

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO RIO GRANDE DO SUL  
UNIDADE UNIVERSITÁRIA EM ENCANTADO  
BACHARELADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**HANS FRÖDER**

**DETECÇÃO DE ESPÉCIES ANIMAIS UTILIZANDO PCR EM TEMPO REAL  
(qPCR) PARA VERIFICAR FRAUDES EM PRODUTOS CÁRNEOS PROCESSADOS**

**ENCANTADO**

**2022**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**UNIDADE UNIVERSITÁRIA EM ENCANTADO**  
**BACHARELADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**HANS FRÖDER**

**DETECÇÃO DE ESPÉCIES ANIMAIS UTILIZANDO PCR EM TEMPO REAL  
(qPCR) PARA VERIFICAR FRAUDES EM PRODUTOS CÁRNEOS PROCESSADOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Eléia Righi

**ENCANTADO**

**2022**

Catálogo de publicação na fonte (CIP)

F924d	Fröder, Hans
	Detecção de espécies animais utilizando PCR em tempo real (qPCR) para verificar fraudes em produtos cárneos processados / Hans Fröder. – Encantado: Uergs, 2022.
	69 f.
	Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos (Bacharelado), Unidade em Encantado, 2022.
	Orientadora: Prof. <sup>a</sup> Dr. <sup>a</sup> Eléia Righi
	1. Fraude. 2. Salgados. 3. Detecção. 4. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação). I. Righi, Eléia. II. Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos (Bacharelado), Unidade em Encantado, 2022. III. Título.

**HANS FRÖDER**

**DETECÇÃO DE ESPÉCIES ANIMAIS UTILIZANDO PCR EM TEMPO REAL  
(qPCR) PARA VERIFICAR FRAUDES EM PRODUTOS CÁRNEOS PROCESSADOS**

Trabalho de Conclusão apresentado ao Curso de Bacharelado em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Eléia Righi

Aprovado em: 24/11/2022

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Eléia Righi

Universidade Estadual do Rio Grande do Sul – UERGS

---

Prof<sup>ª</sup>. MSc. Magnólia Martins Erhardt

Universidade Estadual do Rio Grande do Sul – UERGS

---

Dra. Júnia Cápua de Lima Novello

ESSEN – Consultoria Alimentícia

Dedico este trabalho de conclusão aos meus pais, Erico e Loni, e à minha irmã Deisi pelo apoio, pela preocupação e pelo amor incondicional. Obrigado por confiar em mim e acreditar naquilo que amo fazer: estudar! Amo vocês!

## **AGRADECIMENTOS**

A DEUS, pela vida e pela saúde que me tem concedido diariamente.

Minha estima especial à professora Dra. Eléia Righi, pelas orientações, pelos ensinamentos, pelos conselhos, por ouvir minhas ansiedades e pela amizade ao longo dos semestres.

Sinceramente, muito obrigado!

Às professoras MSc. Magnólia Martins Erhardt e Dra. Eliane Kolchinski pelos ensinamentos, pelas orientações, pelo convívio e pela amizade.

Ao Laboratório Unianálises pelo apoio na infraestrutura laboratorial.

À secretaria da graduação da UERGS.

E a todos que, de alguma forma, fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

“Motivação é aquilo que te faz começar.

Hábito é aquilo que te faz continuar”

Jim Ryn

## RESUMO

A rotulagem de alimentos é fundamental para evitar a ingestão de uma espécie de carne específica por motivos religiosos e razões culturais, mas, principalmente, para evitar fraudes com o propósito de obter vantagens financeiras. O método real-time qPCR é comumente utilizado para quantificar o DNA em uma determinada amostra através da quantificação relativa, usando Cq comparativo (concentração do DNA alvo específico sobre a concentração do DNA endógeno). Em estudos que usam a qPCR para quantificar espécies contaminantes, a normalização é realizada usando um gene de referência de cópia única, como a miostatina, presente na maioria dos mamíferos e das aves. Esse estudo teve por objetivo avaliar se o sistema primer-sonda espécie-específica detecta individualmente cada espécie animal (bovino, suíno, frango, ovino e equídeo), empregando a sonda TaqMan<sup>®</sup> e o sistema primer espécie-específica com o corante SYBR<sup>®</sup> Green; e padronizar a técnica real-time qPCR para a obtenção de resultados quantitativos relativos em carnes bovinas fraudadas. Os resultados do estudo revelaram que os sistemas primer-sondas são específicos e amplificaram corretamente os respectivos DNAs de cada espécie animal, mesmo quando foram combinados em um único microtubo. O gene de referência (miostatina) para verificar a amplificabilidade do ácido nucleico, usado como controle positivo, também co-amplificou na PCR, indicando a exclusão de resultados falso-negativos. Para a padronização do método, o limite de detecção (LD) resultou em um sinal de fluorescência Cq de 36.80 ciclos em pelo menos 9 de 10 repetições (90%) na concentração de 0,008% em cavalo e Cq de 36.60 ciclos em pelo menos 7 de 10 repetições (70%) na concentração de 0,0005% em frango. A concentração mais baixa (LQ) em que o desvio padrão relativo (RSD) foi  $\leq 25\%$  estava entre 0,125% (RSD 19,4%) e 0,031% (RSD 25,6%) para cavalo e entre 0,125% (RSD 6,13%) e 0,031% (RSD 26,94%) para frango. Observou-se que as informações contidas nos rótulos de sete produtos cárneos processados foram 100% coerentes com o rótulo do fabricante. Ambos os mastermix para sonda e para SYBR<sup>®</sup> Green apresentaram resultados concordantes, visto que o ideal para o corante é reduzir o número de ciclos para evitar resultados falso-positivos ou acúmulo de sinal fluorescente nos ciclos finais da PCR. Mesmo usando curvas padrões de quantificação contendo 50% de misturas de carnes ou 100% de carne pura do alvo, a inclinação da curva, a eficiência de amplificação e a correlação linear estiveram dentro do critério de aceitação recomendado. O ensaio proposto esteve de acordo com os critérios mínimos definidos para a quantificação, sendo um método sensível e uma alternativa na rotina de fiscalização de produtos tanto para alimentação humana quanto animal.

**Palavras-chave:** real-time qPCR, fraude, validação, detecção, produtos cárneos.



## ABSTRACT

Food labeling is essential to avoid eating a specific kind of meat for religious reasons, cultural reasons and, above all, to avoid fraud with the purpose of obtaining financial advantages. The real-time qPCR method is commonly used to quantify DNA in a given sample by relative quantification using comparative C<sub>q</sub> (concentration of specific target DNA over endogenous DNA concentration). In studies that use qPCR to quantify contaminating species, normalization is performed using a single-copy reference gene such as myostatin, present in most mammals and birds. This study aimed to evaluate whether the species-specific primer-probe system individually detects each animal species (cattle, swine, chicken, sheep and equine) using TaqMan<sup>®</sup> probe and the species-specific primer system with SYBR<sup>®</sup> Green dye; and standardize the real-time qPCR technique to obtain relative quantitative results in fraudulent meat beef. The results of this study revealed that the primer-probe systems are specific and correctly amplified the respective DNA of each animal species, even when they were combined in a single microtube. The reference gene (myostatin) to verify the amplifiability of the nucleic acid used as a positive control also co-amplified in the PCR, indicating the exclusion of false-negative results. For standardization of the method, the detection limit (LD) resulted in a fluorescence signal C<sub>q</sub> 36.80 cycles in at least 9 of 10 repetitions (90%), in the concentration of 0.008% in horse and C<sub>q</sub> of 36.60 cycles in at least 7 of 10 repetitions (70%) at a concentration of 0.0005% in chicken. The lowest concentration (LQ) where the relative standard deviation (RSD) was  $\leq 25\%$  was between 0.125% (RSD 19.4%) and 0.031% (RSD 25.6%) for horse and also between 0.125% (RSD 6.13%) and 0.031% (RSD 26.94%) for chicken. It was observed that the information contained on the labels of seven processed meat products was 100% consistent with the manufacturer's label. Both probe and SYBR<sup>®</sup> Green mastermix showed concordant results, since the ideal for the dye is to reduce the number of cycles to avoid false-positive results or fluorescent signal accumulation in the final cycles of PCR. Even using quantification standard curves containing 50% meat mixtures or 100% pure meat from the target, the slope of the curve, the amplification efficiency and the linear correlation were within the recommended acceptance criteria. The test proposed here was in accordance with the minimum criteria defined for quantification, being a sensitive method and an alternative in the routine inspection of products for both human and animal food.

**Keywords:** real-time qPCR, fraud, validation, detection, meat products

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Fraudes em alimentos.....	25
Quadro 2 - Identificação de primers, sondas, genes de referência, sequência direta e reversa das espécie-específicas para cada alvo usados no experimento.....	27
Quadro 3 - Combinações das amostras de carne bovina fraudada com mistura de carnes .....	30
Quadro 4 - Resultados da avaliação qualitativa das amostras de carne termicamente processadas utilizando os cinco sistemas de primers/sondas para cada gene alvo (suíno, bovino, frango, ovino e cavalo) e miostatina, empregando sonda TaqMan® .....	49
Quadro 5 - Resultados da avaliação qualitativa das amostras de carne termicamente processadas utilizando os cinco sistemas de primers/sondas para cada gene alvo (suíno, bovino, frango, ovino e cavalo) empregando o corante SYBR® Green .....	53

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados da análise dos primers/sondas fornecidos pelo programa MFEprimer-3.1 .....	37
Tabela 2 - Determinação do LD e do LQ com diluição serial de DNA a partir de um padrão de carne contendo 2% de cavalo em carne bovina.....	42
Tabela 3 - Determinação do LD e do LQ com diluição serial de DNA a partir de um padrão de carne contendo 2% de frango em carne bovina.....	44
Tabela 4 - Resultados obtidos de conteúdo de cavalo (%) na carne bovina através da curva padrão estabelecida com misturas de carne 50% (p/p).....	57
Tabela 5 - Resultados obtidos de conteúdo de cavalo (%) na carne bovina através da curva padrão estabelecida com carne de cavalo 100% (p/p).....	57
Tabela 6 - Resultados obtidos de conteúdo de frango (%) na carne bovina através da curva padrão estabelecida com misturas de carne 50% (p/p).....	58
Tabela 7 - Resultados obtidos de conteúdo de frango (%) na carne bovina através da curva padrão estabelecida com carne de frango 100% (p/p).....	59

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Gráficos de amplificação dos genes específicos para cada espécie animal e do gene de referência miostatina (MY70), usados para detectar seletivamente a mistura de DNAs das cinco espécies (bovino, frango, suíno, cavalo e ovino) em um único microtubo..... 39
- Figura 2 - Eficiência da curva padrão obtida a partir do DNA de cavalo (a) e do DNA de frango (b). As curvas padrões de ambas as matrizes foram obtidas a partir de três extrações de DNA, realizadas em duplicata.....41
- Figura 3 - Repetibilidade do ensaio qPCR: curvas padrão obtidas a partir de extrações de DNA diluídos serialmente de uma mistura de carne de: a) 50% de cavalo em bovino; e b) 50% de frango em bovino. Três extrações de DNA foram realizadas em duplicata e em dias diferentes. Cada extração de DNA foi analisada em duplicata, partindo da concentração de 100 ng/ $\mu$ L até 0,006 ng/ $\mu$ L. ....47
- Figura 4 - Eliminação de um ponto da curva de quantificação e consequente ajuste do coeficiente de correlação ( $R^2$ ).....49
- Figura 5 - Gráfico de amplificação do gene específico para cavalo e do gene miostatina usados para avaliação qualitativa das amostras de carne termicamente processadas ..... 55
- Figura 6 - Curva padrão estabelecida para o PCR específico (cavalo) e o PCR referência (miostatina), usando como padrões os MRC. A curva foi construída utilizando 50% (p/p) da mistura de carne..... 57
- Figura 7 - Curva padrão estabelecida para o PCR específico (cavalo) e o PCR referência (miostatina), usando como padrões os MRC. A curva foi construída utilizando 100% (p/p) da carne de cavalo ..... 58
- Figura 8 - Curva padrão estabelecida para o PCR específico (frango) e o PCR referência (miostatina), usando como padrões os MRC. A curva foi construída utilizando 50% (p/p) da mistura de carne..... 58

Figura 9 - Curva padrão estabelecida para o PCR específico (cavalo) e o PCR referência (miostatina), usando como padrões os MRC. A curva foi construída utilizando 100% (p/p) da carne de frango ..... 59

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>16</b>
1.1 OBJETIVO GERAL	17
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
1.3 JUSTIFICATIVA	18
<b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	<b>19</b>
2.1 DETECÇÃO DE ESPÉCIE ANIMAL	19
2.2 PCR EM TEMPO REAL QUANTITATIVO (qPCR)	24
2.2.1 FRAUDES EM ALIMENTOS DETECTADAS POR REAL-TIME qPCR	25
<b>3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS</b>	<b>27</b>
3.1 SISTEMAS PRIMERS E SONDAS	27
3.2 DETECÇÃO DE ESPÉCIE ANIMAL	29
3.3 QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DE ESPÉCIE ANIMAL	29
3.3.1 MÉTODO REAL-TIME qPCR USANDO MISTURA DE CARNES	30
3.3.2 CURVAS PADRÕES DE QUANTIFICAÇÃO	30
3.3.3 ESTRATÉGIA DE QUANTIFICAÇÃO	31
3.3.4 VALIDAÇÃO REAL-TIME qPCR DUPLEX	31
3.3.4.1 EFICIÊNCIA DO ENSAIO REAL-TIME qPCR DUPLEX	32
3.3.4.2 LIMITES DE DETECÇÃO (LD) E DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)	32
3.3.4.3 REPETIBILIDADE	32
3.4 EXTRAÇÃO DO DNA	32
3.5 MISTURAS DE REAÇÃO qPCR (MASTERMIX)	33
3.5.1 QUANTINOVA™ PROBE PCR	33
3.5.2 QUANTINOVA™ SYBR® GREEN PCR	34
3.6 CONDIÇÕES TÉRMICAS DA CICLAGEM DA PCR	34
3.7 ANÁLISE DOS RESULTADOS	34
<b>4 ANÁLISE E DESCRIÇÃO DOS RESULTADOS</b>	<b>36</b>
4.1 AVALIAÇÃO <i>IN SILICO</i> DOS PRIMERS E SONDAS	36
4.2 AVALIAÇÃO EXPERIMENTAL DOS SISTEMAS PRIMERS-SONDAS	38
4.2.1 ESPECIFICIDADE E SELETIVIDADE	38
4.2.2 EFICIÊNCIA DE AMPLIFICAÇÃO	41

4.2.3 LIMITES DE DETECÇÃO (LD) E DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)	42
4.2.4 REPETIBILIDADE	47
4.2.5 VALIDAÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO	56
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>62</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>64</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Desde que o comércio de alimentos foi introduzido, as fraudes alimentares existem e a maioria tem o propósito de obter benefícios financeiros através de enganos e danos aos consumidores e/ou de não conformidades ou de violações da lei alimentar feita por autoridades oficiais de controle (VISCIANO; SCHIRONE, 2021). Recentemente no Brasil, muitos escândalos envolveram a cadeia de abastecimento de alimentos, causando aos clientes perdas econômicas ou compra de alimentos de baixa qualidade.

Um tópico que foi incluído nas normas de qualidade e segurança de alimentos é a fraude em alimentos (“*food fraud*”). A cada dia, esse assunto aparece nos veículos de comunicação e é de interesse tanto do consumidor quanto das indústrias produtoras de alimentos. A norma alimentar IFS (padrão internacional para alimentos), versão 7, de outubro de 2020, é reconhecida mundialmente na área de qualidade e segurança de alimentos e define fraude em alimentos como “a substituição intencional, rotulagem enganosa, adulteração ou falsificação de alimentos de matérias-primas ou materiais de embalagem disponibilizados no mercado para fins de ganhos econômicos” (IFS FOOD, 2020, p. 135). Portanto, ela exige uma avaliação documental sobre a vulnerabilidade quanto à fraude em alimentos para determinar os riscos de atividades fraudulentas. Apesar de serem consideradas crime, as fraudes em alimentos sempre envolveram vantagem financeira e podem ou não afetar a saúde do consumidor.

As atividades fraudulentas acontecem mundialmente e um exemplo é o caso de adição de carne de cavalo em hambúrguer na Inglaterra em 2013, onde a rotulagem descrevia o produto como 100% carne bovina (THANAKIATKRAI; KITPIPIT, 2017). No Brasil, entre 2015 e 2017, tem-se o “leite compensado”, no qual a empresa adulterava leite impróprio para consumo com ácido para reduzir a contaminação microbiológica, e a operação “carne fraca”, em que frigoríficos foram acusados de adulterar carne para mercado interno e externo, revelando um esquema de corrupção em órgãos fiscalizadores. Recentemente, no Rio Grande do Sul, foi desarticulado um esquema que misturava carnes de cavalo e bovina com a finalidade de comercialização em hamburguerias da Serra Gaúcha (FOOD SAFETY BRAZIL, 2021).

A Instrução Normativa (IN) n° 75 estabelece os requisitos técnicos para a declaração da rotulagem nutricional nos alimentos embalados (BRASIL, 2020). No entanto, outros tipos de fraudes alimentares que ocorrem são a falsificação do nome da marca; da embalagem; da formulação, substituindo um ingrediente de alto custo por outro de menor valor; de diluição, substituindo ou adulterando com adição de materiais desconhecidos e não declarados produtos alimentícios, visando melhorar atributos de qualidade; e de rotulagem e etiquetagem incorreta,



com inclusão de falsas alegações, como adulteração de lote e de validade, ocultação de ingredientes ou de alergênicos presentes na fórmula da lista de ingredientes da embalagem ou, ainda, o peso líquido informado sendo menor do que o declarado no rótulo, dentre outros (SINCABIMA, 2022).

Embora o consumidor possa atentar aos detalhes do produto, como informações no rótulo, data de validade, sinais de adulteração, condições da embalagem etc., é importante destacar que não é apenas ele que sofre com a fraude em alimentos, mas também a indústria, principalmente se não houver um controle rigoroso na escolha dos fornecedores. Embora as indústrias tenham (ou devessem ter) um programa de qualidade e de segurança de alimentos implantado, a maioria das fraudes em alimentos só pode ser detectada e/ou quantificada através de análises laboratoriais.

Nesse sentido, a análise de DNA de alimentos é uma ferramenta capaz de identificar a composição de produtos, revelando os ingredientes animais que os compõem e auxiliando no rastreio de possíveis fraudes e adulterações. Assim, um diagnóstico rápido e economicamente viável para serviços de inspeção e vigilância sanitária de alimentos se faz necessário.

## 1.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar e padronizar a técnica de PCR em tempo real (qPCR) para a identificação e a quantificação de fraudes na composição cárnea em alimentos processados.

## 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos são:

- Avaliar se o sistema primer-sonda espécie-específica detecta individualmente cada animal e se o sistema primer-sonda referência detecta o DNA de mamíferos e aves empregando o mastermix QuantiNova™ Probe PCR Kit;
- Analisar se a composição do tipo de carne condiz com aquela informada no rótulo do fabricante através do uso do mastermix QuantiNova™ Probe PCR Kit e do mastermix QuantiNova SYBR®Green PCR;
- Padronizar a técnica real-time qPCR para a obtenção de resultados quantitativos com a qualidade mínima exigida para a detecção de espécies animais.

### 1.3 JUSTIFICATIVA

Segundo dados da Associação Brasileira de Frigoríficos (Abrafrigo), o Brasil exportou mais de 1,8 milhões de toneladas de carne bovina processada e *in natura* em 2021 (ABRAFRIGO, 2021). Por ser um dos maiores produtores de carnes no mundo, o Brasil também possui um vasto mercado consumidor interno de carne e produtos cárneos. A garantia da qualidade e da integridade desses produtos deve ser avaliada na medida em que fraudes podem afetar questões culturais, religiosas e, principalmente, relacionadas à saúde.

Os embutidos cárneos industrializados são obtidos de uma emulsão das carnes de animais de açougue, acrescidos ou não de toucinho, adicionados de ingredientes e de envoltório natural ou artificial em diferentes formas, e submetidos ao tratamento térmico adequado de acordo com a Instrução Normativa da Secretaria de Defesa Agropecuária - IN SDA-4 do ano 2000 (MAPA, 2000). Dessa maneira, os produtos processados/industrializados requerem métodos sensíveis de inspeção porque são difíceis de serem fiscalizados quando comparados aos frescos.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 DETECÇÃO DE ESPÉCIE ANIMAL

A consciência do consumidor para os alimentos está crescendo, muito provavelmente por questões ideológicas, por fatores relacionados à saúde ou à religião, ou pelo fato de os consumidores se sensibilizarem devido a constantes incidentes de fraudes alimentares. A identificação das espécies animais é um meio importante para verificar a rotulagem dos alimentos, conforme disposto na IN n° 75 (BRASIL, 2020) e na RDC n° 40 (BRASIL, 2002), ou no Regulamento n° 1169/2011 da União Europeia (EU), que define especificamente o que o rótulo deve conter.

Para o controle, se as regulamentações forem cumpridas, métodos analíticos acessíveis e práticos são necessários. Assim, um dos principais focos dos testes de autenticidade de alimentos é ter métodos de análise e, se necessário, desenvolver novos ou melhorar os existentes. Os resultados qualitativos são suficientes quando as amostras são rastreadas para obter uma ideia com relação à taxa de contaminação e para descobrir casos suspeitos. No entanto, em alimentos processados com vários ingredientes, nem sempre é suficiente detectar um ingrediente específico. Muitas vezes é mais importante saber se o teor de um ingrediente é maior que outro ou se a concentração de um ingrediente excede um certo limite. Para verificar a correta declaração de ingredientes de origem animal ou vegetal, uma estratégia é detectar uma sequência específica do ácido desoxirribonucleico (DNA) do ingrediente correspondente, o que é possível, pois cada espécie tem um genoma único (THANAKIATKRAI; KITPIPIT, 2017).

Um método amplamente estabelecido para isso é a reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real. Ele tem sido usado para diferentes produtos alimentares e, constantemente, novos métodos e/ou variações dessa técnica são publicados para identificação de espécies animais em alimentos e rações (NESVADBOVA *et al.*, 2022), pescados e frutos do mar (MONTEIRO *et al.*, 2021; SILVA; HELLBERG, 2021), leite e produtos lácteos (GIGLIOTI *et al.*, 2022) e frutas (AN *et al.*, 2019).

Soares *et al.* (2013) destacam que os produtos cárneos processados são alvos suscetíveis à rotulagem fraudulenta devido ao lucro que resulta da venda de carnes mais baratas em substituição a carnes de alto valor. Quantidades de carne menores do que as declaradas no rótulo e a substituição da proteína muscular por vegetal também são preocupações comuns em produtos cárneos. Essas práticas têm motivação econômica, pois induzem a concorrência

desleal entre os produtores; religiosa, uma vez que o consumo de determinadas espécies não é permitido em algumas religiões; e ética, refletindo estilos de vida e preocupações com a saúde. A preferência pessoal leva, por exemplo, vegetarianos e veganos a se abster de todos os tipos de carne e as reações alérgicas podem tornar alguns consumidores especialmente vulneráveis a ingredientes não listados e à contaminação. Assim, a questão da segurança e da rastreabilidade alimentar é uma responsabilidade que diz respeito a todos os países, particularmente num mercado alimentar global em constante expansão e com preços crescentes dos alimentos (THANAKIATKRAI; KITPIPIT, 2017).

A demanda por transparência na indústria da carne e pela aplicação de uma rotulagem adequada forneceu subsídios para o desenvolvimento de metodologias analíticas adequadas para a identificação de espécies de carne. Vários métodos de detecção foram desenvolvidos para verificar fontes específicas de carnes, algumas das quais baseadas em proteínas espécie-específicas, como eletroforese, cromatografia, imunoenzimáticos (ELISA) e aqueles baseados em DNA, incluindo multiplex e qPCR (ALIKORD *et al.*, 2018). No entanto, esses métodos são trabalhosos e, às vezes, menos sensíveis para proteínas desnaturadas em produtos durante o aquecimento, a desidratação, o processamento químico e a pressurização. Alguns ensaios baseados em proteínas também não são sensíveis para diferenciar efetivamente as espécies intimamente relacionadas (XU *et al.*, 2018).

A capacidade das moléculas de DNA de suportar o processamento de calor e pressão, quando comparadas às proteínas, e a sua presença em todos os tipos de células levaram à análise de DNA para identificação de espécies em alimentos processados. Nesse sentido, a amplificação do DNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR) é considerada rápida, sensível e altamente específica para identificação de espécies em carnes processadas (SOARES *et al.*, 2013).

Segundo Jonker *et al.* (2008), os métodos baseados na identificação de proteínas, incluindo eletroforese, cromatografia e imunológicos, não eram confiáveis para detectar espécies em produtos termicamente processados devido à degradação das proteínas. Para esses pesquisadores, embora o DNA possa ser fragmentado pelo calor, pela pressão ou por outras tecnologias de processamento, as técnicas moleculares permitem a identificação do DNA de diferentes espécies presentes em uma amostra. Eles observaram que o ensaio quantitativo em tempo real (qPCR) detectou as espécies até o nível de 0,05% em misturas contendo carne bovina, suína, equina, ovina, de frango e de peru. A reação cruzada entre essas espécies não foi constatada, exceto para carne de cavalo pura (250 ng de DNA) no ensaio para carne de peru.

Os autores ressaltam que a técnica qPCR é especialmente adequada para produtos processados porque pequenos fragmentos de DNA ainda podem ser amplificados e identificados.

Portanto, a aplicação da PCR é a forma ideal para identificar alvos espécie-específicos devido à sensibilidade, à confiabilidade e à conveniência. Atualmente na literatura, encontram-se vários métodos de identificação baseados na PCR e variações foram testadas e/ou validadas com base no corante fluorescente SYBR<sup>®</sup> Green (SOARES *et al.*, 2013; XIONG *et al.*, 2019), na sonda TaqMan<sup>®</sup> (XU *et al.*, 2018; SHARLAK *et al.*, 2022), no ensaio duplex (DERZ *et al.*, 2021), multiplex (KÖPPEL *et al.*, 2020) e pentaplex (THANAKIATKRAI *et al.*, 2019), HRM (curvas de fusão de alta resolução) (NJARAMBA *et al.*, 2021; SHI *et al.*, 2020), entre outros.

É difícil detectar a adulteração em uma determinada matriz com precisão, conveniência, rapidez e baixo custo. A complexidade de um sistema multiplex, por exemplo, traz alguns problemas de precisão e estabilidade, como diminuição da especificidade do primer, aumento de incompatibilidade e interferência entre primers e o DNA alvo durante a etapa de amplificação. Além disso, não existe um método que permita detectar todas as espécies, sendo ainda necessário mais estudos nessa área (LI *et al.*, 2021a).

O ensaio qPCR permite detectar o DNA de cada espécie e é realizado através do monitoramento do sinal de fluorescência, o que possibilita a observação direta dos resultados sem etapas adicionais. A PCR multiplex e suas variações para mais de um alvo (duplex, pentaplex etc.) permitem detectar simultaneamente diferentes genes-alvo em uma reação, sendo as sondas TaqMan<sup>®</sup> os métodos mais usados para monitorar a fluorescência. No entanto, a alta temperatura de fusão ( $T_m$ ) das sondas TaqMan<sup>®</sup> restringe seu uso devido ao aumento da competição entre diferentes sondas e primers. Portanto, uma outra técnica que vem sendo utilizada para a genotipagem é a PCR-HRM, que coleta dados durante a etapa de fusão usando incrementos de temperatura menores. Todavia, ela requer o uso de corantes saturantes, de equipamentos qPCR com capacidade de HRM e de algoritmos de *software* especializados (DRUML; CICHNA-MARKL, 2014).

Estudos que utilizam a qPCR muitas vezes podem encarecer o experimento devido ao emprego de sondas quimicamente marcadas. Um estudo conduzido por Soares *et al.* (2013) propôs uma abordagem qPCR baseada no corante SYBR<sup>®</sup> Green para a detecção quantitativa de carne suína em produtos cárneos processados. Para o desenvolvimento do método, misturas de carne contendo quantidades conhecidas de carne suína em carne de aves foram utilizadas para obter uma matriz-padrão com 0,1; 0,5; 1; 5; 10 e 25%. O método revelou alta especificidade pela análise da curva de fusão, sendo validado através da aplicação em misturas

de carnes cegas, o que confirmou ser adequado para a determinação da carne suína. Para os autores, a aplicabilidade do método ainda foi demonstrada em produtos cárneos comerciais, permitindo a verificação da conformidade da rotulagem e da identificação de espécies de carne em alimentos processados.

Li *et al.* (2021c) desenvolveram um método qPCR duplex SYBR<sup>®</sup> Green para detectar adulterações de produtos de carne bovina com base em primers universais específicos de bovinos e vertebrados. Ao analisar as posições do valor  $T_m$  dos picos da curva de fusão dos produtos de PCR duplex, os pesquisadores identificaram simultaneamente bovinos e não bovinos em amostras e quantificaram parcialmente a porcentagem bovina de acordo com as razões da área dos picos. Os primers específicos e universais foram desenhados com base nos genes mitocondriais ND4 e 16S rRNA, respectivamente; seus valores  $T_m$  de amplicons foram  $72,6 \pm 0,5$  °C e 79–81 °C, com outros picos a 74–78 °C e acima de 81 °C se existissem componentes não bovinos. O limite de detecção foi de 1 pg para DNA bovino e 1–30 pg para DNA não bovino com base em diferentes espécies.

Como visto, a molécula de DNA pode ser degradada devido a protocolos de processamento de alimentos, como modificação de acidez e esterilização. A técnica qPCR é bastante versátil, permitindo diferentes abordagens para testar a autenticidade da carne. Uma delas é a PCR direta, ou seja, a amplificação do DNA alvo pela PCR sem extração prévia do material genético, utilizando polimerases e tampões tolerantes a inibidores encontrados em alimentos. Sem a etapa de extração, ela aumenta o rendimento de DNA, especialmente para amostras de traços, e diminui a chance de contaminação, pois são necessárias menos etapas. No entanto, os ensaios de PCR diretos requerem o uso de eletroforese em gel, um processo não automatizado que pode aumentar a chance de contaminação cruzada do produto de PCR ou de troca de amostras, pois os tubos de PCR são abertos após a amplificação. Portanto, a análise da curva de fusão com um corante intercalante usando qPCR pode eliminar a etapa de eletroforese em gel, desde que os produtos de PCR das diferentes espécies animais se fundam em diferentes temperaturas (KITPIPIIT *et al.*, 2014).

Com base nisso, Thanakiatkrai e Kitpipit (2017) desenvolveram e validaram um ensaio qPCR multiplex direto com análise de curva de fusão para a identificação de diferentes tipos de carne. O ensaio detectou seis espécies de carne, ofereceu facilidade de uso e reduziu o tempo de análise e o custo. Os primers espécie-específicos foram desenvolvidos a partir dos genes citocromo b, citocromo oxidase I e 16S rRNA para gerar produtos de PCR com picos de fusão específicos que diferenciam carne de porco, carne bovina, carne de cavalo, carne de pato, carne

de avestruz e frango. Os pesquisadores salientam que a validação do ensaio mostrou robustez, especificidade e sensibilidade de até 0,32 ng de molde de DNA. Além do mais, levou menos de uma hora para a obtenção do resultado e tem baixo custo por amostra. Ainda, pontuaram que 92,5% das amostras de carne crua e de produtos alimentícios foram amplificadas com sucesso.

A sonda TaqMan<sup>®</sup> baseada em ácido nucleico bloqueado (LNA), um análogo de nucleotídeo artificial que é modificado por uma ponte de metileno e que conecta o oxigênio 2' da fração ribose ao carbono 4', reduz a flexibilidade conformacional do ácido nucleico e resulta em maior afinidade de ligação nas sequências complementares. A resistência à atividade 5'-exonuclease aumenta a estabilidade do duplex quando ligado e quando os ácidos nucleicos são incorporados às sondas TaqMan<sup>®</sup>, o que proporciona maior especificidade e sensibilidade. Esse tipo de sonda foi utilizado numa pesquisa conduzida por Xu *et al.* (2018), em que o método multiplex LNA PCR em tempo real (MLNA-RT-PCR) foi desenvolvido para detectar simultaneamente quatro amostras de carne (pato, porco, bovina e frango), sendo os primers e as sondas TaqMan<sup>®</sup>-LNA desenhados com base na sequência do gene mitocondrial de cada espécie. A especificidade desse ensaio foi verificada através da identificação de DNA mitocondrial com alvos espécie-específicos não relacionados (ovelha, cavalo, veado, burro, coelho, ganso, cabra, camarão, salmão e milho). O limite de detecção do MLNA-RT-PCR foi de 0,01% para cada espécie, com 92% de resultados consistentes para as fontes de carne comercial e de produtos derivados de carne.

Tendo em vista a menor eficiência de detecção e o maior custo da PCR simplex, a técnica de PCR multiplex tem atraído cada vez mais a atenção dos pesquisadores. Além disso, considerando a atual situação de adulteração de produtos cárneos, é necessário um método de identificação de alto fluxo, de baixo custo e preciso. Com base nisso, Li *et al.* (2021a) desenvolveram um ensaio qPCR hexaplex usando a análise de curva de fusão para identificar onze espécies de carne simultaneamente. Um total de seis pares de primers específicos foram projetados com base em genes mitocondriais, incluindo CO I, CO II, ND4, 12S rRNA e 16S rRNA. Os amplicons corresponderam exclusivamente a seis picos de fusão distintos a  $71,69 \pm 0,60$  °C (ovelha/cabra),  $74,47 \pm 0,34$  °C (cavalo),  $78,87 \pm 0,33$  °C (gado),  $80,75 \pm 0,15$  °C (porco),  $83,36 \pm 0,08$  °C (burro) e  $85,10$ – $87,16$  °C (aves: frango, pato, ganso, ganso selvagem e codorna), respectivamente. Os resultados da validação mostraram que o método tem boa especificidade de primers e os limites de detecção de 0,01–0,1 ng de DNA de limite de detecção absoluto e de 0,1–1% de mistura de carne de limite de detecção relativo fornecem suporte técnico confiável e aplicável para as indústrias e os órgãos reguladores.

Normalmente, para quantificar adulterações em carne, emprega-se genes mitocondriais espécie-específicos e genes de referência. Existem milhares de cópias de DNA mitocondrial em uma célula e o número de cópias varia de acordo com as células e os tecidos. Isso significa que muitos erros seriam possivelmente introduzidos quando genes mitocondriais fossem usados para quantificar a adulteração de carne (XU *et al.*, 2018). Nesse sentido, Li *et al.* (2021b) propuseram um método quantitativo baseado em genes de referência nuclear de cópia única (ex.: miostatina) e genes específicos para espécies de ovinos para detectar componentes derivados de carne ovina em amostras de carneiro-frango, carneiro-pato e carneiro-porco. Com esse método, as amostras de carneiro artificialmente adulteradas com as três espécies puderam ser quantificadas com precisão, com taxas de recuperação de 89,56%, 107,13% e 95,20%, respectivamente. Além disso, tanto os genes de cópia única específicos para espécies de ovinos quanto os genes de referência de cópia única apresentaram boa linearidade entre os valores Ct e as concentrações de DNA diluído em série, com coeficientes de correlação de 0,9999 e 0,9993, respectivamente.

## 2.2 PCR EM TEMPO REAL QUANTITATIVO (qPCR)

A técnica de qPCR permite que as etapas de amplificação e de detecção ocorram simultaneamente, possibilitando que a visualização dos resultados ocorra sem a necessidade de qualquer processamento após a amplificação, evitando contaminação e garantindo economia de tempo e custos (RODRIGUEZ-LAZARO, 2013).

Na literatura, encontram-se várias revisões e guias sobre essa técnica (BUSTIN *et al.*, 2009; NAVARRO *et al.*, 2015; KRALIK; RICCHI, 2017), que é baseada na detecção da fluorescência gerada por uma molécula repórter (fluoróforo) que aumenta enquanto a reação ocorre. Isso acontece devido ao acúmulo do produto de PCR em cada ciclo de amplificação. A fluorescência detectada na qPCR é gerada pelo emprego de marcadores fluorescentes com modos de ação específicos. Dentre os diversos tipos de princípios fluorogênicos existentes no mercado, cabe destacar o corante SYBR<sup>®</sup> Green e as sondas TaqMan<sup>®</sup> (FRÖDER, 2008).

SYBR<sup>®</sup> Green é um corante fluorescente sensível que se liga à dupla-fita de DNA e, em uma mistura de reação PCR, a fluorescência aumenta quando o corante está ligado ao DNA dupla-fita e é baixa quando não está. A incorporação de SYBR Green I na reação de qPCR permite a detecção de qualquer DNA dupla-fita gerado durante a PCR. Como a quantidade de DNA dupla-fita aumenta com os ciclos, a intensidade da fluorescência também é ampliada.



Esse corante permanece estável durante toda a reação de amplificação e a fluorescência é captada por filtros existentes no equipamento. Por outro lado, as sondas TaqMan<sup>®</sup> são as mais utilizadas em qPCR e hibridizam regiões internas de um produto PCR. Esse sistema se baseia na atividade 5'-exonuclease da DNA polimerase e utiliza um oligonucleotídeo (sonda) com um corante repórter anexado ao terminal 5' e um corante silenciador anexado ao terminal 3'. Enquanto o fluoróforo e o silenciador estão próximos na sonda intacta, a energia emitida pelo primeiro é parcialmente absorvida pelo segundo por transferência de energia fluorescente ressonante (FRET) e a energia não absorvida é observada como fluorescência de fundo (APPLIED BIOSYSTEMS, 2014). Durante a reação de amplificação, a sonda é hidrolisada, os dois corantes são separados e a fluorescência emitida é captada por filtros do equipamento qPCR.

Em um estudo conduzido por Andersen *et al.* (2006), foi testado e comparado o desempenho de 12 ensaios diferentes, representando quatro distintos químicos da reação qPCR para detectar organismos geneticamente modificados (OGM). Os ensaios moleculares incluíram SYBR<sup>®</sup> Green, TaqMan<sup>®</sup>, sonda MGB e molecular beacon, que foram projetados para detecção e quantificação específica do evento GTS 40-3-2 da soja Roundup Ready. Eles verificaram que nenhuma das abordagens baseadas pareceu ser significativamente melhor do que a outra, porém o ensaio com molecular beacon foi menos eficiente e mais sensível a mudanças na configuração experimental.

### 2.2.1 FRAUDES EM ALIMENTOS DETECTADAS POR REAL-TIME qPCR

Ao longo dos anos, várias fraudes alimentares aconteceram tanto em países desenvolvidos quanto naqueles em desenvolvimento. No Quadro 01 encontra-se a técnica utilizada para a detecção, o tipo de alimento fraudado, o objetivo do estudo e os resultados obtidos pelos pesquisadores.

Quadro 1 - Fraudes em alimentos

Autor	Técnica	Alimento	Objetivo
Giglioti <i>et al.</i> (2022)	PCR quantitativo em tempo real (qPCR).	Leite e produtos lácteos.	Detectar e quantificar a adulteração entre amostras de leite de vacas, búfalos, cabras e ovelhas.
<b>Resultado:</b> não foi verificada a presença de DNA de vaca nas amostras de queijo de ovelha e cabra. Já nas amostras de leite de búfala, o DNA de vaca foi detectado e quantificado em 12 amostras.			

Kang; Tanaka (2018)	SYBR Green real-time PCR.	Carne suína em produtos processados de carne bovina.	Comparar cinco métodos qPCR comuns de autenticação para determinar a melhor forma de quantificação.
<b>Resultado:</b> Resultados da diluição do DNA com base em espectrofluorométrico mostraram melhores resultados qPCR do que os baseados em espectrofotometria em termos de correlação, eficiência de amplificação e faixa dinâmica linear. Além disso, os métodos de normalização do gene 18S rRNA mostraram melhor veracidade (-11,79% a -6,73%) do que os métodos usando curvas padrão absolutas e relativas (-28,52% a -18,64%) em matriz-padrão. Ademais, estimaram com sucesso as quantidades de carne suína na faixa de 100%-0,01% em produtos de carne bovina.			
Marchetti <i>et al.</i> (2021)	Real-time PCR.	Leite bovino em iogurte de búfala.	Detectar a presença não declarada de leite bovino em iogurte de búfala.
<b>Resultado:</b> o ensaio PCR em tempo real mostrou a presença não declarada de DNA bovino além do DNA de búfalo em 18 das 72 amostras.			
Köppel <i>et al.</i> (2020)	qPCR multiplex.	Produtos veganos.	Desenvolver um qPCR multiplex para detectar simultaneamente DNA de animais, peixes e plantas em amostras de alimentos.
<b>Resultado:</b> sistema econômico que exibiu alta sensibilidade. Os testes de especificidade confirmaram que todas as espécies (peixe, planta e animal) foram detectadas. O sistema específico da planta serviu como controle de isolamento de DNA e foi usado para gerar resultados válidos. Uma grande seleção de amostras de mercado foi analisada e mostrou os resultados esperados e a robustez dessa ferramenta analítica em análises de rotina.			
Lubis <i>et al.</i> (2017)	qPCR.	Carne suína.	Desenvolver um ensaio qPCR para a detecção rápida e sensível de DNA suíno em amostras de alimentos.
<b>Resultado:</b> O ensaio detectou tão baixo quanto 1 pg/μL de DNA suíno e tão baixo quanto 0,001% de carne de porco na mistura de porco-frango cru.			
Dolch <i>et al.</i> (2019)	Real-time PCR.	Produtos cárneos processados.	Desenvolver ensaios de PCR em tempo real para a detecção e a quantificação dos seis cereais mais utilizados: cevada, aveia, centeio, milho, arroz e trigo em produtos cárneos processados em diferentes temperaturas (75 °C, 117 °C e 121 °C).
<b>Resultado:</b> O limite de quantificação foi tão baixo quanto 5 ppm de proteína vegetal para todas as condições de produção, o que correspondeu a 36-58 mg de farinha por kg de linguiça. Uma influência negativa na detectabilidade do DNA foi observada com o aumento da temperatura de cozimento.			
Kryuchenko <i>et al.</i> (2021)	PCR e ELISA.	Produtos cárneos (salsichas) e farinhas (milho, lentilha e trigo) sem glúten.	Estudar a prevalência e o nível de contaminação por glúten de produtos cárneos e farinhas sem glúten utilizadas para a produção de produtos cárneos.
<b>Resultado:</b> Em quatro (duas de salsicha e duas de farinha) das nove amostras testadas, o glúten foi encontrado em um nível superior a 20 mg/kg por ambos os métodos. Glúten em nível significativamente superior ao aceitável foi encontrado nas amostras de farinha de milho e lentilha, que podem ser ingredientes de produtos cárneos.			

Fonte: Organizado pelos autores (2022).

### 3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

Todos os experimentos foram realizados no Laboratório Unianálises da Universidade do Vale do Taquari (UNIVATES), situado em Lajeado/RS.

#### 3.1 SISTEMAS PRIMERS E SONDAS

O propósito é usar um sistema primer/sonda específico para o alvo desejado e que não tenha reação cruzada com outras espécies animais. As sequências genômicas ideais para os primers/sondas específicos devem ser pesquisadas no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) e, uma vez selecionadas, devem ser testadas quanto à similaridade com sequências de genes conhecidas de outras espécies animais usando a *Basic Local Algorithm Search Tool* (BLAST), uma ferramenta de pesquisa de algoritmo de alinhamento. Nesse trabalho, foram utilizados os primers/sondas já validados para a detecção de espécies animais e descritos na *International Standardization for Organization/Technical Specification* (ISO/TS) 20224 (Quadro 02), partes 1 a 4 e 6.

Quadro 2 - Identificação de primers, sondas, genes de referência, sequência direta e reversa das espécie-específicas para cada alvo usados no experimento.

Nome	Gene de referência/Acesso no GenBank	Sequência	Alvo detectado	Referência
Bovine-62bp-F	beta actina nuclear do cromossomo 25 (NC_037352.1)	5'-GGCCTCGGAGTGTGTATTTCAG-3'	<i>Bison bison</i> ; <i>Bos taurus</i> ; <i>Bos indicus</i> ; <i>Bos mutus</i>	ISO/TS 20224-1
Bovine-62bp-R		5'-GCCCCAGAATGAGGTTCACTT-3'		
Bovine-62bp-P		5'-[FAM]-AGGTGCACAGTACGTTC-[NFQ-MGB]-3'		
Ovine-88bp-F	receptor nuclear de prolactina ovina (PRLR) (AF041979.1)	5'-CCAACATGCCTTTAAACCCTCAA-3'	<i>Ovis aries</i>	ISO/TS 20224-2
Ovine-88bp-R		5'-GGAAGTGTAGCCTTCTGACTCG-3'		
Ovine-88bp-P		5'-[FAM]-TGCTTTTCCTTCCCCGCCAGTCTC-[TAMRA]-3'		
Porcine-97bp-F	beta actina (DQ452569.1)	5'-CGTAGGTGCACAGTAGGTCTGAC-3'		ISO/TS 20224-3

Porcine-97bp-R		5'-GGCCAGACTGGGGACATG-3'	<i>Sus scrofa domesticus</i> ; <i>S. scrofa</i>	
Porcine-97bp-P		5'-[FAM]-CCAGGTCGGGGAGTC-[NFQ-MGB]-3'		
Chicken-77bp-F	TGF- $\beta$ 3 (AY685072.1)	5'-CAGCTGGCCTGCCGGC-3'	<i>Gallus gallus domesticus</i> ; <i>G. gallus</i>	ISO/TS 20224-4
Chicken-77bp-R		5'-GCCCAGTGGAATGTGGTATTCA-3'		
Chicken-77bp-P		5'-[FAM]-TGCCACTCCTCTGCACCCAGTGC-[TAMRA]-3'		
Horse-125bp-F	cromossomo 28 (NC_009171.3)	5'-ACTCATCAAACGCCGCTCTC-3'	<i>Equus caballus</i> (macho) x <i>Equus asinus</i> (fêmea); <i>E. caballus</i> ; <i>Equus caballus</i> (fêmea) x <i>Equus asinus</i> (macho); <i>E. przewalskii</i> ; <i>E. burchellii</i>	ISO/TS 20224-6
Horse-125bp-R		5'-GCTGTGAAGACCCCGTTGG-3'		
Horse-125bp-P		5'-[FAM]-CCAGGGCTCGGTGCTTCCAATCGC-[TAMRA]-3'		
MY70-F	miostatina (AF320998 para bovinos e AY448007 para aves)	5'-TTGTGCARATCCTGAGACTCAT-3'	Mamíferos; Aves	Druml <i>et al.</i> (2016); Laube <i>et al.</i> (2007)
MY70-R		5'-TTCARAGATCGRATTCCAGTATA-3'		
MY70-P		5'-FAM-CCCATGAAAGACGGTACAAG-[NFQ-MGB]-3'		

A especificidade dos sistemas primers/sondas é uma condição importante para qualquer sistema PCR em tempo real (IWOBI *et al.*, 2015). Embora os primers/sondas usados nesse trabalho sejam baseados em uma referência internacional, não foi realizado um teste com várias espécies animais e vegetais. Os sistemas foram testados *in silico* quanto à temperatura de fusão ( $T_m$ ) e à formação de estruturas secundárias e, posteriormente, em laboratório conforme o fluxo de trabalho sugerido por Bustin e Huggett (2017). Para testar a qualidade dos oligonucleotídeos projetados, utilizou-se o programa MFEprimer-3.1 (WANG *et al.*, 2019), ajustando as condições de teste para um produto máximo de 150 pares de base (pb), temperatura de fusão ( $T_m$ ) mínimo de 50 °C, concentrações de cátions monovalentes de 50 mM e de cátions divalentes de 1,5 mM, concentração de dNTPs de 0,2 mM e anelamento da concentração de oligonucleotídeo de 50 mM.

### 3.2 DETECÇÃO DE ESPÉCIE ANIMAL

Para analisar se a composição do tipo de carne condiz com aquela informada no rótulo do fabricante, foram utilizados os sistemas espécie-específicos. Além destes, na Tabela 03 encontra-se as sequências para o gene da miostatina (MY70) usado como referência e como controle positivo no real-time qPCR. A miostatina foi escolhida porque pode ser usada como método de referência para a quantificação relativa de uma variedade de espécies de mamíferos e aves (LAUBE *et al.*, 2007; ISO/TS 20224). Sua eficiência de amplificação, precisão e repetibilidade na quantificação do teor de carne em misturas de carnes e linguiças termicamente processadas foi demonstrada nos trabalhos publicados por Druml *et al.* (2015; 2016).

Para a validação do ensaio de detecção, foram adquiridos no comércio local diferentes produtos cárneos termicamente processados.

### 3.3 QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DE ESPÉCIE ANIMAL

A quantificação relativa é menos trabalhosa do que usando calibradores específicos de matriz. Uma pré-condição para obter resultados precisos são, no entanto, que as espécies de carne contidas nas amostras de alimentos não levem a diferentes valores C<sub>q</sub> no sistema de referência (MY70) (DRUML *et al.*, 2016). Além disso, uma vez que o teor de carne (peso/peso) é calculado a partir do DNA alvo, fatores como o tipo de tecido, o número de células por unidade de massa, o grau de ploidia (número de pares de cromossomos homólogos que cada célula apresenta) e o tamanho do genoma afetam o resultado quantitativo. Os alvos do ensaio DNA genômico de cópia única se baseiam na quantificação relativa usando curvas padrão para o sistema específico (alvo) e de referência (miostatina), adotando misturas de carnes como padrão ou produzindo uma matriz-padrão.

Segundo Iwobi *et al.* (2015), para uma quantificação confiável do conteúdo real de carne, são necessários materiais de referência adequados para cada produto à base de carne sob investigação. A produção de tais padrões adequados de carne pode ser demorada e trabalhosa. Além disso, devido à complexidade na fabricação de diversos produtos cárneos, com variações que acompanham as receitas e o estilo de produção dos fabricantes, produzir materiais de referência adequados para cada produto cárneo comercial pode não ser viável. Assim, foram adquiridos materiais de referência certificados (MRC) da LGC (Reino Unido) para cada espécie

animal, sendo 100% (p/p) de carne de cavalo (LGC7220), bovina (LGC7221), suína (LGC7222), ovelha (LGC7223) e frango (LGC7224) usados para estabelecer a curva de quantificação e/ou como controle positivo.

### 3.3.1 MÉTODO REAL-TIME qPCR USANDO MISTURA DE CARNES

Para a validação do método real-time qPCR duplex quantitativo, foram utilizadas misturas de carnes como padrão no lugar da fabricação de uma matriz-padrão, cujo propósito foi verificar se o método é capaz de quantificar misturas de carnes em níveis muito baixos e produzidos em escala laboratorial. Foram pesadas diferentes alíquotas de carne de cavalo em carne bovina e de carne de frango em carne bovina. A fraude da carne bovina com a de aves pode ocorrer porque a moela tem a mesma pigmentação avermelhada, o que dificulta um discernimento entre as espécies. As misturas binárias de carnes seguiram conforme o Quadro 03, usando o padrão LGC para a carne equídea, bovina moída e de frango moída pesadas no laboratório de físico-química. Propositamente, foram combinadas quantidades mínimas de carne de cavalo e de frango em carne bovina a fim de verificar se o método é suficientemente sensível em detectar e quantificar quando há um nível de incerteza na massa crítica.

Quadro 3 - Combinações das amostras de carne bovina fraudada com mistura de carnes.

Porcentagem de carne bovina fraudada	10%	25%	50%
Mistura bovina + cavalo	0,18 g bovina + 0,02 g cavalo	0,15 g bovina + 0,05 g cavalo	0,1 g bovina + 0,1 g cavalo
Mistura bovina + frango	0,18 g bovina + 0,02 g frango	0,15 g bovina + 0,05 g frango	0,1 g bovina + 0,1 g frango

Fonte: Adaptado de Li *et al.* (2021b).

### 3.3.2 CURVAS PADRÕES DE QUANTIFICAÇÃO

Para a construção das curvas de quantificação, foram testadas duas abordagens, sendo a primeira baseada em misturas de carnes 50% (p/p) (DRUML *et al.*, 2015) e a segunda a partir de carne pura 100% (p/p) (ou DNA genômico puro) (IWOBI *et al.*, 2015) das espécies animais cavalo (LGC7220) em carne bovina (LGC7221) e de frango (LGC7224) em carne bovina,

quantificadas no Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) e o DNA genômico diluído em água grau PCR (Sigma) para produzir diluições seriadas (1:4).

### 3.3.3 ESTRATÉGIA DE QUANTIFICAÇÃO

O método utiliza o princípio da quantificação relativa, sendo a concentração do DNA (ng/ $\mu$ L) das frações de carne equídea ou de frango extrapolados em relação à concentração (ng/ $\mu$ L) calculados para o gene de referência endógeno miostatina, para dar a proporção de carne equídea ou de frango em percentuais, conforme exemplificado abaixo:

$$x\% = 100\% \times \text{Horse-125/MY70}$$

$$y\% = 100\% \times \text{Chicken-77/MY70}$$

onde x% e y% denotam a proporção de carne de cavalo e de frango em porcentagens, respectivamente, e horse-125 e chicken-77 representam a concentração (ng/ $\mu$ L) gerada em número de frações de carne de cavalo e de frango nas amostras, conforme calculado a partir das respectivas curvas padrão, em relação à concentração (ng/ $\mu$ L) do gene universal endógeno miostatina (MY70) (IWOB *et al.*, 2015; DRUML *et al.*, 2015).

### 3.3.4 VALIDAÇÃO REAL-TIME qPCR DUPLEX

O ensaio real-time qPCR duplex foi avaliado em relação à eficiência, à repetibilidade e ao limite de detecção e de quantificação (LD, LQ) em um processo de validação interno. O limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ) do ensaio real-time qPCR foi determinado de acordo com as orientações dispostas pelo *European Network of GMO Laboratories* (ENGL, 2015), que define os seguintes critérios de aceitação: inclinação das curvas padrão (*slope*) numa faixa entre -3,1 e -3,6 (ideal -3,32), correspondendo a uma eficiência de amplificação de 90% a 110%, respectivamente, e um coeficiente de correlação linear ( $R^2$ ) de  $\geq 0,98$ . A curva padrão deverá compreender uma faixa de cinco pontos, realizados em triplicata, e o LQ deverá cobrir toda a faixa dinâmica. Para o LQ, o desvio padrão relativo (RSD) deverá ser  $\leq 25\%$  na menor concentração de uma série de 10 réplicas de PCR e, para o LD, todas as réplicas deverão ser positivas (detectadas) na menor concentração da série de 10 réplicas de PCR testadas.

### 3.3.4.1 EFICIÊNCIA DO ENSAIO REAL-TIME qPCR DUPLEX

A eficiência de amplificação do ensaio real-time qPCR duplex foi determinada analisando 10 extrações de DNA de cavalo e de frango. A concentração de DNA variou de 100 ng/ $\mu$ L e foi diluído serialmente (1:4) em água grau PCR até a concentração de 0,006 ng/ $\mu$ L. Assim, a eficiência de amplificação foi calculada a partir da inclinação da curva padrão, usando a fórmula: Eficiência [%] =  $[10^{(-1/(\text{inclinação}))} - 1] \times 100$  (ENGL, 2015).

### 3.3.4.2 LIMITES DE DETECÇÃO (LD) E DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)

O LD e o LQ do ensaio real-time qPCR foram determinados analisando extrações de DNA diluídos em série a partir de uma mistura de carne e pesados diretamente no microtubo Eppendorf de 2 mL estéril contendo 2% (p/p) da carne de cavalo em bovino. A concentração de carne de cavalo variou de 2% (p/p) a 0,008% (p/p), sendo o DNA diluído de 139,26 a 0,64 ng/ $\mu$ L por reação de PCR. O mesmo procedimento foi realizado para a carne de frango em carne bovina, cuja concentração de carne de frango foi a mesma (2% (p/p) a 0,008% (p/p)) e o DNA diluído de 140,04 a 0,2 ng/ $\mu$ L. O LD é a concentração mais baixa que resulta em um sinal de fluorescência e o LQ é a menor concentração em que o desvio padrão relativo for  $\leq 25\%$  (ENGL, 2015).

### 3.3.4.3 REPETIBILIDADE

A repetibilidade do ensaio qPCR foi avaliada analisando as extrações de DNA diluídas serialmente de uma mistura, consistindo em 50% de carne de cavalo em 50% de bovino e de 50% de carne de frango em 50% de bovino (DRUML *et al.*, 2015). Alíquotas de DNA foram obtidas por duas extrações independentes, realizadas pela mesma pessoa em três dias diferentes, variando pipetadoras e balança.

## 3.4 EXTRAÇÃO DO DNA

Para a extração total do ácido nucleico, foi utilizado o protocolo do kit DNeasy<sup>®</sup> mericon<sup>®</sup> Food (Qiagen, 2020). Foram pesadas alíquotas de 0,2 g dos padrões de carne da LGC, mantidos a -20 °C, e das amostras adquiridas comercialmente, mantidas entre 2 e 8 °C, em



microtubos Eppendorf de 2 mL estéril. Para as combinações de carnes (Tabela 02), foi utilizada a balança analítica (Mettler Toledo, Brasil). Aliquota de 1 mL do tampão de lise e 2,5 µL da solução de proteinase K foram adicionados ao microtubo. A suspensão foi homogeneizada até a completa distribuição e incubada em um termomixer (Thermo Fischer Scientific) por 30 min a 60 °C com agitação constante (1000 rpm). Foi realizada uma adaptação do método para um tempo de incubação de 30 min adicionais porque se percebeu que a amostra teve uma melhor distribuição (digestão enzimática) nessas condições.

Para aumentar a precipitação do inibidor, a amostra foi resfriada até atingir a temperatura ambiente e centrifugada (Thermo Fischer Scientific) por 5 min a 2500 g, e 500 µL de clorofórmio foram transferidos para um novo microtubo Eppendorf de 2 mL estéril. Cuidadosamente, o volume máximo de sobrenadante (parte clara) da amostra foi transferido para o microtubo contendo o clorofórmio, misturado com o auxílio de um vortex (Phoenix Luferco, São Paulo) por 15 s e centrifugado por 15 min a 14.000 g. Na sequência, foram pipetados 350 µL de tampão PB em um novo microtubo Eppendorf de 2 mL estéril e adicionados outros 350 µL na parte superior da fase aquosa. Posteriormente, os 700 µL da solução homogênea foram pipetados na coluna QIAquick spin colocada no tubo coletor de 2 mL. A seguir, centrifugou-se a 17.900 g por 1 min e descartou-se o eluído. Foram adicionados 500 µL de tampão AW2 à coluna de centrifugação QIAquick spin, centrifugados a 17.900 g por 1 min e o eluído descartado. Reutilizou-se o tubo coletor e centrifugou-se novamente a 17.900 x g por 1 min para secar a membrana. Por fim, transferiu-se a coluna de centrifugação QIAquick spin para um novo microtubo de 1,5 mL Eppendorf estéril e pipetou-se 150 µL de tampão de eluição EB diretamente sob a membrana QIAquick spin. Incubou-se por 1 min em temperatura ambiente e centrifugou-se a 17.900 g por 1 min para eluir.

A qualidade do DNA extraído foi avaliada por espectrofotômetro UV (Nanodrop) (Thermo Fisher Scientific) e mantido sob refrigeração (2-8 °C).

### 3.5 MISTURAS DE REAÇÃO qPCR (MASTERMIX)

#### 3.5.1 QUANTINOVA™ PROBE PCR

O ensaio real-time qPCR foi realizado em duplex com sistemas primers/sondas específicos para cada espécie animal, conforme Quadro 02. A mistura de reação compreendeu 5 µL do mastermix 2X Probe PCR; 0,5 µL do corante de referência ROX (diluído 1:20); 0,4 µL de cada par de primers numa concentração final de 0,4 µM; e 0,2 µL de cada sonda na

concentração final de 0,2  $\mu\text{M}$  e 0,5  $\mu\text{L}$  de água. Para o ensaio real-time qPCR, foram utilizados 8  $\mu\text{L}$  da mistura de reação e 2  $\mu\text{L}$  do DNA extraído em cada microtubo. Esse protocolo seguiu o descrito pelo fabricante (QIAGEN, 2013), mas foram feitas alterações no volume por reação.

### 3.5.2 QUANTINOVA™ SYBR® GREEN PCR

O ensaio real-time qPCR foi realizado com sistemas primers específicos para cada espécie animal, conforme Quadro 02. A mistura de reação compreendeu 6  $\mu\text{L}$  do mastermix 2X SYBR Green® PCR (contendo ROX); 0,7  $\mu\text{L}$  de cada par de primers numa concentração final de 0,7  $\mu\text{M}$ ; e 0,6  $\mu\text{L}$  de água. Para o ensaio real-time qPCR, foram utilizados 8  $\mu\text{L}$  da mistura de reação e 2  $\mu\text{L}$  do DNA extraído em cada microtubo. Esse protocolo seguiu o descrito pelo fabricante (QIAGEN, 2013), mas foram feitas alterações no volume por reação.

### 3.6 CONDIÇÕES TÉRMICAS DA CICLAGEM DA PCR

Por se tratar de um protocolo de início rápido, o QuantiNova™ Probe PCR Kit (Qiagen) estabelece uma etapa inicial de ativação a 95 °C por 2 minutos, 40 ciclos de 95 °C por 5 segundos e combinação das etapas de anelamento/extensão a 60 °C por 30 segundos para sistemas duplex (primer/sonda mix - referência miostatina e primer/sonda mix alvo específico). Para o kit contendo o corante SYBR® Green, apenas o tempo da etapa de anelamento/extensão modificou para 10 segundos e o restante continuou com a mesma ciclagem térmica.

Os experimentos foram realizados com o QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) e as condições qPCR seguiram o recomendado pelo fabricante do kit (QIAGEN, 2013).

### 3.7 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os resultados obtidos pelo QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System foram avaliados pelo programa Design and Analysis Software 2.6.0 (ambos ThermoFisher Scientific) tanto para a detecção das matrizes comerciais quanto para a quantificação das carnes fraudadas artificialmente. Foi avaliado o valor  $C_q$  (*threshold cycle* - número de ciclos de PCR necessários para que o sinal da fluorescência cruze a linha de detecção) das amostras de carne espécie-específicas. O limiar de detecção (*threshold line*) foi ajustado manualmente observando a

intensidade do sinal fluorescente. O *software* fornece automaticamente o gráfico da curva padrão e calcula a inclinação (*slope*), o coeficiente de correlação linear ( $R^2$ ), a interseção y (y-inter) e a porcentagem da eficiência de amplificação (Eff%).

## 4 ANÁLISE E DESCRIÇÃO DOS RESULTADOS

É fundamental demonstrar que o ensaio PCR, nas condições em que é validado/otimizado, tenha as características mínimas necessárias para a obtenção de resultados com a qualidade exigida. Para isso, empregou-se uma sugestão proposta por Bustin e Huggett (2017), os quais propuseram um fluxo de trabalho envolvendo duas etapas, sendo a *in silico* para avaliar os oligonucleotídeos projetados e a etapa experimental em laboratório. Alguns parâmetros de validação, como especificidade, seletividade, repetibilidade, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ), foram baseados em estudos conduzidos por Druml *et al.* (2015) e Iwobi *et al.* (2015) e previstos na ENGL (2015).

### 4.1 AVALIAÇÃO *IN SILICO* DOS PRIMERS E SONDAS

As sequências dos primers e sondas para as cinco espécies animais mais comuns estão descritos nos métodos oficiais da *International Organization for Standardization* (ISO 20224) e o gene de referência (miostatina) é proveniente de publicações de pesquisadores que validaram o ensaio para esse gene, encontrado na maioria das espécies de mamíferos e aves (LAUBE *et al.*, 2007; DRUML *et al.*, 2015; DRUML *et al.*, 2016). Para avaliar *in silico* a presença de formações inespecíficas dos oligonucleotídeos (Tabela 03), foi utilizado o programa MFEprimer-3.1 (WANG *et al.*, 2019). Mesmo que os primers/sondas sejam oriundos de publicações internacionalmente aceitas, uma avaliação prévia é essencial para garantir que os ensaios baseados em DNA sejam eficientes e precisos (IWOBI *et al.*, 2015), uma vez que uma sequência de ácido nucleico de simples fita é instável e pode formar estruturas intramoleculares (*hairpins*) e intermoleculares (*self dimer* e *cross dimer*).

Alguns aspectos no desenho de primers devem ser considerados, como o comprimento dos iniciadores, geralmente entre 18 e 30 nucleotídeos, e a presença de grampos (primer-dimer) na extremidade 3' que afetam a reação PCR, ou seja, estruturas que comprometem o anelamento do primer ao DNA alvo e, conseqüentemente, prejudicam a amplificação, reduzindo a disponibilidade de primers para a reação. Além disso, a  $T_m$  ideal dos primers deve estar entre 52 e 58 °C (BORAH, 2011) ou entre 60 e 65 °C (BUSTIN; HUGGETT, 2017), de modo que o valor negativo alto de energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ), necessária para quebrar a estrutura secundária, indica grampos estáveis e indesejáveis. O uso de um *software* adequado é a maneira ideal de automatizar essas etapas e minimizar erros.

Os dados obtidos através do programa estão na Tabela 01 e mostram que os aspectos do comprimento do primer/sonda, do conteúdo GC, da  $T_m$  e da energia livre de Gibbs estão adequados e não apresentaram estruturas secundárias que comprometem a amplificação do material genético de interesse.

Tabela 1 - Resultados da análise dos primers/sondas fornecidos pelo programa MFEprimer-3.1.

Oligo ID	Sequência (5' → 3')	Tamanho (pb)	GC (%)	$T_m$ (°C)	$\Delta G$ (kcal/mol)
Bovine-62bp-F	GGCCTCGGAGT GTGTATTCAG	21	57.14	61.06	-23.08
Bovine-62bp-R	GCCCCAGAATG AGGTTCACTT	21	52.38	60.87	-22.63
Bovine-62bp-P	AGGTGCACAGT ACGTTC	17	52.94	54.45	-18.25
Ovine-88bp-F	CCAACATGCCTT TAAACCCTCAA	23	43.48	60.28	-23.37
Ovine-88bp-R	GGAAGTGTAGC CTTCTGACTCG	22	54.55	61.01	-23.61
Ovine-88bp-P	TGCCTTTCCTTC CCCGCCAGTCTC	24	62.50	69.25	-28.92
Porcine-97bp-F	CGTAGGTGCAC AGTAGGTCTGA C	23	56.52	63.10	-25.39
Porcine-97bp-R	GGCCAGACTGG GGACATG	18	66.67	60.30	-20.97
Porcine-97bp-P	CCAGGTTCGGGG AGTC	15	73.33	54.90	-17.54
Chicken-77bp-F	CAGCTGGCCTGC CGGC	16	81.25	64.39	-21.80
Chicken-77bp-R	GCCCAGTGGAA TGTGGTATTCA	22	50.00	61.23	-23.40
Chicken-77bp-P	TGCCACTCCTCT GCACCCAGTGC	23	65.22	69.72	-28.66
Horse-125bp-F	ACTCATCAAAC GCCGCTCTC	20	55.00	61.31	-22.76
Horse-125bp-R	GCTGTGAAGAC CCGTTGG	19	63.16	61.54	-22.22
Horse-125bp-P	CCAGGGCTCGG TGCTTCCAATCG C	24	66.67	70.68	-30.29
MY70-F	TTGTGCARATCC TGAGACTCAT	22	45.45	59.77	-22.62
MY70-R	TTCARAGATCGR ATTCCAGTATA	23	39.13	56.69	-21.43

MY70-P	CCCATGAAAGA CGGTACAAG	20	50.00	56.70	-20.43
--------	--------------------------	----	-------	-------	--------

---

As sondas TaqMan<sup>®</sup> conjugadas [NFQ-MGB] (quenchers não fluorescentes-ligante de sulco menor) apresentam duplex estáveis e incorporam um NFQ para absorver (silenciar) o sinal do marcador de corante fluorescente na extremidade 3' da sonda. Nesse estudo, usou-se sondas NFQ-MGB para os sistemas bovino, suíno e miostatina (Quadro 02). Embora as propriedades do NFQ, combinadas com o comprimento curto da sonda MGB, resultem em um sinal de fundo mais baixo do que com sondas NFQ (não MGB), essas sondas são, portanto, mais sensíveis à incompatibilidades de base única e podem ser mais curtas do que aquelas marcadas com quenchers alternativos, como é o caso da sonda TAMRA (ISO 20224; QIAGEN, 2013).

Assim, tanto as sondas conjugadas quanto as duplamente marcadas apresentaram intensidade de fluorescência adequada após a hibridização com cada alvo (Figura 01). Segundo Lukhtanov *et al.* (2007), uma sonda que tem um fundo de fluorescência instável devido à formação de estrutura secundária pode gerar um perfil de fusão complexo e levar a conclusões errôneas. Se tivesse tido a formação de estruturas secundárias em uma das sondas utilizadas, a taxa de hibridização diminuiria, resultando em hibridização insuficiente e, conseqüentemente, um nível baixo de fluorescência seria observado. Isso é crucial para ensaios real-time qPCR de ciclagem rápida, como é o caso do presente estudo.

## 4.2 AVALIAÇÃO EXPERIMENTAL DOS SISTEMAS PRIMERS-SONDAS

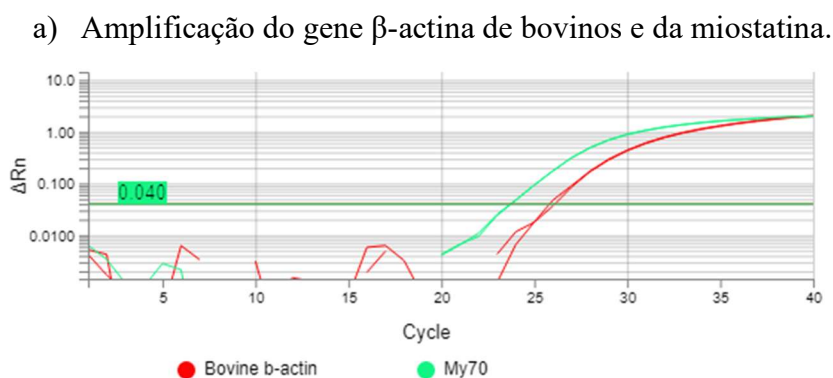
### 4.2.1 ESPECIFICIDADE E SELETIVIDADE

A especificidade e a seletividade estão relacionadas ao método qualitativo, ou seja, à detecção do alvo. Um método que produz uma resposta para apenas um alvo é chamado específico e um que produz respostas para vários alvos, mas que pode distinguir a resposta de um alvo em relação aos outros, é chamado seletivo (INMETRO, 2016). Para verificar se os sistemas primers/sondas geram respostas específicas e seletivas, o DNA espécie-específico foi isolado a partir de materiais de referência individuais, contendo carnes puras (100%) de cavalo, bovina, suíno, ovino e de frango. Após a extração, os DNAs puros foram diluídos até a concentração de 10 ng/μL e alíquotas de 5 μL de cada espécie animal foram misturadas em um único tubo Eppendorf de 1,5 mL estéril. A especificidade dos sistemas primers/sondas não foi

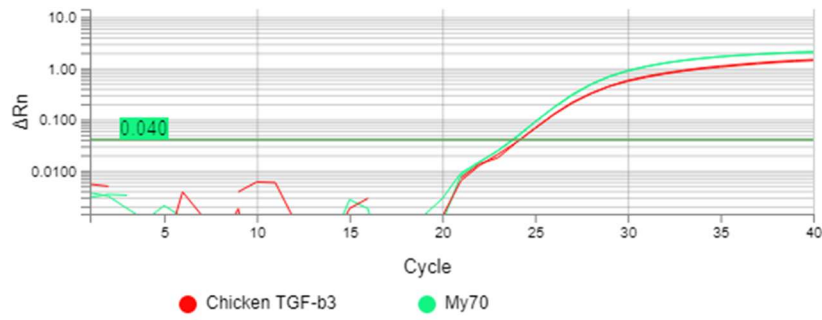
testada contra outras espécies na presente pesquisa porque a ISO 20224 já procedeu com esse estudo na espécie humana, em diferentes espécies animais e de plantas. A reação cruzada com espécies animais e que são detectadas por cada sistema primer/sonda específico estão descritas na Tabela 03. Além disso, os sistemas específicos e de referência também não foram testados em ingredientes alimentares (espécies vegetais) em embutidos termicamente processados, defumados ou crus. Segundo Laube *et al.* (2007), não foi observado um aumento na fluorescência em especiarias (cebola, alho, páprica e pimenta), em trigo ou em soja pelo sistema de referência (MY70).

Nesse trabalho, os resultados revelaram que os sistemas primers/sondas são específicos para cada espécie animal e, na mistura dos DNAs, cada alvo foi amplificado, indicando que o ensaio é seletivo para cada gene alvo, conforme representado na Figura 1 (a-e). Além disso, em todos os ensaios duplex houve a co-amplificação do gene de referência miostatina (MY70), utilizado também como controle positivo da reação PCR.

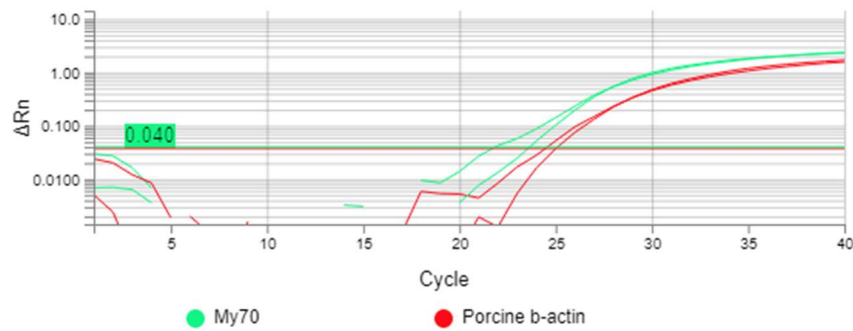
Figura 1 - Gráficos de amplificação dos genes específicos para cada espécie animal e do gene de referência miostatina (MY70), usados para detectar seletivamente a mistura de DNAs das cinco espécies (bovino, frango, suíno, cavalo e ovino) em um único microtubo.



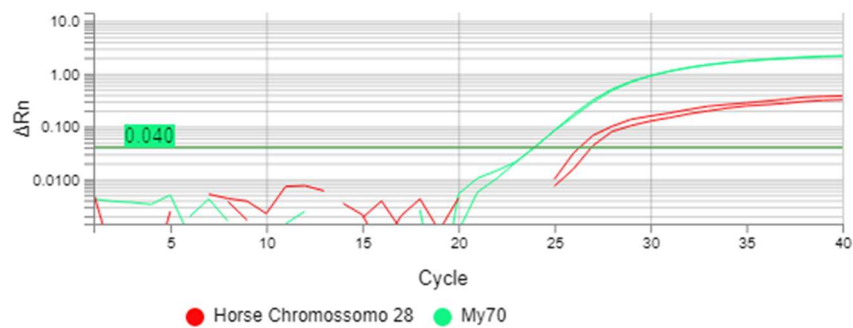
b) Amplificação do gene fator de crescimento transformador beta-3 de aves (frango) e da miostatina.



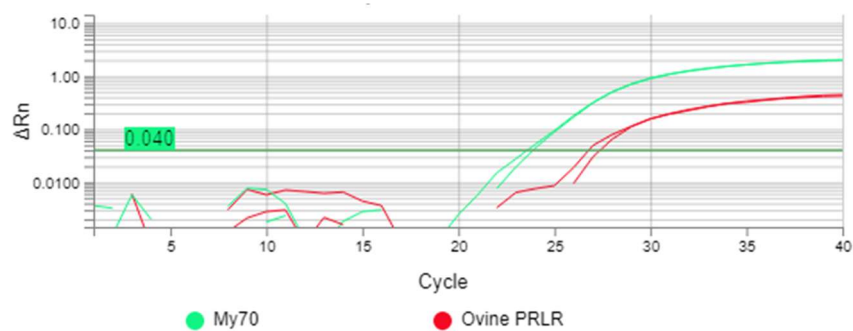
c) Amplificação do gene  $\beta$ -actina de suínos e da miostatina.



d) Amplificação do gene cromossomo 28 do cavalo e da miostatina.



e) Amplificação do gene receptor nuclear de prolactina de ovinos e da miostatina.



Fonte: Autor (2022).

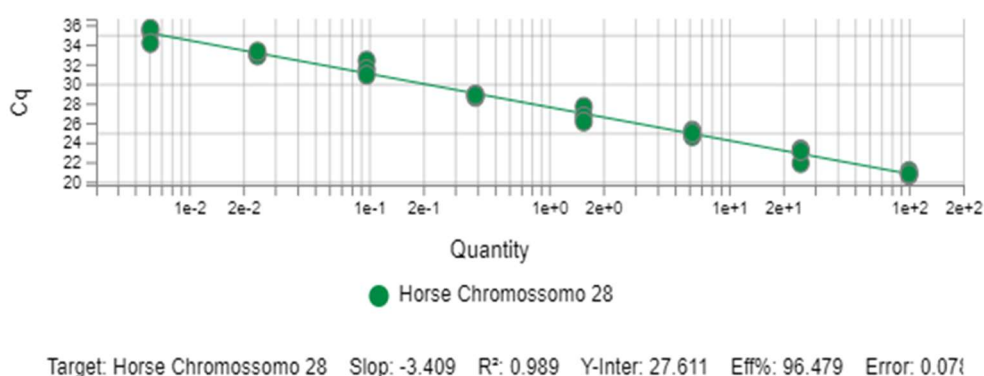


#### 4.2.2 EFICIÊNCIA DE AMPLIFICAÇÃO

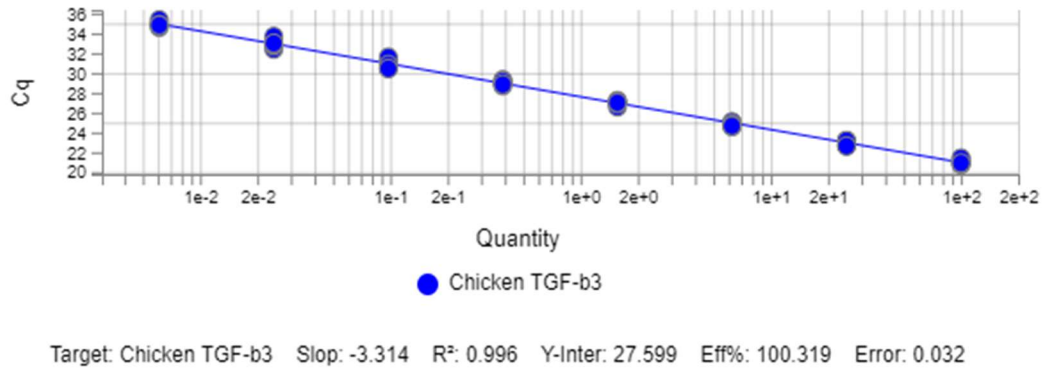
A eficiência de amplificação do ensaio qPCR foi determinada analisando o DNA extraído de 50% de carne de cavalo em carne bovina e de 50% de frango em carne bovina. Partindo de uma concentração de DNA de 100 ng/μL, o DNA foi diluído serialmente (1:4) em água até a concentração de 0,006 ng/μL. A curva de quantificação compreendeu uma faixa de oito pontos, pipetados em triplicata. O gráfico da curva padrão foi realizado através do valor Cq contra o logaritmo da concentração de DNA representado na Figura 2. Um coeficiente de correlação linear ( $R^2 = 0,989$ ) foi encontrado nessa faixa de variação com oito pontos, com inclinação (*slope*) de -3.409, correspondendo a uma eficiência de amplificação de 96,48% para o alvo cavalo (Figura 2a). Para frango, um coeficiente de correlação linear ( $R^2 = 0,995$ ) foi encontrado na faixa de variação ajustada para oito pontos, com inclinação de -3.314, correspondendo a uma eficiência de 100,32% para frango (Figura 2b).

Figura 2 - Eficiência da curva padrão obtida a partir do DNA de cavalo (a) e do DNA de frango (b). As curvas padrões de ambas as matrizes foram obtidas a partir de três extrações de DNA, realizadas em duplicata.

a)



b)



Fonte: Autor (2022).

#### 4.2.3 LIMITES DE DETECÇÃO (LD) E DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)

O LD e o LQ do ensaio de qPCR foram determinados analisando extrações de DNA diluídos em série a partir de uma mistura de carne e pesados diretamente no microtubo Eppendorf de 2 mL estéril contendo 2% (p/p) da carne de cavalo em bovino e da carne de frango em bovino (misturas binárias). A concentração do alvo variou de 2% (p/p) a 0,008% (p/p). Os valores Cq de cada alvo estão resumidos nas Tabelas 02 e 03.

Tabela 2 - Determinação do LD e do LQ com diluição serial de DNA a partir de um padrão de carne contendo 2% de cavalo em carne bovina.

Conteúdo cavalo (%)	Cq	Média Cq	Média do [DNA] de cavalo (ng/μL)	Desvio padrão (ng/μL)	Desvio padrão relativo (RSD) (%)
	26.95				
	26.34				
	27.54				
	27.73				
2	28.08	27.44	139.26	1.96	1.41
	28.08				
	28.00				
	27.26				
	27.57				
	26.85				
1	27.71	28.48	77.1	5.17	6.71

	27.94				
	28.20				
	27.89				
	28.80				
	29.35				
	28.97				
	28.60				
	28.49				
	28.81				
	28.81				
	29.20				
	29.50				
	29.76				
	30.68				
0.5	29.87	29.81	39.94	3.95	9.88
	30.60				
	30.49				
	29.82				
	29.33				
	30.30				
	30.72				
	31.72				
	32.47				
	32.35				
0.125	32.03	31.78	9.54	1.85	19.42
	32.34				
	31.80				
	32.34				
	31.68				
	33.04				
	32.88				
	33.99				
0.031	34.31	34.14	2.52	0.65	25.63
	34.63				
	35.36				

	34.67				
	34.37				
	34.19				
	33.94				
	38.30				
	35.94				
	35.36				
	ND				
0.008	38.57	36.78	0.64	0.24	37.63
	37.03				
	37.32				
	36.84				
	36.02				
	35.64				

Legenda: ND (não detectado).

Tabela 3 - Determinação do LD e do LQ com diluição serial de DNA a partir de um padrão de carne contendo 2% de frango em carne bovina.

Conteúdo frango (%)	Cq	Média Cq	Média do [DNA] de frango (ng/uL)	Desvio padrão (ng/uL)	Desvio padrão relativo (RSD) (%)
	23.78				
	24.10				
	24.54				
	24.49				
2	24.30	24.29	140.04	3.16	2.25
	24.32				
	24.43				
	24.33				
	24.30				
	24.34				
	25.51				
1	25.54	25.57	72.66	4.95	6.81
	25.40				
	25.69				

	25.58				
	25.53				
	25.56				
	25.64				
	25.62				
	25.61				
	26.49				
	26.54				
	26.63				
	26.84				
0.5	26.62	26.61	30.94	1.99	6.42
	26.61				
	26.51				
	26.68				
	26.53				
	26.67				
	28.46				
	28.60				
	28.58				
	28.65				
0.125	28.60	28.58	7.26	0.44	6.05
	28.75				
	28.60				
	28.17				
	28.87				
	28.52				
	31.09				
	30.47				
	30.73				
	30.83				
0.031	30.81	30.84	2.76	0.74	26.94
	30.95				
	30.94				
	31.02				
	30.82				

	30.71				
	32.88				
	33.15				
	33.18				
	32.93				
0.008	33.56	33.04	0.2	0.16	79.06
	32.56				
	32.26				
	33.12				
	33.49				
	33.25				
	37.53				
	34.38				
	34.12				
	34.46				
0.002	35.44	35.05	-0.14	0.51	-366.31
	34.84				
	35.23				
	34.10				
	34.45				
	35.94				
	35.37				
	ND				
	34.91				
	36.38				
0.0005	ND	36.60	-0.34	0.18	-53.43
	37.87				
	35.90				
	ND				
	37.24				
	38.56				

---

Legenda: ND (não detectado).

O LD resultou em um sinal de fluorescência dentro de Cq de 36.80 ciclos em pelo menos 9 de 10 repetições (90%) na concentração de 0,008% em cavalo (Tabela 03) e Cq de 36.60

ciclos em pelo menos 7 de 10 repetições (70%) na concentração de 0,0005% em frango (Tabela 04). Foram necessárias mais duas diluições (1:4) para estabelecer o LD da mistura da carne de frango fraudada em carne bovina. Assim, para os conteúdos de frango 0,002 e 0,0005%, as concentrações médias de DNA foram negativas (Tabela 04). Ambas foram realizadas em outra corrida real-time qPCR e não na mesma que as demais concentrações. Nesse trabalho, os dois experimentos conduzidos também apresentaram um limite Cq de 37 ciclos (valores arredondados). Segundo Druml *et al.* (2015), o limite de 37 ciclos é definido na rotina analítica a fim de diminuir a probabilidade de obtenção de sinais falsos-positivos devido à reação cruzada. Outra perspectiva proposta pela EURL (2015) estabelece um LD95%, que é definido como o LD no qual o ensaio detecta a presença do analito em pelo menos 95% do tempo (garantindo  $\leq 5\%$  de resultados falsos-negativos).

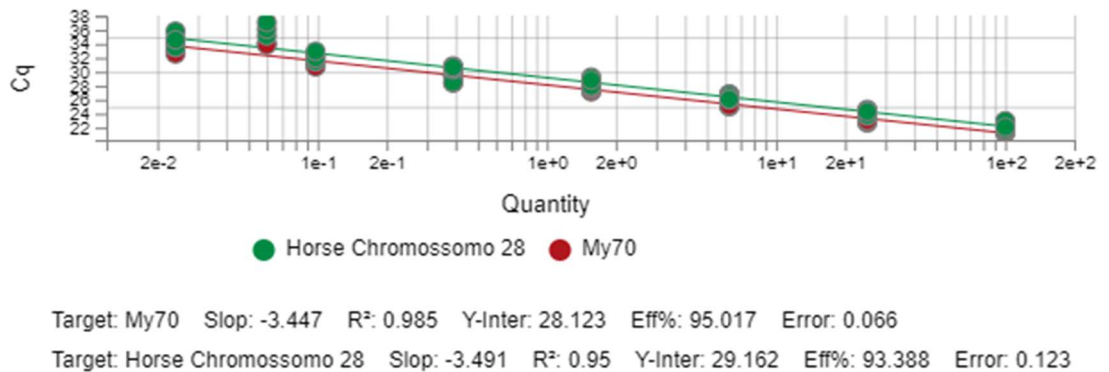
O LQ, a concentração mais baixa em que o desvio padrão relativo (RSD) foi  $\leq 25\%$ , estava entre 0,125% (RSD 19,4%) e 0,031% (RSD 25,6%) para cavalo (Tabela 1) e entre 0,125% (RSD 6,13%) e 0,031% (RSD 26,94%) para frango (Tabela 2). O RSD  $\leq 25\%$  entre as concentrações 0,5% e 0,125% também foi encontrado por Druml *et al.* (2015) empregando matriz-padrão contendo 2% de carne de veado em suíno.

#### 4.2.4 REPETIBILIDADE

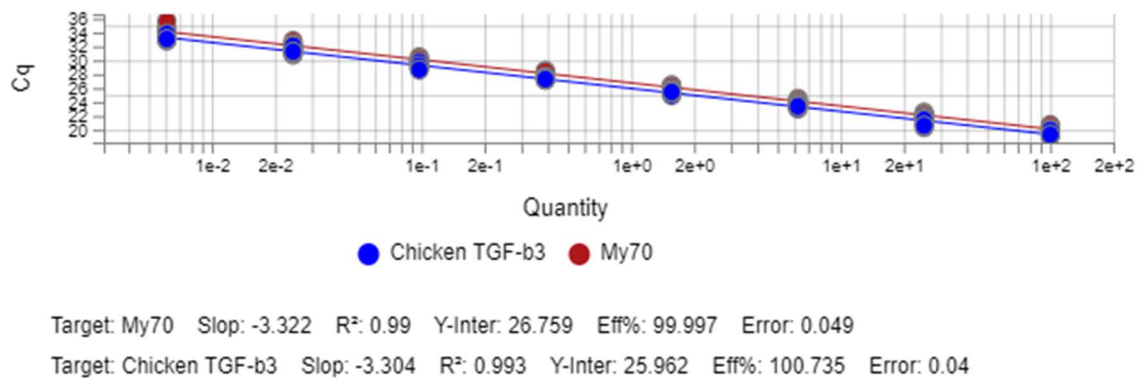
A repetibilidade do ensaio qPCR foi avaliada analisando as extrações de DNA diluídas serialmente de uma mistura de 50% de carne de cavalo em 50% de bovino e outra de 50% de carne de frango em 50% de bovino. Alíquotas de DNA foram obtidas por duas extrações independentes, realizadas pela mesma pessoa em três dias diferentes, variando pipetadoras e balança. Os resultados apresentados na Figura 03a-b indicam alta repetibilidade do método, tanto para o gene específico quanto para o de referência.

Figura 3 - Repetibilidade do ensaio qPCR: curvas padrão obtidas a partir de extrações de DNA diluídos serialmente de uma mistura de carne de: a) 50% de cavalo em bovino; e b) 50% de frango em bovino. Três extrações de DNA foram realizadas em duplicata e em dias diferentes. Cada extração de DNA foi analisada em duplicata, partindo da concentração de 100 ng/ $\mu$ L até 0,006 ng/ $\mu$ L.

a) Gráfico da curva padrão obtida da mistura de carne de cavalo em bovina.



b) Gráfico da curva padrão obtida da mistura de carne de frango em bovina.



Fonte: Autor (2022).

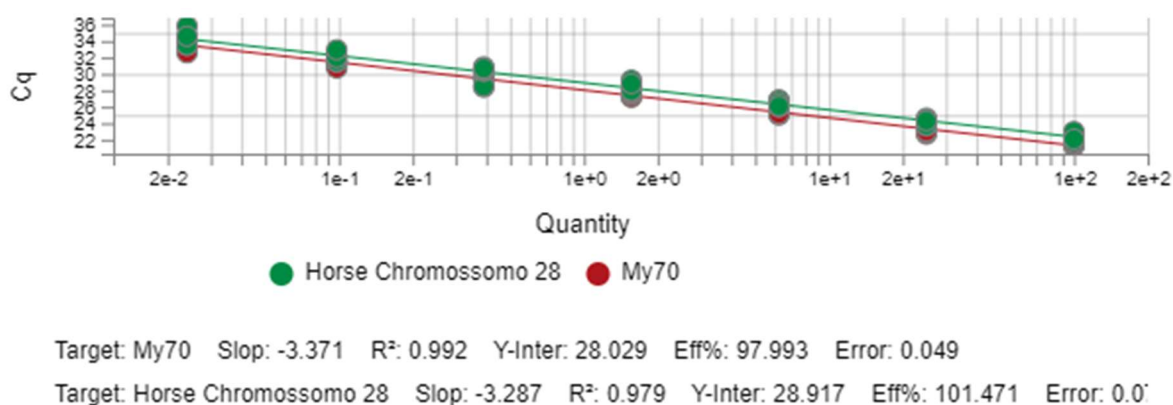
Segundo o DOC-CGCRE 8 (INMETRO, 2016), a repetibilidade é um conjunto de condições que inclui o mesmo procedimento de medição, os mesmos operadores, as mesmas condições de operação e o mesmo local. As repetições devem ser independentes, ou seja, incluir todas as etapas de preparo do processo de medição. Para avaliar a repetibilidade do método, o número mínimo de repetições para cada nível de concentração varia, mas tipicamente são entre 6 e 15 por material usado no estudo. Nessa pesquisa, as três extrações em duplicata aconteceram em dias diferentes e a curva padrão foi construída com 6 réplicas e uma faixa de concentração contendo 8 pontos diferentes na curva de calibração (Figura 3a-b).

Embora a inclinação da reta e a eficiência de amplificação da mistura cavalo em bovino tenha ficado dentro da faixa ideal, observou-se que o coeficiente de correlação linear ( $R^2$ )



decaiu para 0,95. Para obter uma melhora nesse parâmetro, normalmente pode-se eliminar algum ponto da curva de calibração e avaliar os dados novamente. O ideal é que a curva padrão tenha pelo menos cinco pontos e que os valores fiquem dentro dos critérios de avaliação. Isso pode ser observado quando se exclui um ponto da curva de quantificação, sendo que o coeficiente de variação melhora para  $R^2 = 0.979$ , conforme observado na Figura 04.

Figura 4 - Eliminação de um ponto da curva de quantificação e consequente ajuste do coeficiente de correlação ( $R^2$ ).



Fonte: Autor (2022).

Para verificar se a composição do tipo de carne condiz com aquela informada no rótulo do fabricante, foram utilizados os cinco sistemas espécie-específicos (gene-alvo). As amostras foram analisadas em duplicatas e a miostatina (gene de referência) foi usada como controle positivo da reação PCR. Os valores Cq atingidos para cada gene animal, bem como os resultados esperados e obtidos, estão apresentados no Quadro 04.

Quadro 4 - Resultados da avaliação qualitativa das amostras de carne termicamente processadas utilizando os cinco sistemas de primers/sondas para cada gene alvo (suíno, bovino, frango, ovino e cavalo) e miostatina empregando sonda TaqMan®.

Amostra	Gene alvo	Valor Cq	Resultado Esperado	Resultado Obtido
Linguíça calabresa	My70	23,37	detectado	detectado
	Porcine b-actin	24,86		
	My70	23,33		

	Porcine b-actin	25,16		
Mortadela	My70	22,73	detectado	detectado
	Porcine b-actin	29,02		
	My70	22,84		
	Porcine b-actin	29,09		
Morcela	My70	23,67	detectado	detectado
	Porcine b-actin	24,48		
	My70	23,43		
	Porcine b-actin	24,61		
Linguiça mista cozida	My70	22,97	detectado	detectado
	Porcine b-actin	25,80		
	My70	23,11		
	Porcine b-actin	26,24		
Salsicha hot dog	My70	22,54	detectado	detectado
	Porcine b-actin	27,27		
	My70	22,63		
	Porcine b-actin	26,97		
Patê de presunto	My70	23,89	detectado	detectado
	Porcine b-actin	25,12		
	My70	23,84		
	Porcine b-actin	24,97		
Patê de fígado suíno	My70	24,08	detectado	detectado
	Porcine b-actin	24,11		
	My70	24,42		
	Porcine b-actin	24,16		
Linguiça calabresa	Bovine b-actin	-	-	-
	My70	23,08	detectado	detectado
	Bovine b-actin	-	-	-
	My70	23,07	detectado	detectado
Mortadela	Bovine b-actin	-	-	-
	My70	22,54	detectado	detectado
	Bovine b-actin	-	-	-
	My70	22,39	detectado	detectado
Morcela	Bovine b-actin	32,08	detectado	detectado
	My70	23,21		
	Bovine b-actin	31,20		
	My70	23,52		
Linguiça mista cozida	Bovine b-actin	28,26	detectado	detectado
	My70	22,85		
	Bovine b-actin	28,38		
	My70	23,20		
Salsicha hot dog	Bovine b-actin	-	-	-
	My70	22,78	detectado	detectado
	Bovine b-actin	-	-	-
	My70	22,62	detectado	detectado
Patê de presunto	Bovine b-actin	-	-	-
	My70	24,14	detectado	detectado

	Bovine b-actin	-	-	-
	My70	23,63	detectado	detectado
Patê de fígado suíno	Bovine b-actin	-	-	-
	My70	24,47	detectado	detectado
	Bovine b-actin	-	-	-
	My70	24,15	detectado	detectado
Linguiça calabresa	My70	23,32	detectado	detectado
	Chicken TGF-b3	24,52		
	My70	22,99		
	Chicken TGF-b3	24,42		
Mortadela	My70	22,46	detectado	detectado
	Chicken TGF-b3	23,25		
	My70	22,79		
	Chicken TGF-b3	23,62		
Morcela	My70	23,28	detectado	detectado
	Chicken TGF-b3	-	-	-
	My70	23,36	detectado	detectado
	Chicken TGF-b3	-	-	-
Linguiça mista cozida	My70	22,59	detectado	detectado
	Chicken TGF-b3	23,95		
	My70	22,93		
	Chicken TGF-b3	23,97		
Salsicha hot dog	My70	22,80	detectado	detectado
	Chicken TGF-b3	23,53		
	My70	22,04		
	Chicken TGF-b3	23,00		
Patê de presunto	My70	23,77	detectado	detectado
	Chicken TGF-b3	25,83		
	My70	23,61		
	Chicken TGF-b3	25,49		
Patê de fígado suíno	My70	23,52	detectado	detectado
	Chicken TGF-b3	-	-	-
	My70	23,87	detectado	detectado
	Chicken TGF-b3	-	-	-
Linguiça calabresa	Ovine PRLR	-	-	-
	My70	23,13	detectado	detectado
	Ovine PRLR	-	-	-
	My70	22,73	detectado	detectado
Mortadela	Ovine PRLR	-	-	-
	My70	22,28	detectado	detectado
	Ovine PRLR	-	-	-
	My70	22,43	detectado	detectado
Morcela	Ovine PRLR	-	-	-
	My70	23,38	detectado	detectado
	Ovine PRLR	-	-	-
	My70	23,14	detectado	detectado
Linguiça mista cozida	Ovine PRLR	-	-	-

	My70	22,83	detectado	detectado
	Ovine PRLR	-	-	-
	My70	23,11	detectado	detectado
Salsicha hot dog	Ovine PRLR	-	-	-
	My70	22,48	detectado	detectado
	Ovine PRLR	-	-	-
Patê de presunto	My70	22,46	detectado	detectado
	Ovine PRLR	-	-	-
	My70	23,49	detectado	detectado
Patê de fígado suíno	Ovine PRLR	-	-	-
	My70	23,64	detectado	detectado
	Ovine PRLR	-	-	-
	My70	24,22	detectado	detectado
Linguiça calabresa	Ovine PRLR	-	-	-
	My70	24,20	detectado	detectado
	Ovine PRLR	-	-	-
	My70	23,00	detectado	detectado
Mortadela	Horse Chromossomo 28	-	-	-
	My70	22,83	detectado	detectado
	Horse Chromossomo 28	-	-	-
	My70	21,92	detectado	detectado
Morcela	Horse Chromossomo 28	-	-	-
	My70	22,44	detectado	detectado
	Horse Chromossomo 28	-	-	-
	My70	22,82	detectado	detectado
Linguiça mista cozida	Horse Chromossomo 28	-	-	-
	My70	23,29	detectado	detectado
	Horse Chromossomo 28	-	-	-
	My70	22,53	detectado	detectado
Salsicha hot dog	Horse Chromossomo 28	-	-	-
	My70	22,48	detectado	detectado
	Horse Chromossomo 28	-	-	-
	My70	22,17	detectado	detectado
Patê de presunto	Horse Chromossomo 28	-	-	-
	My70	22,87	detectado	detectado
	Horse Chromossomo 28	-	-	-
	My70	23,21	detectado	detectado
Patê de fígado suíno	Horse Chromossomo 28	-	-	-
	My70	23,30	detectado	detectado
	Horse Chromossomo 28	-	-	-
	My70	23,59	detectado	detectado
Patê de fígado suíno	Horse Chromossomo 28	-	-	-
	My70	23,78	detectado	detectado
	Horse Chromossomo 28	-	-	-
	My70	23,59	detectado	detectado

Legenda: - (não detectado).

Para a avaliação qualitativa de produtos cárneos adquiridos comercialmente, observou-se que as informações dos ingredientes contidos nos rótulos apresentaram 100% de correlação, ou seja, os ingredientes informados pelo fabricante eram aqueles identificados através do sistema primers/sondas espécie-específicos. Os ingredientes discriminados no rótulo da amostra de linguiça tipo calabresa defumada fatiada foram carne e gordura suína e carne mecanicamente separada (CMS) de aves; da mortadela, CMS de frango, pele e gordura suína; da morcela, CMS de frango, pele e gordura suína; da linguiça mista cozida, carne bovina, CMS de aves e carne suína; da salsicha hot dog, CMS de frango, carne e pele suína e CMS de suíno; do patê de presunto, presunto, gordura suína, carne de frango e miúdos suínos; e do patê de fígado, gordura, fígado e recorte de suíno. Todas as sete amostras avaliadas eram provenientes de estabelecimentos com sistema de inspeção federal (SIF) e dentro do prazo de validade.

Além dos sistemas específicos, o gene de referência (MY70) também apresentou 100% de co-amplificação nas amostras analisadas, indicando que não houveram resultados falsos-negativos. Como o DNA extraído das amostras comerciais foi diluído até 10 ng/μL, os valores Cq detectados tanto da amostra quanto do MY70 foram próximos, o que revela que o gene da miostatina em mamíferos e em aves é de cópia única (Quadro 04).

Empregando o kit contendo o corante intercalante SYBR<sup>®</sup> Green, os resultados de detecção dos produtos cárneos foram bastante similares àqueles obtidos por sonda TaqMan<sup>®</sup>. Valores Cq obtidos com SYBR<sup>®</sup> Green, além de terem gerado resultados comparáveis aos esperados para a maioria das amostras de produtos cárneos, demonstram que o uso desse kit torna a PCR menos onerosa, como também apontado por You *et al.* (2014). Para reduzir o acúmulo de sinal fluorescente e a obtenção de falsos-positivos (Quadro 5), o ideal é que a ciclagem da PCR seja reduzida para 35 ciclos, como observado no gráfico de amplificação da PCR (Figura 5) e sugerido pelo fabricante do kit (35-40 ciclos) (QIAGEN, 2013).

Quadro 5 - Resultados da avaliação qualitativa das amostras de carne termicamente processadas utilizando os cinco sistemas de primers/sondas para cada gene alvo (suíno, bovino, frango, ovino e cavalo) empregando o corante SYBR<sup>®</sup> Green.

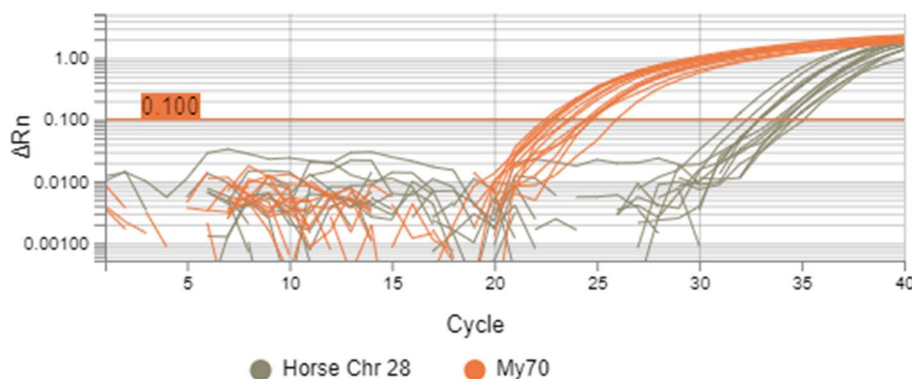
Amostra	Gene alvo	Valor Cq	Resultado esperado	Resultado obtido
Linguiça calabresa	Porcine b-actin	21.15	detectado	detectado
		21.11		
Mortadela	Porcine b-actin	26.64	detectado	detectado
		24.99		

Morcela	Porcine b-actin	21.19	detectado	detectado
		20.27		
Linguiça mista cozida	Porcine b-actin	22.62	detectado	detectado
		22.98		
Salsicha hot dog	Porcine b-actin	22.69	detectado	detectado
		23.81		
Patê de presunto	Porcine b-actin	22.25	detectado	detectado
		20.51		
Patê de fígado suíno	Porcine b-actin	20.39	detectado	detectado
		21.34		
Linguiça calabresa	Bovine b-actin	-	não detectado	-
		34.27		<b>detectado</b>
Mortadela	Bovine b-actin	38.21	não detectado	<b>detectado</b>
		-		-
Morcela	Bovine b-actin	27.52	detectado	detectado
		26.53		
Linguiça mista cozida	Bovine b-actin	24.34	detectado	detectado
		23.46		
Salsicha hot dog	Bovine b-actin	36.67	não detectado	<b>detectado</b>
		35.01		
Patê de presunto	Bovine b-actin	-	não detectado	não detectado
Patê de fígado suíno	Bovine b-actin	-	não detectado	não detectado
		35.89		<b>detectado</b>
Linguiça calabresa	Chicken TGF-b3	20.98	detectado	detectado
		21.24		
Mortadela	Chicken TGF-b3	22.08	detectado	detectado
		20.01		
Morcela	Chicken TGF-b3	-	não detectado	não detectado
Linguiça mista cozida	Chicken TGF-b3	20.85	detectado	detectado
		21.05		
Salsicha hot dog	Chicken TGF-b3	21.85	detectado	detectado
		22.5		
Patê de presunto	Chicken TGF-b3	23.56	detectado	detectado
		22.98		
Patê de fígado suíno	Chicken TGF-b3	-	não detectado	não detectado
Linguiça calabresa	Ovine PRLR	-	não detectado	não detectado
Mortadela	Ovine PRLR	-	não detectado	não detectado

Morceia	Ovine PRLR	-	não detectado	não detectado
Linguiça mista cozida	Ovine PRLR	-	não detectado	não detectado
Salsicha hot dog	Ovine PRLR	-	não detectado	não detectado
Patê de presunto	Ovine PRLR	-	não detectado	não detectado
Patê de fígado suíno	Ovine PRLR	-	não detectado	não detectado
Linguiça calabresa	Horse Chr 28	33.90	não detectado	<b>detectado</b>
		32.90		
Mortadela	Horse Chr 28	34.18	não detectado	<b>detectado</b>
		32.97		
Morceia	Horse Chr 28	33.74	não detectado	<b>detectado</b>
		34.62		
Linguiça mista cozida	Horse Chr 28	33.00	não detectado	<b>detectado</b>
		32.38		
Salsicha hot dog	Horse Chr 28	35.05	não detectado	<b>detectado</b>
		34.25		
Patê de presunto	Horse Chr 28	34.56	não detectado	<b>detectado</b>
		34.20		
Patê de fígado suíno	Horse Chr 28	31.63	não detectado	<b>detectado</b>
		32.90		

Legenda: - (não detectado).

Figura 5 - Gráfico de amplificação do gene específico para cavalo e do gene miostatina usados para avaliação qualitativa das amostras de carne termicamente processadas.



Fonte: Autor (2022).

#### 4.2.5 VALIDAÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO

Para calibração, extrações de DNA foram diluídas serialmente (1:4) a partir de uma mistura contendo 50% (p/p) de cavalo em bovino e outra contendo 50% (p/p) de frango em bovino. Ambas foram analisadas pelos ensaios real-time qPCR, empregando os sistemas específicos para cavalo e para frango com o de referência para mamíferos e aves (miostatina). A concentração de DNA de cavalo e de DNA de frango, bem como o da carne total, variou de 0.006 ng/ $\mu$ L até 100 ng/ $\mu$ L (Figura 3). Para determinar o conteúdo da carne de cavalo em bovino a partir de misturas de carne realizadas em tubos Eppendorf estéreis, as extrações de DNA foram ajustadas para 10 ng/ $\mu$ L, cujo procedimento foi repetido para a carne de frango em bovino. As diluições decimais do DNA usadas para a curva de calibração e as extrações de DNA das diferentes concentrações foram analisadas na mesma corrida PCR por ambos os ensaios, sendo os específicos e o de referência. O conteúdo de cavalo e de frango na amostra foi calculado se referindo à concentração do DNA do alvo e à concentração do DNA total da carne.

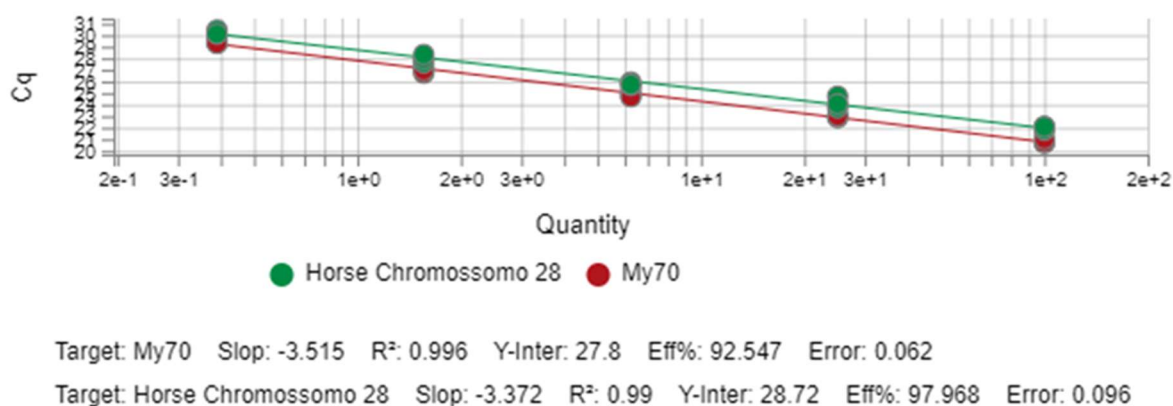
A quantificação foi validada analisando as extrações de DNA a partir de misturas de carne (50%) realizadas em tubos Eppendorf estéreis contendo 10%, 25% e 50% (p/p) de cavalo em bovino e nas mesmas condições para frango em bovino. Para avaliar a repetibilidade intradiária, extrações de DNA em duplicata foram analisadas em três dias diferentes. Os resultados estão resumidos na Tabela 04.



Tabela 4 - Resultados obtidos de conteúdo de cavalo (%) na carne bovina através da curva padrão estabelecida com misturas de carne 50% (p/p).

	% Mistura de cavalo	Extração A		Extração B		Média (%)	DP (%)	DPR (%)	Erro Sistemático (%)
		R1	R2	R1	R2				
Dia 1	10	15.40	16.55	20.28	17.14	17.34	2.09	12.03	73.40
Dia 2	25	25.53	21.58	19.28	24.77	22.79	2.90	12.72	-8.84
Dia 3	50	57.77	48.05	54.76	62.98	55.89	6.23	11.15	11.78

Figura 6 - Curva padrão estabelecida para o PCR específico (cavalo) e o PCR referência (miostatina), usando como padrões os MRC. A curva foi construída utilizando 50% (p/p) da mistura de carne.

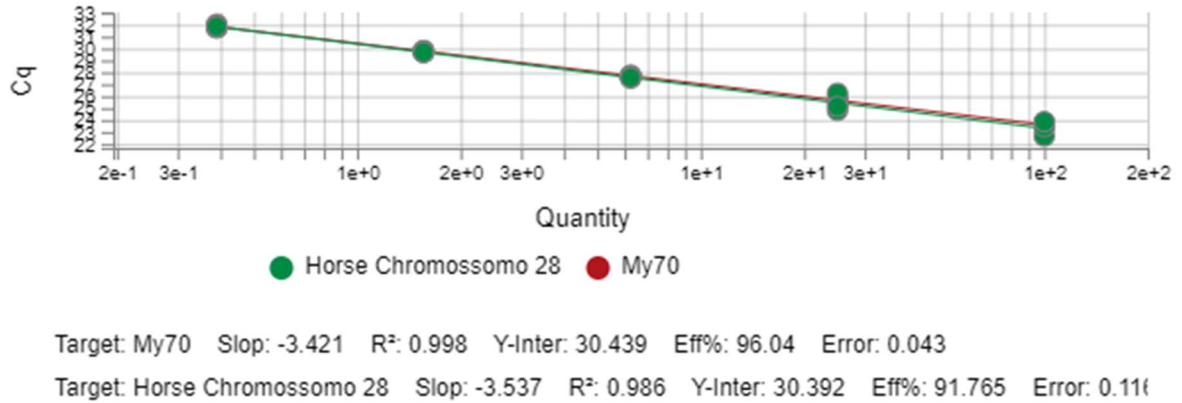


Fonte: Autor (2022).

Tabela 5 - Resultados obtidos de conteúdo de cavalo (%) na carne bovina através da curva padrão estabelecida com carne de cavalo 100% (p/p).

	% Mistura de cavalo	Extração A		Extração B		Média (%)	DP (%)	DPR (%)	Erro Sistemático (%)
		R1	R2	R1	R2				
Dia 1	10	11.35	15.86	13.93	11.79	13.23	2.08	15.75	32.3
Dia 2	25	26.52	22.04	22.20	23.01	23.44	2.10	8.95	-6.24
Dia 3	50	48.81	48.72	39.86	35.04	43.11	6.82	15.83	-13.78

Figura 7 - Curva padrão estabelecida para o PCR específico (cavalo) e o PCR referência (miostatina), usando como padrões os MRC. A curva foi construída utilizando 100% (p/p) da carne de cavalo.

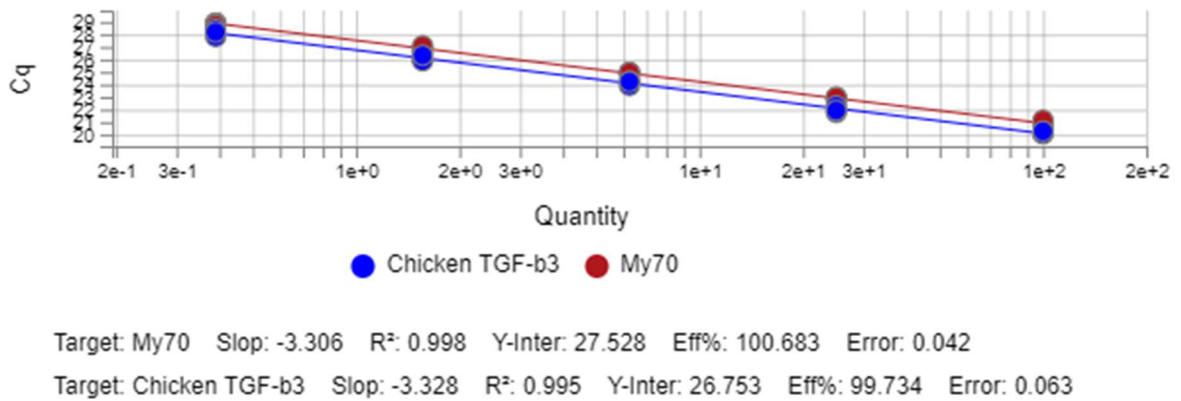


Fonte: Autor (2022).

Tabela 6 - Resultados obtidos de conteúdo de frango (%) na carne bovina através da curva padrão estabelecida com misturas de carne 50% (p/p).

	% Mistura de frango	Extração A		Extração B		Média (%)	DP (%)	DPR (%)	Erro Sistemático (%)
		R1	R2	R1	R2				
Dia 1	10	15.38	18.34	17.12	16.34	16.79	1.25	7.45	67.90
Dia 2	25	24.97	35.44	29.35	25.97	28.93	4.73	16.34	15.72
Dia 3	50	42.38	43.65	41.91	45.33	43.32	1.53	3.52	-13.36

Figura 8 - Curva padrão estabelecida para o PCR específico (frango) e o PCR referência (miostatina), usando como padrões os MRC. A curva foi construída utilizando 50% (p/p) da mistura de carne.

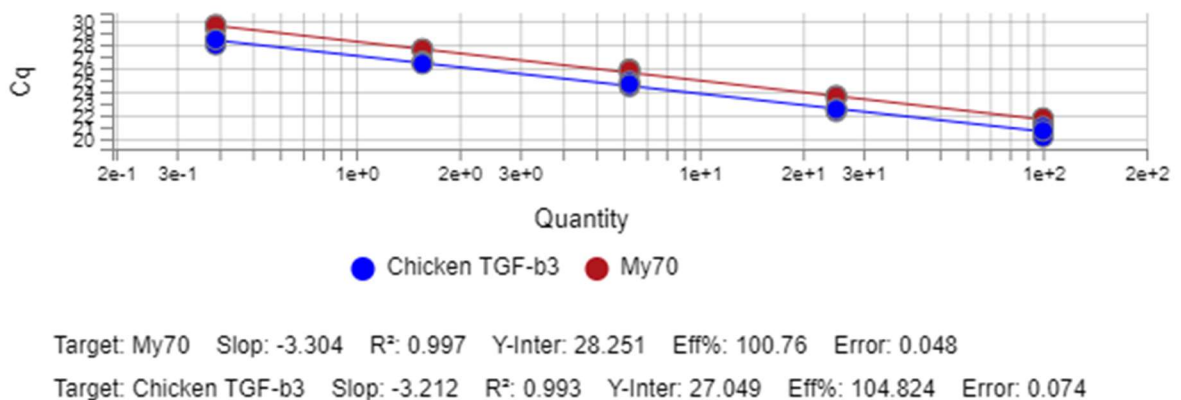


Fonte: Autor (2022).

Tabela 7 - Resultados obtidos de conteúdo de frango (%) na carne bovina através da curva padrão estabelecida com carne de frango 100% (p/p).

	% Mistura de frango	Extração A		Extração B		Média (%)	DP (%)	DPR (%)	Erro Sistemático (%)
		R1	R2	R1	R2				
Dia 1	10	12.76	14.61	14.82	13.30	13.87	1.00	7.23	38.70
Dia 2	25	25.42	25.52	25.29	24.47	25.18	0.48	1.90	0.72
Dia 3	50	37.46	39.19	37.86	39.22	38.44	0.91	2.36	-23.12

Figura 9 - Curva padrão estabelecida para o PCR específico (cavalo) e o PCR referência (miostatina), usando como padrões os MRC. A curva foi construída utilizando 100% (p/p) da carne de frango.



Fonte: Autor (2022).

Avaliando os resultados das curvas de quantificação usando a estratégia proposta por Druml *et al.* (2015) de empregar misturas de carne, e a outra utilizando curvas com DNA genômico puro como descrito por Iwobi *et al.* (2015), verificou-se que ambas podem ser utilizadas para estabelecer a quantificação relativa, como observado para o valor médio das porcentagens obtidas (Tabelas 04 a 07). No presente estudo quantitativo, os valores médios não foram muito precisos com relação às porcentagens esperadas (10%, 25% e 50%). Isso também foi observado nos resultados quantitativos obtidos por Druml *et al.* (2015), realizando sete dias de extrações de DNA. Não se pode inferir qual curva de quantificação apresentou resultados melhores, mas é provável que os resultados fiquem mais corretos quando a carne a ser fraudada estiver em maior porcentagem. Além disso, a maioria dos estudos sobre quantificação de fraudes em alimentos emprega uma “matriz-padrão” com diferentes concentrações (CHEN *et al.*, 2020; SARLAK *et al.*, 2022), sendo que o ideal, para fins de validação *in house*, é preparar uma matriz-padrão com diferentes concentrações, garantindo uma homogeneização adequada.

Em todas as misturas de carne, o erro sistemático foi maior nas concentrações menores, já que a massa utilizada no experimento foi muito baixa em cada um dos alvos (cavalo e frango) fraudados na carne bovina. Isso foi observado por Druml *et al.* (2015) usando 2% da carne de veado em carne suína (erro sistemático de 40.9%) e Iwobi *et al.* (2015) tiveram maior RSD (11,56%) na proporção de 5% de carne suína. Ainda, para os últimos autores, o método desenvolvido, no qual frações de carne bovina e suína foram quantificadas em paralelo ao do conteúdo de miostatina, demonstrou ser robusto e preciso para a carne moída. A incerteza de medição quando o método foi aplicado a outros produtos cárneos comerciais foi baixo, podendo ser facilmente transferido para outros itens de matriz e composições diferentes.

Nessa pesquisa, é possível ter uma repetibilidade interdiária do ensaio real-time qPCR empregando misturas com massas muito baixas (Quadro 03); porém, para uma melhora nos resultados, o ideal é iniciar com uma massa 10 vezes maior ou utilizar diferentes concentrações de matriz-padrão. Nesse caso, é fundamental ter homogeneidade e garantir a extração adequada do DNA, principalmente quando se utilizam misturas binárias de carnes com elevada porcentagem de gordura (IWOBI *et al.*, 2015). Entretanto, mesmo usando curvas padrões de quantificação contendo 50% de misturas de carnes ou 100% de carne pura do alvo, a inclinação da curva, a eficiência de amplificação e a correlação linear estiveram dentro do critério de aceitação, conforme observado nas Figuras 6 a 9.

Oliveira *et al.* (2015) avaliou a sensibilidade da PCR multiplex para detectar fraude por adição intencional de carne moída bubalina em carne moída bovina. Esses pesquisadores

produziram 13 concentrações diferentes (0,01%; 0,1%; 1%; 5%; 10%; 25%; 50%; 75%; 90%; 95%; 99%; 99,9%; e 99,99%) de carne moída bubalina e concluíram que a técnica foi eficaz, possui alta sensibilidade e foi capaz de detectar incrementos de 10% (2,05 ng) de DNA bubalino e de 0,1% (0,041 ng) de DNA bovino. Hou *et al.* (2015) mencionam que a sensibilidade da PCR multiplex varia de acordo com a espécie animal, o gene alvo e o tamanho do fragmento amplificado. No presente estudo, o método real-time qPCR foi capaz de amplificar o cromossomo 28 para cavalo em níveis de 2% a 0,008% (139,26 a 0,64 ng/ $\mu$ L) (Tabela 03) e o gene TGF-b3 para frango de 2% a 0,008% (140,04 a 0,20 ng/ $\mu$ L) (Tabela 04). Para estabelecer o LD de frango, foram necessárias duas diluições seriadas (1:4) adicionais (0,002% e 0,0005%) (Tabela 4); porém, para esses níveis, a média da concentração de DNA não é precisa. Isso revela que a técnica de real-time qPCR é ser altamente sensível (Cq 37 arredondando) para ambas as carnes fraudadas.

Matsunga *et al.* (1999) identificaram espécies de bovino (*Bos taurus*), cabra (*Capra hircus*) e ovelha (*Ovis aries*) utilizando como região alvo o citocromo b, com limite de detecção de 0,25 ng para todas as espécies. Porcentagens muito próximas às desse estudo também foram obtidos por Ballin (2010) quando empregou o gene 12S rRNA, obtendo um limite de 0,002% (0,0025 ng) nos mesmos mamíferos. Zhang *et al.* (2013) avaliaram alimentos pré-cozidos e processados de carne bovina utilizando o gene do citocromo b e detectaram o limite de 0,001 ng de DNA. Furutani *et al.* (2017) identificaram espécies de carne por real-time PCR portátil com extração de DNA simplificada e detectaram 0,1% de carne de frango em carne suína.

Drummond *et al.* (2013) escolheram DNA mitocondrial como alvo de amplificação devido à abundância celular e, mesmo quando as moléculas de DNA são degradadas pelo calor ou por processos químicos e/ou físicos através dos quais os alimentos são preparados, os pesquisadores mostraram altas correlações entre os valores medidos e esperados entre as curvas de calibração. Eles destacam que pequenos desvios podem ter resultado de diferenças no número de mitocôndrias por célula nas diferentes espécies, bem como das variações do número de células somáticas.

Chen *et al.* (2020) relataram que existem diferenças nos teores de carne bovina entre os detectados pelo real-time qPCR e o dos rótulos dos produtos, pois o grau de processamento afeta a degradação do DNA, resultando em divergências nos dados testados de distintos tipos de produtos cárneos processados. Quanto às amostras salgadas, os teores de carne bovina detectados são muito inferiores aos dos rótulos e os autores sugerem que o alto teor de sal afeta a eficiência de extração de DNA e a consequente amplificação pela PCR.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados obtidos nesse estudo de espécies animais através da avaliação *in silico* demonstrou que os sistemas primers/sondas, o conteúdo GC, a temperatura de fusão ( $T_m$ ) e a energia livre de Gibbs estão adequados, sendo que não apresentaram estruturas secundárias que comprometessem a amplificação do DNA dos alvos e do gene de referência (MY70).

Observou-se que o método proposto detectou 100% do DNA extraído de produtos cárneos termicamente processados, sendo que as combinações de carnes descritas no rótulo do fabricante foram corretamente identificadas utilizando o sistema primer/sonda espécie-específico. Além destes, o gene de referência também co-amplificou, obtendo valores  $C_q$  próximos ao do alvo específico para cada espécie animal, revelando que não houve resultados falsos-negativos ou extrapolação no número de cópias. Para fins de detecção, é possível utilizar apenas os primers espécie-específicos com a mistura de reação do kit contendo SYBR<sup>®</sup> Green PCR ao invés das sondas. O método TaqMan<sup>®</sup> se baseia na hibridização da sonda com o alvo e o método SYBR<sup>®</sup> Green emprega o corante intercalante, que se liga a cada nova cópia de DNA dupla-fita. Avaliando o SYBR<sup>®</sup> Green, os resultados obtidos também foram bastante equivalentes com aqueles por sonda, já que o corante repórter (fluorescente) e o quencher (silenciador) da sonda oneram a reação real-time qPCR. Como o SYBR<sup>®</sup> Green se liga a todo DNA dupla-fita, o resultado é um aumento na intensidade da fluorescência no final da ciclagem e isso pode ter ocorrido para as duas espécies animais. Reduzir o número de ciclos da PCR, inserir controles positivos e ajustar o limiar de detecção são algumas práticas que devem ser observadas quando se analisa e interpreta os resultados.

Os genes cromossomo 28 (cavalo), o fator de crescimento TGF- $\beta$ 3 (frango) e a miostatina (MY70), presente na maioria de mamíferos e aves, apresentam uma única cópia por genoma haploide, o que evita a variação no número de cópias. Cada extração de DNA foi analisada em duplicata, partindo de uma concentração de 100 ng/ $\mu$ L até 0,006 ng/ $\mu$ L, compreendendo oito pontos da curva de quantificação. Porém, para efeitos de padronização e baseando-se nos critérios de aceitação (eficiência de amplificação, *slope* e  $R^2$ ), o melhor LQ foi observado em concentração abaixo de 0,031% para ambas as curvas (cavalo e frango).

Embora a quantificação de amostras de carnes fraudadas (cavalo em bovina e frango em bovina) com diferentes porcentagens (10%, 25% e 50%) tenha fornecido um erro sistemático alto, ela se mostrou sensível e reprodutível, pois detectou fraude empregando massa inicial muito baixa ou com incerteza alta. Isso revela que o método aqui validado tem potencial para

ser utilizado na rotina de laboratórios, mas ainda precisa ser testado com amostras comercialmente disponíveis e/ou elaborando matriz-padrão. É provável que o erro sistemático diminua quando massas no mínimo 10 vezes maiores forem validadas ou, alternativamente, quando compilar as proporções desejadas a partir das digestões individuais.

O ensaio aqui proposto ainda precisa ser testado outras vezes, mas observou-se que os parâmetros quantitativos mínimos estiveram de acordo com os critérios definidos pelo ENGL para a quantificação, apontando como um método sensível e uma alternativa na rotina de fiscalização de produtos tanto para a alimentação humana quanto para a animal.

## REFERÊNCIAS

- ABRAFRIGO. **Exportação de carnes e derivados de bovinos – janeiro a dezembro/2021**. Disponível em: [https://www.abrafrigo.com.br/wp-content/uploads/2021/12/ABRAFRIGO-Exporta%C3%A7%C3%A3o-Carne-Bovina-Jan\\_2020-a-Dez\\_2021.pdf](https://www.abrafrigo.com.br/wp-content/uploads/2021/12/ABRAFRIGO-Exporta%C3%A7%C3%A3o-Carne-Bovina-Jan_2020-a-Dez_2021.pdf). Acesso em: 11 mar. 2022.
- ALIKORD, M.; MOMTAZ, H.; KADIVAR, M.; RAD, A. H. Species identification and animal authentication in meat products: a review. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 12, n. 1, p. 145-155, 2018.
- AN, J.; MOON, J. C.; KIM, J. H.; KIM, G. S.; JANG, C. S. Development of DNA-based species-specific real-time PCR markers for four berry fruits and their application in commercial berry fruit foods. **Applied Biological Chemistry**, v. 62, n. 1, p. 1-7, 2019.
- ANDERSEN, C. B.; HOLST-JENSEN, A.; BERDAL, K. G.; THORSTENSEN, T.; TENGS, T. Equal performance of TaqMan, MGB, molecular beacon, and SYBR green-based detection assays in detection and quantification of roundup ready soybean. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 26, p. 9658-9663, 2006.
- APPLIED BIOSYSTEMS. **Real time PCR Handbook**. 2013. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/Forms/PDF/real-time-pcr-handbook.pdf>. Acesso em: 11 mar. 2022.
- BALLIN, N. Z. Authentication of meat and meat products. **Meat Science**, v. 86, n.3, p.577-587, 2010.
- BORAH, P. Primer designing for PCR. **Science Vision**, v. 11, n.3, p.134-136, 2011.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Instrução Normativa - IN Nº 75, de 8 de outubro de 2020**. Estabelece os requisitos técnicos para declaração da rotulagem nutricional nos alimentos embalados. Disponível em: [http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/3882585/IN\\_75\\_2020\\_COMP.pdf/e89784b5-ed18-4bdd-a4d4-139724a56d4d](http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/3882585/IN_75_2020_COMP.pdf/e89784b5-ed18-4bdd-a4d4-139724a56d4d). Acesso em: 05 mar. 2022.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Resolução RDC. Nº 40, de 8 de fevereiro de 2002**. Regulamento técnico para rotulagem de alimentos e bebidas embalados que contenham glúten. Disponível em: [https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2002/rdc0040\\_08\\_02\\_2002.html](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2002/rdc0040_08_02_2002.html). Acesso em: 05 mar. 2022.
- BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; WITTEWER, C. T. **The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments**, p. 611-62, 2009.
- BUSTIN, S.; HUGGETT, J. qPCR primer design revisited. **Biomolecular Detection and Quantification**, v. 14, p. 19-28, 2017.



CHEN, X., LU, L., XIONG, X., XIONG, X., & LIU, Y. Development of a real-time PCR assay for the identification and quantification of bovine ingredient in processed meat products. **Scientific Reports**, v. 10, n.1, p.1-10, 2020.

DERZ, W.; PAVLOVIC, M.; HUBER, I.; SCHALCH, B.; GERDES, L. Food fraud in the Alps? - Detection of chamois (*Rupicapra rupicapra*) in firm raw sausages, ham, and meat via qualitative duplex real-time PCR. **Food Control**, v. 123, p. 107764, 2021.

DOLCH, K.; JUDAS, M.; SCHWÄGELE, F.; BRÜGGEMANN, D. A. Development and validation of two triplex real-time PCR systems for the simultaneous detection of six cereal species in processed meat products. **Food Control**, v. 101, p. 180-188, 2019.

DRUML, B., MAYER, W., CICHNA-MARKL, M., & HOCHEGGER, R. Development and validation of a TaqMan real-time PCR assay for the identification and quantification of roe deer (*Capreolus capreolus*) in food to detect food adulteration. **Food Chemistry**, v. 178, p. 319-326, 2015.

DRUML, B.; CICHNA-MARKL, M. High resolution melting (HRM) analysis of DNA—Its role and potential in food analysis. **Food Chemistry**, v. 158, p. 245-254, 2014.

DRUML, B.; KALTENBRUNNER, M.; HOCHEGGER, R.; CICHNA-MARKL, M. A novel reference real-time PCR assay for the relative quantification of (game) meat species in raw and heat-processed food. **Food Control**, v.70, p.392-400, 2016.

DRUMMOND, M. G., BRASIL, B. S. A. F., DALSECCO, L. S., BRASIL, R. S. A. F., TEIXEIRA, L. V., & OLIVEIRA, D. A. A. A versatile real-time PCR method to quantify bovine contamination in buffalo products. **Food Control**, v. 29, n. 1, p.131-137, 2013.

EUROPEAN NETWORK OF GMO LABORATORIES (ENGL). Definition of Minimum Performance Requirements for Analytical Methods of GMO Testing. **JRC Technical Report**. 2015. Disponível em: [chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/doc/MPR%20Report%20Application%2020\\_10\\_2015.pdf](chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/doc/MPR%20Report%20Application%2020_10_2015.pdf). Acesso em: 05 mar. 2022.

FOOD SATEFTY BRAZIL. **Escândalo da carne de cavalo: Brasil dez anos atrasado**. Disponível em: <https://foodsafetybrazil.org/escandalo-da-carne-de-cavalo-brasil-dez-anos-atrasado/jose-luiz-bariani/2021/>. Acesso em: 05 mar. 2022.

FRÖDER, H. **Desenvolvimento de métodos para a quantificação direta de *Salmonella* sp. por PCR-tempo real e por transcriptase reversa-PCR-tempo real**. (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo), 2008, 155p.

FURUTANI, S., HAGIHARA, Y., & NAGAI, H. On-site identification of meat species in processed foods by a rapid real-time polymerase chain reaction system. **Meat Science**, v.131, p. 56-59, 2017.

GIGLIOTI, R.; POLLI, H.; AZEVEDO, B. T.; KATIKI, L. M.; VERCESI FILHO, A. E. Detection and quantification of adulteration in milk and dairy products: A novel and sensitive qPCR-based method. **Food Chemistry: Molecular Sciences**, p. 100074, 2022.

HOU, B., MENG, X., ZHANG, L., GUO, J., LI, S., & JIN, H. Development of a sensitive and specific multiplex PCR method for the simultaneous detection of chicken, duck and goose DNA in meat products. **Meat Science**, v. 101, p. 90-94, 2015.

IFS FOOD. **Norma para avaliar a conformidade de produtos e processos em relação à segurança de alimentos e qualidade**. 2020. Disponível em: [https://www.ifs-certification.com/images/standards/ifs\\_food7/documents/standards/IFS\\_Food7\\_pt.pdf](https://www.ifs-certification.com/images/standards/ifs_food7/documents/standards/IFS_Food7_pt.pdf). Acesso em: 05 mar. 2022.

INMETRO. Coordenação Geral de Acreditação. Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos. **DOQ-CGCRE-008**. 2016. Disponível em: chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8\_05.pdf. Acesso em 05 mar. 2022.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION/TECHNICAL SPECIFICATION. **ISO/TS 20224-1**. Molecular biomarker analysis – Detection of animal-derived materials in foodstuffs and feedstuffs by real-time PCR – Part 1: Bovine DNA detection method. 1<sup>st</sup>.Edition, 2020.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION/TECHNICAL SPECIFICATION. **ISO/TS 20224-2**. Molecular biomarker analysis – Detection of animal-derived materials in foodstuffs and feedstuffs by real-time PCR – Part 2: Ovine DNA detection method. 1<sup>st</sup>.Edition, 2020.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION/TECHNICAL SPECIFICATION. **ISO/TS 20224-3**. Molecular biomarker analysis – Detection of animal-derived materials in foodstuffs and feedstuffs by real-time PCR – Part 3: Porcine DNA detection method. 1<sup>st</sup>.Edition, 2020.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION/TECHNICAL SPECIFICATION. **ISO/TS 20224-4**. Molecular biomarker analysis – Detection of animal-derived materials in foodstuffs and feedstuffs by real-time PCR – Part 4: Chicken DNA detection method. 1<sup>st</sup>.Edition, 2020.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION/TECHNICAL SPECIFICATION. **ISO/TS 20224-6**. Molecular biomarker analysis – Detection of animal-derived materials in foodstuffs and feedstuffs by real-time PCR – Part 6: Horse DNA detection method. 1<sup>st</sup>.Edition, 2020.

IWOBI, A., SEBAH, D., KRAEMER, I., LOSHER, C., FISCHER, G., BUSCH, U., & HUBER, I. A multiplex real-time PCR method for the quantification of beef and pork fractions in minced meat. **Food Chemistry**, v.169, p.305-313, 2015.

JONKER, K. M.; TILBURG, J. J. H. C.; HÄGELE, G. H.; DE BOER, E. Species identification in meat products using real-time PCR. **Food Additives and Contaminants**, v. 25, n. 5, p. 527-533, 2008.

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

KITPIPIT, T.; SITTICHAN, K.; THANAKIATKRAI, P. Direct-multiplex PCR assay for meat species identification in food products. **Food Chemistry**, v. 163, p. 77-82, 2014.

KÖPPEL, R.; VAN VELSEN, F.; GANESHAN, A.; PIETSCH, K.; WEBER, S.; GRAF, C.; LICINA, A. Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from chamois, roe, deer, pork and beef. **European Food Research and Technology**, v. 246, n. 5, p. 1007-1015, 2020.

KRALIK, P.; RICCHI, M. A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: definitions, parameters, and everything. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 108, 2017.

LAUBE, I., ZAGON, J., & BROLL, H. Quantitative determination of commercially relevant species in foods by real-time PCR. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 42, n. 3, p. 336-341, 2007.

LI, J.; LI, J.; LIU, R.; WEI, Y.; WANG, S. Identification of eleven meat species in foodstuff by a hexaplex real-time PCR with melting curve analysis. **Food Control**, v. 121, p. 107599, 2021a.

LI, T.; WANG, J.; WANG, Z.; QIAO, L.; LIU, R.; LI, S.; CHEN, A. Quantitative determination of mutton adulteration with single-copy nuclear genes by real-time PCR. **Food Chemistry**, v. 344, p. 128622, 2021b.

LI, J., WEI, Y., LI, J., LIU, R., XU, S., XIONG, S., ... & WANG, S. A novel duplex SYBR Green real-time PCR with melting curve analysis method for beef adulteration detection. **Food Chemistry**, v. 338, p. 127932, 2021c.

LUBIS, H.; SALIHAN, N. T.; HOSSAIN, M. M.; AHMED, M. U. Development of fast and sensitive real-time qPCR assay based on a novel probe for detection of porcine DNA in food sample. **LWT**, v. 84, p. 686-692, 2017.

LUKHTANOV, E. A., LOKHOV, S. G., GORN, V. V., PODYMINOGIN, M. A., & MAHONEY, W. Novel DNA probes with low background and high hybridization-triggered fluorescence. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n.5, p. e30, 2007.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa N ° 4, de 31 de março de 2000**. 2000. Disponível em: <https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/instrucao-normativa-sda-4-de-31-03-2000,662.html>. Acesso em: 25 mar. 2022.

MARCHETTI, P.; MOTTOLA, A.; TANTILLO, G.; CASTRICA, M.; DI PINTO, A. Detection of undeclared presence of bovine milk in buffalo yogurt. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 4, p. 4056-4061, 2021.

MATSUNAGA, T., CHIKUNI, K., TANABE, R., MUROYA, S., SHIBATA, K., YAMADA, J., & SHINMURA, Y. A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. **Meat Science**, v.51, n. 2, p.143-148, 1999.

MONTEIRO, C. S.; DECONINCK, D.; ELJASIK, P.; SOBCHAK, M.; DERYCKE, S.; PANICZ, R.; FARIA, M. A. A fast HRMA tool to authenticate eight salmonid species in commercial food products. **Food and Chemical Toxicology**, v. 156, p. 112440, 2021.

NAVARRO, E.; SERRANO-HERAS, G.; CASTAÑO, M. J.; SOLERA, J. J. C. C. A. Real-time PCR detection chemistry. **Clinica Chimica Acta**, v. 439, p. 231-250, 2015.

NESVADBOVA, M.; KRALIK, P.; DZIEDZINSKA, R.; DUFKOVA, M.; BORILOVA, G. An integrated system of four multiplex qPCR assays for the precise and sensitive identification of animal species in food and feed. **Food Control**, v. 135, p. 108781, 2022.

NJARAMBA, J. K.; WAMBUA, L.; MUKIAMA, T.; AMUGUNE, N. O.; VILLINGER, J. Detection of Species Substitution in the Meat Value Chain by High-Resolution Melting Analysis of Mitochondrial PCR Products. **Foods**, v. 10, n. 12, p. 3090, 2021.

OLIVEIRA, A. C. D. S., FERREIRA, B. C. A., CARDOSO, G. V. F., SILVA, C. L., DA SILVA, A. S., DA SILVA, F., ... & DE MORAES, C. M. Avaliação da técnica PCR multiplex para detecção de fraude por adição de carne bubalina em carne moída bovina. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 74, n. 4, p.371-379, 2015.

QIAGEN. **DNeasy mericon Food Handbook**. 2020. Disponível em: <https://www.qiagen.com/gb/resources/resourcedetail?id=bd9cc2a8-aa71-4cb5-b6f7-97b3d7fc306d&lang=en>. Acesso em: 11 mar. 2022.

QIAGEN. **QuantiNova™ Probe PCR Handbook**. 2013. Disponível em: <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=5167d782-9fef-4202-bc79-95f358be7d8c&lang=en>. Acesso em 23 fev. 2022.

QIAGEN. **QuantiNova™ SYBR® Green PCR Handbook**. 2013. Disponível em: [https://www-qiagen-com.translate.google.us/resources/resourcedetail?id=61d2de10-2b7c-472c-96d9-a818e200fbda&lang=en&x\\_tr\\_sl=en&x\\_tr\\_tl=pt&x\\_tr\\_hl=pt-BR&x\\_tr\\_pto=sc](https://www-qiagen-com.translate.google.us/resources/resourcedetail?id=61d2de10-2b7c-472c-96d9-a818e200fbda&lang=en&x_tr_sl=en&x_tr_tl=pt&x_tr_hl=pt-BR&x_tr_pto=sc). Acesso em: 23 fev. 2022.

RODRIGUEZ-LAZARO, D. **Real-Time PCR in Food Science: Current Technology and Applications**. [S.l.]: Caister Academic Press, 2013.

SARLAK, Z.; SHOJAEE-ALIABADI, S.; REZVANI, N.; HOSSEINI, H.; ROUHI, M.; DASTAFKAN, Z. Development and validation of TaqMan real-time PCR assays for quantification of chicken adulteration in hamburgers. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 106, p. 104302, 2022.

SHI, R.; XIONG, X.; HUANG, M.; XU, W.; LI, Y.; CAO, M.; XIONG, X. High resolution melting (HRM) analysis of a 12S rRNA mini barcode as a novel approach for codfish species authentication in processed fish products. **European Food Research and Technology**, v. 246, n. 5, p. 891-899, 2020.

SILVA, A. J.; HELLBERG, R. S. DNA-based techniques for seafood species authentication. **Advances in Food and Nutrition Research**, Academic Press, 2021, v. 95, p. 207-255. 2021.

SINCABIMA. **Fraude alimentar**. Uma realidade no setor industrial. Disponível em: <https://sincabima.org.br/2019/03/18/fraude-alimentar-uma-realidade-no-setor-industrial/>. Acesso em: 11 mar. 2022.

SOARES, S.; AMARAL, J. S.; OLIVEIRA, M. B. P.; MAFRA, I. A SYBR Green real-time PCR assay to detect and quantify pork meat in processed poultry meat products. **Meat Science**, v. 94, n. 1, p. 115-120, 2013.

THANAKIATKRAI, P.; DECHNAKARIN, J.; NGASAMAN, R.; KITPIPIT, T. Direct pentaplex PCR assay: An adjunct panel for meat species identification in Asian food products. **Food Chemistry**, v. 271, p. 767-772, 2019.

THANAKIATKRAI, P.; KITPIPIT, T. Meat species identification by two direct-triplex real-time PCR assays using low resolution melting. **Food Chemistry**, v. 233, p. 144-150, 2017.

VISCIANO, P.; SCHIRONE, M. Food frauds: Global incidents and misleading situations. **Trends in Food Science & Technology**, v. 114, p. 424-442, 2021.

WANG, K., LI, H., XU, Y., SHAO, Q., YI, J., WANG, R., ... & QU, W. MFEprimer-3.0: quality control for PCR primers. **Nucleic Acids Research**, v.47, n. 1, p.610-613, 2019.

XIONG, X.; YUAN, F.; HUANG, M.; CAO, M.; XIONG, X. Development of a rapid method for codfish identification in processed fish products based on SYBR Green real-time PCR. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 55, n. 4, p. 1843-1850, 2020.

XU, R.; WEI, S.; ZHOU, G.; REN, J.; LIU, Z.; TANG, S.; WU, X. Multiplex TaqMan locked nucleic acid real-time PCR for the differential identification of various meat and meat products. **Meat Science**, v. 137, p. 41-46, 2018.

ZHANG, C. Semi-nested multiplex PCR enhanced method sensitivity of species detection in further-processed meats. **Food Control**, v. 31, n. 2, p. 326-330, 2013.