silva e Menezes (2005), tem por objetivo buscar soluções envolvendo verdades e interesses específicos. Quanto à abordagem do problema, a pesquisa é classificada como qualitativa-quantitativa.

Do ponto de vista do objetivo a pesquisa é classificada como exploratória, para proporcionar maior familiaridade com o problema a fim de torná-lo mais explícito e, então evidenciar formas de solucioná-lo. Quanto aos procedimentos técnicos, a pesquisa é classificada como experimental, uma vez que consiste em submeter objetos de estudo à influência de certas variáveis, em condições controladas e conhecidas pelo pesquisador, a fim de analisar os resultados que a variável implica no objeto (GIL, 2008).

3.2 EXTRAÇÃO DO DNA PARA UTILIZAÇÃO COMO CONTROLE POSITIVO

Para o desenvolvimento da padronização da metodologia PCR, primeiramente realizou-se a exposição do DNA de diferentes espécies animais, sendo: espécie suína, aviária, equina e bovina. Para tanto, utilizou-se amostras de sangue para as espécies suína e equina; e amostras de músculo para as espécies bovina e aviária. As amostras foram adquiridas no comércio local, sendo as amostras de sangue doadas por um criador da região dos Campos Gerais. As análises foram realizadas no Laboratório de Bioengenharia, situado na Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *Campus* Ponta Grossa.

Para a extração do DNA das quatro espécies animais, utilizou-se o protocolo de extração de DNA total descrito por Marcelino; Guimarães; Barros (2008), com adaptações. Este protocolo foi utilizado para todas as espécies animais em estudo, apenas diferenciando quanto ao tecido, pois para as amostras de

músculo houve a necessidade de primeiramente triturá-las em liquidificador com Tampão de Extração (TE) (EDTA 1 mM e Tris-HCL 10mM), na proporção de 20 gramas de amostra para 80 ml de TE.

O protocolo utilizado está descrito a seguir: maceração das amostras com CTAB 2% [50 mM CTAB, 1,4 M NaCl, 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 20 mM EDTA e PVP 1%]. Após a maceração, em um microtubo tipo *ependorf* de 1,5 ml, adicionar 500 µL de tampão CTAB 2% e 100 mg da amostra desejada, para então homogeneizar em *vortex* por 5 minutos e incubar em banho-maria seco a 65°C durante 30 minutos. Para a desproteinização, adicionar 520 µL de CIA [24 partes de Clorofórmio: 1 parte de Álcool Isoamílico] à amostra, homogeneizar em *vortex* por 2 minutos e centrifugar a 12.000 g por 10 minutos. Após a centrifugação, transferir o sobrenadante para um novo *ependorf* de 1,5 ml e adicionar um volume de Isopropanol e 0,5 volume de Acetato de Amônio 7,5 M e, novamente centrifugar a 12.000 g por 10 minutos. Em seguida, descartar o sobrenadante e ressuspender o *pellet* com 500 µL de Etanol 70% refrigerado (para eliminar possíveis impurezas presentes na amostra), homogeneizar por inversão e centrifugar a 12.000 g por 5 minutos. Logo, descartar o sobrenadante e secar o *pellet* em temperatura ambiente por aproximadamente 15 minutos, para então, ressuspender o DNA em 50 µL de TE [1 mM EDTA e 10 mM Tris-HCl] e manter sob congelamento (-18°C).

Por conseguinte, foi realizada a padronização da técnica PCR para as espécies suína e aviária, etapa abordada com maior ênfase no próximo tópico.

3.3 PADRONIZAÇÕES DA TÉCNICA PCR ESPECÍFICA PARA SUÍNO E FRANGO

Após o isolamento do ácido nucleico dos controles positivos ocorreu a amplificação do DNA por meio do método PCR, objetivando verificar as espécies animais encontradas nos produtos cárneos e, portanto, autenticá-los quanto ao seu padrão de identidade (rotulagem). Exemplificando, um hambúrguer de frango deve ser elaborado apenas com os ingredientes descritos em seu rótulo, de forma a garantir a não utilização de outras fontes de proteína animal (como carne suína).

3.3.1 Amplificação do DNA Alvo via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A determinação dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste estudo foi baseada em aspectos encontrados nos trabalhos de Kesmen; Sahin; Yetim (2007) e Mane; Mendiratta; Tiwari (2009), assim como, a reação (concentração de reagentes) e a programação da PCR.

Os *primers* podem ser visualizados na Tabela 5, assim como suas principais características.

Tabela 5 - Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores da espécie suína e aviária

Espécie		Sequência 5'-3'	Tamanho fragmento	Referência
Suíno	Sentido	CATTCGCCTCACTCACATTAACC	227 pb	KESMEN; SAHIN; YETIM, 2007
	Anti-sentido	AAGAGAGAGTTCTACGGTCTGTAG		
Frango	Sentido	CTCGCCCTACTTGCCTTCC	422 pb	MANE; MENDIRATTA; TIWARI, 2009
	Anti-sentido	TAGGACGCAACGCAGGTGT		

Fonte: Autoria Própria, 2013.

A amplificação do DNA extraído foi realizada inicialmente com a PCR gradiente, seguindo a reação de PCR descrita por Kesmen; Sahin; Yetim (2007), com adaptações. A PCR gradiente tem por objetivo padronizar a temperatura de hibridização ideal para cada oligonucleotídeos iniciadores. Esta tem a mesma sequência de ciclos do que a PCR normal, sendo que na fase de hibridização ocorre uma distribuição de temperaturas pelo bloco do termociclador, baseadas na temperatura média dos pares de oligonucleotídeos iniciadores (determinada pelo fabricante).

A mistura da reação de PCR foi preparada em um microtubo tipo *ependorf* de 500 µl, tendo um volume total de 25 µl, contendo: 1X PCR Buffer (Invitrogen®), 200 µM de cada dNTP (Fermentae®), 3,0 mM de MgCl₂ (Invitrogen®), 0,3 µM de cada iniciador (IDT®), 2,5 unidades de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen®), 1µg do DNA alvo e o restante de água ultrapura Mili-Q (KESMEN; SAHIN; YETIM, 2007).

As condições de PCR programadas no termociclador (Therm-1000/Maxygene Versão nº 1.4) seguem 35 ciclos, com: desnaturação inicial do DNA a 94°C durante 3 minutos, desnaturação do DNA a 94°C durante 50 segundos,

hibridização dos iniciadores com temperatura entre 62 a 72°C por 30 segundos (para ambas as espécies estudadas), extensão a 72°C por 1 minuto, extensão final a 72°C por 10 minutos e 15°C até retirada das amostras do equipamento (KESMEN; SAHIN; YETIM, 2007).

Determinada a temperatura de hibridização ideal para cada iniciador, seguiu-se para a validação da metodologia, ou seja, foi avaliada a especificidade de cada *primer* em estudo. Ressalta-se que durante as análises foram realizados ajustes na metodologia, para melhorar as condições de amplificação, sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade.

3.4 VERIFICAÇÃO DA METODOLOGIA PCR EM UM EMBUTIDO

Para a verificação da metodologia PCR, foi avaliada a especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores das espécies suína e aviária. A amostra analisada foi uma linguiça suína, produzida no Laboratório de Carnes, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), *Campus* Ponta Grossa, simulando as condições de industrialização do produto.

A extração do seu DNA foi realizada com o mesmo protocolo de extração de DNA total usado para a exposição do DNA dos controles positivos, descrito no item 3.2 (MARCELINO; GUIMARÃES; BARROS, 2008).

A amplificação do DNA extraído foi realizada com a reação de PCR adaptada de Kesmen; Sahin; Yetim (2007), ambas as espécies animais estudadas seguiu as características estabelecidas na padronização, conforme descrito no item 3.3.1.

3.5 SENSIBILIDADE DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES

O teste de sensibilidade (limiar de detecção) dos oligonucleotídeos iniciadores das espécies suína e aviária foi realizado com o intuito de analisar a correlação entre temperatura de processamento do produto cárneo com a sensibilidade da metodologia, além de verificar o limite de detecção de adulteração da PCR.

As amostras foram produzidas no Laboratório de Carnes da UTFPR, *Campus* Ponta Grossa. Para tanto, adicionou-se músculo suíno (pernil) e gordura suína (toucinho) em amostras de carne de frango. Assim como, foi adicionado músculo de frango (coxa e sobrecoxa) e gordura de frango em amostras de carne suína. As amostras foram trituradas em multiprocessador até apresentarem aparência de patê. Essa mistura foi preparada em concentrações de 0,01%, 0,1%, 1%, 5% e 10%, além de uma amostra de controle negativo para cada espécie, totalizando 72 amostras (Tabela 6). Adicionou-se, também, 2% de sal e 0,1% de pimenta preta em cada amostra.

As amostras foram analisadas nas seguintes diferentes condições de processamento: amostras cruas; amostras cozidas sob pressão atmosférica em banho-maria, até o centro do alimento atingir 72°C; e amostras autoclavadas a 121°C durante 10 minutos (Tabela 6).

Tabela 6 - Concentrações e tratamentos térmicos para o teste de sensibilidade

	100% CARNE DE FRANGO				100% CARNE SUÍNA			
	Carne Suína (%)		Gordura Suína (%)		Carne de Frango (%)		Gordura de Frango (%)	
CRUA	1	0 (CN)*	19	0 (CN)*	37	0 (CN)*	55	0 (CN)*
	2	0,01	20	0,01	38	0,01	56	0,01
	3	0,1	21	0,1	39	0,1	57	0,1
	4	1	22	1	40	1	58	1
	5	5	23	5	41	5	59	5
	6	10	24	10	42	10	60	10
COZIDA SOB PRESSÃO	7	0 (CN)*	25	0 (CN)*	43	0 (CN)*	61	0 (CN)*
	8	0,01	26	0,01	44	0,01	62	0,01
	9	0,1	27	0,1	45	0,1	63	0,1
	10	1	28	1	46	1	64	1
	11	5	29	5	47	5	65	5
	12	10	30	10	48	10	66	10
PRESSÃO ATM	13	0 (CN)*	31	0 (CN)*	49	0 (CN)*	67	0 (CN)*
	14	0,01	32	0,01	50	0,01	68	0,01
	15	0,1	33	0,1	51	0,1	69	0,1
	16	1	34	1	52	1	70	1
	17	5	35	5	53	5	71	5
	18	10	36	10	54	10	72	10

*Controle Negativo

Fonte: Autoria Própria, 2013.

Para a extração do DNA das amostras, foi utilizado o protocolo de extração de DNA total de Marcelino; Guimarães; Barros (2008) (item 3.2). Assim como, utilizou-se as mesmas condições de amplificação descritas no tópico 3.3.1.

3.6 ANÁLISE DOS PRODUTOS CÁRNEOS ADQUIRIDOS NO COMÉRCIO LOCAL

No âmbito deste estudo, foram adquiridas 27 amostras de produtos cárneos de marcas distintas no comércio local de Ponta Grossa, Paraná. Selecionaram-se amostras com diferentes tratamentos térmicos (produto cru, pronto para o consumo e produto enlatado) e diferentes ingredientes proteicos, tendendo selecionar produtos de frango e suíno. Uma vez que, o objetivo dessas análises é a autenticidade (padrão de identidade - rotulagem) dos produtos cárneos para os oligonucleotídeos iniciadores das espécies de frango e suíno. Na Tabela 7 estão reunidas as amostras analisadas e seus constituintes constatados na rotulagem desses produtos.

Tabela 7 - Constituintes constatados na rotulagem de produtos cárneos

Código	Ingredientes
1	Linguiça Frescal de Frango: carne de frango, proteína vegetal e condimentos
2	Linguiça Fina Frescal Suína: carne suína, toucinho e condimentos
3	Linguiça Toscana: carne suína e condimentos
4	Linguiça Toscana: paleta suína, toucinho e condimentos
5	Linguiça Calabresa: carne suína, carne bovina e condimentos
6	Linguiça calabresa: carne suína, toucinho e condimentos
7	Linguiça Tipo Calabresa: carne suína, CMS* de frango e condimentos
8	Apresentado: carne suína e condimentos
9	Apresentado: carne suína e condimentos
10	Apresentado: carne suína e condimentos
11	Hambúrguer de Frango: carne e gordura de frango e condimentos
12	Hambúrguer de Carne de Frango e Bovina: carne e gordura de frango, carne e gordura bovina, gordura suína e condimentos
13	Hambúrguer de Carne Bovina: carne e gordura bovina e condimentos
14	Hambúrguer Misto: carne de aves, bovina, suína e condimentos
15	Empanado de Frango: carne e gordura de frango, CMS de aves e condimentos
16	Empanado de Frango: carne e pele de frango e condimentos
17	Empanado de Frango: CMS e pele de frango e condimentos
18	Patê de Frango: carne de frango, gordura suína e condimentos
19	Patê de Frango: carne de frango, gordura suína e condimentos
20	Patê Suíno (de presunto): carne e gordura suína e condimentos
21	Patê Suíno (de presunto): presunto, carne e gordura suína e condimentos
22	Lasanha à Bolonhesa: carne bovina, presunto cozido e condimentos
23	Lasanha de Frango: carne de frango, bacon e condimentos
24	Escondidinho de Frango: frango desfiado e condimentos
25	Presuntada Enlatada: presunto e condimentos
26	Almôndega Bovina ao Molho Oderich Enlatada: carne bovina e condimentos
27	Salsichas ao Molho Oderich Enlatada: carne suína e bovina, CMS de frango e condimentos

*Carne Mecanicamente Separada

Fonte: Autoria Própria, 2013.

As amostras foram maceradas manualmente em cadinho e armazenadas em recipiente estéril, codificadas e acondicionadas congeladas a -18°C . De forma a evitar contaminações, cada amostra foi tratada separadamente, sempre usando material estéril.

O primeiro passo da amplificação do DNA por PCR consiste no isolamento do DNA. Desta forma, utilizou-se o mesmo protocolo de extração de DNA total descrito do tópico 3.2.

Após a extração do DNA, o mesmo foi submetido à metodologia PCR para sua amplificação. Os oligonucleotídeos iniciadores, reação (Tabela 8) e programação de PCR (Tabela 9) utilizadas foram às mesmas descritas do tópico 3.3.1.

Tabela 8 - Componentes da reação de PCR para os oligonucleotídeos iniciadores das espécies suína e aviária

Componente	Concentração	Volume
H ₂ O ultrapura	-	17,25 μL
Tampão 10X	1 X	2,50 μL
MgCl ₂	200 μM	0,25 μL
dNTP	3,0 Mm	1,50 μL
<i>Primer Forward</i>	0,3 μM	0,40 μL
<i>Primer Reverse</i>	0,3 μM	0,40 μL
Taq DNA polimerase	2,5 UM	0,20 μL
DNA extraído	1,0 μg	2,50 μL
Total	-	25 μL

Fonte: Autoria Própria, 2012.

Tabela 9 - Condições de temperatura e tempo utilizadas na amplificação de DNA via PCR para os oligonucleotídeos iniciadores das espécies suína e aviária

Programação	Espécie Suína		Espécie de Frango	
	Temperatura	Tempo	Temperatura	Tempo
Desnaturação Inicial	94°C	3 minutos	94°C	3 minutos
Desnaturação do DNA	94°C	50 segundos	94°C	50 segundos
Hibridização	70°C	30 segundos	69°C	30 segundos
Extensão	72°C	1 minuto	72°C	1 minuto
Extensão Final	72°C	10 minutos	72°C	10 minutos
Número de Ciclos	35			

Fonte: Autoria Própria, 2012.

3.7 VISUALIZAÇÃO DOS RESULTADOS

Tanto a verificação da qualidade do DNA extraído quanto à visualização dos resultados da PCR foram realizadas através do sistema de eletroforese em cuba horizontal com gel de Agarose 1,5% e tampão de corrida TBE 1X. O gel foi submetido a uma corrente elétrica de 80 Volts por 30 minutos (etapa de extração do DNA) e de 110 Volts por 75 minutos (etapa de amplificação do DNA).

Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de 200 ml de TBE 1X e 40 μ L de Brometo de Etídio (1 μ g/ml) durante 15 minutos. Para então, os resultados serem ponderados por um transiluminador de luz ultravioleta (UV), onde a imagem digital foi captada pelo sistema digital *L.Pix Image HE* e analisada pelo *software Loccus* Biotecnologia.

Os resultados foram analisados perante a presença ou não da banda de DNA. Na observação do produto da PCR as bandas foram comparadas com um padrão de massa molar de 100 pares de base (pb).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PADRONIZAÇÕES DA TÉCNICA PCR ESPECÍFICA PARA SUÍNO E FRANGO

4.1.1 Extração do DNA Alvo

As amostras para a padronização dos controles positivos (sangue suíno e músculo de frango) foram submetidas ao protocolo de extração de DNA total (MARCELINO; GUIMARÃES; BARROS, 2008). Após visualização dos resultados em sistema digital, verificou-se a presença de banda em todas as amostras, tanto para DNA suíno como para o de frango, conforme pode ser visualizado nas Figuras 4 e 5.

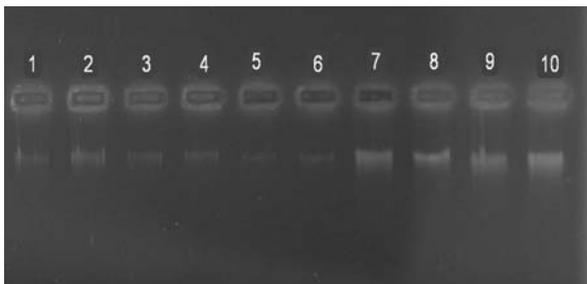


Figura 4 - Perfil da banda de DNA da espécie suína. 1 a 10: amostra suína

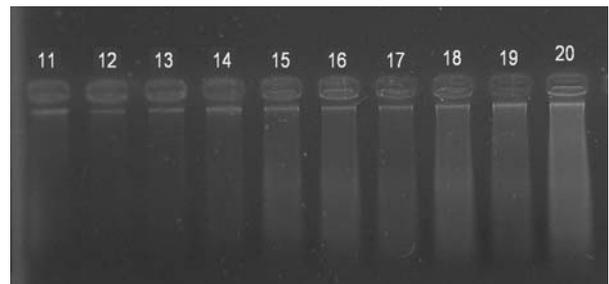


Figura 5 - Perfil da banda de DNA da espécie de frango. 11 a 20: amostra de frango

Nesta etapa de extração do DNA para padronização dos controles positivos, as boas práticas laboratoriais são imprescindíveis, ou seja, realizar as análises de forma a evitar, com garantias, contaminação cruzada das espécies animais. Segundo Brugnano (2010), o preparo de reagentes e soluções, a utilização dos equipamentos e utensílios, além da preparação das amostras, são pontos críticos de controle no desenvolvimento da pesquisa.

Portanto, a utilização de luvas, o cuidado no descongelamento separado de cada espécie (para evitar contaminação pelo exsudato), preparação e utilização de reagentes com cautela e prudência, e a manutenção e limpeza dos equipamentos acarretam em análise com resultados reprodutíveis e confiáveis.

Com o mesmo intuito, em todas as etapas da pesquisa foram tomados cuidados para que os resultados obtidos apresentassem reprodutividade e confiabilidade. Como utilizar controle negativo em cada extração de DNA e reação de amplificação do DNA, para verificar a contaminação ou não dos reagentes da PCR ou durante a realização da análise. No controle negativo é usado somente o mix de reagentes (Tabela 8), sem adição de qualquer DNA.

Deste modo, a qualidade do DNA extraído foi satisfatória para a amplificação do DNA de ambas as espécies animais estudadas. O protocolo de extração utilizado foi considerado eficaz, visto ser capaz de remover inibidores de PCR (proteínas), o que poderia interferir na amplificação (GHOVVATI et al., 2009).

4.1.2 Amplificação do DNA Alvo via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

4.1.2.1 Espécie suína

Com temperatura de hibridização entre 62 a 72°C, realizou-se a PCR gradiente para o *primer* da espécie suína, determinando como temperatura ideal igual a 70°C, uma vez que, a partir desta temperatura, as bandas começaram a se tornar menos visíveis (Figura 6).

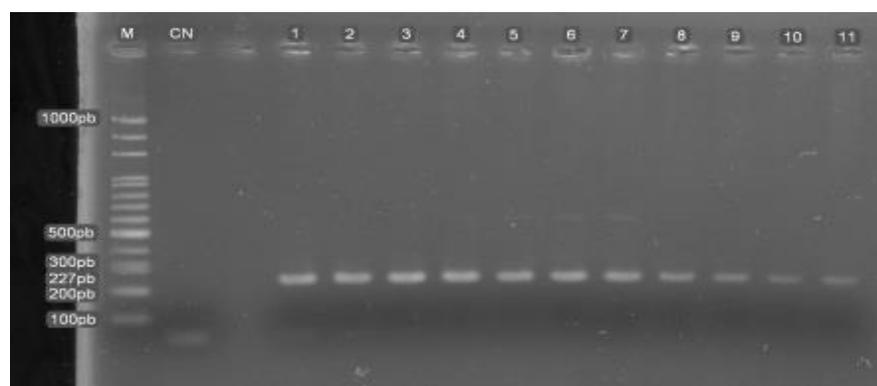


Figura 6 - Resultado da PCR gradiente para o primer da espécie suína em 227 pb. M: marcador; CN: controle negativo; 1: 62°C; 2: 63°C; 3: 64°C; 4: 65°C; 5: 66°C; 6: 67°C; 7: 68°C; 8: 69°C; 9: 70°C; 10: 71°C; 11: 72°C

A amplificação das bandas em 227 pb se demonstrou positiva, sendo equivalente a tomada como referencia para este *primer* (KESMEN; SAHIN; YETIM, 2007). O mesmo não se pode dizer a respeito da temperatura de hibridização determinada como ideal em 70°C, diferenciando em 15°C da temperatura indicada (55°C) por Kesmen; Sahin; Yetim (2007), provavelmente pela diferença dos reagentes e equipamentos utilizados nesta pesquisa.

Com a determinação da temperatura ideal de hibridização em 70°C, foi realizado o teste de especificidade do *primer* suíno a partir do DNA extraído de amostras bovina e equina, além da de frango.

O teste demonstrou ser eficaz quanto à especificidade para a espécie suína. Observando a Figura 7, nota-se a amplificação, como esperado, apenas na amostra que contém o DNA suíno situado em 227pb. Teste semelhante foi realizado por Tanabe et al. (2007) com o mesmo intuito, os autores analisaram a especificidade do *primer* da espécie suína conjuntamente com DNA de diferentes espécies. Esses autores relataram a eficiência do *primer* a partir da amplificação unicamente na amostra contendo o DNA de suíno.

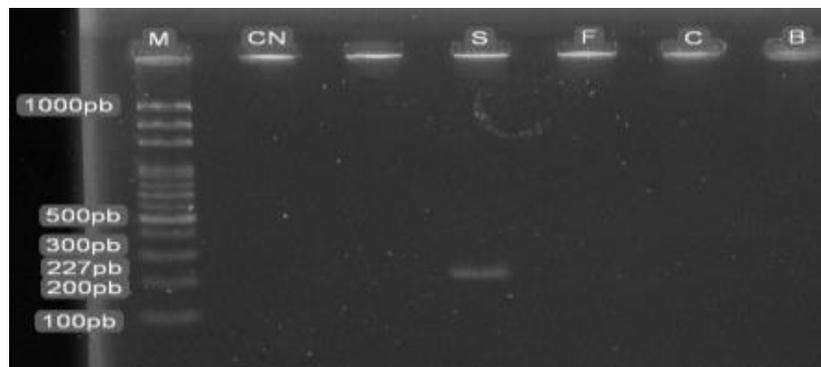


Figura 7 - Resultado do teste de especificidade para o *primer* da espécie suína em 227 pb. M: marcador; CN: controle negativo; S: amostra de PCR com DNA suíno (controle positivo); F: amostra de PCR com DNA de frango; C: amostra de PCR com DNA equino; B: amostra de PCR com DNA bovino

A eficiência na especificidade do *primer* é uma etapa de suma importância para a pesquisa, a fim de gerar resultados confiáveis comparado com outras espécies. Em estudo semelhante, os autores detectaram a presença de carne suína em hambúrgueres rotulados como carne de frango ou peru e hambúrgueres sem rotulagem, mas vendidos como tendo somente de carne de frango (CALVO; ZARAGOZA; OSTA, 2001). Esse resultado implica além da adulteração no produto,

um sério problema religioso, principalmente nas populações judaicas e árabes, uma vez que nesses países o consumo de carne suína e seus derivados é considerado pecado (NAKYINSIGE; CHE MAN; SAZILI, 2012).

No caso do oligonucleotídeo iniciador da espécie suína, até esta etapa, se mostrou eficaz e, portanto, satisfatório quanto à reação e programação de PCR utilizada, a temperatura de hibridização e sua especificidade demonstradas nas análises. Com isso, seguiu-se para validação da metodologia, teste de sensibilidade e as análises dos produtos adquiridos no comércio de Ponta Grossa, Paraná.

4.1.2.2 Espécie de frango

Para a realização da bateria de testes para o oligonucleotídeo iniciador da espécie de frango, também foi utilizado a reação e programação de PCR descrita por Kesmen; Sahin; Yetim (2007). Lembrando que a PCR gradiente foi realizada com temperatura de hibridização entre 62 a 72°C (Figura 8).

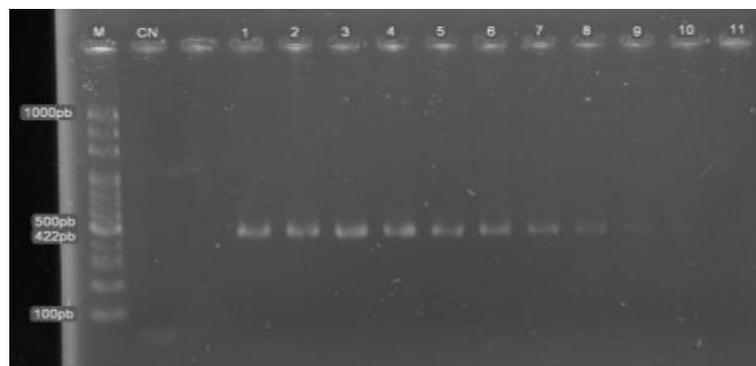


Figura 8 - Resultado da PCR gradiente para o primer da espécie de frango em 422 pb. M: marcador; CN: controle negativo; 1: 62°C; 2: 63°C; 3: 64°C; 4: 65°C; 5: 66°C; 6: 67°C; 7: 68°C; 8: 69°C; 9: 70°C; 10: 71°C; 11: 72°C

Optou-se como temperatura de hibridização ideal a de 69°C, mesmo com a banda apresentando aspecto fraco no gel de agarose. Ainda assim, demonstrou-se eficiência no teste de especificidade, como visualizado na Figura 9. Como já mencionado anteriormente, a utilização de reagentes e equipamentos de marca não equivalente à literatura pode acarretar diferenças na metodologia, como por exemplo, a temperatura de hibridização observada para *primer* da

espécie de frango, na qual difere em 9°C da temperatura dotada por Mane; Mendiratta; Tiwari (2009), que é igual a 60°C.

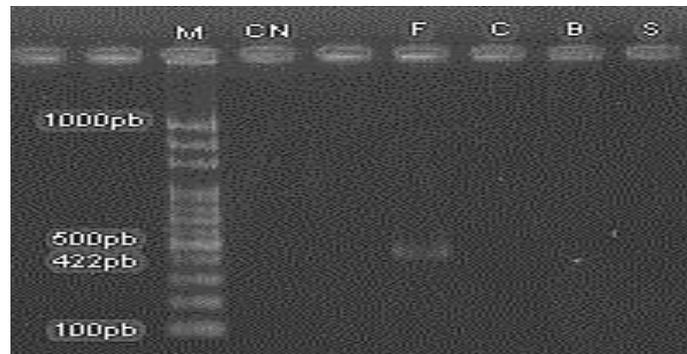


Figura 9 - Resultado do teste de especificidade para o primer da espécie de frango em 422pb. M: marcador; CN: controle negativo; F: amostra de PCR com DNA de frango (controle positivo); C: amostra de PCR com DNA equino; B: amostra de PCR com DNA bovino; S: amostra de PCR com DNA suíno

O teste de especificidade mostrou condições de amplificação satisfatórias para o *primer* da espécie de frango, pois a incidência de DNA de outras espécies (DNA não alvo) não interferiu na especificidade do oligonucleotídeo iniciador. Este não apresentou bandas inespecíficas e o tamanho de apresentação da banda em 422 pb condiz com o descrito por Mane; Mendiratta; Tiwari (2009). Portanto, para o *primer* da espécie de frango os testes de padronização podem ser considerados hábeis e finalizados.

Em produtos cárneos, a substituição da espécie animal rotulada pela carne de frango é muito comum, por esta ser mais econômica, imperceptível sensorialmente e, também, pelo fato de não ser utilizados métodos de análise capazes de detectar essa adulteração (BALLIN, 2010; GHOVVATI et al., 2009). Neste sentido, Soares et al. (2010) e Nakyinsige; Che Man; Sazili (2012) ressaltam a importância da correta autenticidade quanto ao padrão de identidade dos produtos cárneos processados (rotulagem condizente com o constituinte proteico utilizado) na detecção de adulterações, a fim de zelar pela saúde e confiança dos consumidores.

4.2 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA PCR EM UM EMBUTIDO

Adulteração de espécies animais em produtos cárneos é de grande preocupação mundial, com destaque para os recentes casos de fraude com carne de cavalo em hambúrgueres e produtos pronto para consumo na Europa. Recentemente, a Nestlé divulgou ter encontrado quantidade maior que 1% de DNA equino em seus produtos à base de carne bovina, mostrando a importância da metodologia PCR na autenticidade de produtos cárneos. O valor de 1% é o limite definido pela ANVISA (Agência de Segurança Alimentar) para indicar adulteração provável ou negligência grave (BAI et al., 2009; G1 ECONOMIA, 2013).

Para a validação da metodologia, primeiramente foi isolado o DNA da linguiça suína e sua qualidade verificada em sistema digital (Figura 10).

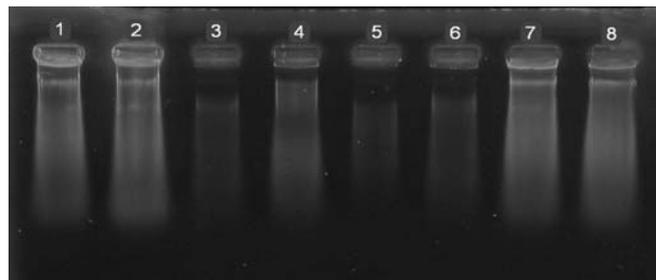


Figura 10 - Perfil da banda de DNA da amostra de linguiça suína. 1 a 8: amostra de linguiça suína

A extração do DNA foi eficaz apenas para as amostras 1, 2, 7 e 8. Acredita-se que em função da amostra apresentar muita gordura em sua composição, dificultou a exposição do DNA nas amostras (RODRIGUES, 2013).

A metodologia PCR foi validada quanto aos oligonucleotídeos iniciadores da espécie suína e de frango. Para tanto, realizou-se uma reação de PCR para a espécie suína e outra para a espécie de frango, ambas contendo o DNA extraído da linguiça suína juntamente com o DNA das demais espécies animais (suíno, de frango, bovino e equino).

Na programação da PCR utilizou-se a relatada por kesmen; Sahin; Yetim (2007), descrita no tópico 3.3.2. Apenas diferenciando a temperatura de hibridização, que neste caso, foi utilizada com dois graus a menos da tomada como ideal, ficando em 68°C para a espécie suína e 67°C para a de frango. Esta decisão foi tomada pela complexidade da matriz alimentícia. Uma vez que, alimentos como

embutidos são extremamente complexos e possuidores de alto teor lipídico, o que dificulta a extração de um DNA mais limpo, além de conter contaminantes e enzimas ativas que podem inibir a reação de PCR. Fatores que podem comprometer os resultados quando comparado à utilização de matéria-prima simples, como o caso das amostras de sangue e músculo usadas para padronização da metodologia (RODRIGUES, 2013; PASSO, 2009). Os resultados da validação estão apresentados na Figura 11.

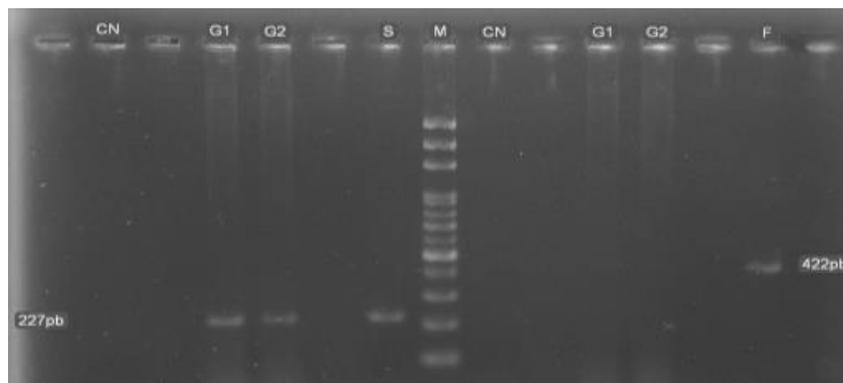


Figura 11 - Resultado do teste de validação da metodologia em língua suína. M: marcador; CN: controle negativo; G1 e G2: amostra de PCR com DNA da língua suína; S: amostra de PCR com DNA suíno (controle positivo); F: amostra de PCR com DNA de frango (controle positivo)

Ao observar os resultados, a metodologia pode ser considerada eficaz, precisa e específica para ambos os *primers* estudados, já que ocorreu formação de banda de DNA (amplificação) somente com o oligonucleotídeo iniciador específico para a amostra testada, ou seja, da espécie suína.

Na Tabela 10 encontra-se o resumo quanto as características de cada oligonucleotídeo iniciador estudado.

Tabela 10 – Resumo dos resultados finais para o oligonucleotídeo iniciador da espécie suína e de frango

Espécie Animal	Tamanho do fragmento	Temperatura de hibridização	Reação de PCR	Programação da PCR
			KESMEN; SAHIN; YETIM,2007	
Suíno	227 pb	68°C	Volume final de 25µL, com: 1X PCR Buffer, 200 µM de dNTP, 3,0 mM de MgCl ₂ , 0,3 µM de cada <i>Primer</i> (IDT®), 2,5U de Taq DNA polimerase e 1µg do DNA alvo	35 ciclos: desnaturação inicial a 94°C por 3", desnaturação do DNA a 94°C por 50', hibridização dos <i>primers</i> por 30', extensão a 72°C por 1", extensão final a 72°C por 10" e 15°C até retirada das amostras do equipamento
Frango	422 pb	67°C		

Fonte: Autoria Própria, 2013.

4.3 SENSIBILIDADE DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES

Métodos precisos, autênticos e rápidos para a identificação dos constituintes proteicos em alimentos de origem animal são indispensáveis para proteger o consumidor contra práticas de adulteração e também evitar a concorrência desleal no mercado. Principalmente para populações onde a crença religiosa proíbe a ingestão de determinadas espécies animais por considerar um pecado, como os judeus e os islâmicos, que não consomem carne suína e seus derivados.

Os pares de oligonucleotídeos iniciadores usados nesta pesquisa foram selecionados com base no gene mitocondrial D-Loop. Segundo estudos, com o uso do DNA mitocondrial é possível obter iniciadores mais específicos, pois o DNA mitocondrial é herdado matematicamente, ou seja, há somente um alelo no indivíduo, não havendo, portanto, ambiguidade na sequência. Além disso, as regiões variáveis do DNA mitocondrial estão presentes em milhares de cópias por célula, aumentando a probabilidade de obtenção de um resultado positivo, mesmo em caso de fragmentação do DNA devido às condições extremas durante o processamento, como por exemplo, o uso de alta temperatura. Característica que o torna ideal para a identificação de espécies animais em produtos cárneos processados (MANE; MENDIRATTA; TIWARI, 2009; KESMEN; SAHIN; YETIM, 2007; ARSLAN; ÍLHAK; CALICIOGLU, 2006).

Na Tabela 11 estão ilustrados os resultados obtidos nos testes de sensibilidade realizados para ambos os oligonucleotídeos iniciadores.

Tabela 11 - Resultado do Teste de Sensibilidade da Técnica PCR em diferentes concentrações e tratamentos térmicos

	100% CARNE DE FRANGO						100% CARNE SUÍNA					
	Carne Suína (%)			Gordura Suína (%)			Carne de Frango (%)			Gordura de Frango (%)		
CRUA	1	0	ND*	19	0	ND	37	0	ND	55	0	ND
	2	0,01	ND	20	0,01	ND	38	0,01	ND	56	0,01	ND
	3	0,1	ND	21	0,1	D	39	0,1	ND	57	0,1	ND
	4	1	ND	22	1	D	40	1	ND	58	1	ND
	5	5	D**	23	5	D	41	5	D	59	5	ND
	6	10	D	24	10	D	42	10	D	60	10	ND
SOB PRESSÃO	7	0	ND	25	0	ND	43	0	ND	61	0	ND
	8	0,01	ND	26	0,01	ND	44	0,01	ND	62	0,01	ND
	9	0,1	ND	27	0,1	ND	45	0,1	ND	63	0,1	ND
	10	1	ND	28	1	ND	46	1	ND	64	1	ND
	11	5	ND	29	5	D	47	5	D	65	5	ND
	12	10	D	30	10	D	48	10	D	66	10	ND
PRESSÃO ATM	13	0	ND	31	0	ND	49	0	ND	67	0	ND
	14	0,01	ND	32	0,01	ND	50	0,01	ND	68	0,01	ND
	15	0,1	ND	33	0,1	ND	51	0,1	ND	69	0,1	ND
	16	1	ND	34	1	ND	52	1	ND	70	1	ND
	17	5	ND	35	5	D	53	5	D	71	5	ND
	18	10	D	36	10	D	54	10	D	72	10	D

*ND: Não Detectado

**D: Detectado

O ensaio de PCR foi avaliado quanto ao seu limite de detecção na amplificação do DNA extraído a partir de carne de frango intencionalmente adulterada com carne suína e gordura suína. Além de testar sua eficácia com diferentes tratamentos térmicos (carne crua, cozida e autoclavada). A metodologia foi eficiente para amplificar os fragmentos em 442 pb do DNA extraído da espécie de frango (Figura 12).

Quanto aos diferentes tratamentos térmicos, nenhum efeito adverso foi observado, pois ocorreu amplificação em todas as amostras que continham 10% de adulteração com carne suína (227 pb) (Figura 13). Resultado semelhante foi encontrado por Ulca et al. (2013), o qual avaliou a PCR em tempo real, analisando produtos cárneos crus e cozidos durante 20 minutos a 200°C, obtendo amplificação em 0,1% de carne suína independente do processamento utilizado.

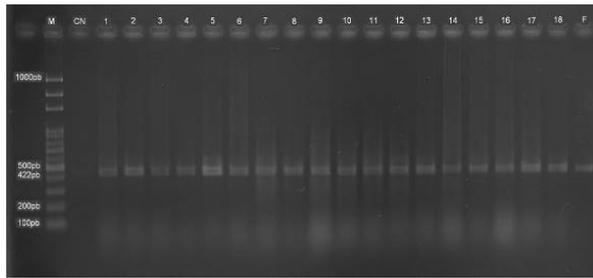


Figura 12 - Resultado do teste de sensibilidade para o iniciador da espécie de frango. M: marcador; CN: controle negativo; 1 a 6: amostras de carne de frango crua com 0%, 0,01%, 0,1%, 1%, 5% e 10% de carne suína; 7 a 12: amostras de carne de frango cozida sob pressão com 0%, 0,01%, 0,1%, 1%, 5% e 10% de carne suína; 13 a 18: amostras de carne de frango cozida a pressão atm com 0%, 0,01%, 0,1%, 1%, 5% e 10% de carne suína; F: controle positivo

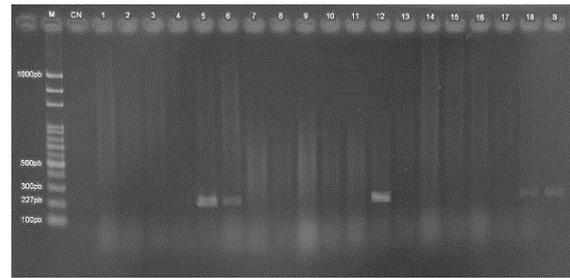


Figura 13 - Resultado do teste de sensibilidade para o iniciador da espécie suína. M: marcador; CN: controle negativo; 1 a 6: amostras de carne de frango crua com 0%, 0,01%, 0,1%, 1%, 5% e 10% de carne suína; 7 a 12: amostras de carne de frango cozida sob pressão com 0%, 0,01%, 0,1%, 1%, 5% e 10% de carne suína; 13 a 18: amostras de carne de frango cozida a pressão atm com 0%, 0,01%, 0,1%, 1%, 5% e 10% de carne suína; S: controle positivo

Já ao analisar o limite de detecção na adulteração da carne de frango com gordura suína, a metodologia mostrou um alto grau de sensibilidade, uma vez que houve amplificação a partir da concentração de 0,1% nas amostras cruas e, nas amostras com tratamento térmico, obteve banda em 5% e 10%, mesmo após sofrer processo de esterilização a 121°C por 10 minutos (Figuras 14 e 15). Como mencionado anteriormente, este resultado pode ser devido ao grande número de cópias de DNA mitocondrial no tecido, contribuindo para a sobrevivência de um número suficiente de cópias de DNA, e ainda a estabilidade ao calor, mesmo quando submetido a condições extremas (MANE; MENDIRATTA; TIWARI, 2009).

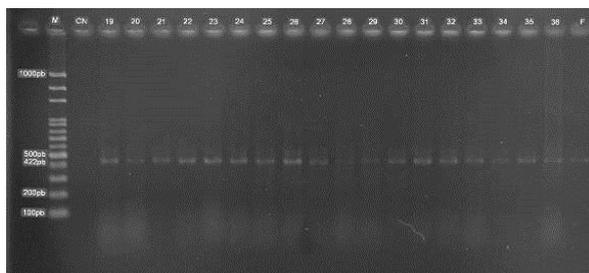


Figura 14 - Resultado do teste de sensibilidade para o iniciador da espécie de frango. M: marcador; CN: controle negativo; 19 a 24: amostras de carne de frango crua com 0%, 0,01%, 0,1%, 1%, 5% e 10% de gordura suína; 25 a 30: amostras de carne de frango cozida sob pressão com 0%, 0,01%, 0,1%, 1%, 5% e 10% de gordura suína; 31 a 36: amostras de carne de frango cozida a pressão atm com 0%, 0,01%, 0,1%, 1%, 5% e 10% de gordura suína; F: controle positivo

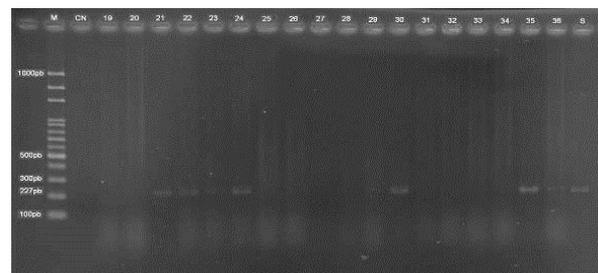


Figura 15 - Resultado do teste de sensibilidade para o iniciador da espécie suína. M: marcador; CN: controle negativo; 19 a 24: amostras de carne de frango crua com 0%, 0,01%, 0,1%, 1%, 5% e 10% de gordura suína; 25 a 30: amostras de carne de frango cozida sob pressão com 0%, 0,01%, 0,1%, 1%, 5% e 10% de gordura suína; 31 a 36: amostras de carne de frango cozida a pressão atm com 0%, 0,01%, 0,1%, 1%, 5% e 10% de gordura suína; S: controle positivo

A substituição de uma espécie animal por outra economicamente mais barata, ou ainda, rotulagem não condizente com o padrão de identidade do produto pode afetar milhares de consumidores que confiam na qualidade e transparência do produto. Estas fraudes vêm tomando proporções exorbitantes por não serem facilmente mensuráveis, o que acarretou no aumento de pesquisas com o intuito de, cada vez mais, aprimorar metodologias capazes de identificar os constituintes cárneos de um produto processado. Neste contexto, a utilização do DNA mitocondrial e os oligonucleotídeos iniciadores usados nesta etapa da pesquisa foram satisfatórios, pois obteve um limiar de detecção de 0,1%, o que atesta a alta sensibilidade da metodologia (Figura 15).

Kesmen; Sahin; Yetim (2007) também utilizaram com sucesso o ensaio de PCR para identificação das espécies animais presentes em salsichas de frango cozidas. Quanto à sensibilidade do ensaio, a amplificação foi detectada em misturas com menos de 1% de adulteração, sem quaisquer comentários adversos às condições de processamento (calor) e ingredientes utilizados para a preparação de salsichas.

O ensaio de PCR também foi analisado quanto ao seu limite de detecção na amplificação do DNA extraído a partir de carne suína intencionalmente adulterada com carne (Figura 16 e 17) e gordura de frango (Figuras 18 e 19).

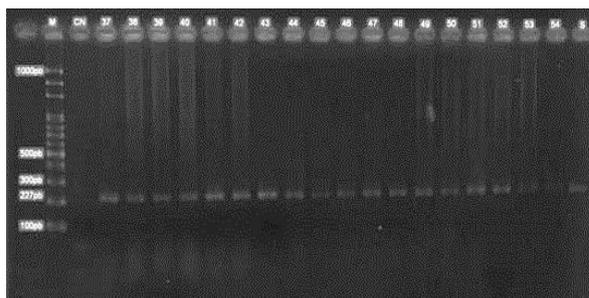


Figura 16 - Resultado do teste de sensibilidade para o iniciador da espécie suína. M: marcador; CN: controle negativo; 37 ao 42: amostras de carne suína crua com 0%, 0,01%, 0,1%, 1%, 5% e 10% de carne de frango; 43 ao 48: amostras de carne suína cozida sob pressão com 0%, 0,01%, 0,1%, 1%, 5% e 10% de carne de frango; 49 ao 54: amostras de carne suína cozida a pressão atm com 0%, 0,01%, 0,1%, 1%, 5% e 10% de carne de frango; S: controle positivo

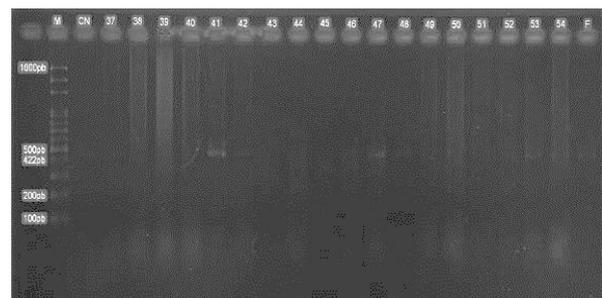


Figura 17 - Resultado do teste de sensibilidade para o iniciador da espécie de frango. M: marcador; CN: controle negativo; 37 ao 42: amostras de carne suína crua com 0%, 0,01%, 0,1%, 1%, 5% e 10% de carne de frango; 43 ao 48: amostras de carne suína cozida sob pressão com 0%, 0,01%, 0,1%, 1%, 5% e 10% de carne de frango; 49 ao 54: amostras de carne suína cozida a pressão atm com 0%, 0,01%, 0,1%, 1%, 5% e 10% de carne de frango; F: controle positivo

O ensaio de PCR foi satisfatório para a amplificação da espécie suína, obtendo banda com 227 pb, conforme Kesmen; Sahin; Yetim (2007) descreveram. A amplificação foi positiva em todas as amostras, sem apresentar efeito adverso às condições de processamento e ingredientes utilizados para a preparação das amostras. Este resultado também foi verificado em estudo realizado por Calvo et al. (2002), o qual desenvolveu com sucesso iniciadores específicos da espécie suína para sua identificação em produtos cárneos como salsichas, hambúrgueres e patês.

A reação de PCR detectou adulteração nas amostras contendo 5 e 10% de carne de frango (Figura 17), independente do tratamento térmico sofrido. Estes resultados deixam claro que a eficiência da técnica não é afetada com o emprego de calor nas amostras, tornando-a ideal para a identificação dos constituintes proteicos em produtos cárneos processados (MANE; MENDIRATTA; TIWARI, 2009).

Contudo, esses resultados não foram repetidos ao se analisar a carne suína adulterada com gordura de frango. Ao mesmo tempo em que o oligonucleotídeo iniciador (*primer*) da espécie suína apresentou resultados positivos em todas as amostras – sem alteração nas amostras com tratamento térmico (Figura 18), o limite de detecção (sensibilidade) do iniciador da espécie de frango não foi satisfatório, amplificando somente a amostra 72 (Figura 19).

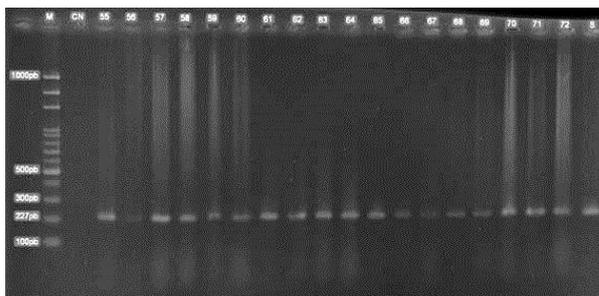


Figura 18 - Resultado do teste de sensibilidade para o iniciador da espécie suína. M: marcador; CN: controle negativo; 55 ao 60: amostras de carne suína crua com 0%, 0,01%, 0,1%, 1%, 5% e 10% de gordura de frango; 61 ao 66: amostras de carne suína cozida sob pressão com 0%, 0,01%, 0,1%, 1%, 5% e 10% de gordura de frango; 67 ao 72: amostras de carne suína cozida a pressão atm com 0%, 0,01%, 0,1%, 1%, 5% e 10% de gordura de frango; S: controle positivo

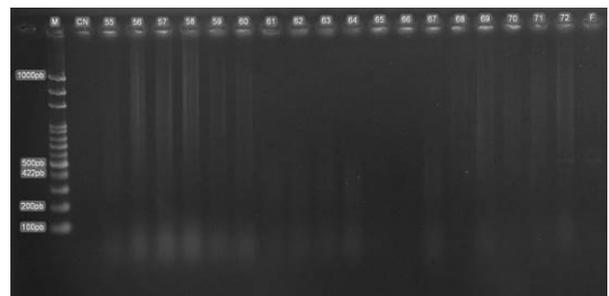


Figura 19 - Resultado do teste de sensibilidade para o iniciador da espécie de frango. M: marcador; CN: controle negativo; 55 ao 60: amostras de carne suína crua com 0%, 0,01%, 0,1%, 1%, 5% e 10% de gordura de frango; 61 ao 66: amostras de carne suína cozida sob pressão com 0%, 0,01%, 0,1%, 1%, 5% e 10% de gordura de frango; 67 ao 72: amostras de carne suína cozida a pressão atm com 0%, 0,01%, 0,1%, 1%, 5% e 10% de gordura de frango; F: controle positivo

A amplificação apenas na amostra de maior concentração de adulteração (10%) e no tratamento térmico mais brando (cozimento em banho-maria até 72°C) pode ser resultado da dificuldade de extrair o DNA observado no estudo. Alimentos com alto teor lipídico dificultam a extração de um DNA mais limpo, além disso, podem conter contaminantes e enzimas ativas (inibem a reação) e, assim, comprometer os resultados quando comparado à utilização de matéria-prima simples (RODRIGUES, 2013).

Por fim, a metodologia PCR foi empregada com sucesso para a detecção da adulteração em produtos de carne suína e de frango, apresentando sensibilidade semelhante aos testes realizados por Arslan; Ílhak; Calicioglu (2006), Che Man et al. (2007) e Haunshi et al. (2009). Estes resultados evidenciam que a PCR é uma técnica sensível, específica, rápida e com capacidade de detectar adulteração em produtos cárneos submetidos a diferentes tratamentos térmicos.

4.4 ANÁLISE DOS PRODUTOS CÁRNEOS ADQUIRIDOS NO COMÉRCIO LOCAL

Para a autenticidade dos produtos cárneos adquiridos no mercado local, foi escolhido produtos com diferentes espécies animais rotuladas, contudo, enfatizando os produtos a base de carne de frango e suína. Ressaltando que para as análises, foi realizada uma reação de PCR para cada oligonucleotídeo iniciador separadamente. Tendo em vista o número de poços do gel de agarose, a visualização dos resultados das 27 amostras foi dividida em 4 fotos digitalizadas, primeiramente da amostra 1 a 14 para a espécie de frango (Figuras 20) e para a suína (Figura 21) e, em seguida, da amostra 15 a 27 para a espécie de frango (Figura 22) e para a espécie suína (Figura 23).

Visualizando a Figura 20, pode-se observar banda na amostra 5, com 422 pb, o que representa DNA de frango. Contudo, a rotulagem desse produto (linguiça calabresa) não indica o uso desta espécie animal como ingrediente. Da mesma forma se apresentou a amostra 7, entretanto, sua rotulagem específica "linguiça do tipo calabresa". Segundo a ANVISA, linguiças denominadas Tipo Calabresa, é permitido a utilização de até 20% de CMS (Carne Mecanicamente Separada), desde que seja declarado no rótulo de forma clara ao consumidor a expressão "carne mecanicamente separada de (espécie animal)".

Já a amostra 8 também demonstrou amplificação em 422 pb, o que implica em fraude, uma vez que apresentou DNA de frango em um produto rotulado como apresuntado (apenas carne suína como ingrediente) (Figura 20).

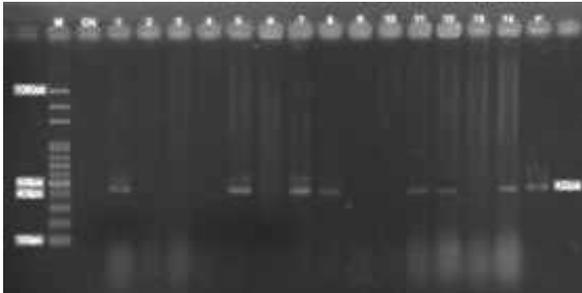


Figura 20 - Resultado da análise de produtos do mercado local para o iniciador da espécie de frango. M: marcador; CN: controle negativo; 1: linguiça frescal de frango; 2: linguiça fina frescal suína; 3 e 4: linguiça toscana; 5 e 6: linguiça calabresa; 7: linguiça tipo calabresa; 8, 9 e 10: apresuntado; 11: hambúrguer de frango; 12: hambúrguer de carne de frango e bovina; 13: hambúrguer de carne bovina; 14: hambúrguer misto; F: controle positivo

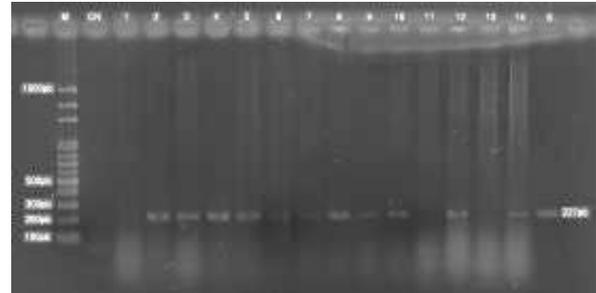


Figura 21 - Resultado da análise de produtos do mercado local para o iniciador da espécie suína. M: marcador; CN: controle negativo; 1: linguiça frescal de frango; 2: linguiça fina frescal suína; 3 e 4: linguiça toscana; 5 e 6: linguiça calabresa; 7: linguiça tipo calabresa; 8, 9 e 10: apresuntado; 11: hambúrguer de frango; 12: hambúrguer de carne de frango e bovina; 13: hambúrguer de carne bovina; 14: hambúrguer misto; S: controle positivo

Observando a Figura 21, não foi detectada adulteração em nenhuma das amostras rotuladas como produto carne suína ou naquelas que indicavam carne ou gordura suína como ingredientes. A ocorrência de não conformidade com a rotulagem em algumas amostras suínas, provavelmente pela substituição da mesma por carne de frango, pode ser pelo fato de que carne de frango é mais barata no mercado brasileiro, acarretando em lucro para a empresa. Ghovvati et al. (2009) analisaram carne moída e salsichas, os autores encontraram adulteração nas amostras de salsichas. Ainda segundo os autores, a substituição de espécies animais é muito frequente, provavelmente, por razões econômicas e, principalmente, devido à adulteração não ser detectada facilmente pelos métodos convencionais utilizados.

Com base nos resultados obtidos para as amostras 15 a 27, pode-se afirmar que todas as amostras estão de acordo com seu padrão de identidade, já que as 12 amostras contêm apenas os constituintes proteicos indicados na rotulagem, ao menos para as espécies animais aqui estudadas (suína e de frango). Stamoulis et al. (2010) obtiveram os mesmos resultados, os *primers* utilizados pelos autores amplificaram com sucesso todas as amostras analisadas, assim como os produtos

processados. Os tratamentos térmicos convencionais não afetaram a amplificação do DNA através da PCR.

Pode-se notar também, que a metodologia PCR e os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para esta pesquisa demonstraram especificidade e sensibilidade, uma vez que a amplificação do DNA alvo não foi alterada pelo tratamento térmico de algumas amostras. Isto pode ser validado nas amostras 25, 26 e 27, as quais sofreram o maior emprego de calor em seu processamento (esterilização/envasamento) e, mesmo assim, a PCR foi capaz de amplificar o DNA formando bandas visíveis (Figuras 22 e 23). O DNA é uma molécula bastante termoestável, ou seja, resistente a tratamentos térmicos severos. Com isso, para a autenticidade de produtos cárneos processados, técnicas baseadas no DNA levam vantagem em comparação a métodos fundamentados nas proteínas (STAMOULIS et al., 2010).

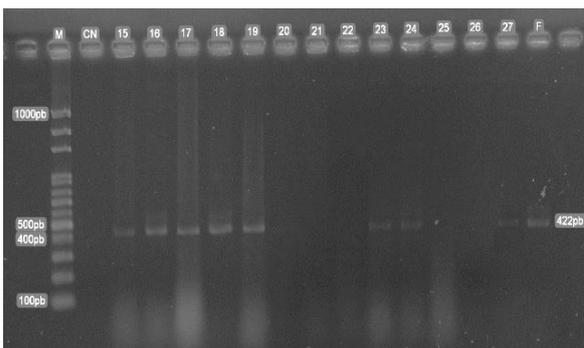


Figura 22 - Resultado da análise de produtos do mercado local para o iniciador da espécie de frango. M: marcador; CN: controle negativo; 15, 16 e 17: empanado de frango; 18 e 19: patê de frango; 20 e 21: patê suíno; 22: lasanha à bolonhesa; 23: lasanha de frango; 24: escondidinho de frango; 25: apresuntada enlatada; 26: almôndega bovina ao molho oderich enlatada; 27: salsichas ao Molho Oderich enlatadas; F: controle positivo

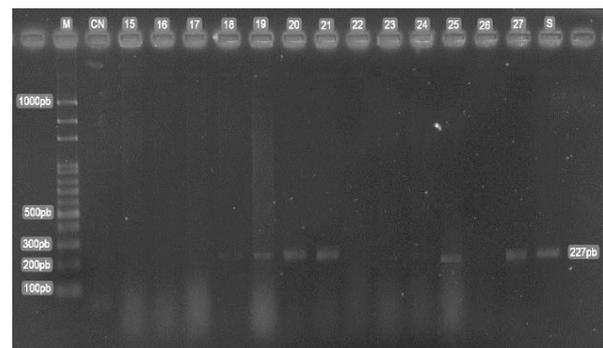


Figura 23 - Resultado da análise de produtos do mercado local para o iniciador da espécie suína. M: marcador; CN: controle negativo; 15, 16 e 17: empanado de frango; 18 e 19: patê de frango; 20 e 21: patê suíno; 22: lasanha à bolonhesa; 23: lasanha de frango; 24: escondidinho de frango; 25: apresuntada enlatada; 26: almôndega bovina ao molho oderich enlatada; 27: salsichas ao Molho Oderich enlatadas; S: controle positivo

O método PCR se mostrou, portanto, eficaz, sensível e específico, já que os oligonucleotídeos iniciadores da espécie de frango amplificou DNA em todas as amostras rotuladas como produto cárneo de frango, assim como o da espécie suína. Inclusive, foi capaz de detectar adulteração nas amostras 5 e 8 (Figura 22). Além de formar bandas visíveis, independente do tratamento térmico utilizado no processamento das amostras analisadas.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento de um sistema para amplificação de DNA para diagnose de diferentes origens animais, assim como a validação da metodologia PCR foram eficazes para ambas as espécies, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores estudados nessa pesquisa.

A validação da metodologia PCR em um embutido (linguiça suína) foi satisfatória para o oligonucleotídeo iniciador da espécie suína e para o *primer* da espécie de frango, essa análise convalidou a técnica quanto à sua reação e programação de PCR e, os dois iniciadores quanto à especificidade e repetibilidade.

O teste de sensibilidade da técnica trouxe como resultados a capacidade de detecção da PCR trabalhada, ou seja, quanto maior o limiar de detecção mais sensível e eficaz será o método. Além de responder a questões como a interferência de calor (processamento) na metodologia.

Através da análise dos produtos cárneos comerciais, foi possível identificar a adição de carne suína nos produtos de frango analisados a partir de 0,1%. Foi também possível detectar a adição de frango em produtos suínos. Os tratamentos térmicos não influenciaram o limiar de detecção e, por conseguinte, a metodologia PCR pode ser considerada como um método robusto, mesmo quando ao se utilizar procedimentos com tratamento térmico mais invasivo, como a esterilização.

Ao analisar os produtos cárneos processados adquiridos no mercado local, o método PCR revelou-se como eficaz, sensível e específico. Pois, os oligonucleotídeo iniciador da espécie de frango amplificou DNA em todas as amostras rotuladas como produto cárneo de frango, assim como o da espécie suína, com bandas de DNA visíveis. Nesta análise, foi detectada adulteração nas amostras 5 e 8, independente do tratamento térmico utilizado no processamento das amostras.

Portanto, é possível usar a técnica PCR na análise de rotina para identificar as espécies animais utilizadas em produtos cárneos processados, a fim de proteger os consumidores contra práticas fraudulentas, como a substituição de espécies. É, também, uma alternativa para estabelecer a autenticidade do padrão de identidade (rotulagem) do produto final para fins industriais.

REFERÊNCIAS

- ALBINO FILHO, A.L. Produção de carne bovina no Brasil: qualidade, quantidade ou ambas? **II Simpósio sobre Desafios e Novas Tecnologias na Bovinocultura de Corte**, Brasília, 2006.
- ARRUDA, G.A. **Perfil fenotípico de *Listeria monocytogenes* isoladas de alimentos**: análise crítica das técnicas de PCR e PFGE e importância para a saúde pública. 2006. 117f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2006.
- ARSLAN, A.; ILHAK, I.O.; CALICIOGLU, M. Effect of method of cooking on identification of heat processed beef using polymerase chain reaction (PCR) technique. **Meat Science**, v.72, n.2, p.326-330, 2006.
- ASENSIO, L. et al. Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELIZA). **Food Control**, v.19, n.1, p.1-8, 2008.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA PRODUTORA E EXPORTADORA DE CARNE SUÍNA - ABIPECS. **Brazilian Pork**: Relatório Anual 2012 – 2013. Disponível em: <http://www.abipecs.org.br/uploads/relatorios/relatorios-associados/ABIPECS_relatorio_2012_pt.pdf>. Acesso em: 28 out. 2013.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ALIMENTOS - ABIA. **A Força do Setor de Alimentos**. Disponível em: <<http://abia.org.br/vst/AForcadoSetordeAlimentos.pdf>>. Acesso em: 28 out. 2013.
- BAI, W. et al. A novel common primer multiplex PCR (CP-M-PCR) method for the simultaneous detection of meat species. **Food Control**, v.20, n.4, p.366-370, 2009.
- BALLIN, N.Z. Authentication of meat and meat products. **Meat Science**, v.86, n.3, p.577-587, 2010.
- BARBOSA, L. et al. **Brasil Food Trends 2020**. FIESP/ITAL, Gráfica Ideal: São Paulo, cap.3, p.39-47, 2010.
- BELGA, I.M.F. **Processo de integração e implementação de sistemas de gestão da qualidade, do meio ambiente e de segurança e saúde ocupacional**. 2007. 164f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Industrial, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2007.
- BERTHIER, F.M. **Ferramentas de gestão da segurança de alimentos: APPCC e ISO 22000 – uma revisão**. 2007, 37f. Monografia (Especialização) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia em Alimentos, Universidade de Brasília. Brasília, 2007.
- BRASIL. Rastreabilidade e segurança alimentar. **Boletim técnico**, n. 91, p. 1-25, 2012. Universidade Federal de Lavras. Lavras: Ufla, 2012.

BRIDI, A.M. **Qualidade da carne para o mercado internacional**. Universidade Estadual de Londrina: Departamento de Zootecnia, Londrina, 2008.

BRUGNANO, F.M. **Identificação da espécie animal em amostras de carne através da reação em cadeia da polimerase: o método de controle de fraudes em alimentos**. 2010, 114f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental aplicada às Zoonoses, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2010.

CALVO, J.H. Beef- and Bovine-Derived Material Identification in Processed and Unprocessed Food and Feed by PCR Amplification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n. 19, p.5262-5264, 2002.

CALVO, J.H.; ZARAGOZA, P.; OSTA, R. Technical note: a quick and more sensitive method to identify pork in processed and unprocessed food by PCR amplification of a new specific DNA fragment. **Journal of Animal Science**, v.79, n.19, p.2108-2112, 2001.

CAMARGO, C.F.; SILVA, P.R.Q. **Aplicação das técnicas de PCR e suas técnicas derivadas em diagnóstico molecular**. Universidade Católica de Goiás/IFAR, 2011.

CHE MAN, Y.B. Identification of pork derivatives in food products by species-specific Polymerase Chain Reaction (PCR) for halal verification. **Food Control**, v.18, n.7, p.885-889, 2007.

CIBALHALAL. Disponível em: <<http://www.cibalhalal.com.br/br/conscientizacao.html>>. Acesso em: 14 dez. 2012.

CORTEZ, A.L.L. **Disseminação de bactérias do gênero *Campylobacter* e *Salmonella* em linhas de abate de aves**. 2006. 97f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo. Jaboticabal, 2006.

CUNHA, G.J.; SAES, M.S.M. Rastreabilidade e coordenação dos sistemas agroindustriais. **Revista Brasileira de Agroinformática**, v.7, n.1, p.29-43, 2005.

DALMASSO, A. et al. A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs. **Molecular and Cellular Probes**, v.18, n.2, p.81-87, 2004.

FRANÇA, J.M. **Barreiras técnicas e desempenho da cadeia produtiva de frangos no estado do Paraná**. 2006, 130f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Produção, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2006.

FIEP. **Brasil Food Trends 2020**. FIESP/ITAL/IBOPE, Gráfica Ideal: São Paulo, cap.4, p.48-62, 2010.

G1 ECONOMIA. Nestlé diz que achou carne de cavalo em produto ligado à empresa da JBS. Disponível em: <<http://g1.globo.com/economia/noticias/2013/02/nestle-diz-que-achou-carne-de-cavalo-em-produto-vindo-de-braco-da-jbs.html>>. Acesso em: 18 fev. 2013.

- GANDRA, E. Á. et al. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Acta Scientiarum Technology**, v.30, n.1, p.109-118, 2008.
- GIL, A.C. **Métodos e técnicas de pesquisa social**. 6ª. Ed., São Paulo: Atlas, 2008.
- GLAAB, B. **Os fenômenos religiosos: hinduísmo**. Disponível em: <<http://www.estef.edu.br/brunoglaab/wpcontent/uploads/2011/09/Hindu%C3%ADsmo.pdf>>. Acesso em: 14 dez. 2012.
- GHOVVATI, S. et al. Fraud identification in industrial meat products by multiplex PCR assay. **Food Control**, v.20, n.8, p.696–699, 2009.
- HAUNSHI, S. et al. Identification of chicken, duck, pigeon and pig meat by species-specific markers of mitochondrial origin. **Meat Science**, v.83, n.3, p.454-459, 2009.
- HSIEH, H-M. et al. Species identification of meat products using the cytochrome b gene. **Forensic Science Journal**, v.4, n.1, p.29-36, 2005.
- ÍLHAK, O. Í.; ARSLAN, A. Identification of meat species by Polymerase Chain Reaction (PCR) Technique. **Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences**, v.31, n.3, p.159-163, 2007.
- KESMEN, Z.; SAHIN, F.; YETIM, H. PCR assay for the identification of animal species in cooked sausages. **Meat Science**, v.77, n.4, p.649-653, 2007.
- LAUBE, I.; ZAGON, J.; BROLL, H. Quantitative determination of commercially relevant species in foods by real-time PCR. **International Journal of Food Science and Technology**, v.42, n.3, p.336–341, 2007.
- MAFRA, L.; OLIVEIRA, M.B.P.P. Organismos geneticamente modificados e alimentos derivados: II. Métodos de detecção e quantificação. **Alimentação Humana**, v.11, s/n, p.71-89, 2005.
- MANE, B.G.; MENDIRATTA, S.K.; TIWARI, A.K. Polymerase chain reaction assay for identification of chicken in meat and meat products. **Food Chemistry**, v.116, n.3, p.806–810, 2009.
- MARCELINO, F.C.; GUIMARÃES, M.F.M.; BARROS, E.G. de. Detection and quantification of Roundup Ready® soybean residues in sausage samples by conventional and real-time PCR. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28 (Supl.), p.38-45, 2008.
- MAYER, W.; HOCHEGGER, R. Discrimination of two alleles of the melanocortin receptor 1 gene to discern European wild boar (*Sus scrofa scrofa*) and domestic pig (*Sus scrofa domestica*) in meat products by real-time PCR. **European Food Research and Technology**, v.232, n.4, p.687-692, 2011.
- MONTOWSKA, M.; POSPIECH, E. Authenticity determination of meat and meat products on the protein and DNA basis. **Food Reviews International**, v.27, n.1, p.84-100, 2011.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - **MAPA**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/exportacao>>. Acesso em: 15 jun. 2012.

MORAES, V.G. de; CAPANEMA, L. A genética de frangos e suínos – a importância estratégica de seu desenvolvimento para o Brasil. **Agroindústria**, v.35, s/n, p.119-154, 2011.

NAU, F. et al. Detection of Turkey, Duck, and Guinea Fowl egg in hen egg products by species-specific PCR. **Food Analytical Methods**, v.2, n.3, p.231-238, 2009.

NAKYINSIGE, K.; CHE MAN, Y.B.C.; SAZILI, A.Q. Halal authenticity issues in meat and meat products. **Meat Science**, v.91, n.3, p.207-214, 2012.

O POVO. Burger King encontra carne de cavalo em fábrica de fornecedora irlandesa. Disponível em: <<http://www.opovo.com.br/app/maisnoticias/mundo/2013/02/01/noticiasmundo,2999365/burger-king-encontra-carne-de-cavalo-em-fabrica-de-fornecedora-irlandesa.shtml>>. Acesso em: 10 fev. 2013.

PASSO, M.C.S.U.C. **Avaliação de métodos moleculares para avaliação da qualidade e da segurança microbiológicas em produtos alimentares**. 2009, 53f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Aplicada, Universidade de Lisboa. Lisboa, 2009.

PEREIRA, A.S.C. **Princípios do processamento de carnes**. 2002. Disponível em: <<http://www.beefpoint.com.br/radares-tecnicos/qualidade-da-carne/principios-do-processamento-de-carnes-5009/>>. Acesso em: 20 nov. 2013.

PERETTI, A.P.R.; ARAÚJO, W.M.C. Abrangência do requisito segurança em certificados de qualidade da cadeia produtiva de alimentos no Brasil. **Gestão & Produção**, v.17, n.1, p.35-49, 2010.

QUEIROZ, T.R.; MACHADO, M.D.; ZUIN, L.F.S. Análise e propostas de melhorias da gestão da qualidade em uma indústria do setor lácteo: um estudo de caso. In: **Jornada Científica de Economia e Administração da UFMS**, Campo Grande, p.1-11, 2004.

REGO, R.A. **Brasil Food Trends 2020**. FIESP/ITAL, Gráfica Ideal: São Paulo, cap.5.1, p.69-97, 2010.

REID, L.M.; O'DONNELL, C.P.; DOWNEY, G. Recent technological advances for the determination of food authenticity. **Food Science and Technology**, v.17, n.7, p.344-353, 2006.

ROCHA-REVILLA, J.C et al. Detección de *Pantoea stewartii* Mergaert, Verdonck & Kersters directamente de la semilla de maíz utilizando INMUNO -PCR. **Universidad y Ciencia**, v.25, n.3, p. 245-252, 2009.

RODRIGUES, Marjory Xavier. **Proposta de inovação tecnológica no controle de qualidade da produção agroindustrial**. 2013. 106 f. Dissertação (Mestrado em

Engenharia de Produção) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Produção, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, 2013.

RÜCKERT, D.A.S.V. **Comparação dos métodos microbiológicos convencional, imunoenálise e reação de polimerase em cadeia (PCR) no monitoramento de *Salmonellasp.* em frangos durante o abate.** 2006, 70f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade de Federal de Viçosa. Viçosa, 2006.

SANTOS, C.M.G. dos. **Avaliação da autenticidade de alheiras de caça por técnicas de biologia molecular.** 2011. 107 f. Dissertação (Mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar) - Escola Superior Agrária de Bragança. Bragança, 2011.

SANTOS, L.V.; PALMEIRA, E.M. Exportações gaúchas de carne bovina processada para os EUA. **Reservatório de la Economía Latino Americana – Revista Acadêmica de Economía**, n.71, 2006.

SILVA, E.L. da; MENEZES, E.M. **Metodologia da pesquisa e elaboração de dissertação.** 4ª ed. Florianópolis: UFSC, 2005.

SOARES, S. et al. Quantitative detection of poultry meat adulteration with pork by a duplex PCR assay. **Meat Science**, v.85, n.3, p.531-536, 2010.

STAMOULIS, P. et al. Development and application of molecular markers for poultry meat identification in food chain. **Food Control**, v.21, n.7, p.1061-1065, 2010.

TANABE, S. et al. A real-time quantitative PCR detection method for pork, chicken, beef, mutton and horseflesh in foods. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.71, n.12, p.3131-3135, 2007.

TANG, Y. et al. Rapid detection techniques for biological and chemical contamination in food: A review. **International Journal of Food Engineering**, v.5, n.5, 2009.

ULCA, P. et al. Meat species identification and Halal authentication using PCR analysis of raw and cooked traditional Turkish foods. **Meat Science**, v.94, n.3, p.280-284, 2013.

UOL. França retira do mercado várias marcas de lasanha por caso da carne de cavalo. Disponível em: <<http://noticias.uol.com.br/ultimas-noticias/efe/2013/02/09/franca-retira-do-mercado-varias-marcas-de-lasanha-por-caso-da-carne-de-cavalo.htm>>. Acesso em: 10 fev. 2013.

VALONES, M.A.A. et al. Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, n.1, p.1-11, 2009.

VEIGA, R.L. da. **Inspeção de produtos cárneos acabados.** 2011. 39f. Monografia (Conclusão de Curso) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul. Bento Gonçalves, 2011.

VELOSO, A.C.A. et al. Detecção de adulterações em produtos alimentares contendo leite e/ou proteínas lácteas. **Química Nova**, v.25, n.4, p.609-615, 2002.

ZHANG, C.L. et al. A Taq Man real-time PCR system for the identification and quantification of bovine DNA in meats, milks and cheeses. **Food Control**, v.18, n.9, p.1149–1158, 2007.

ANEXO – Preparação de Reagentes e Soluções

- EDTA 0.5M e pH 8.0

Pesar 18,61 gramas de EDTA em 80 ml de água destilada. Agitar vagorosamente em agitador magnético (solúvel somente em pH 8.0). Após ajustar a solução para pH 8.0 com adição de NaOH, autoclavar a 121°C por 15 minutos.

- TRIS HCL 1M e pH 8.0

Pesar 60,55 gramas de Tris base em 400 ml de água destilada. Ajustar o pH para 8.0 por adição de HCl, sempre utilizando agitador magnético com aquecimento. Em seguida, autoclavar a 121°C por 15 minutos.

- Tampão de Extração TE

Pipetar em um franco âmbar estéril 0,1 ml de EDTA 0.5M e pH 8.0 juntamente com 0,5 ml de Tris HCl 1M e pH 8.0 para 49,4 ml de água destilada estéril.

- Tampão de Corrida TBE 5X e 1X

Em um frasco âmbar com capacidade de 500 ml, pipetar 10 ml de EDTA 0.5M e pH 8.0, pesar 27 gramas de Tris HCl 1M e pH 8.0 e 13,75 gramas de Ácido Bórico e completar o volume para 500 ml de água destilada estéril. Para melhor homogeneização, usar agitador magnético com aquecimento.

Para preparar o TBE 1X, misturar 100 ml do TBE 5X em 400 ml de água destilada estéril.

- CTAB 2%

Pesar em um frasco âmbar: 2 g de CTAB juntamente com 8,12 gramas de NaCl 1.4M e 1 grama de PVP. No mesmo frasco, pipetar 4 ml de EDTA 0.5M e pH 8.0 com 10 ml de Tris HCl 1M e pH 8.0. Completar o volume para 100 ml de água destilada estéril. Para melhor homogeneização, usar agitador magnético com aquecimento.