

**Utilização de técnica de PCR para identificação de fraudes  
por substituição de espécies em embutidos frescos  
comercializados no Rio de Janeiro–RJ**

Stephanie Furtado Ramalho<sup>1</sup>, Rodrigo Silveira de Albuquerque<sup>2</sup>, Leandro dos Santos Machado<sup>3</sup>, Nathalie Costa da Cunha<sup>3</sup>, Elmiro Rosendo do Nascimento<sup>3</sup>, Alfredo Tavares Fernandez<sup>4</sup>.

1. **Discente PIBIC- UFF, FAVET-UFF,**
2. **Discente PIBIC FAPERJ - UFF, FAVET-UFF**
3. **Docente Departamento MSV , FAVET-UFF**
4. **Docente Departamento MTA, FAVET-UFF**

## **1. RESUMO**

O Brasil, além de ser um dos mais importantes produtores de carnes no mundo, possui um grande mercado consumidor interno dos derivados cárneos. A garantia da qualidade e integridade destes produtos devem ser avaliadas na medida em que, fraudes podem interferir na sociedade em questões culturais, de saúde e religiosas. Nesse sentido, tendo em vista que produtos processados requerem métodos mais avançados de inspeção, quando comparado com alimentos frescos, já que são difíceis de serem inspecionados macroscopicamente. Este estudo visou validar a técnica de PCR na avaliação e detecção de fraudes por adição de carnes de outras espécies em amostras de embutidos frescos comercializados na cidade do Rio de Janeiro. Utilizou-se seis amostras de linguiças com declaração da espécie da carne utilizada na rotulagem sendo cinco de origem suína e uma de frango. As amostras foram submetidas a técnica de PCR com pares de primers para as espécies suína, ovina, bovina e de frango. Após corrida eletroforética constatou-se que todas as linguiças expostas para comercialização como sendo unicamente de origem suína apresentavam adição não declarada de carne de frango. No entanto, as amostras fraudadas não estavam adicionadas de carne ovina e/ou bovina. Já a amostra da linguiça de frango foi a única que não estava adulterada. Apesar do pequeno número de amostras, evidencia-se uma possível falta de controle pelos órgãos de inspeção, inclusive porque uma das amostras não apresentava registro em regime de inspeção. Dessa forma, o PCR mostrou-se como uma técnica eficiente para a detecção dessas fraudes em embutidos crus como a linguiça frescal.

## **2. INTRODUÇÃO**

O Brasil se encontra entre os países que são os maiores produtores e exportadores de carne do mundo, além de possuir um mercado interno com valores aproximados de consumo per capita superiores a 80 kg/hab/ano. O país também sobressai na produção de derivados cárneos como os embutidos e desses; a linguiça frescal, elaborada com carne suína, é a mais comum e também a mais apreciada enquanto a linguiça frescal de carne de aves também vem obtendo resultados expressivos na comercialização já que essa espécie de carne é considerada mais saudável pelos consumidores. As Adulterações Economicamente Motivadas –AEM vem sendo estudadas mundialmente não só pela questão econômica, mas também por práticas religiosas e culturais além de envolvimento com questões de saúde coletiva.

Nos dias atuais, o consumo de carne tem deixado os consumidores em alerta, sendo exigido assim, a precisão do rótulo, a fim de orientar a escolha do produto por parte da população, a qual leva em consideração estilos de vida, religião e questões de saúde (Ballin, 2009). A rotulagem é o principal meio de comunicação entre produtores e consumidores. Embora às políticas de rotulagem sejam diferentes, de caráter amplo, fatores relevantes sobre alérgenos devem fazer parte da prática de rotulagem (Premanandh, 2013).

Segundo Meerza et al. (2019), a adulteração de alimentos e a falta de identificação correta de seus componentes nos rótulos são ameaças à sua integridade se tornando a principal preocupação para indústria, consumidores e governos ao redor do mundo. No ponto de vista econômico, as constatações de fraude nos produtos implicam em diminuição no seu valor. Já para Tibola et al. (2018) existem outras consequências mais prejudiciais para a indústria do que o impacto econômico direto, como a perda de confiança de investidores, clientes,

consumidores e autoridades. Esta prática é uma ameaça para a sustentabilidade, e a redução das adulterações e vulnerabilidades são de extrema prioridade para o Brasil.

Além dos impactos econômicos da fraude em alimentos, a preocupação com relação a composição dos alimentos e autenticidade são necessários por algumas razões: aparecimento de doenças de origem alimentar; tráfico ilegal de espécies animais e estudos de biodiversidade. Dessa forma, uma nova e confiável técnica é uma grande preocupação para fornecer uma solução promissora (Yacoub; Sadek, 2017).

Atualmente, as pessoas exigem informações claras e confiáveis nos rótulos dos alimentos o que leva a um grande impacto sobre a economia, uma vez que a escolha do consumidor é muito influenciada pela composição dos alimentos detalhada na rotulagem. No caso de produtos de carne processados, uma simples inspeção visual não permite diferenciar facilmente os diferentes componentes (Sentandreu; Sentandreu, 2014).

Para Kumar et al., (2017), a segurança dos alimentos é uma preocupação mundial, tendo em vista que toxinas produzidas por microrganismos contaminantes e episódios de adulteração podem ocasionar enfermidades, como induzir êmese, diarreia e até mesmo óbito. Além de causarem danos à saúde pública e custos econômicos, os incidentes de fraude alimentar causam efeitos secundários, os quais incluem perda de confiança pública na indústria e na efetividade dos sistemas regulatórios dos governos (Everstine et al., 2018).

Mais recentemente, a ideia de fraude ou crime em alimentos veio à tona como uma prática sofisticada realizada por criminosos que enganam os consumidores a respeito da verdadeira natureza do produto, a fim de obter ganhos financeiros (Brooks et al., 2017, Barrere et al., 2020). Estas adulterações nos alimentos podem ser de diferentes tipos: substituição de um componente por outro de menor custo; presença de ingredientes não declarados no rótulo; data de validade equivocada; falsa declaração de métodos de processamento; indicação superior de ingredientes ao que realmente consta no produto; falsa origem geográfica e de produção (Scarano; Rao, 2014).

Apesar da fraude ter como objetivo permanecer indetectável para o consumidor (Barrere et al., 2020), vem aumentando a consciência da população diante de ocorrências como adição de melamina em produtos pets e em leites; adição de carne de cavalo não declarada e repetitivas substituições de espécies marinhas (Spink et al., 2016). Depois do caso de adulteração de alimentos por carne de cavalo ocorrido em 2013, a prática de substituição de espécies ganhou maior atenção, já que por vezes é difícil detectar a fraude, especialmente em produtos processados (Prandia et al., 2019).

O estabelecimento e publicação das definições básicas de fraudes foram importantes à medida que os eventos se tornaram melhor conhecidos globalmente, o que influenciou o desenvolvimento de muitas leis internacionais no Parlamento Europeu, nos Estados Unidos, Reino Unido, Coreia do sul e China (Spink et al., 2014). No entanto, apesar da existência de inúmeras legislações em muitos países, a adulteração de alimentos ainda é uma realidade que demanda atenção em todo o mundo e causa preocupações com relação à qualidade dos alimentos (Montowska et al., 2015).

A técnica de Reação em Cadeia de Polimerase ou Polymerase Chain Reaction – PCR pode ser utilizada para identificar as fraudes além de ser uma técnica rápida, econômica e de fácil execução. O DNA vem sendo extensivamente utilizado na identificação de espécies em diferentes produtos, devido a facilidade de extração de muitas matrizes biológicas mesmo após tratamentos físicos como o cozimento e de possuírem a capacidade de fornecer sequências de material genético por meio de ensaios de PCR (Schiavo et al., 2018). Assim, diante dos casos de adulterações, a cadeia produtiva de alimentos deve estar empenhada para desenvolver novas soluções tecnológicas ou se basear nas técnicas de análise de DNA, a fim de torná-las basilares na verificação da autenticidade de produtos cárneos e atuar no combate a fraudes e erros de rotulagem (Wiedemair, 2018). Portanto, o recente desenvolvimento de métodos moleculares para identificação de carnes ganhou atenção. A maioria destes é baseada em PCR (Girish et al., 2004). A técnica de PCR foi evoluída e sofisticada pela utilização do PCR em tempo real. A amplificação e detecção das sequências específicas de DNA simultaneamente se tornou possível com a adição de brometo de etídio que ao se ligar à dupla cadeia de DNA, e excitado pela luz UV, emitia fluorescência proporcional a quantidade de DNA na amostra permitindo a visualização do produto de PCR a cada ciclo (Logan et al., 2009). Esse trabalho teve como objetivos validar a técnica de PCR convencional na avaliação e detecção de fraudes por adição de carnes de outras espécies não declaradas no rótulo em linguiças comercializadas na cidade do Rio de Janeiro

### 3. METODOLOGIA

Para as amostras controle positivo, foram usados tecidos musculares provenientes de carne suína, bovina, ovina e de frango adquiridos em supermercados.

A preparação das carnes padrões para a PCR foi feita a partir da maceração de aproximadamente um grama de carne com a mistura de 800 µL de Solução Tampão Fosfato -PBS. Em seguida, a extração do DNA foi realizada pelo método fenol: clorofórmio adaptado por Sambrook e Russel et al. (2006). Foram transferidos 500 µL de amostra para microtubos de 1,5 mL e centrifugados por 20 minutos a 13.500 rpm. Após essa etapa, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 600 µL de Tris EDTA dextrose (Ludwig Biotec, Brasil) sendo adicionados 30 µL de proteinase K - 240 µg/mL (GE Healthcare, UK) e 30 µL de dodecilsulfato de sódio - SDS 10% (Ludwig Biotec, Brasil), submetido a vórtex para homogeneização e seguido de incubação em banho de água a 50-55°C durante 30 minutos. Na sequência, procedeu-se a purificação do DNA onde os tubos foram resfriados à temperatura ambiente e 500 µL de fenol (LGC Biotecnologia, Brasil) foram adicionados, seguido de homogeneização por 10 minutos e centrifugação a 13.500 rpm por 30 minutos. A fase superior foi transferida para um novo microtubo com 500µL de clorofórmio (VETEC, Brasil), homogeneizada por 3 minutos e submetida a centrifugação a 13500 rpm por 10 minutos. Após esse período, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo com 1000µ de etanol (VETEC, Brasil) e reservado no congelador durante a noite. No outro dia, os microtubos foram centrifugados durante 20 minutos a 13.500 rpm e o etanol foi descartado e as amostras foram secas à temperatura ambiente. Em seguida, os pellets foram ressuspensos em 100 µl de Tris EDTA pH 8,3 e armazenados a -20 ° C. O resultado da extração foi quantificado e avaliado no espectrofotômetro Biodrop Touch ®.

As reações de PCR utilizadas para detectar tecido muscular de suíno, bovino, ovino e frango foram realizadas de acordo com Di Pinto (2015). A reação de PCR teve um volume final de 25 µL contendo: 1X PCR buffer (10 mM Tris HCl, 50 mM KCl (pH 8.3)), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 mM de dNTP, 0,25 µM de cada primer, 2,5 U de Taq polimerase (Ludwig, Brasil) e 5µL de DNA. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador (Px2 Thermal Cycler, Thermo Electron Corporation) seguindo uma desnaturação inicial a 94°C por 5 min, 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 s, anelamento a 59°C por 30 s, extensão a 72°C por 45s e extensão final a 72°C por 5 min. Os primers utilizados, sequências e tamanho dos amplicons estão especificados no Quadro 1.

QUADRO 1. Primers, sequência de nucleotídeos e tamanho de amplicon utilizados na detecção de tecidos musculares de diferentes espécies animais.

<b>Primers</b>	<b>Sequência</b>	<b>Tamanho do Amplicon</b>	<b>Referência</b>
<b>Suíno</b>	GCT GAT AGT AGA TTT GTG ATG ACC GTA	398	(Matsunaga et al. 1999)
<b>Bovino</b>	CTA GAA AAG TGT AAG ACC CGT AAT ATA AG	274	(Matsunaga et al. 1999)
<b>Frango</b>	AAG ATA CAG ATG AAG AAT GAG GCG	227	(Matsunaga et al. 1999)
<b>Ovino</b>	AAA CAT AGC CTA TGA ATG CTG TGG CTA TTG TC	340	(Matsunaga et al. 1999)

Os amplicons obtidos na PCR foram aplicados em gel de agarose a 1,5%, submerso em Tampão Tris-Borato-EDTA (TBE), e então submetidos à corrida eletroforética. Após a corrida eletroforética, o gel foi corado em brometo de etídio e a visualização dos “amplicons” foi realizada sob luz ultravioleta em transiluminador.

Após a padronização dos controles positivos, seis amostras de linguiças adquiridas em supermercados da cidade do Rio de Janeiro foram coletadas para a aplicação da PCR (Tabela 1). As amostras foram submetidas a extração Fenol-Clorofórmio e quantificadas no espectrofotômetro Biodrop para posterior realização da PCR que foi então realizada com os primers específicos para espécie suíno, bovino, ovino e frango e os amplicons submetidos a corrida eletroforética.

Tabela 1: Designação de venda, regime de inspeção sanitária e matéria prima das amostras de embutidos frescos analisadas.

Amostras	Designação de venda	Matéria prima	Regime de Inspeção Sanitária
A	Linguiça de pernil	Pernil suíno	Federal
B	Linguiça de carne suína	Carne suína	Federal
C	Linguiça de pernil	Pernil suíno	Federal
D	Linguiça de frango	Frango	Federal
E	Linguiça de pernil	Pernil suíno	Federal
F	Linguiça de porco	Carne suína	Ausente

#### 4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

A viabilização da técnica de PCR convencional no presente experimento para detecção de fraudes por adição de espécies não declaradas no rótulo foi considerada importante. Nesse contexto, Kušec et al. (2017) compararam o PCR convencional com o Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) -PCR a fim de identificar carnes bovinas, de frango e ovinas em salsichas suínas. O estudo constatou que o RFLP-PCR foi capaz de

identificar apenas carne de frango, enquanto que o PCR tradicional a verificou a presença tanto de frango quanto das outras espécies citadas.

Todos os controles positivos apresentaram amplicons com faixas de tamanho esperado (bovino com 274 pb, ovino com 340 pb, frango com 227 pb e suíno com 398pb) conforme a Figura 1. Ainda, de acordo com a tabela 2 e figura 1, verifica-se que todas as amostras de embutidos frescais de carne suína foram fraudadas com carne de frango. Apenas a amostra de embutido frescal que foi elaborada com carne de frango estava idônea. A incidência dessa fraude nos embutidos frescais de carne suína se justifica como AEM; inclusive no aspecto relacionado a detecção da fraude. Não houve detecção das carnes bovina ou ovina nas análises efetuadas.

No Brasil, Felk (2014) em seus resultados com a utilização de PCR detectou fraudes como uso de carne de frango na elaboração de linguiça calabresa sem estar contido na rotulagem e uso de carne de frango na elaboração de apresuntado, uma grave não conformidade já que esse produto não permite tal uso.

Tabela 2: Resultados das análises de PCR em amostras de linguiças segundo a utilização de matriz cárnea em comparação com a rotulagem.

Amostras	Rótulo	DNA			
		Suíno	Ovino	Frango	Bovino
A	Suíno	+	-	+	-
B	Suíno	+	-	+	-
C	Suíno	+	-	+	-
D	Frango	-	-	+	-
E	Suíno	+	-	+	-
F	Suíno	+	-	+	-



Figura 1: Corrida em gel de eletroforese. A seta verde indica o amplicon do Controle positivo da amostra padrão bovino; a seta azul indica o controle positivo da amostra padrão de músculo de ovino. A seta laranja indica que todas as amostras apresentaram presença do DNA de músculo de frango; A seta vermelha indica as amostras que deram positivo para DNA suíno.

A ocorrência de fraudes em embutidos frescos de carne suína parece se justificar pelo baixo preço da carne de frango o que barateia o custo final. Previam-se que por tratar-se de estabelecimentos sob regime de Inspeção Federal, que esse tipo de fraude teria ocorrência mínima, o que não se efetivou. Já produtos elaborados sem regime de inspeção teriam maior chance de apresentar esse tipo de fraude o que se efetivou em uma das amostras. Nesse contexto, uma elevada ocorrência foi constatada por Ayaz et al. (2006) ao utilizarem a técnica ELISA que identificou que 39,2 % das salsichas, 35,7% dos salames, 37,2% dos “frankfurters”, 22,2 % da carne crua e 6,2% das almôndegas apresentaram espécies não declaradas na embalagem.

Perestam et al. (2017) compararam o real-time PCR e o ELISA na análise de adulteração de salsichas, embutidos e amostras de carne moída. O estudo concluiu que ambos foram eficientes, porém o PCR foi considerado adequado para análise de produtos processados e com níveis baixos de adulteração, enquanto que o ELISA destaca-se pela sua maior facilidade de aplicação.

Corroborando os resultados; no Brasil; Felk (2014) ao analisar 27 amostras de produtos cárneos comerciais, a metodologia PCR se mostrou satisfatória e robusta, uma vez que detectou adulteração em três amostras, além de não demonstrar variação nos resultados em função do tratamento térmico utilizado no produto.



## 6. CONCLUSÕES

A utilização da técnica de PCR foi considerada eficiente para a detecção das fraudes por substituição de espécies em embutidos frescos. A ocorrência dessas fraudes em cinco das seis amostras de linguiças cruas utilizadas, com uso da carne de frango, sugere que as práticas enganosas são comuns na elaboração destes alimentos.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AYAZ Y.; AYAZ N. D.; EROL I. Detection of species in meat and meatproducts using enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Food Muscle**. v. 17, n. 2, 2006, Pages 214–220.

BALLIN, N. Z.; VOGENSEN, F. K.; KARLSSON, A. H. Species determination - Can we detect and quantify meat adulteration?. **Meat Science**. v. 83, n. 2, 2009, Pages 165-17.

BARRERE, V.; EVERSTINE, B. K.; THÉOLIERA, J.; GODEFROYA, S. Food Fraud Vulnerability Assessment: Towards a global consensus on procedures to manage and mitigate food fraud. **Trends in Food Science & Technology**. v. 100, 2020, Pages 131-137.

BROOKS S.; ELLIOTTI, C. T.; SPENCE, M.; WALSH, C.; DEAN, M. Four years post-horsegate: an update of measures and actions put in place following the horsemeat incident of 2013. **Npj Science of Food**. v. 1, n. 5, 2017.

DI PINTO, A.; BOTTARO, M.; BONERBA, E.; BOZZO, G.; CECI, E.; MARCHETTI, P.; MOTTOLA, A.; TANTILLO, G. Occurrence of mislabeling in meat products using DNA-based assay. **Journal Food Science Technology**. v. 52, 2015, Pages, 2479-2484.

EVERSTINE, K, ABT E, MCCOLL D, POPPING, B.; MORRISON-ROWE S.; LANE, R.W.; SCIMECA, J.; WINTER, C.; EBERT, A.; MOORE, J. C.; CHIN, H. B.. Development of a Hazard Classification Scheme for Substances Used in the Fraudulent Adulteration of Foods. **Journal of Food Protection**. v. 81, n. 1, 2018, Pages 31-36.

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

GIRISH, P. S.; ANJANEYULU, A. S.; VISWAS, K. N.; ANAND, M.; RAJKUMAR, N.; SHIVAKUMAR, B. M.; BHASKAR, S. Sequence analysis of mitochondrial 12S rRNA gene can identify meat species. **Meat Science**, v. 66, n. 3, 2004, Pages 551–556.

KUMAR, V.; GULERIA, P.; MEHTA, S. K. Nanosensors for food quality and safety assessment. **Environmental Chemistry Letters**. v. 15, n. 2, 2017, Pages 165–177.

KUŠEC, I. D.; SAMAC, D. MARGETA, D. RADIŠIĆ, Z.; VINCEK, D.; KUŠEC G. Efficiency of PCR-RFLP and Species-specific PCR for the Identification of Meat Origin in Dry Sausages. **Food Analysis, Food Quality and Nutrition**. v. 35, n. 5, 2017, Pages 386-391.

LOGAN, J. M. J.; EDWARDS, K.J.; SAUNDERS, N. A. **Real-Time PCR: Current Technology and Applications**. 1st ed., Horizon Scientific Press, 2009, Page-65.

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

MEERZA, S. I. A.; GUIANNAKAS, K.; YIANNAKA, A. Markets and welfare effects of food fraud. **The Australian Journal of Agricultural and Resources Economics**. v. 63, 2019, Pages 759-789.

MONTOWSKA, M.; ALEXANDER, M. R.; TUCKER, GREGORY A.; BARRETT, D. A. Authentication of processed meat products by peptidomic analysis using rapid ambient mass spectrometry. **Food Chemistry**. v. 187, 2015, Pages 297–304.

PERESTAM, A. T.; FUJISAKI, K. K.; NAVA, O.; HELLBERG, R. S. Comparison of real-time PCR and ELISA-based methods for the detection of beef and pork in processed meat products. **Food Control**. v. 71, 2019, Pages 346–352.

PRANDIA B.; VARANIA M.; FACCINIC A.; LAMBERTINID, F. SUMAND, M.; LEPORATID, A.; TEDESCHIA, T.; SFORZA, S.; Species specific marker peptides for meat authenticity assessment: A multispecies quantitative approach applied to Bolognese sauce. **Food Control**. v. 97, 2019, Pages 15-24.

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

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. Purification of Nucleic Acids by Extraction with Phenol:Chloroform. **Cold Spring Harb Protocol**. v. 1, 2006.

SCARANO, D.; RAO, R.; DNA Markers for Food Products Authentication. **Diversity**. v. 6, p. 579-596. 2014.

SCHIAVO, G.; UTZERI, V. J.; BERTOLINI, F.; GERACI C.; BOVO, S.; Fontanesi L. Application of next generation semiconductor based sequencing for species identification and analysis of within-species mitotypes useful for authentication of meat derived products. **Food Control**. v. 91, 2018, Pages 58-67.

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

SPINK J.; FORTIN, N. D.; MOYER, D. C.; MIAO, H.; WU, Y. Food Fraud Prevention: Policy, Strategy, and Decision-Making - Implementation Steps for a Government Agency or Industry. **Chimia (Aarau)**. v. 70, n. 5, 2016, Pages 320-328.

SPINK, J.; MOYER, D. C. Introducing Food Fraud Including Translation and Interpretation to Russian, Korean, and Chinese Languages, **Food Chemistry**. v. 189, 2014, Pages 102-107.

TIBOLA, C. S.; SILVA, S. A.; DOSSA, A. A.; PATRÍCIO, D. I.; Economically Motivated Food Fraud and Adulterations in Brazil: Incidents and Alternatives to Minimize Occurrence. **Journal of Food Science**. v. 83, n. 8, 2018, Pages 2028-2038.

WIEDEMAIR, M.; BIASIO, R.; LEITNER, D.; BALTHASAR, C.; W. HUCK. “Application of Design of Experiment for Detection of Meat Fraud with a Portable Near-Infrared Spectrometer”, **Current Analytical Chemistry** v. 14, 2018, Page 58.

YACOUB, H. A.; SADEK, M. A. Identification of fraud (with pig stuffs) in chicken-processed meat through information of mitochondrial cytochrome b. **Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal**. v. 28, n. 6, 2017, Pages 855-859.