



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

VANDERSON VASCONCELOS DANTAS

**REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE MULTIPLEX (mPCR) PARA
DETECÇÃO DE FRAUDE E IDENTIFICAÇÃO DE *Salmonella* spp. EM AMOSTRAS
DE CARNE BOVINA E BUBALINA**

Belém-PA
2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

VANDERSON VASCONCELOS DANTAS

**REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE MULTIPLEX (mPCR) PARA
DETECÇÃO DE FRAUDE E IDENTIFICAÇÃO DE *Salmonella* spp. EM AMOSTRAS
DE CARNE BOVINA E BUBALINA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof. Dra. Lúcia de Fátima Henriques Lourenço

Co-orientadora: Prof. Dra. Carina Martins de Moraes

Belém-PA
2019

VANDERSON VASCONCELOS DANTAS

**REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE MULTIPLEX (mPCR) PARA
DETECÇÃO DE FRAUDE E IDENTIFICAÇÃO DE *Salmonella* spp. EM AMOSTRAS
DE CARNE BOVINA E BUBALINA**

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Lúcia de Fátima Henriques Lourenço
Universidade Federal do Pará – FEA/ITEC - Orientadora

Prof. Dr. Carina Martins de Moraes
Universidade Federal do Pará – IMV/FMV - (Co-orientadora)

Prof. Dr. Alessandra Santos Lopes
Universidade Federal do Pará – PPGCTA/FEA/UFPA- Membro

Prof. Dr. Maria Regina Sarkis Peixoto Joele
Universidade Federal do Pará – PPGCTA/UFPA

Prof. Dr. Talita Bandeira Roos (Externo)
Universidade Federal do Pará – IMV/FMV/UFPA

Prof. Dr. Carla Cristina Guimarães de Moraes (Externo)
Universidade Federal do Pará – IMV/FMV/UFPA

Dedico este trabalho aos meus pais Antônio Barbosa Dantas e Vera Lúcia Vasconcelos Dantas pelo exemplo de dedicação, orientação e amor que sempre revestiram minha existência.

AGRADECIMENTOS

Á Deus por toda sua magnitude e fidelidade, por cumprir e fazer cumprir todas as suas promessas na minha vida “Nunca me deixes esquecer que tudo o que tenho, tudo o que sou, o que vier a ser, vem de ti, Senhor”.

Aos meus pais Antônio Dantas e Vera Lúcia Dantas por suas orações, apoio e por me ensinarem a viver com dignidade, mostrando-me que na vida o mais importante é “ser” e não “ter”.

Ás minhas irmãs Vanessa e Vanielle Dantas pelo carinho, amizade, amor e incentivo, vocês são especiais.

Á família Vasconcelos em especial á minha avó Maria Lúcia, pelas orações, apoio e momentos de lazer.

Á família Dantas especialmente ao meu avô Antônio Dantas “*In memorian*” e a minha tia Maria Dantas, que tem sido nossa coluna de oração.

Ás minhas orientadoras Lúcia de Fátima Henriques Lourenço e Carina Martins de Moraes (Co-orientadora) pelas oportunidades concedidas, pela confiança, respeito, paciência nos momentos difíceis, pelo incentivo e fundamentalmente por acreditar em minha capacidade. Vocês são um exemplo de competência, sensibilidade e humildade.

Aos membros da banca Prof. Dra. Alessandra Lopes, Prof. Dra. Regina Joelle, Prof. Dra. Talita Roos, Prof. Dra. Carla Guimarães pelas valiosas contribuições.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pará pela oportunidade de cursar e concluir o doutorado.

Aos amigos do Laboratório LHQA Gabrielle Virgínia, Andreia Silva, Josyane Brasil, Ana Paula Presley, Joelson Lima e Mylla Christy pela parceria, auxílio no desenvolvimento do trabalho e momentos de descontração.

Aos colegas do LAPOA em especial à Cleidine Araújo, pelo apoio, incentivo e momentos de distração.

Aos meus amigos, Anderson Costa, Alexandre do Amaral, Bruno Brito, Luiza Helena, Eliana Pinheiro, Hernando Andres e Enrique Pino pelo apoio moral e emocional, pela ajuda nas adversidades e pelos momentos de descontração e sorrisos.

Á minha amiga Natácia Silva pela amizade, companheirismo e incentivo, por compartilhar momentos de alegria e descontentamento.

Aos meus alunos e bolsistas do curso de Tecnologia de Alimentos – UEPA, campus Redenção pela compreensão, parceria e aprendizado mútuo que construímos.

*“Os teus olhos viram a minha substância ainda informe
E no teu livro foram escritos todos os meus dias,
sim, todos os dias preparados para mim,
mesmo antes de qualquer um deles vir a existir”*

Salmos 139:16

RESUMO

A autenticidade dos alimentos tem se tornado uma questão importante na atualidade, por razões econômicas, estilo de vida, saúde e convicções religiosas, além de ser uma exigência dos órgãos fiscalizadores de alimentos. A rotulagem adequada de um produto conforme seu padrão de identidade e qualidade é imprescindível para garantir a segurança alimentar dos consumidores. No entanto, a identificação das carnes e constituintes de um produto cárneo ainda é um desafio para as autoridades, visto que nem sempre é possível a autenticação da espécie de origem a partir dos métodos comumente utilizados, principalmente em casos onde ocorrem adulterações pelo acréscimo de matéria prima oriunda de espécies diferentes daquelas indicadas no rótulo. O objetivo desse estudo foi otimizar e desenvolver diferentes protocolos de Reação em Cadeia da Polimerase Multiplex (mPCR) para identificação simultaneamente das espécies bovina e bubalina e para identificação de *Salmonella* spp. em cortes cárneos comercialmente disponíveis. Para tal foram aplicados dois métodos de extração de DNA e a qualidade e quantidade do material obtido foi determinada por eletroforese em gel de agarose e a partir de espectrofotometria. Para a execução da mPCR proposta foram utilizados iniciadores que amplificam sequências de 429 pares de base para DNA de *Salmonella* spp., 346 pares de bases para DNA bovino e 220 pares de bases para DNA bubalino e a avaliação da sensibilidade da técnica foi realizada a partir da diluição do DNA molde extraído. Já para a verificação da especificidade foram utilizados DNAs de diferentes espécies animais e de micro-organismos. Após a padronização da técnica, amostras de carne bovina e bubalina foram contaminadas artificialmente com cepa padrão de *Salmonella* *tiphymurium* (ATCC 14028), para que o limite de detecção da técnica fosse determinado e, por fim, amostras comerciais de cortes cárneos comercializados no norte do Brasil foram analisadas pela referida técnica, para verificar a hipótese da ocorrência fraude e da presença de *Salmonella* spp. em produtos comercializados na região alvo do estudo. Os resultados obtidos demonstraram que a mPCR proposta apresentou sensibilidade e especificidade adequadas, sendo capaz de detectar *Salmonella* spp. a partir de 10^6 ufc/mL após 12h de enriquecimento. Além disso, observou-se que aproximadamente 20% das amostras comercializadas como sendo de origem bovina eram de origem bubalina e que, desse total, 31% apresentavam presença de *Salmonella* spp. Concluiu-se que As mPCRs desenvolvidas são eficientes para detectar fraude em cortes cárneos e *Salmonella* spp. podendo ser uma alternativa a ser utilizada na rotina de fiscalização destes produtos.

Palavras-Chave: autenticidade, análise de DNA, fraude economicamente motivada.

ABSTRACT

The authenticity of food has become a major issue today, for economic reasons, lifestyle, health and religious beliefs, as well as a requirement of food regulators. Proper labeling of a meat product according to its identity and quality standard is essential to ensure the food safety of consumers. However, the identification of meat and meat constituents is still a challenge for the authorities, as it is not always possible to authenticate the species of origin using commonly used methods, especially in cases where adulteration by the addition of material occurs. from a species other than those indicated on the label. The aim of this study was to optimize and develop different Multiplex Polymerase Chain Reaction (mPCR) protocols for simultaneous identification of bovine and buffalo species and for identification of *Salmonella* spp. in commercially available meat cuts. Two methods of DNA extraction were applied (commercial kit and from the use of organic solvents) and the quality / quantity of the obtained material was determined by agarose gel electrophoresis and spectrophotometry. Primers that amplify sequences of 429 base pairs for *Salmonella* spp. DNA, 346 base pairs for bovine DNA and 220 base pairs for buffalo DNA were used to perform the proposed mPCR. dilution of the extracted template DNA. For the verification of specificity, DNAs from different animal species and microorganisms were used. After standardization of the technique, bovine and buffalo meat samples were artificially contaminated with standard *Salmonella* *tiphymurium* strain (ATCC 14028), so that the detection limit of the technique was determined and, finally, commercial samples of meat cuts commercialized in northern Brazil. Brazil were analyzed by this technique to verify the hypothesis of fraud and the presence of *Salmonella* spp. in products marketed in the target region of the study. The results showed that the proposed mPCR presented adequate sensitivity and specificity, being able to detect *Salmonella* spp. from 106 cfu/mL after 12h enrichment. In addition, it was observed that approximately 20% of the samples marketed as bovine origin were of bubaline origin, and of this total, 31% had *Salmonella* spp. It was concluded that The developed mPCRs are efficient to detect fraud in meat cuts and *Salmonella* spp. It may be an alternative to be used in the routine inspection of these products.

Keywords: authenticity, DNA analysis, economically motivated fraud

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

Figura 1 Gel de agarose 1,5% corado com GelRed™ demonstrando fraude por substituição de cortes cárneos bovinos por cortes cárneos bubalino nos estados do Pará e Amapá, norte do Brasil. **A:** L: marcador molecular 1kb; Bt: *Bos taurus* - controle positivo bovino (346pb); Bb: *Bubalus bubalis* - controle positivo bubalino (220 pb); **B1 a B5:** fraude em Belém (PA); M6 e M7: fraude em Marabá (PA); J8 a J12: fraude no Marajó (PA); C-: Controle negativo. **B:** L: marcador molecular 1kb; Bt: *Bos taurus* - controle positivo bovino (346pb); Bb: *Bubalus bubalis* - controle positivo bubalino (220 pb); **J13 a J24:** fraude no Marajó (PA); C-: Controle negativo. **C:** L: marcador molecular 1kb; Bt: *Bos taurus* - controle positivo bovino (346pb); Bb: *Bubalus bubalis* - controle positivo bubalino (220 pb); **J25 a J29:** continuação de fraude no Marajó (PA); **A30 a A35:** fraude em Macapá (AP); C-: controle negativo..... 54

CAPÍTULO 3

Figura 1 Eletroforese em gel de agarose 1,5% demonstrando os produtos da mPCR-SBb aplicada em amostras comerciais bubalinas identificando contaminação por *Salmonella* spp. **M:** marcador de peso molecular de 100pb; **Bb:** *B. bubalis*, **Sa:** *Salmonella* spp., **C+:** controle positivo (*Salmonella* spp. e *B. bubalis*) **1 a 7:** Amostras comerciais de cortes cárneos bubalinos comercializados no Pará; **C-:** controle negativo..... 79

TABELA**CAPÍTULO 1**

Tabela 1 - Consumo de carne bovina no mundo em 2018: Rank dos principais países.....

Tabela 2 - Diferentes métodos de PCR utilizados na autenticação de carne e produtos cárneos.....

CAPÍTULO 2

Tabela 1 – Distribuição dos resultados da análise de mPCR usada para detecção de fraude por substituição de cortes de carne bovina por carne de búfalo em amostras de cortes cárneos coletados em diferentes lugares nos estados do Pará e Amapá, norte do Brasil..... 55

SUMÁRIO

ESTRUTURA DA TESE.....	12
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 OBJETIVOS.....	15
2.1 OBJETIVO GERAL.....	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
CAPÍTULO 1.....	16
REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA DETECÇÃO DE FRAUDE EM CARNES E PRODUTOS CÁRNEOS: UMA REVISÃO.....	16
RESUMO.....	16
1 INTRODUÇÃO.....	17
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
3.1 Autenticidade de carnes e produtos cárneos.....	20
3.2 Reação em Cadeia da Polimerase e suas variações na detecção de fraude.....	24
3.2.1 PCR multiplex (mPCR).....	26
3.2.2 PCR em Tempo Real (qPCR).....	27
CONCLUSÃO.....	30
REFERÊNCIAS.....	31
CAPÍTULO 2.....	39
APPLICATION OF A MULTIPLEX POLYMERASE CHAIN REACTION (mPCR) ASSAY TO DETECT FRAUD BY SUBSTITUTION OF BOVINE MEAT CUTS WITH WATER BUFFALO IN NORTHERN BRAZIL.....	39
ABSTRACT.....	39
INTRODUCTION.....	40
MATERIAL AND METHODS.....	42
Materials.....	42
DNA Extraction.....	42
DNA quality and concentration.....	43
Specific primers and mPCR for gene amplification.....	43
Electrophoresis of mPCR products.....	44
Specificity and sensitivity.....	44
Application of the mPCR in samples of commercial meat.....	45
Electrophoresis of the mPCR products of the commercial samples.....	45

RESULTS AND DISCUSSION.....	46
DNA Extraction and quality.....	46
mPCR.....	46
Specificity and sensitivity.....	46
mPCR in commercial meat samples.....	48
CONCLUSION.....	50
REFERENCES.....	51
CAPÍTULO 3.....	58
APLICAÇÃO DE PCR MULTIPLEX PARA DETECÇÃO DE <i>Salmonella</i> spp. EM AMOSTRAS DE CARNE BOVINA E BUBALINA E PARA AUTENTICAÇÃO DAS ESPÉCIES CÁRNEAS.....	58
RESUMO.....	58
1 INTRODUÇÃO.....	60
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	62
2.1 Materiais.....	62
2.2 Extração de DNA.....	63
2.3 Qualidade e concentração do DNA.....	63
2.4 PCR convencional para padronização da técnica.....	64
2.5 Sequenciamento e alinhamento das sequências.....	65
2.6 Padronização das mPCRs.....	65
2.7 Eletroforese dos produtos das mPCRs.....	66
2.8 Especificidade e sensibilidade.....	66
2.9 Contaminação artificial de amostras de carne bovina e bubalina.....	67
2.10 Aplicação das mPCRs em amostras de carnes comerciais.....	68
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	68
3.1 Extração e qualidade do DNA.....	68
3.2 Sequenciamento e Alinhamento.....	68
3.3 mPCRS.....	69
3.4 Especificidade e sensibilidade.....	70
3.5 Avaliação dos ensaios de mPCR em amostras de carne bovina e de búfalo artificialmente contaminadas com <i>Salmonella</i>	70
3.6 Aplicação das mPCRs em amostras comerciais de carne.....	71
CONCLUSÃO.....	74
REFERÊNCIAS.....	74
CONCLUSÃO.....	81

ESTRUTURA DA TESE

Este estudo foi organizado em introdução geral, objetivos, capítulos em diferentes formatos por serem artigos que foram e/ou serão submetidos, aceitos ou publicados em periódicos distintos e conclusão geral.

Introdução e Objetivos: nesse tópico estão descritos a justificativa do trabalho, bem com o objetivo geral e os objetivos específicos.

Capítulo 1 – “Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detecção de fraude em carnes e produtos cárneos: uma revisão”: Esse capítulo é um artigo de revisão em preparação que será submetido na revista *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. Nesse estudo estão descritos dados envolvendo fraudes em carnes e produtos cárneos e a Aplicação da Reação em Cadeia da Polimerase como ferramenta para detecção. Esses dados foram obtidos de diferentes artigos científicos publicados em periódico e de relatórios públicos oficiais de órgãos governamentais.

Capítulo 2 – “Aplicação de uma Reação em Cadeia da Polimerase multiplex (mPCR) para detecção de fraude por substituição de cortes cárneos bovino por bubalino no Norte do Brasil”: Esse capítulo corresponde a um artigo publicado na revista *Cyta: Journal of Food*, onde estão apresentados dados referentes a a otimização de uma metodologia para extração de DNA de tecido animal utilizando solventes orgânicos e de uma mPCR para amplificação simultânea dos DNAs de bovino e bubalino. Além disso foi verificada a hipótese de fraude por substituição de cortes cárneos bovino e bubalino na região norte do Brasil.

Capítulo 3 – “Ensaio de PCR multiplex para detecção de *Salmonella* spp. em amostras de carne bovina e bubalina e autenticação das espécies cárneas”: Este capítulo é um manuscrito em preparação a ser submetido para publicação no periódico intitulado *International Journal of Food Science & Technology*. Nesse trabalho foi realizada a otimização de uma metodologia para extração de DNA capaz de extrair simultaneamente DNA animal e de *Salmonella* spp., o desenvolvimento de duas mPCR (capazes de detectar a espécie bovina e *Salmonella* spp. simultaneamente e identificar a espécie bubalina e *Salmonella* spp. em uma única reação) e o sequenciamento/alinhamento dos amplicons obtidos para a confirmação das espécies.

Conclusão Geral: Neste tópico são apontadas as principais conclusões da pesquisa.

1 INTRODUÇÃO

A pecuária de corte tem posição de destaque na economia brasileira, devido ao mercado doméstico e o externo. O Brasil possui o segundo maior rebanho bovino em nível mundial, sendo superado apenas pela Índia, que não explora a pecuária bovina com fins comerciais. Sendo assim, o Brasil recebe a classificação de país com o maior rebanho bovino comercial do mundo e maior exportador de carne bovina, em toneladas.

O referido país também se destaca na produção de búfalos, detendo o maior rebanho do ocidente, com destaque para os estados do Pará e do Amapá. Nesses locais a cadeia produtiva se encontra pouco organizada e sem estratégias de coordenação, o que torna essa atividade pouco atrativa economicamente na região.

A carne bubalina apresenta características sensoriais muito semelhantes às da carne bovina e, além disso, os padrões dos cortes comerciais das carcaças desses animais são idênticos o que faz com que quando fracionados sem nenhuma identificação específica, essa semelhança torne-se ainda maior, interferindo na diferenciação entre as carnes dessas duas espécies. Todos esses fatores contribuem para a realização de ações fraudulentas na comercialização da carne, sendo a carne bubalina comercializada como bovina em muitos locais, uma vez que o consumidor não consegue diferenciar as carnes e que a carne bubalina comumente tem menor valor comercial nesses lugares.

No que se refere ao consumo de produtos alimentícios, a percepção do consumidor quanto à qualidade de um alimento e a da indústria alimentícia pode ser diferente, visto que as necessidades dos consumidores são complexas e envolvem muitos componentes. Na visão do consumidor, o conceito de qualidade, na maioria das vezes, está baseado apenas na satisfação de características como sabor, aroma, aparência, embalagem, preço e disponibilidade, sendo as condições de segurança alimentar desconhecidas ou desconsideradas em muitos casos. Já na visão da indústria, esse conceito se estende ao conjunto de normas de produção, transporte e armazenamento, visando determinadas características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais padronizadas segundo as quais os alimentos são considerados seguros para o consumo.

Nesse sentido a qualidade dos produtos alimentares inclui a sua autenticidade, sendo esse um conceito importante para os consumidores modernos, resultando em uma pressão crescente sobre as políticas do governo e em diferentes níveis de proteção da cadeia alimentar, principalmente quanto a substituição fraudulenta de carnes superiores.

A adulteração de produtos a partir da substituição de uma espécie por outra ocorre geralmente quando existem diferenças acentuadas no preço ou na disponibilidade de matérias-primas, quer de origem nacional ou internacional, ou quando um produto derivado de uma espécie é vendido como se fosse originado a partir outra. Associado ao problema de fraude está o da contaminação da carne por patógenos, que pode ocorrer em diferentes etapas do abate e do processamento de produtos cárneos.

Entre os agentes etiológicos envolvidos em Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA's) as diferentes espécies de *Salmonella* merecem destaque. *Salmonella* spp. é um dos gêneros microbianos mais amplamente distribuídos na natureza, sendo o homem e os animais seus principais reservatórios naturais. O aumento da incidência de salmonelose provocada por alimentos contaminados demonstra que, na atualidade, apesar dos avanços tecnológicos alcançados, esse problema ainda ocorre mundialmente.

Um dos maiores desafios da área de microbiologia de alimentos na atualidade é a disponibilidade de um método eficiente para se distinguir espécies de micro-organismos associados na mesma amostra de alimento, que possa apresentar resultados seguros em um pequeno intervalo de tempo. Em alguns casos, a diferenciação se faz apenas por meio de análises fenotípicas das colônias em meios de cultivo, podendo haver falhas na especificidade. Da mesma forma, poucos testes que visem identificar fraudes estão disponíveis.

A adulteração de carnes superiores por carnes de espécies mais baratas e a contaminação desses alimentos por micro-organismo patogênicos tem se tornado comum em todo o mundo, constituindo um risco à saúde de indivíduos por causar doenças infecciosas, metabólicas ou alergias. Por estas razões o desenvolvimento de um método rápido e confiável para identificação de espécies animais e de micro-organismo em uma mesma amostra de alimento tem se tornado de grande importância e nesse sentido a PCR tem se mostrado bastante promissor por ser de alta sensibilidade podendo identificar diversas espécies animais e micro-organismo simultaneamente reduzindo custo e tempo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL:

Testar a hipótese da existência de fraudes pela venda indevida da carne bubalina em substituição da carne bovina na região norte do Brasil e pesquisar a presença de microorganismos do gênero *Salmonella* em amostras de carne bovina e bubalina comercializada nos estados do Pará e Amapá.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Capítulo 1

- Reunir informações disponíveis em periódicos acadêmicos e relatório públicos oficiais de órgãos governamentais sobre fraude envolvendo carnes e produtos cárneos e destacar a utilização da PCR e suas variações como ferramenta no controle de qualidade desses produtos.

Capítulo 2

- Otimizar uma extração de DNA de tecidos cárneos;
- Aplicar um protocolo molecular baseado em mPCR para verificar a hipótese de fraudes comerciais por substituição de cortes de carne bovina por bubalina.

Capítulo 3

- Otimizar a extração de DNA dos tecidos cárneos e *Salmonella* simultaneamente;
- Desenvolver métodos baseados na mPCR capaz de autenticar amostras de carne bovina e bubalina e simultaneamente detectar *Salmonella*.
- Aplicar a técnica em amostras comerciais para verificar sua eficiência na autenticação e verificar a hipótese de contaminação das carnes por *Salmonella* spp.

1 **CAPÍTULO 1** – Artigo de revisão a ser submetido na Revista *Comprehensive Reviews in*
2 *Food Science and Food Safety*

3
4 **Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detecção de fraude em carnes e produtos**
5 **derivados: uma revisão**

6
7 **RESUMO:** A fraude em carnes e produtos cárneos tornou-se uma preocupação importante
8 no mercado doméstico e internacional, principalmente devido ao surgimento de novos
9 mercados, aumento da população, consumo e produção de produtos processados. Em
10 muitos casos, a adulteração e/ou substituição desses alimentos ocorre de forma intencional,
11 caracterizando fraude economicamente motivada, onde espécies altamente valorizadas são
12 substituídas por espécies de menor valor como forma de obter maiores lucros. Este estudo
13 teve por objetivo analisar fraudes envolvendo carnes e produtos derivados, bem como a
14 utilização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) como ferramenta para autenticação
15 desses alimentos. Foi realizado uma pesquisa sistemática em artigos científicos publicados
16 em revistas e em relatórios oficiais de órgãos governamentais. A pesquisa revelou que a
17 fraude economicamente motivada no setor de carnes ocorre de forma generalizada em todo
18 mundo, afetando milhares de consumidores em termos de saúde, estilo de vida e convicções
19 religiosas. Em todos os estudos desenvolvidos e consultados nesse trabalho a PCR e suas
20 variações demonstraram ser métodos adequados na identificação de diferentes espécies
21 animais, podendo ser aplicados por laboratórios de controle de qualidade e serviços de
22 inspeção para avaliar possíveis adulterações na carne *in natura* e produtos processados.

23 **Palavras-Chave:** autenticação, DNA, produtos de origem animal

24
25

26 **1 Introdução**

27 A fraude em alimentos vem sendo relatada desde a antiguidade pelas civilizações
28 grega e romana, embora ocorresse de forma limitada. Com o desenvolvimento das cadeias
29 produtivas e de suprimentos o risco de fraudes se intensificou, gerando impacto em
30 populações globais e tornando a autenticidade dos alimentos comercializados uma das
31 grandes preocupações dos consumidores na atualidade (Spink and Moyer, 2011; Charlebois
32 et al., 2016).

33 O aumento dos casos de fraude alimentar está parcialmente atribuído ao crescente
34 número de estabelecimentos comerciais em nível mundial e ao surgimento novos mercados
35 emergentes, bem como ao aumento constante dos preços dos alimentos em todo o mundo
36 (Holbrook, 2013).

37 Mundialmente não existe uma definição de fraude alimentar, contudo existem
38 diferentes conceitos que se alteram conforme as normas de cada região ou país (MalaguTTI,
39 2017). No Brasil, de acordo com Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos
40 de Origem Animal do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), a fraude
41 alimentar é definida como a “alteração total ou parcial de um ou mais elementos normais do
42 produto com a intenção deliberada de estabelecer falsa impressão, substituição de um ou
43 mais elementos por outros, ou especificação na rotulagem que não condiz com o produto
44 acondicionado” e a adulteração é definida como “modificação das características iniciais das
45 matérias-primas e produtos por meio da adição de ingredientes, aditivos ou substâncias de
46 qualquer natureza com o objetivo de dissimular ou de ocultar alterações, deficiências de
47 qualidade da matéria-prima ou defeitos na elaboração de um produto (Brasil, 2017).

48 Já na União Europeia (EU) a falta de um conceito harmonizado para "fraude
49 alimentar", faz com que os Países-Membros adotem metodologias diferentes na sua

50 definição (Vaqué e Vidreras, 2018). No entanto, o artigo 8 do Regulamento nº 178/2002 do
51 Parlamento Europeu e do Conselho, de 28 de Janeiro de 2002, estabelece diretrizes para
52 proteção dos interesses dos consumidores e fornece informações para que as pessoas
53 possam escolher corretamente os alimentos que consomem. Esse regulamento visa prevenir
54 as práticas fraudulentas ou enganosas, a adulteração de gêneros alimentícios e quaisquer
55 outras práticas que possam induzir em erro o consumidor (EC, 2002).

56 Nos Estados Unidos, a agência federal Food and Drug Administration (FDA) descreve
57 fraude alimentar como a “Adulteração Economicamente Motivada”, que pode ser definida
58 como “o ato intencional em adulterar um produto através da adição ou substituição de uma
59 substância com o objetivo de aumentar o valor do produto ou reduzir o custo da produção”
60 (FDA, 2009). Esse tipo de fraude envolve produtores, fabricantes, processadores,
61 distribuidores ou varejistas de alimentos que precisam gerenciar a oferta, demanda e seus
62 concorrentes e que se utilizam de práticas ilícitas para obter lucros indevidos e negócios no
63 mercado (Albanese, 2012). Geralmente, a diferença acentuada de preços faz com que um
64 produto de menor valor comercial seja vendido com valor elevado devido as semelhanças
65 entre os produtos (Mane et al, 2012; Everstine; Spink; Kennedy, 2013).

66 Entre os diferentes tipos de fraudes envolvendo carne e produtos derivados, as
67 fraudes por adição e substituição de espécies são as mais comuns. Isso ocorre devido as
68 semelhanças sensoriais entre muitas espécies e devido ao processamento onde a carne
69 sofre modificações em suas características normais, facilitando a substituição e/ou
70 incorporação de carnes com baixo valor de mercado (Mane et al., 2012).

71 Nos últimos anos, incidentes envolvendo fraude e adulteração de alimentos
72 ocorreram em muitos países (Tognoli et al., 2011; Cawthorn; Steinman; Witthuhn, 2012;
73 Jakes et al., 2015; Meira et al., 2017) e a presença de carne de cavalo em produtos de carne

74 bovina na União Europeia revelou atos semelhantes em outros países, afetando a percepção
75 dos consumidores sobre a integridade do mercado em geral, e do setor de alimentos
76 (O'mahony, 2013; Shayan et al., 2018). Esses eventos tiveram impactos locais e
77 internacionais, levando a perdas econômicas significativas e preocupações com a saúde
78 humana.

79 Atualmente vários métodos podem ser aplicados para detectar espécies animais de
80 carne como provas químicas e físicas, cromatografia e imunoenaios. No entanto, a maioria
81 desses testes tem limitações inerentes, pois dependem de análises das proteínas, e estas
82 perdem a sua atividade biológica após a morte do animal, além de sua presença e
83 características dependerem dos tipos de células e a maioria delas sofrerem desnaturação
84 (Calvo et. al, 2002). Por isso, a maior parte destas técnicas tem sido substituída por métodos
85 moleculares baseadas em análise do DNA, sendo a PCR a de maior escolha para detectar
86 fraudes em alimentos de origem animal por sua simplicidade, alta sensibilidade e
87 reprodutibilidade (Sakaridis, 2013). O objetivo do presente artigo foi realizar uma revisão
88 abrangente sobre fraude alimentar envolvendo carne e produtos cárneos e explorar a
89 aplicação dos métodos baseados na análise de DNA para identificar a substituição e/ou
90 adição de carnes e produtos cárneos por outras espécies. Para se concentrar em estudos
91 mais recentes, a maioria dos artigos pesquisados foram publicados após o ano de 2000.

92

93 **2 Material e Métodos**

94 Para o desenvolvimento desse estudo foi realizada uma pesquisa sistemática para
95 identificar artigos científicos revisados por pares entre os anos de 2000 a 2019, sobre
96 fraudes envolvendo carnes e produtos derivados e relatório públicos oficiais de órgãos
97 governamentais disponíveis na internet.

98 As informações foram coletadas de bancos de dados como Science Direct, Scielo,
99 periódico capes, sites oficiais de governos e outros. As publicações foram selecionadas a
100 partir dos termos “fraude alimentar”, “autenticidade da carne” “fraude economicamente
101 motivada” “fraude em produtos cárneos”, “PCR”, e “análise de DNA” descritas nos títulos e
102 palavras-chave dos trabalhos.

103 A elaboração deste estudo baseou-se na leitura da bibliografia selecionada e análise
104 das informações obtidas que passaram a fazer parte do corpo deste trabalho. Destaca-se
105 que esta pesquisa se concentrou apenas na fraude intencional e na adulteração visando
106 vantagens econômicas. Estudos envolvendo fraude acidental de substâncias extrínsecas aos
107 alimentos, micro-organismos e outros contaminantes não foram incluídos.

108

109 **3 Resultados e Discussão**

110 **3.1 Autenticidade de carnes e produtos cárneos**

111 A autenticidade dos produtos de origem animal é fundamental para garantir a
112 conformidade e qualidade dos alimentos, evitando possíveis fraudes econômicas e assegurar
113 a saúde dos consumidores e suas convicções religiosas, além de ser uma exigência dos
114 órgãos reguladores de alimentos (Lohumi et al., 2015). De acordo com Lu e Fine (1995), a
115 autenticidade está relacionado à certeza de que o produto provém de fontes confiáveis, sem
116 estar sujeito a alterações, correspondendo assim às expectativas associadas ao produto.

117 O aumento da conscientização dos consumidores sobre o papel dos alimentos na
118 manutenção da saúde, principalmente no que se refere a transmissão de doenças por
119 alimentos, a percepção sobre seu papel para uma economia justa e equilibrada e a
120 compreensão sobre a diversidade cultural das pessoas e das tradições religiosas tem
121 contribuído para identificar fraude em alimentos (Bottero; Dalmaso, 2011).

122 Em geral, a autenticidade de produtos de origem animal está relacionada a
123 verificação da sua composição e características físico-químicas (Carvalho; Gennari;
124 Paschoalin, 2015), que são determinadas por métodos físicos (que se baseiam na
125 determinação da densidade, textura, cor e solubilidade) e técnicas químicas (baseadas nas
126 propriedades químicas das amostras), de acordo com Joshi, Pullala e Khan (2005).

127 Entre os produtos de origem animal, a carne é considerada um dos alimentos mais
128 consumidos no mundo de acordo o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA)
129 (USDA, 2019), conforme descrito na Tabela 1. Desta forma, as espécies cárneas *in natura*
130 e/ou produtos processados são os mais suscetíveis a sofrerem adulteração em sua
131 composição, sendo há muito tempo uma questão global, que não apenas se relaciona a
132 importação e exportação, mas também tem impacto no comercio varejista (Zhang et al.,
133 2013). A não autenticidade da carne e seus derivados pode assumir diferentes formas
134 (Nakyinsige et al., 2012), mas a principal ocorre por substituição total ou parcial de matérias-
135 primas mais nobres por outros materiais de menor qualidade e/ou valor comercial, com o
136 objetivo de aumentar os lucros, prejudicando os direitos do consumidor (Carvalho; Gennari;
137 Paschoalin, 2015). Nesse contexto, a substituição de espécies animais tem sido relatada por
138 vários autores em diversos países, tornando-se um problema generalizado (Drummond et
139 al., 2013; Mousavi et al., 2015; Huang et al., 2014; Kane e Hellberg, 2015).

140 Além disso, as fraudes ligadas a carne e seus derivados lideram os relatórios sobre
141 casos de fraude alimentar (Tahkapaa et al., 2015). No Reino Unido, em 2003, fraude
142 envolvendo o desvio de carne de aves impróprias para o consumo gerou impacto negativo
143 no setor (FSA, 2004). Já em 2013, na China, foi constatado pelo governo local a venda
144 fraudulenta de carne de rato e raposa como sendo de carneiro e bovina (O'Mahony, 2013).
145 No Brasil, em 2017, o escândalo da carne bovina processada contendo papelão gerou uma

146 das maiores crises do setor do agronegócio pecuário, com restrições de venda da carne para
147 outros países, o que gerou perdas econômicas e desconfiança por parte dos consumidores
148 (National Hog Farmer, 2017).

149 Pelo acima exposto, muitas pesquisas científicas já foram realizadas destacando
150 fraude no comércio da carne. Ayaz et al. (2006), em um estudo sobre a detecção de espécies
151 em carnes e produtos derivados verificaram que 22,2% das amostras de carne cruas
152 coletadas declaradas como bovinas eram de cavalo e/ou de veado e que produtos como
153 salsicha fermentada e salame cozido como de origem bovina continham apenas carne de
154 frango.

155 Kane e Hellber (2015), verificando a autenticidade das carnes vendidas nos Estados
156 Unidos constataram que, das 48 amostras analisadas, 10 encontravam-se fraudadas com
157 outras espécies de carnes, sendo que em duas delas foi constatada a presença de carne de
158 cavalo. O abate de cavalo para consumo humano é uma prática proibida nos Estados Unidos
159 desde de 2009 pela H.R. 503 – Lei de Prevenção da Crueldade Equina (USA, 2009).

160 No Irã, Mousavi et al. (2014) em um estudo para identificar fraude em carne moída *in*
161 *natura*, constataram que 47% das amostras coletadas continham carne de frango e 0,7%
162 carne de burro. Os autores destacam que apesar do baixo índice de adulteração por carne
163 de burro encontrado no estudo, é improvável que a adição da mesma tenha ocorrido de
164 forma acidental durante o processo de moagem, já que o fornecimento de carne de burro é
165 proibido no Irã, levando a crer que a adulteração tenha ocorrido de forma intencional e
166 motivada.

167 É importante destacar que a carne de frango tem sido frequentemente relatada
168 como substituta de outras espécies em uma variedade de produtos à base de carne.
169 Ghovvati et al. (2009) verificando a incidência de fraude em produtos industriais derivados

170 da carne, constataram que 40% das amostras de salsichas e 30% das amostras de carne a
171 frio continham carne de frango não declarada. Kitpipit, Sittichan e Thanakiatkrai (2014)
172 avaliando a autenticidade de espécies cárneas em alimentos prontos comercializados na
173 Tailândia, atestaram que dos produtos congelados a base porco, 20% eram de carne de
174 frango e aproximadamente 68% de carne a frio continha essa espécie não declarada. Além
175 disso, 62.5% de alimentos de rua e com certificação Halal que eram comercializados como
176 carne, na verdade era frango.

177 Na China, Hou Bo et al. (2015) em um estudo para avaliar fraude em produtos
178 derivados da carne, verificaram que 20% das amostras continha carne de frango não
179 declarada. Os autores também constataram a presença de outra espécie cárnea (pato) que
180 não constava no rotulo dos produtos. Outros trabalhos descrevem a presença da carne de
181 frango não declarada como substituinte total ou parcial de outras espécies (Dalsecco et al.,
182 2018, Karabasanavar et al., 2013, Tafvizi et al., 2016). Em geral os autores atribuem esses
183 casos à grande disponibilidade dessa proteína, por ser imperceptível sensorialmente e
184 principalmente devido ao seu preço, que é mais baixo do que outras espécies.

185 Fraudes envolvendo carnes e produtos derivados também foram observadas no
186 Brasil (Zhang, 2013; Drumond et al., 2013). Felkl (2014) ao verificar a autenticidade de
187 produtos cárneos, detectou que 7,40% das amostras estavam adulteradas com outras
188 espécies diferentes das descritas nos rótulos. Oliveira et al. (2018) analisando a
189 autenticidade de carne bovina moída no norte do Brasil, encontraram adulteração em 17,5%
190 dos produtos comercializados, por carne de búfalo. Da mesma forma, Dantas et al. (2019)
191 observaram fraude por substituição de cortes cárneos bovinos por bubalinos na mesma
192 região. Os autores relatam que esses casos estão relacionados a alta produção desses

193 animais na região, além da semelhança sensorial e a falta de organização da cadeia
194 produtiva bubalina.

195 Estudos abrangendo fraudes em produtos à base de carne também foram
196 observados em no Egito (El-Shewy, 2007, Abd El-Nasser, Labieb e Abd El-Aziz, 2010, Zahran e
197 Hagag, 2015) Iraque (Jaayid, 2013), África do Sul (Cawthorn et al., 2013 , D'Amato et al.,
198 2013), Canadá (Naaum et al. 2018) e Turquia (Ulca, Balta, Çağın e Senyuva, 2013) Os autores
199 constataram a presença de espécies cárneas não declaradas como carne de cavalo e burro e
200 espécies não rotuladas como carne de porco, e frango. De acordo com Espiñeira e Vieites
201 (2015) a rotulagem exata dos alimentos é de fundamental importância para a segurança
202 alimentar.

203 Na busca por informação os rótulos funcionam como auxiliares dos consumidores na
204 escolha dos produtos alimentares de acordo com suas necessidades e desejos. Desta forma,
205 os rótulos das embalagens devem conter toda a descrição referente a composição básica do
206 alimento, como lista de ingredientes incluindo a espécie animal, de acordo com os
207 regulamentos oficiais para cada produto (FAO, 2010). No entanto, Charlebois et al. (2016),
208 afirmam que a lista de ingredientes presente nos rótulos pode permanecer a mesma
209 enquanto as substituições não relatadas são feitas durante o processo de produção.

210 Por isso, a identificação precisa de espécies de carne tornou-se um elemento vital
211 nos procedimentos de controle de qualidade da carne para monitorar produtos comerciais
212 (Wang, Hang, Geng, 2019)

213

214 **3.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e suas variações na detecção de fraude**

215 Atualmente, existem diversas técnicas que podem ser utilizadas para a identificação
216 espécie-específica nos diferentes produtos de origem animal, sendo úteis na detecção de

217 práticas fraudulentas e na determinação da origem dos alimentos (Ballin, 2010). No entanto,
218 as técnicas baseadas na análise do DNA têm se tornado um dos principais mecanismos
219 empregados para se determinar a composição de diferentes produtos alimentares, com
220 destaque para Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que vem sendo utilizada por muitos
221 pesquisadores em diferentes países (Kitipit, 2013; Ali et al, 2015).

222 A PCR foi desenvolvida nos anos 80 por Kary Mullis e é um método de diagnóstico que
223 pode ser executado inteiramente in vitro, sem a utilização de células (Mullis, 1990; Bruce et
224 al., 1999). Essa técnica permite que o DNA seja multiplicado artificialmente a partir de ciclos
225 repetidos de duplicação e cuja reação é catalisada por uma enzima denominada DNA
226 polimerase. Os iniciadores utilizados delimitam a sequência do DNA a ser replicada e o
227 resultado obtido é a amplificação do material genético, num processo que imita a replicação
228 do DNA in vivo (Radwanska et al., 2002; Zulantay et al., 2004; Ferro, 2010).

229 O produto da PCR é geralmente visualizado a partir da eletroforese em gel. Essa
230 técnica consiste na separação de moléculas como proteínas, DNA e RNA, durante a aplicação
231 de uma carga elétrica, ocorrendo a migração de partículas devido à diferença de potencial,
232 que originam um conjunto de bandas. Essas bandas são visualizadas com auxílio de radiação
233 ultravioleta, que só é possível devido à adição de um composto que ao interagir com o DNA,
234 torna-se fluorescente (Oliveira, 2009).

235 A PCR é um método considerado bastante promissor em termos de velocidade, por
236 apresentar alta sensibilidade, especificidade, repetibilidade e baixo intervalo de detecção,
237 caracterizando um avanço dos métodos de diagnóstico para identificar fraude em alimentos
238 (Egito et al., 2006; Tafvizi, Hashemzadegan, 2016). Além disso, a tecnologia da PCR é muito
239 flexível, permitindo modificações que possibilitam o seu emprego na análise de uma grande
240 variedade de amostras, assim variações dessa técnica foram desenvolvidas para

241 aumentarem as possibilidades de pesquisas e diagnósticos, bem como melhorar a
242 sensibilidade do método. Na tabela 2 são demonstrados diferentes métodos de PCR
243 utilizados na identificação de espécies em carne e produtos cárneos. [Inserir Tabela 2 aqui].

244

245 *3.2.1 PCR multiplex (mPCR)*

246 A PCR multiplex é uma variação da técnica convencional em que dois ou mais alvos
247 são simultaneamente amplificados na mesma reação devido à utilização de vários pares de
248 primers específicos para cada espécie a ser identificada (Xu et al., 2012). Essa técnica foi
249 desenvolvida com a finalidade de promover a diferenciação entre várias espécies ou gêneros
250 microbianos simultaneamente (Oliveira et al., 2007) e atualmente tem sido muito utilizada
251 para verificar a autenticidade de produtos alimentícios (Ghovvati, 2009; Zha, 2010; Al-
252 Taghlubeena, 2019).

253 Uma das vantagens da técnica é a maior rapidez na obtenção do resultado, assim
254 como maior economia de reagentes, quando comparada a PCR convencional. Outra
255 vantagem é que, como vários loci são amplificados simultaneamente na mesma reação, há
256 necessidade de uma quantidade menor de ácido nucleico para o diagnóstico (Rosseti; Silva;
257 Rodrigues, 2006; Xu et al., 2012).

258 Kitpipit et al. (2014) propuseram uma PCR multiplex para identificar diferentes
259 espécies de carne, em produtos alimentares. O ensaio amplificou simultaneamente DNA de
260 carnes de porco, cordeiro/carneiro, frango, avestruz, cavalo e bovina com produtos
261 específicos de PCR de 100, 119, 133, 155, 253 e 311 pares de base, respectivamente. Os
262 autores afirmam que a técnica pode ser usada em uma variedade de carnes e produtos
263 incluindo crus e processados.

264 Alikord et al. (2017) visando autenticar produtos de carne Halal, desenvolveram uma
265 PCR multiplex para identificar espécies de carne de cavalo, burro e porco. Os autores
266 projetaram primers para amplificação de sequências de DNA mitocondrial específicas de
267 cada espécie e prepararam mostras com diferentes combinações de carne. Os resultados
268 mostraram que as espécies de carne foram determinadas com precisão em todas as
269 combinações por PCR multiplex, e a sensibilidade do método foi de 0,001 ng. Os autores
270 concluíram que a técnica é adequada para uso em produtos de carne industrial.

271 Mais recentemente Liu et al. (2019) projetaram um ensaio de PCR multiplex mediada
272 por primers universais para detectar adulteração em carne de carneiro por outras espécies
273 de carne. Eles desenvolveram nove diferentes iniciadores e identificaram quatro tipos de
274 produtos de carne. Os resultados obtidos por eles mostraram que os primers em múltiplos
275 sistemas de PCR mediados por primers universais podem ser usados para a rápida
276 identificação de carne de rato, raposa, pato e ovelha em produtos de carne de carneiro. Eles
277 observaram ainda que a sensibilidade de detecção alcançou 0,05 ng / μ L. A identificação de
278 amostras de alimentos validou o valor prático desse método. Eles concluíram que a técnica
279 pode ser usada para identificar rapidamente ingredientes de ratos, raposas e patos em
280 produtos de carne de carneiro.

281

282 3.2.2 PCR em Tempo Real (qPCR)

283 A PCR em tempo real representa um grande avanço na área da biotecnologia. Ela
284 permite a quantificação precisa dos produtos de PCR durante a fase exponencial da
285 amplificação, diferente da PCR convencional, onde o resultado é qualitativo e o resultado é
286 obtido apenas no final dos ciclos de amplificação propostos (Gabert et al., 2003).

287 A qPCR envolve a utilização de fluoróforos, dois deles (SYBR[®] Green e TaqMan) são
288 amplamente utilizados. O SYBR[®] Green é uma molécula com propriedade corante que se
289 intercala na fita dupla de DNA. Durante os ciclos consecutivos da PCR, a quantidade de DNA
290 de fita dupla aumenta de modo exponencial, elevando-se, assim, a quantidade de SYBR[®]
291 Green intercalado e, como consequência, a fluorescência emitida é detectada, já a sonda
292 TaqMan tem sido amplamente empregada e utiliza a atividade exonucleásica 5'-3' da Taq[®]
293 DNA polimerase. Nesse a polimerase promove a síntese de novas cadeias de material
294 genético a partir dos primers e conseqüentemente cliva a sonda correspondente,
295 propiciando um aumento do sinal fluorescente. Esse será captado a cada ciclo pelo detector
296 até atingir um limiar, região onde todas as amostras podem ser analisadas (Almeida, Saddi,
297 2007; Nascimento et al., 2013).

298 Kesmen, Gulluce, Sahin e Yetim (2009) desenvolveram um ensaio de PCR em tempo
299 real baseado em TaqMan para identificar espécies animais e sua quantificação em produtos
300 de carne crua e cozida. Os autores projetaram iniciadores específicos e sonda a partir dos
301 genes mitocondriais ND2, ND5 e ATP 6-8 para burro, porco e cavalo, respectivamente. De
302 acordo com os resultados obtidos pelos autores não foi observada reação cruzada entre os
303 sistemas de sonda dos iniciadores específicos para as espécies de burro e porco e para as
304 espécies não-alvo (bovinos, ovinos, galinhas e perus). No entanto eles destacaram que uma
305 reação cruzada foi observada entre o conjunto de sonda do iniciador específico da espécie
306 de cavalo e 100 ng de DNA de porco no nível ct 33.01 (correspondendo a 0.01 ng de DNA de
307 cavalo). O ensaio desenvolvido por esses autores permitiu a detecção de 0.0001 ng de DNA
308 modelo de carne pura para cada espécie investigada e misturas experimentais de carne. Eles
309 sugerem que a técnica pode ser utilizada em estudos de rotina para identificar espécies de
310 carne em produtos de carne crua e cozida.

311 Soares et al. (2013) propuseram uma PCR em tempo real baseada no corante SYBR
312 Green para a detectar quantitativamente carne de porco em produtos processados. Para
313 isso, eles realizaram misturas binárias de carne contendo quantidades conhecidas de carne
314 de porco na carne de aves. As amostras foram usadas para obter um modelo de calibração
315 normalizado de 0,1 a 25% com alta correlação linear e eficiência de PCR. De acordo com os
316 resultados obtidos, o método revelou alta especificidade por meio da análise da curva de
317 fusão, sendo validado com sucesso através da sua aplicação em misturas não conhecidas de
318 carne, o que confirmou sua adequação para a determinação da carne suína.

319 Em estudo realizado por Iwobi et al (2015) foi relatado uma abordagem quantitativa
320 de PCR em tempo real triplex para a quantificação de carne em produtos de carne picada.
321 Nesse estudo as frações de carne bovina e suína foram quantificadas empregando
322 sequências de iniciador e sonda que reconhecem especificamente componentes de vaca e
323 porco, no contexto da miostatina, uma sequência universal comumente encontrada em
324 mamíferos e espécies de aves. Os resultados obtidos no estudo revelaram limite de 20
325 equivalentes no genoma, enquanto a medição da incerteza foi determinada em 1,83%.

326 Meira et al. (2017) desenvolvendo uma qPCR para determinar a adulteração de carne
327 de cavalo em alimentos processados, verificaram alta sensibilidade e especificidade, de até
328 0,0001% (p / p) de carne de cavalo em misturas de carne bovina e 0,1 pg de DNA de cavalo,
329 em carnes cruas e autoclavadas. Já Kaltenbrunner, Hochegger e Cicchna (2018) projetaram
330 um ensaio de PCR em tempo real para a autenticação de veados sika (*Cervus nippon*) e seus
331 produtos. O sistema de iniciador/sonda amplificou um fragmento de 71 pb do precursor de
332 *kapa-caseínagene*. O ensaio de PCR em tempo real não mostrou reatividade cruzada com 19
333 espécies de animais e 49 de plantas testadas. Os autores avaliaram a precisão da técnica por

334 meio da análise de misturas de DNA e isolados de DNA de misturas de extratos de carne e
335 misturas de carne. Em geral, as recuperações estavam na faixa de 70 a 130%.

336 De modo geral a eficiência das reações de PCR e de suas variações está
337 diretamente relacionada às novas ferramentas de bioinformática. Nos últimos anos, os
338 genomas de várias espécies de organismos foram sequenciados, aumentando assim o
339 número de sequências de DNA disponíveis nos bancos de dados, o que facilita a
340 determinação de sequências alvo que sejam exclusivas à determinadas espécies, permitindo
341 sua identificação de forma precisa (Tenenbaum, 2016). Além disso, as referidas ferramentas
342 tornam possível que se realize análises *in silico*, minimizando erros e aumentando a precisão
343 de análises laboratoriais pela prévia execução e estimativas de resultados em análises
344 computacionais (Heather e Chain, 2016).

345

346 **Conclusão**

347 Esta pesquisa mostrou que a fraude alimentar envolvendo carnes e produtos
348 derivados ocorre a nível mundial de forma generalizada, sendo a fraude por adição e
349 substituição de espécies muito frequente, o que caracteriza ato intencional com o objetivo
350 de obter vantagens econômicas. A prevenção da fraude e adulteração desses alimentos
351 exige monitoramento e desenvolvimento de métodos eficazes, rápidos e de baixo custo para
352 detecção de fraudes. As técnicas baseadas na Reação em Cadeia da Polimerase são muito
353 eficientes e podem ser recomendado para empresas de controle de qualidade, visando a
354 aplicação de controles mais rigorosos sobre produtos de carne industrial, em benefício dos
355 consumidores.

356

357 **Referências**

- 358 Al-qassab, T., Kamkar, A., Shayan, P., & Khanjari, A. (2019). *Mislabeled in Cooked Sausage is*
359 *a Seriously Increasingly Problem in Food Safety Abstract: 13(1), 101–113.*
360 <https://doi.org/10.22059/ijvm.2018.267894.1004935>
- 361 Al-taghlubee, D., Misaghi, A., Shayan, P., Akhondzadeh Basti, A., Gandomi, H., & Shayan, D.
362 (2019). Comparison of Two Multiplex PCR Systems for Meat Species Authentication.
363 *Journal of Food Quality and Hazards Control, 6, 8–15.*
364 <https://doi.org/10.18502/jfqhc.6.1.453>
- 365 Alikord, M., Keramat, J., Kadivar, M., Momtaz, H., Eshtiaghi, M. N., & Homayouni-Rad, A.
366 (2017). Multiplex-PCR As a Rapid and Sensitive Method for Identification of Meat
367 Species in Halal-Meat Products. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture, 8(3),*
368 *8–9.* <https://doi.org/10.2174/2212798409666170113151213>
- 369 Alimentos, C. De. (2019). *Revistas e Livros Métodos moleculares complementares detectam*
370 *espécies não declaradas em embutidos em mercados de varejo no Canadá Start tracking*
371 *your Reading History.* 1–17.
- 372 Albanese, J.S. (2012). Deciphering the linkages between organized crime and transnational
373 crime. *Journal of International Affairs, v.66, n.1, p.1-16, 2012.*
- 374 Ayaz, Y., Ayaz, N. D., & Erol, I. Detection of species in meat and meat products using enzyme-
375 linked immunosorbent assay. *Journal Muscle Foods, v.17, n.2, p. 214-220, 2006.*
- 376 Al-taghlubee, D.; Misaghi, A.; Shayan, P.; Basti, A.A.; Gandomi, H.; Shayan, D. Comparison of
377 Two Multiplex PCR Systems for Meat Species Authentication. *Journal of Food Quality*
378 *and Hazards Control. v.6, n.1, p.8-15. 2019*
- 379 Bottero, M. T.; Dalmaso, A. Animal species identification in food products: Evolution of
380 biomolecular methods. *The Veterinary Journal, v.190, n.1, p.34-38, 2011.*
- 381 Bruce, A.; Bray, D.; Johnson, A.; Lewis, J.; Rass, M.; Roberts, K.; Walter, P. Fundamentos da
382 biologia celular: uma introdução à biologia molecular da célula. Porto Alegre: Artes
383 Médicas Sul, 1999.
- 384 Branch, P. (2019). *Identificação específica de fraudes de frango e soja em hambúrgueres*
385 *premium usando o método multiplex- Palavras-chave.* 1–22.
- 386 Carvalho, A.C.S.; Gennari, S.M.; Paschoalin, V.M.F. Consumption of animal products and
387 frauds: DNA-based methods for the investigation of authenticity and traceability in
388 dairy and meat-derived products – a review. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci., São Paulo, v.*
389 *52, n. 3, p. 183-194, 2015.*
- 390 Cawthorn, D.M.; Steinman, H.A.; Witthuhn, R.C. (2013). Evaluation of the 16S and 12S rRNA
391 genes as universal markers for the identification of commercial fish species in South
392 Africa. *Gene, v.491, p40-48. 2013.*
- 393 Charlebois, S.; Schwab, A.; Henn, R.; Huck, C.W. (2016). Food fraud: An exploratory study for
394 measuring consumer perception towards mislabeled food products and influence on
395 selfauthentication intentions. *Trends in Food Science & Technology, v.50, p.211-218,*
396 *2016.*
- 397 Cheng, J. H., Chou, H. T., Lee, M. S., & Sheu, S. C. (2016). Development of qualitative and
398 quantitative PCR analysis for meat adulteration from RNA samples. *Food Chemistry,*
399 *192, 336–342.* <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.094>
- 400 Dalia, Z., & Sanaa, H. (2015). Use of molecular biology techniques in the detection of fraud
401 meat in the Egyptian market. *African Journal of Biotechnology, 14(5), 360–364.*
402 <https://doi.org/10.5897/ajb2014.14297>

- 403 Dalsecco, L. S., Palhares, R. M., Oliveira, P. C., Teixeira, L. V., Drummond, M. G., & de
404 Oliveira, D. A. A. (2018). A Fast and Reliable Real-Time PCR Method for Detection of Ten
405 Animal Species in Meat Products. *Journal of Food Science*, 83(2), 258–265.
406 <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14001>
- 407 Dantas, V.V., Cardoso, G.F.F.; Araújo, W.S.C.; Oliveira, A.C.S., et al. (2019). Application of a
408 multiplex polymerase chain reaction (mPCR) assay to detect fraud by substitution of
409 bovine meat cuts with water buffalo meat in Northern Brazil. *CYTA – Journal of Food*.
410 v.17, 2019. <https://doi.org/10.1080/19476337.2019.1650832>.
- 411 Drummond, M.G. (2013). Brasil, B.S.A.F., Dalsecco, L.S., Brasil, R.S.A.F., Teixeira, L.V.,
412 Oliveira, D.A.A. A versatile real-time PCR method to quantify bovine contamination in
413 buffalo products. *Food Control*, v.29, p.131-137, 2013.
- 414 El-Shazly, E., El-Shinawy, N., & Tolba, K. (2016). Molecular assay using PCR based technology
415 to identify fraud and adulteration of some meat products. *Benha Veterinary Medical*
416 *Journal*, 31(2), 33–39. <https://doi.org/10.21608/bvmj.2016.31257>
- 417 Erhan; İPLİKÇİOĞLU ÇİL, K. (2017). Identification of meat species in different types of meat
418 products by PCR. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 64(4), 261–266.
419 https://doi.org/10.1501/vetfak_0000002808
- 420 Everstine, K. (2013). Economically motivated adulteration: Implications for food protection
421 and alternate approaches to detection. *ProQuest Dissertations and Theses*, 148.
422 Retrieved from
423 http://sfx.scholarsportal.info/guelph/docview/1419461507?accountid=11233%5Cnhttp://sfx.scholarsportal.info/guelph?url_ver=Z39.88-2004&rft_val_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:dissertation&genre=dissertations+%2526+theses&sid=ProQ:ProQuest+Dissertations+%2526+Theses+A%252
- 427 Egito, A.S.; Rosinha, G.M.S; Laguna, L.E.; Miclo, L.; Girardet, J.L. Método Eletroforético
428 rápido para detecção da adulteração do leite caprino com leite bovino. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.58, n5, p.932-939, 2006.
- 430 Everstine, K.; Spink, J.; Kennedy, S. Economically motivated adulteration (EMA) of food:
431 common characteristics of EMA incidents. *Journal of Food Protection*, v.76, n.4, p.723-
432 735. 2013.
- 433 Floren, C., Wiedemann, I., Brenig, B., Schütz, E., & Beck, J. (2015). Species identification and
434 quantification in meat and meat products using droplet digital PCR (ddPCR). *Food Chemistry*, 173, 1054–1058. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.138>
- 436 Fuseini, A., Wotton, S. B., Knowles, T. G., & Hadley, P. J. (2017). Halal Meat Fraud and Safety
437 Issues in the UK: a Review in the Context of the European Union. *Food Ethics*, 1(2), 127–
438 142. <https://doi.org/10.1007/s41055-017-0009-1>
- 439 IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES BOVINA, SUÍNA E CANINA em amostras de carne através da
440 reação em cadeia pela polimerase (PCR) CONTROLE. - PDF.pdf. (n.d.).
- 441 FDA, Food and Drug Administration. Economically Motivated Adulteration. [Boletim nº.
442 FDA-2009-N-0166] Versão eletrônica. Federal Register, 74, 15497. Disponível
443 em:<http://edocket.access.gpo.gov/2009/pdf/E9--7843.pdf> . consultado em 23 de abril
444 de 2018.
- 445 Ferro, E. S. Biotecnologia translacional: hemopressina e outros peptídeos
446 intracelulares. *Estudos Avançado.*, São Paulo , v. 24, n. 70, p. 109-121, 2010 .
- 447 Ghovvati, S.; Nassiri, M.R.; Mirhoseini, S.Z.; Moussavi, A.H.; Javadmanesh, A. Fraud
448 identification in industrial meat products by multiplex PCR assay. *Food Control*, v.20,
449 p.696-699, 2009.

- 450 Gräfe, D., Ehlers, B., Mäde, D., Ellerbroek, L., Seidler, T., & Johne, R. (2017). Detection and
451 genome characterization of bovine polyomaviruses in beef muscle and ground beef
452 samples from Germany. *International Journal of Food Microbiology*, *241*, 168–172.
453 <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.024>
- 454 Huang, Y.-R.; Yin, M.-C.; Hsieh, Y.-L.; Yeh, Y.-H.; Yang, Y.-C.; Chung, Y. L., et al. Authentication
455 of consumer fraud in Taiwanese fish products by molecular trace evidence and
456 forensically informative nucleotide sequencing. *Food Research International*. v.55, p.
457 294-302. 2014
- 458 Jakes, W.; Gerdova, A.; Defernez, M.; Watson, A.D.; Mccallum, C.; Limer, E., et al.(2015).
459 Authentication of beef versus horse meat using 60 MHz 1H NMR spectroscopy *Food*
460 *Chemistry*. v.175, p. 1-9. 2015.
- 461 Joshi, V. C.; Pullala, V. S.; Khan, I. A. (2005). Rapid and easy identification of *Illicium verum*
462 Hook. f. and its adulterant *Illicium anisatum* Linn. by fluorescent microscopy and gas
463 chromatography. *Journal of Association of Official Analytical Chemists International*,
464 v.88, p.703-706, 2005.
- 465 Jen, J. J.-S., & Chen, J. (2017). *Food Safety in China: Science, Technology, Management and*
466 *Regulation*. 10.
- 467 Kaltenbrunner, M., Hochegger, R., & Cichna-Markl, M. (2018). Sika deer (*Cervus nippon*)-
468 specific real-time PCR method to detect fraudulent labelling of meat and meat
469 products. *Scientific Reports*, *8*(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25299-7>
- 470 Karabasanavar, N. S., Singh, S. P., Kumar, D., & Shebannavar, S. N. (2013). Development and
471 application of highly specific PCR for detection of chicken (*Gallus gallus*) meat
472 adulteration. *European Food Research and Technology*, *236*(1), 129–134.
473 <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1868-7>
- 474 Kesmen, Z., Gulluce, A., Sahin, F., & Yetim, H. (2009). Identification of meat species by
475 TaqMan-based real-time PCR assay. *Meat Science*, *82*(4), 444–449.
476 <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.02.019>
- 477 Kane, D.E., Hellberg, R.S. (2015) Identification of species in ground meat products sold on the
478 U.S. commercial market using DNA-based methods. *Food Control*, v.59, p.158-163,
479 2015.
- 480 Kitpipit, T.; Sittichan, K.; Thanakiatkrai, P. (2014). Direct-multiplex PCR assay for meat species
481 identification in food products. *Food Chemistry*. v.163, p.77-82. 2014
- 482 Kim, Mi ju, & Kim, H. Y. (2017). Species identification of commercial jerky products in food
483 and feed using direct pentaplex PCR assay. *Food Control*, *78*, 1–6.
484 <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.02.027>
- 485 Kim, Miju, Yoo, I., Lee, S. Y., Hong, Y., & Kim, H. Y. (2016). Quantitative detection of pork in
486 commercial meat products by TaqMan® real-time PCR assay targeting the
487 mitochondrial D-loop region. *Food Chemistry*, *210*, 102–106.
488 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.084>
- 489 Kumar, A., Kumar, R. R., Sharma, B. D., Mendiratta, S. K., Gokulakrishnan, P., Kumar, D., &
490 Sharma, D. (2015). Authentication of goat (*Capra hircus*) meat using PCR amplification
491 of mitochondrial cytochrome b gene. *Small Ruminant Research*, *131*, 17–20.
492 <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2015.07.016>
- 493 Li, T. T., Jalbani, Y. M., Zhang, G. L., Zhao, Z. Y., Wang, Z. Y., Zhao, X. Y., & Chen, A. L. (2019).
494 Detection of goat meat adulteration by real-time PCR based on a reference primer.
495 *Food Chemistry*, *277*, 554–557. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.009>
- 496 Liu, P. (2009). Voluntary environmental and social labels in the food sector. In *Innovations in*

- 497 *Food Labelling*. <https://doi.org/10.1533/9781845697594.117>
- 498 Liu, W., Wang, X., Tao, J., Xi, B., Xue, M., & Sun, W. (2019). A multiplex PCR assay mediated
499 by universal primers for the detection of adulterated meat in mutton. *Journal of Food*
500 *Protection*, 82(2), 325–330. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-18-302>
- 501 Lohumi, S.; Lee, S.; Lee, H.; Cho, B.K. (2015). A review of vibrational spectroscopic techniques
502 for the detection of food authenticity and adulteration. *Trends in Food Science &*
503 *Technology*, v.46, p. 85-98, 2015.
- 504 Lu, S.; Fine, G.A. (1995) The Presentation of Ethnic Authenticity: Chinese Food as a Social
505 Accomplishment. *The Sociological Quarterly*. v.36, n.3, p.535-553, 1995.
- 506 Matins, B., Ribeiro, F. A., & Queiroz, E. O. (2012). 2 3 4 5.
- 507 Omran, G. A., Tolba, A. O., El-Sharkawy, E. E. E. D., Abdel-Aziz, D. M., & Ahmed, H. Y. (2019).
508 Species DNA-based identification for detection of processed meat adulteration: is there
509 a role of human short tandem repeats (STRs)? *Egyptian Journal of Forensic Sciences*,
510 9(1), 0–7. <https://doi.org/10.1186/s41935-019-0121-y>
- 511 Mane, B. G.; Mendiratta, S. K.; Tiwari, A. K., Bhilegaokar, K. N. (2012). Detection of
512 Adulteration of Meat and Meat Products with Buffalo Meat Employing Polymerase
513 Chain Reaction Assay in Food Analytical Methods. *Food Analytical Methods*, v. 5, n.2, p
514 296-300, 2012.
- 515 Meira, L.; Costa, J.; Villa, C.; Ramos, F.; Oliveira, M.P.P.; Mafra, I. (2017). EvaGreen real-time
516 PCR to determine horse meat adulteration in processed foods. *LWT - Food Science and*
517 *Technology*. v.75, p.408-416, 2017.
- 518 Mousavi, S. M., Jahed Khaniki, G., Eskandari, S., Rabiei, M., Mirab Samiee, S., & Mehdizadeh,
519 M. (2015). Applicability of species-specific polymerase chain reaction for fraud
520 identification in raw ground meat commercially sold in Iran. *Journal of Food*
521 *Composition and Analysis*, v.40, p.47–51. 2015.
- 522 Mullis, K.B. Target amplification for DNA analysis the polymerase chain reaction. *Ann Biol*
523 *Clin*. v.48, n.8, p.579-582, 1990.
- 524 National Hog Farmer. (2017). Brazil police targets JBS, BRF in food fraud probe. 2017.
525 Available in: [https://www.nationalhogfarmer.com/marketing/brazil-police-targets-](https://www.nationalhogfarmer.com/marketing/brazil-police-targets-jbs-brf-food-fraud-probe)
526 [jbs-brf-food-fraud-probe](https://www.nationalhogfarmer.com/marketing/brazil-police-targets-jbs-brf-food-fraud-probe). Acesso em: 18 de outubro de 2017.
- 527 O’Mahony, P. (2013). Finding horse meat in beef products - a global problem. *QJM*. v.106,
528 n.6, p.595–597. 2013
- 529 Oliveira, M.C.S.; Regitano, L.C.A.; Roese, A.D.; Anthonisen, D.G.; Patrocínio, E.; Parma, M.M.;
530 Scagliusi, S.M.M.; Timóteo, W.H.B.; Jardim, S.N. (2007). *Fundamentos teórico-práticos*
531 *e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em*
532 *cadeia da polimerase – São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste. 43 p., 2007*
- 533 Oliveira, A.R.R. *Quantificação de ADN nuclear e ADN mitocondrial por PCR em tempo real*.
534 Tese de mestrado, Universidade de Lisboa – Faculdade de Ciências. Lisboa, 131 pp.
535 2009.
- 536 Oliveira, A. C. DO S. DE, Pedroso, S. C. DA S., Cardilli, D. J., Leite, F. P. L., Ferreira, G. V. L.,
537 Silva, A. S. DA, ... Monteiro, R. DO S. D. (2018). Brazilian ground beef authentication
538 by multiplex polymerase chain reaction. *Ciência Rural*, 48(2), 1–7.
- 539 Radwanska, M.; Claes, F.; Magez, S.; Magnus, E.; Perez-Morga, D.; Pays, E. (2002). Novel
540 primer sequences for polymerase chain reaction–based detection of. *Tropical*
541 *Medicine*. v.67, n3, p.289-295. 2002.
- 542 Rosseti, M.L.; Silva, C.M.D.D.; Rodrigues, J.J.S. *Doenças infecciosas: diagnóstico molecular*. Rio
543 de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

- 544 Shayan, P.; Al-Taghlabee, D.; Misaghi, A.; Shayan, D.; Gandomi, H.; Basti, A.A.; Alghassab, T.;
545 Kamkar, A.; Khanjari, A.; Eckert, B. (2018). An innovative reverse line blot for
546 simultaneous detection of animal species in food. *European Food Research and*
547 *Technology*. v.244, p.1711–1717. 2018
- 548 Skouridou, V., Tomaso, H., Rau, J., Bashammakh, A. S., El-Shahawi, M. S., Alyoubi, A. O., &
549 O’Sullivan, C. K. (2019). Duplex PCR-ELONA for the detection of pork adulteration in
550 meat products. In *Food Chemistry* (Vol. 287).
551 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.02.095>
- 552 Spink, J.; Moyer, D. C. Defining the public health threat of food fraud. *Journal of Food*
553 *Science*, v.76, n.9. 2011.
- 554 Soares, S., Amaral, J. S., Oliveira, M. B. P. P., & Mafra, I. (2013). A SYBR Green real-time PCR
555 assay to detect and quantify pork meat in processed poultry meat products. *Meat*
556 *Science*, 94(1), 115–120. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.12.012>
- 557 Tisza, Á., Csikós, Á., Simon, Á., Gulyás, G., Jávör, A., & Czeglédi, L. (2016). Identification of
558 poultry species using polymerase chain reaction-single strand conformation
559 polymorphism (PCR-SSCP) and capillary electrophoresis-single strand conformation
560 polymorphism (CE-SSCP) methods. *Food Control*, 59, 430–438.
561 <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.06.006>
- 562 Trivedi, D. K., Hollywood, K. A., Rattray, N. J. W., Ward, H., Trivedi, D. K., Greenwood, J., ...
563 Goodacre, R. (2016). Meat, the metabolites: An integrated metabolite profiling and
564 lipidomics approach for the detection of the adulteration of beef with pork. *Analyst*,
565 141(7), 2155–2164. <https://doi.org/10.1039/c6an00108d>
- 566 Thanakiatkrai, P., & Kitpipit, T. (2017). Meat species identification by two direct-triplex real-
567 time PCR assays using low resolution melting. *Food Chemistry*, 233, 144–150.
568 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.090>
- 569 Tsimidou, M. Z., Ordoudi, S. A., Nenadis, N., & Mourtzinos, I. (2015). Food Fraud. In
570 *Encyclopedia of Food and Health* (1st ed.). [https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00010-6)
571 [2.00010-6](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00010-6)
- 572 T€Ahk€Ap€A€A, S.; Maijala, R.; Korkeala, H.; Nevas, M. (2015). Patterns of food frauds and
573 adulterations reported in the EU rapid alert system for food and feed and in Finland.
574 *Food Control*. v.47, p.175-184, 2015.
- 575 Tafvizi, F.; Hashemzadegan, M. (2016). Specific identification of chicken and soybean fraud in
576 premium burgers using multiplex-PCR method. *Journal Food Science and Technology*.
577 v.53, n1, p.816–823. 2016.
- 578 USA – Lei H.R. 503 – Prevenção da Crueldade Equina (To amend title 18, United States Code,
579 to prohibit certain conduct relating to the use of horses for human consumption) -
580 111TH CONGRESS – USA, 2009.
- 581 Wang, L.; Hang, X.; Geng, R. (2018). Molecular detection of adulteration in commercial
582 buffalo meat products by multiplex PCR assay. *Food Sci. Technol.* v.39 n.2, Campinas,
583 2018.
- 584 Wang, W., Liu, J., Zhang, Q., Zhou, X., & Liu, B. (2019). Multiplex PCR assay for identification
585 and quantification of bovine and equine in minced meats using novel specific nuclear
586 DNA sequences. *Food Control*, 105(May), 29–37.
587 <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.05.016>
- 588 Wallace, C. A. (2018). Food Fraud and Food Defence. *Food Safety for the 21st Century*, 265–
589 282. <https://doi.org/10.1002/9781119053569.ch13>
- 590 Xu, W.; Zhai, Z.; Huang, K.; Zhang, N.; Yuan, Y.; Shang, Y.; Luo, Y. (2012). A novel universal

- 591 primer-Multiplex-PCR method with sequencing gel electrophoresis analysis. *PLoS ONE*.
592 v.7, n.1. 2012.
- 593 Xu, R., Wei, S., Zhou, G., Ren, J., Liu, Z., Tang, S., ... Wu, X. (2018). Multiplex TaqMan locked
594 nucleic acid real-time PCR for the differential identification of various meat and meat
595 products. *Meat Science*, 137(November 2017), 41–46.
596 <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.11.003>
- 597 Yacoub, H. A., & Sadek, M. A. (2017a). Identification of fraud (with pig stuffs) in chicken-
598 processed meat through information of mitochondrial cytochrome b. *Mitochondrial*
599 *DNA Part A: DNA Mapping, Sequencing, and Analysis*, 28(6), 855–859.
600 <https://doi.org/10.1080/24701394.2016.1197220>
- 601 Yacoub, H. A., & Sadek, M. A. (2017b). Identification of fraud (with pig stuffs) in chicken-
602 processed meat through information of mitochondrial cytochrome b. *Mitochondrial*
603 *DNA Part A: DNA Mapping, Sequencing, and Analysis*, 28(6), 855–859.
604 <https://doi.org/10.1080/24701394.2016.1197220>
- 605 日本保育協会. (2014). *No Title 保育士のキャリアパスに関する調査報告*.
- 606 Zha, D.; Xing, X.; Yang, F. (2010). A multiplex PCR assay for fraud identification of deer
607 products. *Food Control*. v.21, p.1402–1407. 2010.
- 608 Zhao, J., Zhang, T., Liu, Y., Wang, X., Zhang, L., Ku, T., & Quek, S. Y. (2018). Qualitative and
609 quantitative assessment of DNA quality of frozen beef based on DNA yield, gel
610 electrophoresis and PCR amplification and their correlations to beef quality. *Food*
611 *Chemistry*, 260, 160–165. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.073>
- 612 Zhao, L., Wang, K., Yan, C., Xiao, J., Wu, H., Zhang, H., ... Zheng, W. (2020). A PCR-based
613 lateral flow assay for the detection of Turkey ingredient in food products. *Food Control*,
614 107(March 2019), 106774. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106774>
- 615 Zulantay, I., Honores, P., Solari, A., Apt, W., Ortiz, S., Osuna, A., Rojas, A., López, B., Sanches,
616 G., Use of polymerase chain reaction (PCR) and hybridization assays to detect
617 *Trypanosoma cruzi* in chronic chagasic patients treated with itraconazole or
618 allopurinol. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v.48, p.253–257. 2004.
- 619
620
621
622
623
624
625
626
627
628

629 **Tabelas**

630 Tabela 1. Consumo de carne bovina no mundo em 2018: Rank dos principais países

Rank	País	Consumo (toneladas)	% mundial
1	Estados Unidos	12.592.00	20.67
2	China	8.530.00	14.00
3	Brasil	7.935.00	13.03
4	União Europeia	7.825.00	12.85
5	Argentina	2.565.00	4.21
6	Índia	2.400.00	3.94
7	México	1.860.00	3.05
8	Paquistão	1.736.00	2.85
9	Rússia	1.685.00	2.77
10	Turquia	1.500.00	2.46

631 Fonte: USDA 2019. Adaptada de Beefpoint.

632

633

634

635

636

637

638

639

640

641

642

643

644

645

646

647

648

649

650 Tabela 2. Diferentes métodos de PCR utilizados na autenticação de carne e produtos cárneos

Autor	Técnica	Espécies alvo
Ano – 2019		
Skouridou et al.	Duplex PCR-ELONA	Suína
Wang et al.	PCR multiplex quantitativa e qualitativa	Bovina e Equina
Li et al.	PCR em tempo real	Cabra
Ano – 2018		
Zhao et al.	PCR quantitativa em tempo real	Bovina
Xu et al.	MLNA-RT-PCR	Pato, porco, carne bovina e frango
Zhao et al.	Ensaio de fluxo lateral baseado em PCR (PCR-LFA)	Peru
Ano – 2017		
Kim & Kim	PCR pentaplex direto	Porco, frango, carne bovina e pato
Grafe et al.	PCR	Bovina
Thanakiatkrai & Kitpipit	PCR em tempo real triplex direto	Porco, bovina, cavalo, pato, avestruz e frango
Ano – 2016		
Kim et al.	PCR em tempo real TaqMan®	Porco
Cheng et al.	PCR baseada em Mrna	Frango, porco, cabra, carne e avestruz.
Tisza et al.	Polimorfismo de conformação de cadeia única de reação em cadeia da polimerase (PCR-SSCP)	Aves de capoeira
Ano – 2015		
Ho bo et al.	PCR multiplex	Frango, pato e ganso
Kumar et al.	PCR convencional	Cabra (<i>Capra hircus</i>)
Druml, Hohegger & Cichna-Markl	PCR em tempo real dúplex	veados (<i>A. capreolus</i>) e soma de gamos, veados e veados sika

651

652

Application of a multiplex polymerase chain reaction (mPCR) assay to detect fraud by substitution of bovine meat cuts with water buffalo meat in Northern Brazil**ABSTRACT**

The adulteration of meat products can affect the confidence of consumers and the market, leading to negative impacts on the economy. Accordingly, product authenticity has become an important issue in modern society. Therefore, our study aimed to optimize the extraction of DNA from meat and use multiplex polymerase chain reaction (mPCR) to determine the incidence of fraud by substitution of bovine meat cuts with water buffalo meat in the states of Pará and Amapá, Northern Brazil. The mPCR protocol used primers that amplify sequences of 346 base pairs of bovine DNA and 220 base pairs of buffalo DNA. To assess the sensitivity of the technique, a standardized PCR assay was performed using the template DNA extracted and diluted from 10^0 to 10^{-10} in PCR-grade water. Next, 161 samples of meat cuts marketed as bovine (rump) origin were collected in the states of Pará and Amapá, Northern Brazil. The mPCR assays demonstrated good specificity of the primers used. The sensitivity test amplified bovine and buffalo DNA fragments down to the 10^{-2} dilution. The results demonstrated fraud by substitution of beef by water buffalo meat in 21.7% of samples, demonstrating that this act does occur intentionally for economic gains.

KEYWORDS: DNA extraction, multiplex PCR, Species identification, Food fraud

Introduction

Food fraud is prevalent worldwide, and recent studies have focused on identifying fraud in meat products (Ahmed et al., 2018; Mousavi et al., 2015; Veneza, da Silva, Sampaio, Schneider, & Gomes, 2017). In Brazil, the adulteration of food products, mainly meat products, has affected consumer confidence and the international market, leading to negative impacts on the Brazilian economy (National Hog Farmer, 2017). Consequently, product authenticity has become an important issue in modern society (Premanandh, 2013; Shehata et al., 2017).

Brazil is a major player in cattle breeding, possessing the largest commercial herd in the world, and Brazilian beef is exported to several countries (Gomes, Feijó, & Chiari, 2017; IBGE, 2017). The variety of soil, climate, and ecosystems makes cattle breeding considerably heterogeneous in the country, being able to meet the demands of different national or international markets (Oaigen et al., 2011).

Northern Brazil is an important livestock region, being responsible for 22.6% of cattle production. Furthermore, this region is also important for breeding buffaloes, owning 66% of the national herd, with the states of Pará and Amapá leading the country (IBGE, 2017). However, the water buffalo production chain in this region is relatively unorganized and lacks coordination strategies, with buffalo meat being undervalued and cheaper than cattle meat (Marques et al., 2015).

The low value of buffalo meat is due to lack of adequate legislation for the production of water buffaloes in the country. Accordingly, animals are slaughtered and sold like cattle in many places (Teixeira, Teixeira, Caldeira, Bastianetto, & Oliveira, 2012). Similarities in characteristics such as color, aroma, flavor, and texture between beef and buffalo meat, besides the identical commercial cuts between these animals, makes it difficult for consumers to identify the difference between the products at the time of purchase (Joele et

al., 2017; Lira et al., 2005). Moreover, although Brazil has a tracking system (SISBOV), it has many limitations in its application (IBGE, 2017; Rodrigues & Nantes, 2010). All these factors contribute to the occurrence of commercial fraud by substitution of beef meat with water buffalo meat (Marques et al., 2016).

Food fraud is a threat to health and consumer confidence, in addition to generating economic losses to businesses, with loss of market share (Ballin, 2010; Van Ruth, Luning, Silvis, Yang & Huisman, 2018). Fraud in the meat industry and retail markets occurs mainly by replacing the meat of one species with another undeclared species that is usually cheaper, in order to obtain higher profits (Kyrova et al., 2017).

One of the techniques being studied and recommended for identifying food fraud is polymerase chain reaction (PCR), which is prominent owing to its rapidity and efficiency. This method is considered to be very promising because it is highly sensitive, as minimal amounts of DNA can be detected using species-specific primers (Egito et al., 2006).

Several studies have demonstrated the efficiency of PCR in detecting adulteration in meat products (Amaral, Santos, Oliveira, & Mafra, 2017; Oliveira et al., 2018; Quinto, Tinoco, & Hellberg, 2016; Xu et al., 2018), and some studies using multiplex PCR (mPCR) have already been developed for detecting bovine and buffalo species in different products, such as milk (Darwish et al., 2009), cheese (López-Calleja et al., 2005), minced meat (Oliveira et al. 2015), and raw and processed products (Wang, Hang, & Geng, 2018). However, additional research involving detection of fraud by substitutions in commercially available *in natura* meat cuts are needed, particularly in predominantly agricultural countries such as Brazil, which supply meat to various markets. Furthermore, the majority of scientific studies involving fraud are related to meat byproducts. Thus, fraud that is detected in animal byproducts may be directly related to fraud by substitution of meat cuts.

Given the important issues related to consumer protection, health, and future implications of Brazilian beef in local and international trade, the present study aimed to optimize a meat DNA extraction methodology and apply a molecular protocol based on mPCR to verify the occurrence of commercial fraud by the replacement of meat cuts labelled and presented as beef with water buffalo meat in the states of Pará and Amapá, Northern Brazil.

Material and Methods

Materials

DNA from the species *Bos taurus* and *Bubalus bubalis*, obtained from samples of bovine and buffalo meat, respectively, were collected and labelled in a slaughterhouse registered by the Federal Inspection Service (SIF) of Brazil.

DNA extraction

DNA extraction was performed using the Wizard® Promega extraction kit, according to the manufacturer's instructions, with modifications. Accordingly, 0.3 g of each meat sample was weighed in a vial, then 800 µL of lysis solution and 10 µL of proteinase K were added. The samples were incubated in a water bath at 56 °C overnight (14 h) and centrifuged at $12.000 \times g$ for 10 min. To optimize the separation and precipitation of protein, 700 µL of phenol-chloroform (1:1) was added, incubated on ice for 5 min, and an additional centrifugation was performed at $14.000 \times g$ for 20 min. Four hundred microliters of the supernatant was transferred to a new vial containing 600 µL of isopropanol, which was then centrifuged at $14.000 \times g$ for 1 min. The supernatant was completely discarded, and 600 µL of 70% ethanol was added and centrifuged at $14.000 \times g$ for 1 min. The supernatant was again discarded and the vials were dried in an oven at 37 °C for 30 min. DNA samples were

hydrated with 100 μL TE buffer solution (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) and stored at -18°C until use. Additionally, a reagent blank was included with each set of extracted samples as negative control.

DNA quality and concentration

The quality of the extracted DNA was analyzed by 1% agarose gel electrophoresis in TBE buffer (Tris-Borate-EDTA 0.5X), stained with non-mutagenic GelRed TM fluorescent dye, run in TBE buffer 0.5X at 110V and visualized in a transilluminator under ultraviolet light coupled to Image LabTM Software (Biorad). The nucleic acid concentration was determined using a NanoDrop[®] spectrophotometer.

Specific primers and mPCR for gene amplification

The mPCR methodology was performed as described by Darwish et al. (2009), with modifications described by Oliveira et al. (2015). For this purpose, primers were used to amplify specific sequences of the species *B. bubalis* 12SBUF-REV2 (TTCATAATAACTTTCGTGTTGTTGGGTGT), *B. taurus* 12SBT-REV2 (AAATAGGGTTAGATGCACTGAATCCAT), and primers that amplify common sequences to the two species 12SM-FW (CTAGAGGAGCCTGTTCTATAATCGATA) described by López-Calleja et al. (2005), which amplify fragments of 346 bp for *B. taurus* and 220 bp for *B. bubalis*. The primers were prepared according to the manufacturer's instructions (Ludwing Biotec[®]), and eluted in TE buffer pH 8.0 to a concentration of 100 pmol μL^{-1} .

The mPCR mix was run in a final volume of 25 μL containing: 2.5 μL of 10X buffer solution (100 mM Tris-HCl and 500 mM KCl), 0.75 μL of MgCl_2 (50 mM), 0.5 μL of dNTP (10 mM mix), 1.0 μL containing 5 pmol of each primer, 3.0 μL of bovine and buffalo DNA template at a concentration of 100 ng μL^{-1} each, and 0.5 μL of Taq DNA polymerase (1 U μL^{-1}).

¹). Ultra-pure water (11.75 μL) was added to reach the final volume. A negative control of the reaction was performed by replacing DNA with ultra-pure water.

The reactions were performed in a thermocycler (Applied Biosystems VERITI® 96) programmed for an initial denaturation at 93 °C for 3 min, then 30 cycles of denaturation at 93 °C for 30 s, annealing at 56 °C for 30 s and extension at 72 °C for 30 s, plus a final extension at 72 °C for 10 min.

Electrophoresis of mPCR products

The amplified fragments were homogenized in 1 μL of GelRed™ dye and electrophoresed in a 1.5% agarose gel, run in 0.5X TBE buffer at 110 V. Results were analyzed with the aid of a photo documentation equipment under ultraviolet light associated with Image Lab™ Software (Biorad).

Specificity and sensitivity

The specificity of the test was assessed by applying the reaction to four other species: swine (*Sus scrofa domesticus*), sheep (*Ovis aries*), domestic fowl (*Gallus domesticus*), and salmon (*Salmo salar*), purchased and certified directly in slaughterhouses supervised by the SIF in Brazil. The DNA of the samples was extracted according to the protocol described above.

The sensitivity of the technique was evaluated by serially diluting the DNA of target species in triplicate from an initial concentration of 223 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ (beef) and 231 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ (buffalo) diluted up to a concentration of 10^{-10} in Tris-EDTA buffer. These dilutions were tested by the proposed methodology to determine the minimum concentration that can be detected by the technique.

Application of the mPCR in samples of commercial meat

A total of 161 commercial samples of meat cuts labelled as cattle from different suppliers were collected from butchers (n = 52), free-trade stalls (n = 57), supermarkets (n = 14), and meat stalls (n = 38). The samples were collected in the state of Amapá (Macapá) and in the state of Pará (Belém, Marabá, Marajó, and Castanhal), which together account for the largest buffalo production in Brazil and the largest bovine production in the northern region of the country, according to the Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE) (IBGE, 2017). Due to the scarcity of published data, the sample number was calculated taking into account the district number of each locality, considering an estimated prevalence of fraud ranging from 1–50% determined according to the method proposed by Barbetta (2002) and Spiegel, Schiller, & Srinivasan (2004) for a 95% confidence interval and a tolerable sampling error of 5%, with a total of 49 samples from Belém, 38 from Marabá, 32 from Marajó, 28 from Castanhal, and 14 from Macapá.

The samples were collected randomly in their original packaging, simulating actual purchasing conditions by the consumer. They were then stored in a refrigerated container and forwarded to the laboratory of Hygiene and Food Quality of the Institute of Veterinary Medicine of the Federal University of Pará - Campus Castanhal, where their origin was registered and the sample was then stored at -18 °C until analysis.

Electrophoresis of the mPCR products of the commercial samples

The extraction of DNA and the mPCR reaction were carried out as described above. For each electrophoresis run, a negative control and a bovine and a buffalo positive control of amplicons obtained from mPCR were used, which were homogenized in 1 µL of GelRed™ dye and subjected to 1.5% agarose gel electrophoresis, run in 0.5X TBE buffer. Results were

analyzed with the aid of a transilluminator under ultraviolet light coupled to Image Lab™ Software (Biorad).

Results and Discussion

DNA extraction and Quality

The optimization of the extraction technique ensured genomic DNA with a mean concentration of $223 \pm 3.6 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ (bovine) and $231 \pm 2.6 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ (buffalo). According to Marengoni, Machado, and Gasparino (2006), studies that optimize the extraction of good quality DNA are important in the field of molecular biology. Scorsato and Telles (2011) assert that isolating nucleic acids from tissues with sufficient quantity, purity, and integrity is essential for ensuring that the desired regions are amplified. Extraction of DNA using proteinase K in the digestion buffer and phenol-chloroform in the purification step resulted in material with satisfactory quantity and purity for the amplification reaction.

mPCR

The results demonstrated that the protocol adopted enabled the simultaneous amplification of several genes. Although the primers have already been used by other authors for identifying fraud in milk, cheese, and meats (López-Calleja et al., 2005; Oliveira et al., 2018; Silva et al., 2015), this is the first time they have been used for identifying fraud in commercially available whole meat cuts, which suggests that they may also be used to detect *B. taurus* and *B. bubalis* DNA in other food products.

Specificity and sensitivity

The specificity test showed that our mPCR protocol did not amplify DNA from the species *S. scrofa domesticus*, *O. aries*, *G. domesticus*, and *S. salar* from samples analyzed in

this study. According to Ali et al. (2015), this is related to the specific binding ability of the set of primers to the target sequences under study. Rashid et al. (2015) stated that mPCR may have reduced efficiency or even fail at amplification because of the inability of the primer to anneal to their respective binding regions. Oliveira et al. (2018) used the same primers to verify the authenticity of minced meat and found no cross-reaction in the specificity test.

The sensitivity of the mPCR demonstrated that this technique was able to simultaneously amplify DNA from cattle (*B. taurus*) and buffalo (*B. bubalis*) up to a dilution of 10^{-2} (2.23 ng μL^{-1} and 2.31 ng μL^{-1} , respectively). The results show that this range is adequate to identify the DNA of these meat species using the mPCR conditions proposed in this study. A similar result was found by Oliveira et al. (2015) for buffalo meat using the same primers, in which the detection limit was 2.15 ng μL^{-1} . However, the outcome for beef was superior, with a sensitivity of 0.041 ng μL^{-1} .

Although the sensitivity of the proposed mPCR was adequate, better results were obtained by other authors working with different meat species, such as Hou et al. (2015) who reported a sensitivity of 0.05 ng μL^{-1} for DNA from chicken, ducks, and geese, Fang and Zhang (2016) who observed a detection limit of 0.1 ng μL^{-1} for murine DNA (mouse or rat) in meat products, and Qin, Hong, Kim (2016) who detected a limit of 0.005 ng μL^{-1} for beef (*B. taurus*), duck (*Anas platyrhynchos*), and lamb (*O. aries*). Nevertheless, Oliveira et al. (2015) reported that the variation in sensitivity is a natural phenomenon of mPCR depending on the species involved, target gene, and fragment size. Thus, although specificity and sensitivity tests have already been performed in other studies, we decided to perform them again in our study since we used a different DNA extraction methodology and different concentrations of mPCR reagents.

mPCR in commercial meat samples

The results obtained from the mPCR performed in samples of meat cuts sold commercially in the North region of Brazil (Pará and Amapá) are shown in Figure 1. [Figure 1 near here]

Approximately 21.7% (35/161) of the samples labelled and presented as bovine meat cuts were actually water buffalo meat cuts, indicating fraud by substitution. Of these samples, 18% (29/35) were from the state of Pará and 3.7% (6/35) from the state of Amapá. Table 1 shows the distribution of the results of the samples analyzed. [Table 1 near here]

In a study performed to detect different species in meat and meat byproducts, Ayaz et al. (2006) found that 22.2% of samples of raw meat declared as bovine were actually horse meat and/or venison. Similarly, Kane and Hellberg (2016), examined the authenticity of meat sold on the commercial market in the United States also found that, of the 48 samples analyzed, 10 were substituted with other species of meat.

The results obtained corroborate data obtained by Oliveira et al. (2018) and Silva et al. (2015), demonstrating that adulteration of food products with undeclared species is widespread in Brazil, indicating economically motivated fraud. Hossain et al. (2017) reported that the motivation for adulteration stems from a company's interest in obtaining a growing profit from improper sale of similar but cheaper items. According to Fang and Zhang (2016), besides distorting market rules, this practice threatens food security and can affect people's health.

Of the locations with a higher incidence of fraud by substituting beef meat cuts with water buffalo meat, Marajó (PA) and Macapá (AP) lead the ranking in the studied region, probably because these regions possess a larger number of buffaloes than other localities. Unlike other places like Egypt, Vietnam, and the European Union, in which buffalo meat is valued, in Brazil, especially in the northern region, this material presents a low commercial

value, being 20% cheaper than beef, according to Marques et al. (2016). Hossain et al. (2017) found similar results when analyzing the authenticity of meat products in Malaysia, and identified the total replacement of beef by buffalo, as this is cheaper.

In the North Region of Brazil, the wide availability of water buffaloes and the lack of specific regulation for the slaughter and marketing of buffalo meat mean that these animals are usually slaughtered clandestinely or in slaughterhouses that do not fulfill minimum requirements of sanitary legislation, contributing to fraudulent actions. According to Brasil (1990), illegal slaughter is considered a crime in the country for undermining consumer relations. In addition, [Omotosho](#) et al. (2016) report that this type of practice directly influences the quality of meat and has implications for public health, since there may be a risk of transmitting zoonoses, such as listeriosis, staphylococcal infections, and salmonellosis, among others.

The fragility of the buffalo production chain in most regions of Brazil contributes to these animals being registered, slaughtered, and marketed as beef. Food fraud is considered a crime in Brazil according to the Penal Code (Brazil, 1940), because it undermines public health. According to Santos et al. (2016) one way to contain these fraudulent actions would be to organize the sector, standardization, and valuation of water buffalo meat in Brazil, which is currently a significant challenge.

Regarding the percentage of fraud found by establishment type, 54% (19/35) were obtained from butchers, followed by 40% (14/35) from free-trade markets, and 6% (2/35) from supermarkets. According to Santos et al. (2011) and Martins and Ferreira (2018), butchers and free-trade markets are the locations most prone to fraud, given the ease in obtaining products without verifying the origin and the lack of effective inspection by regulatory bodies in these establishments. To change this, the authorities need to invest in surveillance and implement control measures to reduce the risks of this vulnerability. These

measures include improving the program for verifying the origin of meat available in the market and offering tools that make it possible to verify the authenticity of the products marketed, such as the application of molecular techniques.

The data found in this study are concerning, since the replacement of beef meat cuts with water buffalo meat in the Brazilian market can directly affect the lifestyle of individuals and can generate a serious problem to consumers who are allergic to other types of meat as described by Ali et al. (2012) and Sentandreu and Sentandreu (2014). Therefore, correct information about the authenticity of foods contained on labels is essential to ensure consumer safety. Thus, molecular techniques, such as PCR and its variations, are being established to generate rapid and reliable results for authenticating meat species in food products.

Conclusion

The results of this study demonstrate that the fraud by substitution of beef meat cuts with water buffalo meat occurs frequently and intentionally in the northern region of Brazil to increase economic gains, despite the fact that Brazilian legislation does not permit the counterfeiting of food products with undeclared species.

The results of this study are significant since the northern region of Brazil is a potential producer of meat products for both domestic and international markets, requiring more effective surveillance in order to contain these acts of fraud throughout the country and to ensure consumer protection and the credibility of the country in the meat export market.

The mPCR protocol applied in this study was able to detect the species *B. taurus* and *B. bubalis* in whole meat cuts without nonspecific pairings of the primers, and may serve as an alternative for the routine surveillance of these products.

Acknowledgments

We gratefully acknowledge the help and assistance provided by the Dean of Research and Graduate Studies of the Federal University of the State of Pará (PROPESP) and the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, Brazil).

Declaration of interest

The authors declare that have no conflict of interest that might constitute an embarrassment to the publication of this article submitted to CyTA-Journal of Food.

References

- Ahmed, N., Sangale, D., Tiknaik, A., Prakash, B., Hange, R., Sanil, R., ... Khedkar, G. (2018). Authentication of origin of meat species processed under various Indian culinary procedures using DNA barcoding. *Food Control*, *90*, 259–265. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.02.012>
- Ali, M. E., Hashim, U., Kashif, M., Mustafa, S., Che Man, Y. B., & Abd Hamid, S. B. (2012). Development of swine-specific DNA markers for biosensor-based halal authentication. *Genetics and Molecular Research*, *11*(2), 1762–1772. <https://doi.org/10.4238/2012.June.29.9>
- Ali, Md Equb, Razzak, M. A., Hamid, S. B. A., Rahman, M. M., Amin, M. Al, Rashid, N. R. A., & Asing. (2015). Multiplex PCR assay for the detection of five meat species forbidden in Islamic foods. *Food Chemistry*, *177*, 214–224. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.098>
- Amaral, J. S., Santos, G., Oliveira, M. B. P. P., & Mafra, I. (2017). Quantitative detection of pork meat by evagreen real-time PCR to assess the authenticity of processed meat products. *Food Control*, *72*, 53–61. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.07.029>
- Ayaz, Y., Ayaz, N. D., & Erol, I. (2006). Detection of species in meat and meat products using enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Muscle Foods*, *17*(2), 214–220. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4573.2006.00046.x>
- Ballin, N. Z. (2010). Authentication of meat and meat products. *Meat Science*, *86*(3), 577–587. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.06.001>
- Barbetta, P. A. (2002). Estatística aplicada às ciências sociais. In *Editora da UFSC*. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

- Brasil. (1940). Código penal brasileiro. *Revista Dos Tribunais Online*.
- Brasil. (1990). Crime contra as relações de consumo. Art. 7º, IX. Lei nº 8.137. *Diário Oficial da União*.
- Darwish, S. F., Allam, A., & Amin, A. S. (2009). Evaluation of PCR assay for detection of cow's milk in water buffalo's milk. *World Applied Sciences Journal*, 7(4), 461–467.
- Egito, A. S., Rosinha, G. M. S., Laguna, L. E., Miclo, L., Girardet, J. M., & Gaillard, J. L. (2006). Fast electrophoretic detection method of adulteration of caprine milk by bovine milk. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*, 58(5), 932–939. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352006000500032>
- Fang, X., & Zhang, C. (2016). Detection of adulterated murine components in meat products by TaqMan real-time PCR. *Food Chemistry*, 192, 485–490. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.020>
- Gomes, R. da C., Feijó, G. L. D., & Chiari, L. (2017). Evolução e qualidade da pecuária brasileira. *Embrapa*, 4.
- Hossain, M. A. M., Ali, M. E., Hamid, S. B. A., Asing, Mustafa, S., Desa, M. N. M., & Zaidul, I. S. M. (2017). Targeting double genes in multiplex PCR for discriminating bovine, buffalo and porcine materials in food chain. *Food Control*, 73, 175–184. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.08.008>
- Hou, B., Meng, X., Zhang, L., Guo, J., Li, S., & Jin, H. (2015). Development of a sensitive and specific multiplex PCR method for the simultaneous detection of chicken, duck and goose DNA in meat products. *Meat Science*, 101, 90–94. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.11.007>
- IBGE. (2017). Pesquisa pecuária municipal. *Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística*, 45, 17. <https://doi.org/ISSN 0101-4234>
- Joele, M. R. S. P., Lourenço, L. F. H., Lourenço Júnior, J. B., Araújo, G. S., Budel, J. C. C., & Garcia, A. R. (2017). Meat quality of buffaloes finished in traditional or silvopastoral system in the Brazilian Eastern Amazon. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(6), 1740–1745. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7922>
- Kane, D. E., & Hellberg, R. S. (2016). Identification of species in ground meat products sold on the U.S. commercial market using DNA-based methods. *Food Control*, 59, 158–163. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.05.020>
- Kyrova, V., Surmanova, P., Ostry, V., Rehurkova, I., Ruprich, J., & Jechova, M. (2017). Sea fish fraud? a confirmation of gadoid species food labelling. *British Food Journal*, 119(1), 122–130. <https://doi.org/10.1108/BFJ-03-2016-0113>

- Lira, G. M., Filho, J. M., Torres, P., Cabral, A., Maria, A., Vasconcelos, A., ... Silva, M. C. (2005). Centesimal composition, caloric value, level of cholesterol, and fatty acid profile of the meat from buffalo (*Bubalis bubalis*) breeding in the area of São Luiz do Quitunde-AL. *Rev Inst Adolfo Lutz*, *64*(1), 31–38.
- López-Calleja, I., González Alonso, I., Fajardo, V., Rodríguez, M. A., Hernández, P. E., García, T., & Martín, R. (2005). PCR detection of cows' milk in water buffalo milk and mozzarella cheese. *International Dairy Journal*, *15*(11), 1122–1129. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.12.003>
- Marengoni, N. G., Machado, M. R. F., & Gasparino, E. (2006). Extraction of genomic DNA from solid tissues of teleostei fish. *Semina: Ciências Agrárias*, *27*(1), 99. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2006v27n1p99>
- Marques, C. S. S., Oaigen, R. P., de Moraes, C. M., dos Santos, M. A. S., de Brito Lourenço Júnior, J., & Abel, I. (2016). Segmentation of the buffalo meat consumer market in Belém, Pará, Brazil. *Revista Brasileira de Zootecnia*, *45*(6), 336–344. <https://doi.org/10.1590/S1806-92902016000600008>
- Marques, C. S. S., Oaigen, R. P., Moraes, C. M. de, Souza, M. A. S., Júnior, J. de B. L., & Abel, I. (2015). Profile of consumers of buffalo meat in Belem, Para State, Brazil. *Acta Veterinaria Brasilica*, *9*(2), 126–133.
- Martins, A. G., & Ferreira, A. C. S. (2018). Characterization sanitary hygienic conditions of free fairs cities of Macapá and Santana – AP. *Revista Arquivos Científicos (IMMES)*, *1*(1), 28–35. <https://doi.org/10.5935/2595-4407/rac.immes.v1n1p28-35>
- Mousavi, S. M., Jahed Khaniki, G., Eskandari, S., Rabiei, M., Mirab Samiee, S., & Mehdizadeh, M. (2015). Applicability of species-specific polymerase chain reaction for fraud identification in raw ground meat commercially sold in Iran. *Journal of Food Composition and Analysis*, *40*, 47–51. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2014.12.009>
- National Hog Farmer. Brazil police targets JBS, BRF in food fraud probe. Available in: <https://www.nationalhogfarmer.com/marketing/brazil-police-targets-jbs-brf-food-fraud-probe>
- Oaigen, R. P., Barcellos, J. O. J., Canozzi, M. E. A., Christofari, L. F., Soares, J. C. dos R., & Alves, C. O. (2011). Internal competitiveness in beef cattle activity in the State of Rio Grande do Sul Ricardo. *Ciência Rural*, *41*(6), 1102–1107. <https://doi.org/10.1590/s0103-84782011005000068>
- Oliveira, A. C. D. S. De, Ferreira, B. C. A., Virgínia, G., Cardoso, F., Silva, C. L., Silva, A. S. Da, ... Moraes, C. M. De. (2015). Evaluation of a multiplex PCR for detection of a fraud

- in the minced beef meat by adding buffalo meat RIALA6/1671. *Rev Inst Adolfo Lutz*, 74(4), 371–379.
- Oliveira, A. C. do S. de, Pedroso, S. C. da S., Cardilli, D. J., Leite, F. P. L., Ferreira, G. V. L., Silva, A. S. da, ... Monteiro, R. do S. D. (2018). Brazilian ground beef authentication by multiplex polymerase chain reaction. *Ciência Rural*, 48(2), 1–7. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20160574>
- Omotosho, O. O., Emikpe, B. O., Lasisi, O. T., & Oladunjoye, O. V. (2016). Pig slaughtering in Southwestern Nigeria: peculiarities, animal welfare concerns and public health implications. *African Journal of Infectious Diseases*, 10(2), 146–155. <https://doi.org/10.21010/ajid.v10i2.11>
- Premanandh, J. (2013). Horse meat scandal - a wake-up call for regulatory authorities. *Food Control*, 34(2), 568–569. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.05.033>
- Qin, P., Hong, Y., & Kim, H. Y. (2016). Multiplex-PCR assay for simultaneous identification of lamb, beef and duck in raw and heat-Treated meat mixtures. *Journal of Food Safety*, 36(3), 367–374. <https://doi.org/10.1111/jfs.12252>
- Quinto, C. A., Tinoco, R., & Hellberg, R. S. (2016). DNA barcoding reveals mislabeling of game meat species on the U.S. commercial market. *Food Control*, 59, 386–392. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.05.043>
- Rashid, N. R. A., Ali, M. E., Hamid, S. B. A., Rahman, M. M., Razzak, M. A., Asing, & Amin, M. Al. (2015). A suitable method for the detection of a potential fraud of bringing macaque monkey meat into the food chain. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 32(7), 1013–1022. <https://doi.org/10.1080/19440049.2015.1039073>
- Rodrigues, L. C., & Nantes, J. F. D. (2010). Rastreabilidade na cadeia produtiva da carne bovina: situação atual , dificuldades e perspectivas para o Brasil. *Informações Econômicas*, 40(6), 31–41.
- Santos, A. B. dos, Moura, C. L. de, & Camara, L. B. (2011). Determination of authenticity of honey sold in free and fair trade popular. *Brazilian Educational Technology: Research and Learning*, 2(3), 135–147.
- Santos, C. L. R. dos, Júnior, J. B. dos S., Cunha, M. C. da, Nunes, S. R. F., Bezerra, D. C., Júnior, J. R. de S. T., & Chaves, N. P. (2016). Technological and organizational level of the production chain of cutting in buffaloes Maranhão state. *Arquivos Do Instituto Biológico*, 83(0), 1–8. <https://doi.org/10.1590/1808-1657000022014>
- Scorsato, A. P., & Telles, J. E. Q. (2011). Factors that affect the quality of DNA extracted

- from biological samples stored in paraffin blocks. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 47(5), 541–548. <https://doi.org/10.1590/s1676-24442011000500008>
- Sentandreu, M. Á., & Sentandreu, E. (2014). Authenticity of meat products: tools against fraud. *Food Research International*, 60, 19–29. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.03.030>
- Shehata, H. R., Li, J., Chen, S., Redda, H., Cheng, S., Tabujara, N., ... Hanner, R. (2017). Droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR) assays integrated with an internal control for quantification of bovine, porcine, chicken and turkey species in food and feed. *PLoS ONE*, 12(8), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182872>
- Silva, C. L., Sales, G. A., Neto, J. G. D. S., Silva, J. D. S. E., Lara, A. P. D. S. S. De, Lima, S. C. G. De, ... Moraes, C. M. De. (2015). Detection of fraud of cow milk addition into the commercially Reaction (PCR) available buffalo cheese samples by multiplex Polymerase Chain. *Rev Inst Adolfo Lutz*, 74(1), 21–29.
- Spiegel, M. R., Schiller, J., & Srinivasan, R. A. (2004). Testes de Hipóteses e Significância. In *Probabilidade e estatística* (pp. 222–271). Bookman.
- Teixeira, L. V., Teixeira, C. S., Caldeira, L. G. M., Bastianetto, E., & Oliveira, D. A. A. (2012). Extração de DNA e avaliação da composição espécie-específica de queijos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 64(3), 721–726. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352012000300025>
- Van Ruth, S. M., Luning, P. A., Silvis, I. C. J., Yang, Y., & Huisman, W. (2018). Differences in fraud vulnerability in various food supply chains and their tiers. *Food Control*, 84, 375–381. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.08.020>
- Veneza, I., da Silva, R., Sampaio, I., Schneider, H., & Gomes, G. (2017). Molecular protocol for authentication of snappers (Lutjanidae-Perciformes) based on multiplex PCR. *Food Chemistry*, 232, 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.007>
- Wang, L., Hang, X., & Geng, R. (2018). Molecular detection of adulteration in commercial buffalo meat products by multiplex PCR assay. *Food Science and Technology*, 2061, 1–5. <https://doi.org/10.1590/fst.28717>
- Xu, R., Wei, S., Zhou, G., Ren, J., Liu, Z., Tang, S., ... Wu, X. (2018). Multiplex TaqMan locked nucleic acid real-time PCR for the differential identification of various meat and meat products. *Meat Science*, 137(October 2017), 41–46. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.11.003>

Figure legend

Figure 1.

Agarose gel (1.5%) stained with GelRed™, demonstrating fraud by substitution of bovine meat cuts with water buffalo meat in the states of Pará and Amapá, Northern Brazil. **A:** L: 1-kb molecular marker; Bt: *Bos taurus* - bovine positive control (346 bp); B1: *Bubalus bubalis* - positive buffalo control (220 bp); **B1 to B5:** fraud in Belém (PA); M6 and M7: fraud in Marabá (PA); J8 to J12: fraud in the Marajó (PA); C-: Negative control. **B:** L: 1-kb molecular marker; Bt: *B. taurus* - bovine positive control (346 bp); B1: *B. bubalis* - positive buffalo control (220 bp); **J13 to J24:** fraud in the Marajó (PA); C-: Negative control. **C:** L: 1-kb molecular marker; Bt: *B. taurus* - bovine positive control (346 bp); B1: *B. bubalis* - positive buffalo control (220 bp); **J25 to J29:** continued fraud in the Marajó (PA); **A30 to A35:** fraud in Macapá (AP); C-: negative control.

Figura 1.

Gel de agarosa (1.5%) teñido con GelRed™ demostrando fraude por substitución de cortes de carne bovina por carne de búfalo en los estados de Pará y Amapá, Norte de Brasil. **A:** L: marcador molecular 1kb; Bt: *Bos taurus* – control positivo bovino (346pb); Bb: *Bubalus bubalis* – control positivo búfalo (220 pb); **B1 a B5:** fraude en Belém (PA); **M6 a M7:** fraude en Marabá (PA); **J8 a J12:** fraude en el Marajó (PA); C-: Control negativo. **B:** L: marcador molecular 1kb; Bt: *Bos taurus* – control positivo bovino (346pb); Bb: *Bubalus bubalis* – control positivo búfalo (220 pb); **J13 a J24:** fraude en el Marajó (PA); C-: Control negativo. **C:** L: marcador molecular 1kb; Bt: *Bos taurus* – control positivo bovino (346pb); Bb: *Bubalus bubalis* – control positivo búfalo (220 pb); **J25 a J29** continuación de fraude en el la Marajó (PA); **A30 a A35:** fraude en Macapá (AP); C-: control negativo.

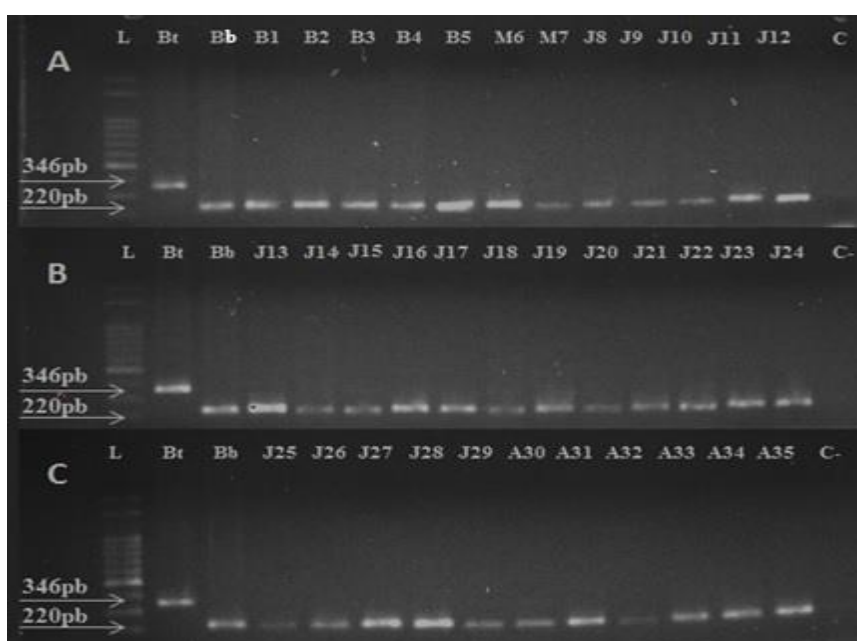


Table 1. Distribution of the results of the mPCR analysis used to detect fraud by replacement of bovine meat cuts with buffalo meat in samples of meat cuts collected from different locations in the states of Pará and Amapá, Northern Brazil.

Tabla 1. Distribución de los resultados del análisis de mPCR usado para la detección de fraude por sustitución de cortes de carne bovina por carne de búfalo en muestras de cortes de carne recolectados em diferentes lugares em los estados de Pará y Amapá, norte de Brasil.

Locations	DNA samples positive for beef (%)	DNA samples positive for buffalo (%)	Total samples (%)
Belém (PA)	44 (27.3)	5 (3.1)	49 (30.4)
Marabá (PA)	36 (22.4)	2 (1.2)	38 (23.6)
Marajó (PA)	10 (6.2)	22 (13.7)	32 (19.9)
Castanhal (PA)	28 (17.4)	0 (0.0)	28 (17.4)
Macapá (AP)	8 (5.0)	6 (3.7)	14 (8.7)
Total	126 (78.3)	35 (21.7)	161 (100.0)

Aplicação de PCR multiplex para detecção de *Salmonella* spp. em amostras de carne bovina e bubalina e para autenticação das espécies cárneas**Resumo**

O objetivo desse trabalho foi padronizar Reações em Cadeia da Polimerase multiplex (mPCR) para detecção de *Salmonella* spp. em carne bovina e bubalina crua e simultaneamente autenticá-las quanto a sua espécie. O protocolo utilizou primers que amplificam sequências de 429 pares de base de DNA de *Salmonella* spp., 346 pares de bases de DNA bovino e 220 pares de base de DNA de búfalo. A especificidade das mPCRs foi testada utilizando DNA de outras espécies cárneas e microbianas. Para avaliar a sensibilidade, foram realizadas diluições seriadas em triplicata até a concentração 10^{-10} das misturas de DNA de *Salmonella typhimurium* e *B. taurus* e *Salmonella typhimurium* e *B. bubalis*. Para contaminação experimental 25g de amostras de carne bovina e bubalina não contaminadas foram colocadas individualmente em sacos plásticos estéreis contendo 225 mL de caldo APT, e diferentes concentrações de cultura de *Salmonella* (1 UFC, 2 UFCs e 3 UFCs) foram adicionadas. Amostras de cortes cárneos comerciais (n = 161) foram coletadas em diferentes estabelecimentos nos estados do Pará e Amapá, Brasil, para verificar sua autenticidade e qualidade microbiológica quanto a presença de *Salmonella* spp. Os resultados obtidos demonstraram que a técnica de extração de DNA resultou em material genômico em quantidade e pureza satisfatórias e que as mPCRs apresentaram sensibilidade e especificidades adequadas. Além disso, os resultados da contaminação experimental demonstraram que a técnica foi capaz de detectar *Salmonella* spp. em amostras de carne bovina e bubalina após 12h de enriquecimento. Observou-se ainda que 98 das amostras de carne coletadas na região norte do Brasil eram de origem bovina e não apresentaram contaminação por *Salmonella* spp. e que 35 amostras eram de origem bubalina,

nas quais constatou-se que em 20% (7/35) havia a presença de *Salmonella* spp. Concluímos que as duas mPCRs desenvolvidas foram eficientes para detectar *Salmonella* spp. após 12 horas de enriquecimento em carnes bovinas e bubalinas e para autenticar simultaneamente esse produtos quanto sua espécie.

Palavras-Chaves: controle de qualidade, *Salmonella*, DNA, fraude

1. Introdução

As técnicas de autenticação de alimentos estão ganhando popularidade, principalmente devido à crescente conscientização do público em relação à qualidade e segurança dos alimentos. O processo de autenticação pode incluir a conformidade do alimento quanto a sua origem (espécie), método de produção e as tecnologias de processamento (Danezis, Tsagkaris, Camin, Brusica, & Georgiou, 2016).

Diferentes formas de adulteração influenciam não apenas na qualidade dos produtos alimentícios, mas também podem causar efeitos prejudiciais à saúde. As carnes e produtos cárneos que apresentam alto valor comercial são frequentemente alvo de adulteração e, por essa razão, há uma necessidade crescente de que técnicas analíticas confiáveis que objetivem fornecer uma resposta decisiva sobre a autenticidade dos produtos cárneos comercializados sejam desenvolvidas (Nešić, Stojanović and Baltić, 2017; Xu & Sum, 2018).

Além disso, as carnes de diferentes espécies como bovina e bubalina também tem sido objeto de estudos em diversas partes do mundo quanto a sua qualidade microbiológica (De Smet, De Zutter, Van Hende, & Houf, 2010; Rahimi, Jalali, & Weese, 2014; Zarei, Basiri, Jamnejad, & Eskandari, 2013), uma vez que possuem notável importância na alimentação da população, devido ao seu valor nutricional e por serem mais acessíveis do ponto de vista financeiro (Escriba-Perez, Baviera-Puig, Buitrago-Vera, & Montero-Vicente, 2017; Kirinus, Fruet, Klinger, Dörr, & Nörnberg, 2013).

Devido as suas características intrínsecas como composição química, elevada atividade de água e pH próximo a neutralidade, as carnes e seus derivados estão expostos à contaminação microbiana em diversas etapas de processamento industrial e de comercialização, sendo frequentemente relatadas como a principal via de transmissão de agentes patogênicos para humanos (Marchi et al., 2012).

Entre os micro-organismos associados a surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), *Salmonella* spp. se destaca como um dos principais agentes relacionados a produtos de origem animal, como carne bovina, bubalina, suína e de aves (Abbassi-Ghozzi et al., 2012; Dallal et al., 2010; Stevens et al., 2008). Essa ocorrência é resultado da presença de *Salmonella* na microbiota intestinal de animais de criação, o que facilita a contaminação das carcaças durante o abate, principalmente devido ao manuseio e processamento inadequado (Buncic & Sofos, 2012).

A incidência de *Salmonella* spp. em alimentos constitui a maior causa de gastroenterite, diarreia e septicemia em humanos na maioria dos países industrializados (Ma et al., 2014; Tatavarthy & Cannons, 2010). Nos Estados Unidos esse patógeno é responsável pelo mais alto número de infecções transmitidas por alimentos (Singh & Mustapha, 2013). Esse gênero bacteriano, na União Europeia, é responsável por aproximadamente 23% dos casos de DTA (Food & Authority, 2015) e na China, estima-se que aproximadamente 80% dos surtos de origem alimentar sejam causados por *Salmonella* spp. (Yang et al., 2010; Yang et al., 2015). Já no Brasil, a subnotificação de casos dificulta a estimativa de prevalência, bem como a identificação dos agentes etiológicos e alimentos envolvidos nos surtos de DTA (Pissetti, Werlang, Biesus, Kich, & De Cardoso, 2012).

As DTA e a salmonelose em particular, resultam em um ônus econômico em todo o mundo devido ao absenteísmo, tratamento, hospitalização e mortalidade (Bugarel, Tudor, Loneragan, & Nightingale, 2017). Essa doença também resulta em perdas econômicas (Scharff, 2011) e a capacidade de proliferação do micro-organismo em diferentes condições favorece a contaminação de vários produtos alimentícios, contribuindo para a sua importância na saúde pública (Liu et al., 2012).

Os Métodos microbiológicos convencionais são comumente usados para monitorar a contaminação por *Salmonella* spp. em carnes e produtos cárneos. Esses métodos são baseados

na identificação bacteriológica e sorológica (Chen et al., 2015) e requerem uma variedade de reagentes tornando o processo dispendioso, complicado e demorado (Fachmann, Josefsen, Hoorfar, Nielsen, & Löfström, 2015).

Nos últimos anos, os métodos baseados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) têm sido relatados como alternativas rápidas, específicas e sensíveis e são cada vez mais usados para identificar vários tipos de bactérias (Pochop et al., 2013), além de serem recomendados para garantir a autenticidade dos alimentos quanto a sua espécie (Mousavi, Khaniki, Eskandari, Rabiei, Mehdizadeh, Samiee, 2015). Essa técnica pode garantir uma liberação mais rápida de produtos para o mercado, além de identificar de forma rápida os agentes etiológicos envolvidos em surtos alimentares.

Diante disso, o presente estudo teve como objetivo padronizar duas mPCRs para detecção de *Salmonella* spp. em carne bovina e bubalina crua e simultaneamente autenticá-las quanto sua espécie, além de aplicar a técnica em amostras comerciais vendidas no norte do Brasil.

2. Material e métodos

2.1 Material

Para realização do presente estudo obteve-se como controle positivo DNA bacteriano extraído de uma cepa padrão de *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) e como controle positivo para *Bos Taurus* e *Bubalus bulis* foram adquiridas amostras de carne comprovadamente bovina e bubalina em matadouro frigorífico credenciado pelo Serviço de Inspeção Federal Brasileiro (SIF).

2.2. Extração do DNA

A cepa de *Salmonella typhimurium* foi cultivada em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) a 37 °C, por 18 horas para a extração do DNA genômico. Para isso, 2 mL desse cultivo foram transferidos para um microtubo, que foi submetido a centrifugação por 14.000 x g por 10 min para obtenção de um pellet. Já para a extração de DNA das espécies *Bos Taurus* e *Bubalus bulis* foram utilizadas 0,3g de carne de cada espécie em um microtubo.

A extração dos DNAs foi realizada utilizando o protocolo descrito por Dantas et al. (2019), com modificações. Para tal, na fase de lise inicial foram adicionados 800 µL de solução de lise e 10 µL de Proteinase K. Em seguida, as amostras foram incubadas a 56 °C durante 5 horas e centrifugadas a 12.000 x g por, 10 minutos. Na etapa de purificação foram adicionados 700 µL de fenol-clorofórmio-álcool Isoamílico (25:24:1) e o material foi mantido em gelo, durante 5 minutos. Após, foi realizada centrifugação a 14.000 x g, por 20 minutos e foram coletados 400 µL do sobrenadante obtido, que foram transferidos para novos microtubos contendo 600 µL de isopropanol. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 14.000 x g por 1 minuto e o sobrenadante descartado por inversão e foram adicionados 600 µL de etanol a 70% gelado, para que ocorresse a precipitação do DNA. O material foi então centrifugado por 1 minuto a 14.000 x g. Por fim, o etanol foi desprezado e os material precipitado seco em estufa a 37 °C, por 60 minutos. O DNA presente nos microtubos foi ressuspenso em 100 µL de solução Tampão TE (tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM) e armazenado a -18 °C, até o momento do uso.

2.3 Qualidade e concentração do DNA

O DNA obtido teve sua qualidade verificada a partir de uma eletroforese em gel contendo 1% de agarose em tampão de TBE (Tris-Borato-EDTA 0.5 X). O DNA foi corado com corante fluorescente não mutagênico GelRedTM, corrido em tampão TBE 0,5x a uma

corrente de 110 V e visualizados em transiluminador sob luz ultravioleta associado ao Image Lab™ Software (Biorad). O material foi também quantificado por espectrofotometria (nanodrop®).

2.4 Padronização da técnica de PCR convencional

Para a padronização da técnica foram realizadas três reações de PCR convencional para a detecção de DNA de *Salmonella* spp., bovino e bubalino individualmente. Para a detecção de *Salmonella* spp. foram empregados os iniciadores ST11 – For (GCCAACCATTGCTAAATTGGCGCA) e ST15 – Rev (GGTAGAAATTCCCAGCGGGTACTGG), descritos por Soumet et al. (1999), que amplificam fragmentos de 429 pb e para detecção de DNA bovino e bubalino foram utilizados os iniciadores 12 SBT-REV2 (AAATAGGGTTAGATGCACTGAATCCAT) e 12 SBUF-REV2 (TTCATAATAACTTTCGTGTTGTTGGGTGT) respectivamente e 12 SM-FW (CTAGAGGAGCCTGTTCTATAATCGATA) para ambas as espécies, descritos por (López-Calleja et al., 2005), que amplificam fragmentos de 346pb para *B. taurus* (bovino) e 220pb para *B. bubalis* (bubalino). Todos os iniciadores foram preparados de acordo com a instrução do fabricante (Ludwing Biotec®), sendo eluídos em tampão TE pH 8,0 até a concentração de 100 pmol/μL.

A mistura para cada reação de PCR foi realizada para um volume final de 25μL contendo 2.5 μL de solução tampão 10X (100 mM Tris-HCl e 500 mM KCl), 0.75 μL de MgCl₂ (50 mM), 0.5 μL de dNTP (10 mM mix), 1.0 μL de cada iniciador a 10 pmol correspondente a espécie alvo a ser detectada, 0.5 μL de Taq DNA polimerase (1 U/μL) e 3.0 μL de DNA molde da espécie correspondente a cada reação na concentração de 947 ng μl⁻¹ (*Salmonella tiphyurium*), 265,9 ng μl⁻¹ (bovino) e 236,5 ng μl⁻¹ (bubalino). Para completar o volume final, foram adicionados a cada reação 15.75 μL de água ultra pura (q.s.p).

O termociclador (Applied Biosystems VERITI® 96) foi programado para 30 ciclos, onde as temperaturas e os tempos utilizados para desnaturação, anelamento e extensão foram, respectivamente, 93 °C/30s, 56 °C/30s e 72 °C/30s, acrescidos de desnaturação inicial a temperatura de 93 °C/3min e extensão final a 72°C/10min, conforme descrito por Oliveira et al. (2015). Em todas as reações foram utilizados controles negativos substituindo o DNA por água ultra pura. Os produtos obtidos a partir das PCRs foram mantidos a 4 °C, para serem analisados posteriormente.

2.5 Sequenciamento e alinhamento de sequências

Os amplicons obtidos foram preparados e encaminhados separadamente para sequenciamento em sequenciador automático (AB 3500 Genetic Analyzer) armado com capilares de 50 cm e polímero POP7 (Applied Biosystems). O alinhamento das sequências obtidas foi analisado pela ferramenta do programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), disponível no *site* do National Center for Biotechnology Information (NCBI).

2.6 Padronização das mPCRs

Após a confirmação dos controles positivos foi realizada a padronização de duas mPCRs: uma realizada com iniciadores específicos para amplificar fragmentos de DNA de *Salmonella* spp. e de DNA bovino simultaneamente (sendo denominada de mPCR-SBt) e outra utilizando iniciadores específicos para amplificar simultaneamente fragmentos de DNA de *Salmonella* spp. e DNA bubalino (mPCR-SBb). Os iniciadores utilizados nas duas mPCRs citadas acima foram os mesmos testados na PCR convencional demonstrada no item 2.4.

A concentração dos DNAs (*Salmonella* spp, bovino e bubalino) foi ajustada para o menor valor obtido e misturadas em quantidades iguais, formando um *pool* para execução da padronização das mPCRs para autenticação das carnes e identificação de *Salmonella* spp.

A mistura da reação de ambas as mPCRs foi realizada para volume final de 25µL, contendo 2.5 µL de solução tampão 10x (100 mM Tris-HCl e 500 mM KCl), 1.0 µL de MgCl₂ (50 mM), 0.75 µL de dNTP (10 mM mix), 1.0 µL de cada um dos iniciadores na concentração de 5pmol, 3.0 µL de cada DNA (*Salmonella* spp e *B. taurus*) para mPCR-SBt e (*Salmonella* spp e *B. bubalis*) para mPCR-SBb e 0.5 µL de Taq DNA polimerase (1 U/µL). Para completar o volume final foi adicionado 10,25 µL de água ultra pura (q.s.p). O controle negativo das reações foi feito substituindo DNA por água ultra pura.

O termociclador foi programado para 35 ciclos, onde as temperaturas e os tempos utilizados para desnaturação, anelamento e extensão foram, respectivamente, 94°C/1min, 56°C/1min e 72°C/1min, acrescidos de desnaturação inicial a temperatura de 93°C/3min e extensão final a 72°C/10 min.

2.7 Eletroforese dos produtos das mPCRs

Os fragmentos amplificados foram homogeneizados em 1 µL de corante GelRed™ na proporção 3:1 e submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corrida em tampão TBE a 0.5 X a 110 V. A análise dos resultados foi realizada com o auxílio de um equipamento de foto documentação sobre luz ultravioleta associado ao Image Lab™ Software (Biorad).

2.8 Especificidade e Sensibilidade dos ensaios

A especificidade das mPCRs foi testada utilizando DNA de outras espécies cárneas: (*Sus scrofa domesticus*, *Ovis aries*, *Gallus gallus domesticus* e *Salmo salar*) e outras espécies bacterianas (*Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*). O DNA das referidas amostras foi extraído de acordo com o protocolo descrito anteriormente.

Já para avaliar a sensibilidade da técnica foram realizadas diluições seriadas em triplicata até a concentração 10⁻¹⁰ das misturas de DNA de *Salmonella tiphymurium* e *B. taurus* e

Salmonella typhimurium e *B. bubalis*, os quais foram diluídos em tampão Tris-EDTA. Para tanto, a concentração dos DNAs foi ajustada para o menor valor obtido e misturadas em quantidades iguais, formando um *pool* e as referidas diluições foram testadas pela metodologia proposta a fim de se determinar a concentração mínima que pode ser detectada pela técnica.

2.9 Contaminação artificial de amostras de carne bovina e bubalina

Para comprovar a eficiência da extração dos DNAs de forma simultânea, bem como o limite de detecção da técnica de mPCR em gradientes diferentes de concentração da bactéria, cepa padrão de *Salmonella Typhimurium* (ATCC 14028) foi cultivada em caldo Infusão Cérebro Coração (BHI) a 37 °C, por 18 horas. A cultura foi diluída em série até 10^{-10} , semeada em meio XLD a partir da técnica de esgotamento e incubada a 37 °C, por 24 horas. Paralelamente, amostras de carne bovina e bubalina foram analisadas pelo método de pesquisa de *Salmonella* spp. descrito pela legislação brasileira vigente (Brasil, 2003) para descartar contaminação prévia pela bactéria. Em seguida, 25g de carne bovina e bubalina não contaminadas foram colocadas individualmente em sacos plásticos estéreis contendo 225 mL de APT e diferentes concentrações (1, 2 e 3 UFCs) de *Salmonella Typhimurium* foram adicionadas. As amostras foram homogeneizadas em *stomacher* por 60s e incubadas a 37°C, durante 18h. Como controle negativo da contaminação experimental foram utilizadas amostras de carne bovina e bubalina não inoculados com a bactéria.

Posteriormente, foram coletadas amostras dos tecidos cárneos e do cultivo no período de 6, 12 e 18 horas. A titulação do cultivo foi realizada nas horas determinadas a partir de diluições seriadas em SSP de 10^{-1} a 10^{-10} expressas em UFC. Para cada horário foram coletadas amostras em triplicata. A extração de DNA e as mPCRs foram realizadas de acordo com as metodologias descritas anteriormente.

2.10 Aplicação das mPCRs em amostras de carne comerciais

Amostras de cortes cárneos comerciais (n = 161) foram coletadas de forma aleatória em diferentes estabelecimentos nos estados do Pará e Amapá, Brasil. As amostras foram submetidas a extração de DNA e aos ensaios de mPCR conforme descrito anteriormente para verificar sua autenticidade e a qualidade microbiológica quanto a presença de *Salmonella* spp.

Os *amplicons* obtidos foram homogeneizados em 1 μL de corante GelRed™ e submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corrida em tampão TBE a 0.5 X. A análise dos resultados foi realizada com o auxílio de um equipamento de foto documentação sobre luz ultravioleta associado ao Image Lab™ Software (Biorad)

3 Resultados e discussão

3.1 Extração e qualidade do DNA

A concentração do DNA extraído apresentou média de 947 ng μl^{-1} para a estirpe bacteriana (*Salmonella tiphymurium*), 265,9 ng μl^{-1} para tecido bovino e 236,5 ng μl^{-1} para bubalino. De acordo com Scorsato & Telles, (2011), a técnica de isolar ácidos nucleicos é uma fase essencial na prática da biologia molecular e o aperfeiçoamento dos métodos de extração são essenciais para torna-los mais simples, rápido e de menor custo. O protocolo adotado utilizando proteinase K no tampão de digestão e fenol-clorofórmio-álcool isoamílico resultaram na obtenção de DNA de *Salmonella tiphymurium*, bovino e bubalino em quantidade e pureza satisfatórias de para realização das duas mPCR.

3.2 Sequenciamento e alinhamento

Os resultados dos alinhamentos evidenciaram compatibilidades de 94%, 98% e 96% para as espécies *Salmonella* spp., *B. taurus* e *B. bubalis*, respectivamente. Nguyen, Van Giau, & Vo (2016) afirmam que o alinhamento da sequência de DNA deve ser realizado para evitar

possíveis reações cruzadas e encontrar a melhor combinação para o desenvolvimento de uma mPCR, proporcionando maior confiabilidade dos resultados, com tamanho exato do fragmento e sequência dos produtos amplificados. Dessa forma, nossos resultados comprovam a credibilidade da metodologia proposta em identificar com segurança os genes alvo do estudo, o que reforça a eficiência da técnica aqui sugerida.

O gene de *Salmonella* spp. provou ser uma importante ferramenta para detecção do patógeno, corroborando com o descrito por Pui et al., (2011). Isso se deve ao fato de que a sequência utilizada é única desse gênero, o que levanta a hipótese de que a metodologia aqui proposta pode também ser utilizada para a identificação do agente patogênico em amostras comerciais de carne bovina e bubalina, conforme evidenciado nesse estudo.

3.3 mPCRs

A padronização da mPCR-SBt e da mPCR-SBb foi eficiente, pois todos os pares de iniciadores utilizados produziram um único produto com amplificação de fragmento de 429 pb para *Salmonella* spp., 346 pb para *B. taurus* e 220 pb para *B. bubalis*, não sendo observada amplificação inespecífica, indicando a boa especificidade dos iniciadores com as espécies correspondentes.

De acordo com Ali, Razzak, & Hamid (2014) e Ye et al. (2016), dois aspectos são de extrema importância para o sucesso de uma mPCR: a temperatura de anelamento (que deve ser ideal para todos os iniciadores) e a concentração dos mesmos (que deve ser otimizada, para se garantir a eficiência da técnica). Os dados obtidos em nosso trabalho demonstraram que o protocolo adotado pode ser utilizado para autenticação de carnes bovina e bubalina e identificação de *Salmonella* spp., visto a amplificação simultânea dos diferentes genes.

3.4 Especificidade e Sensibilidade das mPCR

Os resultados do teste de especificidade demonstraram que não houve amplificação para DNA das espécies *Sus scrofa domesticus*, *Ovis aries*, *Gallus gallus domesticus*, *Salmo salar*, *L. monocytogenes* e *S. aureus*. Liu et al. (2012) e Bugarel et al. (2017) afirmam que a especificidade de detecção em uma mPCR está relacionada a ligação específica do conjunto de iniciadores às sequências alvos em estudo, tornando o método mais seguro e preciso. Em nosso estudo os resultados mostraram que os moldes de DNA das espécies envolvidas no diagnóstico produziram fragmentos com tamanho esperado demonstrando que a metodologia descrita foi bem-sucedida na identificação simultânea dos alvos específicos, o que possibilita a aplicação da técnica em amostras comerciais.

A determinação da sensibilidade das duas mPCR obtida a partir das diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-10} demonstrou que ambas as técnicas conseguiram detectar simultaneamente o DNA das espécies envolvidas até a diluição 10^{-2} , correspondendo a uma concentração mínima de DNA de $2,36 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$. Os ensaios das mPCRs desenvolvidos neste estudo foi mais sensível do que os relatados por He, Xu, Li, Liu, & Yue (2016) estudos como esses demonstram que o método genômico é uma ferramenta importante para identificar patógenos de origem alimentar.

3.5 Avaliação dos ensaios de mPCR em amostras de carne bovina e de búfalo artificialmente contaminadas com salmonela

A dificuldade de detectar bactérias dos alimentos exige que as amostras sejam submetidas ao pré-enriquecimento para recuperação de pequenas quantidades de células que podem estar lesadas aumentando a concentração dos micro-organismo alvo, facilitando a extração de DNA e melhorando a eficiência do teste De acordo com Malorny, Huehn, Dieckmann, Krämer, & Helmuth (2009) uma contagem de aproximadamente 10 ufc/mL ou g

de alimento obtido por enriquecimento é suficiente para garantir a sensibilidade de uma PCR. Neste estudo, o método de extração de DNA utilizado possibilitou a obtenção de DNA de *Salmonella spp*, bovino e bubalino simultaneamente das carnes naturalmente contaminadas e os ensaios das mPCRs desenvolvidos detectou 10^6 ufc/mL de carne bovina e bubalina após 12h de enriquecimento. Embora o enriquecimento tenha aumentado o tempo de análise, forneceu condições confiáveis para a detecção da bactéria patogênicas. Resultados semelhantes foram observados por Alves, Marques, Pereira, Hirooka, & De Oliveira (2012) que detectaram 1 ufc / ml de *S . Enteritidis* após 24 h de enriquecimento não seletivo.

3.6 Aplicação das mPCR em amostras comerciais de carne

A aplicação da mPCR-Sbt comprovou que 78% das amostras eram bovinos para os quais não houve detecção de *Salmonella spp.*, demonstrando a qualidade da proteína brasileira comercializada nos locais estudados. De acordo com Oaigen et al. (2011) isso é resultado da estruturação do setor com investimentos em tecnologias, apesar do país apresentar produção bastante heterogênea. Rosa, Azevedo, Malafaia, & Magalhães (2018) afirmam que uma cadeia produtiva bem coordenada é essencial para garantir a produção de produtos de boa qualidade de forma competitiva. No entanto, medidas de controle e maior rigidez na fiscalização devem ser tomadas como forma de garantir cada vez mais a qualidade da carne bovina produzida no país, garantindo a segurança alimentar dos consumidores.

Os resultados da mPCR-SBb comprovou que aproximadamente 22% das amostras eram bubalinas e desse total 31% apresentaram-se positivas para *Salmonella spp.* conforme figura 4, estando assim em condições sanitárias insatisfatórias e impróprias para o consumo humano, conforme preconiza o Código Internacional para Alimentos – (Codex Alimentarius Commisison, 2013) e RDC nº 12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde (Brasil, 2001). Maharjan, Joshi, Joshi, & Manandhar (2006) encontraram

resultados semelhantes ao avaliarem a prevalência de *Salmonella* em carne bubalina crua, constatando a presença do patógeno em 13,5% das amostras. Já Biswas et al. (2008) verificaram a ocorrência de 1,75% das carnes avaliadas.

A desorganização da cadeia produtiva de búfalo no Norte do Brasil, faz com que a maioria dos animais sejam abatidos de forma clandestina em condições higiênico-sanitárias precárias, favorecendo a contaminação de micro-organismos patogênicos. Além disso, contribui para que a comercialização da carne desses animais seja realizada como sendo de origem bovina, caracterizando fraude comercial economicamente motivada. Shinohara et al. (2008) afirmam que os produtos de origem animal são mais vulneráveis de estarem contaminados com salmonelas viáveis, sendo as carnes os mais suscetíveis à contaminação por *Salmonella* spp. por estarem presente naturalmente nos tratos intestinais, podendo a transmissão desse patógeno para as carcaças ocorrer logo após o abate por contato com material fecal.

De acordo com Neitzke, Roza, & Weber (2017) a presença de *Salmonella* spp. em sistemas de produção animal tem sido uma preocupação mundial por razões relacionadas à saúde pública, visto que a maioria dos casos de infecções por *Salmonella* spp. estão ligados a ingestão de alimentos contaminados. Desta forma, os resultados desse estudo são de grande relevância do ponto de vista da saúde coletiva, uma vez que a presença deste micro-organismo nas amostras de carne bubalina representa risco aos consumidores em virtude das toxinas que podem vir a ser produzidas e que são resistentes a elevadas temperaturas.

Delibato et al. (2014) e Rodriguez-Lázaro et al (2018) afirmam que o monitoramento de *Salmonella* spp. é uma questão de segurança alimentar, sendo necessária a detecção confiável deste patógenos, ao longo de toda a cadeia alimentar através de métodos analíticos apropriados para garantir produtos de qualidade ao consumidor do ponto de vista microbiológico. Diante disso, a detecção de *Salmonella* spp. pela técnica de PCR e suas

variações vem sendo estudada em diversos produtos alimentares (Arguello, Álvarez-Ordoñez, Carvajal, Rubio, & Prieto, 2013; Carraturo, Gargiulo, Giorgio, Aliberti, & Guida, 2016; Zhang et al., 2015), os quais tem apontado maior eficiência quando comparados ao métodos convencionais.

Rall et al. (2009) utilizando o diagnóstico convencional e a técnica de PCR na identificação de *Salmonella* spp. em amostras de alimentos verificaram diferença significativa ao nível de ($p < 0,01$) entre os métodos, enquanto o convencional identificou a presença do agente em 8% das amostras, a PCR constatou a prevalência do patógeno em 46%. (Siala et al., 2017) constataram que a PCR utilizada para detecção de *Salmonella* spp em diferentes amostras de alimentos aumentou o nível de detecção em até 27,2% em comparação com 5% obtidos por métodos de cultura convencionais.

De acordo com Gugliandolo, Lentini, Spanò, & Maugeri (2011) os métodos moleculares são mais vantajosos quando uma avaliação de risco é necessária para a saúde humana, por permitir a detecção rápida de patógeno, já que o primeiro sinal de doença geralmente ocorre em <24 h após a ingestão de alimentos contaminados.

Vários estudos se concentraram em projetar ensaios detectando apenas o alvo bacteriano em carnes e produtos cárneos, sem levar em consideração a autenticidade do produto envolvidos. Os ensaios das mPCRs desenvolvidos nesse estudo foi capaz de amplificar genes de *Salmonella* spp, *B. taurus* e *B. bubalis* simultaneamente, podendo a técnica ser utilizada para verificar a qualidade microbiológica dos produtos e testar a veracidade das espécies cárneas comercializadas.

Em resumo os nossos resultados reforçam o uso de mPCR para identificação de agentes patogênicos como *Salmonella* spp. em amostras de alimentos e autenticação de espécies cárneas bovina e bubalina. A viabilidade da técnica e a rapidez dos resultados pode

ser utilizada para melhorar o controle de qualidade microbiológica de carnes búfalo e sobretudo carne bovina que é um produto importante na balança comercial brasileira.

4 Conclusão

Podemos concluir que aplicação das duas técnicas de mPCR nesse estudo para detecção de *Salmonella* spp. em carne bovina e bubalina e sua autenticação apresentaram-se eficiente, permitindo sua utilização em toda cadeia afim de evitar a distribuição de alimentos contaminados.

Referencias

- Abbassi-Ghozzi, I., Jaouani, A., Hammami, S., Martinez-Urtaza, J., Boudabous, A., & Gtari, M. (2012). Molecular analysis and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolates recovered from raw meat marketed in the area of “Grand Tunis”, Tunisia. *Pathologie Biologie*, 60(5), e49–e54. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2011.07.005>
- Ali, M. E., Razzak, M. A., & Hamid, S. B. A. (2014). Multiplex PCR in Species Authentication: Probability and Prospects—A Review. *Food Analytical Methods*, 7(10), 1933–1949. <https://doi.org/10.1007/s12161-014-9844-4>
- Alves, J., Marques, V. V., Pereira, L. F. P., Hirooka, E. Y., & De Oliveira, T. C. R. M. (2012). Multiplex pcr for the detection of campylobacter spp. and salmonella spp. in chicken meat. *Journal of Food Safety*. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.2012.00386.x>
- ARGUELLO, H., ÁLVAREZ-ORDOÑEZ, A., CARVAJAL, A., RUBIO, P., & PRIETO, M. (2013). Role of Slaughtering in *Salmonella* Spreading and Control in Pork Production. *Journal of Food Protection*, 76(5), 899–911. <https://doi.org/10.4315/0362-028x.jfp-12-404>
- Biswas, A. K., Kondaiah, N., Bheilegaonkar, K. N., Anjaneyulu, A. S. R., Mendiratta, S. K., Jana, C., ... Kumar, R. R. (2008). Microbial profiles of frozen trimmings and silver sides prepared at Indian buffalo meat packing plants. *Meat Science*. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.01.004>
- Bugarel, M., Tudor, A., Loneragan, G. H., & Nightingale, K. K. (2017). Molecular detection assay of five *Salmonella* serotypes of public interest: Typhimurium, Enteritidis, Newport, Heidelberg, and Hadar. *Journal of Microbiological Methods*.

- <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.12.011>
- Buncic, S., & Sofos, J. (2012). Interventions to control Salmonella contamination during poultry, cattle and pig slaughter. *Food Research International*, 45(2), 641–655. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.10.018>
- Carraturo, F., Gargiulo, G., Giorgio, A., Aliberti, F., & Guida, M. (2016). Prevalence, Distribution, and Diversity of Salmonella spp. in Meat Samples Collected from Italian Slaughterhouses. *Journal of Food Science*. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13430>
- Chen, Z., Zhang, K., Yin, H., Li, Q., Wang, L., & Liu, Z. (2015). Detection of Salmonella and several common Salmonella serotypes in food by loop-mediated isothermal amplification method. *Food Science and Human Wellness*. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2015.05.001>
- Codex Alimentarius Commission. (2013). *Code of hygienic practice for meat 1 cac/rcp 58-2005*. I(1985), 1–51.
- Dallal, M. M. S., Doyle, M. P., Rezadehbashi, M., Dabiri, H., Sanaei, M., Modarresi, S., ... Sharifi-Yazdi, M. K. (2010). Prevalence and antimicrobial resistance profiles of Salmonella serotypes, Campylobacter and Yersinia spp. isolated from retail chicken and beef, Tehran, Iran. *Food Control*, 21(4), 388–392. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.06.001>
- Danezis, G. P., Tsagkaris, A. S., Camin, F., Brusica, V., & Georgiou, C. A. (2016, December 1). Food authentication: Techniques, trends & emerging approaches. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 85, pp. 123–132. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.02.026>
- De Smet, S., De Zutter, L., Van Hende, J., & Houf, K. (2010). Arcobacter contamination on pre- and post-chilled bovine carcasses and in minced beef at retail. *Journal of Applied Microbiology*, 108(1), 299–305. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04430.x>
- Delibato, E., Rodriguez-Lazaro, D., Gianfranceschi, M., De Cesare, A., Comin, D., Gattuso, A., ... De Medici, D. (2014). European validation of Real-Time PCR method for detection of Salmonella spp. in pork meat. *International Journal of Food Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.01.005>
- Escriba-Perez, C., Baviera-Puig, A., Buitrago-Vera, J., & Montero-Vicente, L. (2017). Consumer profile analysis for different types of meat in Spain. *Meat Science*, 129, 120–126. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.02.015>
- Fachmann, M. S. R., Josefsen, M. H., Hoorfar, J., Nielsen, M. T., & Löfström, C. (2015). Cost-effective optimization of real-time PCR-based detection of Campylobacter and Salmonella with inhibitor tolerant DNA polymerases. *Journal of Applied Microbiology*,

- 119(5), 1391–1402. <https://doi.org/10.1111/jam.12937>
- Food, E., & Authority, S. (2015). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA Journal*, 13(1). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5500>
- Gugliandolo, C., Lentini, V., Spanò, A., & Maugeri, T. L. (2011). Conventional and molecular methods to detect bacterial pathogens in mussels. *Letters in Applied Microbiology*, 52(1), 15–21. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02959.x>
- He, X., Xu, X., Li, K., Liu, B., & Yue, T. (2016). Identification of *Salmonella enterica* Typhimurium and variants using a novel multiplex PCR assay. *Food Control*, 65, 152–159. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.01.015>
- Kirinus, J. K., Fruet, A. P. B., Klinger, A. C. K., Dörr, A. C., & Nörnberg, J. L. (2013). Relação Entre Faixas De Renda E O Perfil Dos Consumidores De Carne Bovina Da Região Sul Do Brasil. *Revista Monografias Ambientais*, 12(12), 2776–2784. <https://doi.org/10.5902/2236130810424>
- Liu, B., Zhou, X., Zhang, L., Liu, W., Dan, X., Shi, C., & Shi, X. (2012). Development of a novel multiplex PCR assay for the identification of *Salmonella enterica* Typhimurium and Enteritidis. *Food Control*. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.01.062>
- López-Calleja, I., González Alonso, I., Fajardo, V., Rodríguez, M. A., Hernández, P. E., García, T., & Martín, R. (2005). PCR detection of cows' milk in water buffalo milk and mozzarella cheese. *International Dairy Journal*, 15(11), 1122–1129. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.12.003>
- Ma, K., Deng, Y., Bai, Y., Xu, D., Chen, E., Wu, H., ... Gao, L. (2014). Rapid and simultaneous detection of *Salmonella*, *Shigella*, and *Staphylococcus aureus* in fresh pork using a multiplex real-time PCR assay based on immunomagnetic separation. *Food Control*. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.01.042>
- Maharjan, M., Joshi, V., Joshi, D. D., & Manandhar, P. (2006). Prevalence of *Salmonella* species in various raw meat samples of a local market in Kathmandu. *Annals of the New York Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1196/annals.1373.031>
- Malorny, B., Huehn, S., Dieckmann, R., Krämer, N., & Helmuth, R. (2009). Polymerase chain reaction for the rapid detection and serovar identification of salmonella in food and feeding stuff. *Food Analytical Methods*. <https://doi.org/10.1007/s12161-008-9057-9>
- Marchi, P. G. de., Rossi Júnior, O. D., Cereser, N. D., Souza, V. de., Rezende-Lago, N. C. M. de., & Faria, A. A. de. (2012). Avaliação Microbiológica e físico-química da carne bovina moída comercializada em supermercados e açougues de Jaboticabal - SP.

Interdisciplinar: Revista Eletrônica Da Univar, (7), 81–87.

- Mousavi, Seyed Mohammad, Jahed Khaniki, Gholamreza, Eskandari, Soheyl, Rabiei, Maryam Mehdizadeh, Mirab Samiee, S. M. (2015). Applicability of species-specific polymerase chain reaction for fraud identification in raw ground meat commercially sold in Iran. *Journal of Food Composition and Analysis*, 40, 47–51. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2014.12.009>
- Neitzke, D. C., Roza, C. R. da, & Weber, F. H. (2017). Segurança dos alimentos: contaminação por *Salmonella* sp. no abate de suínos. *Brazilian Journal of Food Technology*, 20(0). <https://doi.org/10.1590/1981-6723.6315>
- Nešić, K., Stojanović, D., & Baltić, Ž. M. (2017). Authentication of meat and meat products vs. detection of animal species in feed – what is the difference? *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 85(85), 012043. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/85/1/012043>
- Nguyen, T. T., Van Giau, V., & Vo, T. K. (2016). Multiplex PCR for simultaneous identification of *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes* in food. *3 Biotech*. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0523-6>
- Oaigen, R. P., Barcellos, J. O. J., Canozzi, M. E. A., Christofari, L. F., Soares, J. C. dos R., & Alves, C. O. (2011). Internal competitiveness in beef cattle activity in the State of Rio Grande do Sul Ricardo. *Ciência Rural*, 41(6), 1102–1107. <https://doi.org/10.1590/s0103-84782011005000068>
- Pissetti, C., Werlang, G. O., Biesus, L. L., Kich, J. D., & De Cardoso, M. R. I. (2012). Detecção de *Salmonella enterica* e *Listeria monocytogenes* em carcaças suínas na etapa de pré-resfriamento. *Acta Scientiae Veterinariae*.
- Pochop, J., Kačániová, M., Hleba, L., Petrová, J., Pavelková, A., & Lopašovský, L. (2013). A Real-Time PCR Detection of Genus *Salmonella* in Meat and Milk Samples. *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies*, 46(1), 145–148.
- Pui, C. F., Wong, W. C., Chai, L. C., Nillian, E., Ghazali, F. M., Cheah, Y. K., ... Radu, S. (2011). Simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Salmonella* Typhi and *Salmonella* Typhimurium in sliced fruits using multiplex PCR. *Food Control*. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.05.021>
- Rahimi, E., Jalali, M., & Weese, J. S. (2014). Prevalence of *Clostridium difficile* in raw beef, cow, sheep, goat, camel and buffalo meat in Iran. *BMC Public Health*, 14(1), 2–5. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-14-119>
- Rall, V. L. M., Martin, J. G. P., Candeias, J. M. G., Cardoso, K. F. G., Silva, M. G. da, Rall,

- R., & Araújo Júnior, J. P. (2009). Pesquisa de Salmonella e das condições sanitárias em frangos e lingüiças comercializados na cidade de Botucatu. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2009.26763>
- Rosa, R. de O., Azevedo, D. B. de, Malafaia, G. C., & Magalhães, L. L. K. (2018). Estudo avaliativo da cadeia produtiva da carne bovina no Mato Grosso do Sul. *Revista de Tecnologia Aplicada*. <https://doi.org/10.21714/2237-3713rta2018v8n2p03>
- Scharff, R. L. (2011). Economic Burden from Health Losses Due to Foodborne Illness in the United States. *Journal of Food Protection*, 75(1), 123–131. <https://doi.org/10.4315/0362-028x.jfp-11-058>
- Scorsato, A. P., & Telles, J. E. Q. (2011). Factors that affect the quality of DNA extracted from biological samples stored in paraffin blocks. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 47(5), 541–548. <https://doi.org/10.1590/s1676-24442011000500008>
- Shinohara, N. K. S., De Barros, V. B., Jimenez, S. M. C., Machado, E. D. C. L., Dutra, R. A. F., & De Lima Filho, J. L. (2008). Salmonella spp., important pathogenic agent transmitted through foodstuffs | Salmonella spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. *Ciencia e Saude Coletiva*.
- Siala, M., Barbana, A., Smaoui, S., Hachicha, S., Marouane, C., Kammoun, S., ... Messadi-Akrou, F. (2017). Screening and detecting Salmonella in different food matrices in Southern Tunisia using a combined enrichment/real-time PCR method: Correlation with conventional culture method. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02416>
- Singh, P., & Mustapha, A. (2013). Multiplex TaqMan® detection of pathogenic and multi-drug resistant Salmonella. *International Journal of Food Microbiology*, 166(2), 213–218. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.07.023>
- Soumet, C., Ermel, G., Rose, N., Rose, V., Drouin, P., Salvat, G., & Colin, P. (1999). Evaluation of a multiplex PCR assay for simultaneous identification of Salmonella sp., Salmonella enteritidis and Salmonella typhimurium from environmental swabs of poultry houses. *Letters in Applied Microbiology*. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00488.x>
- Stevens, A., Kerouanton, A., Marault, M., Millemann, Y., Brisabois, A., Cavin, J. F., & Dufour, B. (2008). Epidemiological analysis of Salmonella enterica from beef sampled in the slaughterhouse and retailers in Dakar (Senegal) using pulsed-field gel

- electrophoresis and antibiotic susceptibility testing. *International Journal of Food Microbiology*, 123(3), 191–197. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.01.007>
- Tatavarthy, A., & Cannons, A. (2010). Real-time PCR detection of Salmonella species using a novel target: The outer membrane porin F gene (ompF). *Letters in Applied Microbiology*, 50(6), 645–652. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02848.x>
- Yang, B., Qu, D., Zhang, X., Shen, J., Cui, S., Shi, Y., ... Meng, J. (2010). Prevalence and characterization of Salmonella serovars in retail meats of marketplace in Shaanxi, China. *International Journal of Food Microbiology*, 141(1–2), 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.04.015>
- Yang, X., Wu, Q., Zhang, J., Huang, J., Guo, W., & Cai, S. (2015). Prevalence and characterization of monophasic Salmonella serovar 1,4,[5],12:i:-of food origin in China. *PLoS ONE*, 10(9), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137967>
- Ye, J., Feng, J., Liu, S., Zhang, Y., Jiang, X., & Dai, Z. (2016). Identification of four squid species by quantitative real-time polymerase chain reaction. *Molecular and Cellular Probes*, 30(1), 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2016.01.001>
- Zarei, M., Basiri, N., Jamnejad, A., & Eskandari, M. H. (2013). Prevalence of Escherichia coli O157:H7, Listeria monocytogenes and Salmonella spp. in beef, buffalo and lamb using multiplex PCR. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 6(8), 1–5. <https://doi.org/10.5812/jjm.7244>
- Zhang, Z., Xiao, L., Lou, Y., Jin, M., Liao, C., Malakar, P. K., ... Zhao, Y. (2015). Development of a multiplex real-time PCR method for simultaneous detection of Vibrio parahaemolyticus, Listeria monocytogenes and Salmonella spp. in raw shrimp. *Food Control*. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.11.007>

Figuras

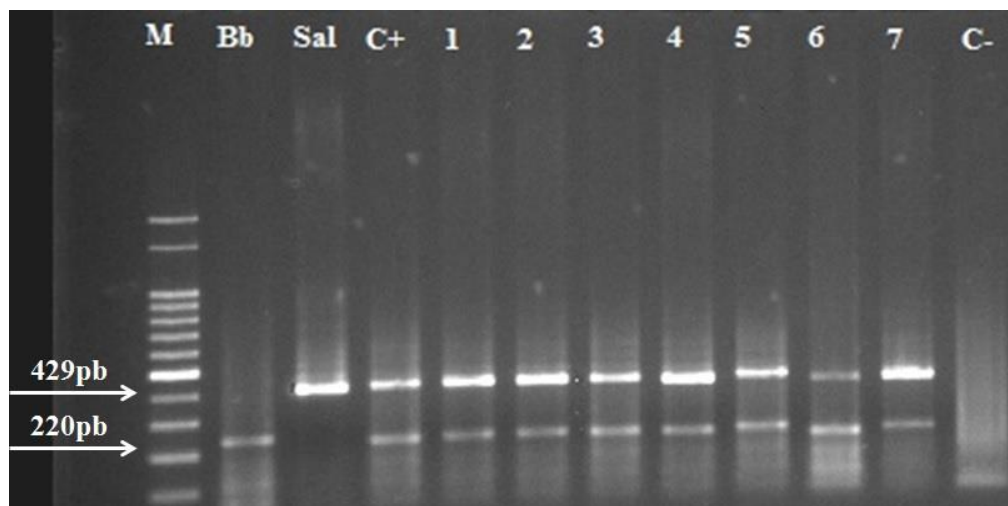


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose 1,5% demonstrando os produtos da mPCR-SBb aplicada em amostras comerciais bubalinas identificando contaminação por *Salmonella* spp. **M:** marcador de peso molecular de 100pb; **Bb:** *B. bubalis*, **Sa:** *Salmonella* spp., **C+:** controle positivo (*Salmonella* spp. e *B. bubalis*) **1 a 7:** Amostras comerciais de cortes cárneos bubalinos comercializados no Pará; **C-:** controle negativo.

CONCLUSÃO

A PCR multiplex descrita neste trabalho para verificação de fraude por substituição provou ser sensível e confiável na identificação das espécies bovina (*B. taurus*) e bubalina (*B. bubalis*), com um limite de detecção baixo, podendo ser utilizadas por pesquisadores, laboratórios e órgãos de fiscalização no controle de qualidade desses produtos quanto a sua origem.

As PCRs Multiplex desenvolvidas para detecção de *Salmonella* spp. em carnes bovina e bubalina demonstraram ser confiáveis, mais rápido e convenientes e podem ser consideradas como melhoria adicional do método tradicional que se baseia apenas na identificação bacteriológica e sorológica, contribuindo para o tratamento e bloqueio de Doenças Transmitidas por Alimentos.

A evidência de fraude por substituição da carne bovina por bubalina nos estados do Pará e Amapá, indica que esse ato ocorre de forma consciente visando ganhos econômicos indevidos. A presença de *Salmonella* spp. nas amostras de carne bubalina, reforça o conceito de esses animais são abatidos em condições higiênico-sanitárias precárias, favorecendo a contaminação da carne por micro-organismos patogênicos.

Embora as informações aqui apresentadas sejam importantes, os resultados reforçam a necessidade de maiores estudos sobre a autenticação de produtos de origem animal, principalmente os processados, bem como a aplicação da técnica em outras variedades de produtos, com diferentes níveis de processamento.