

# Avaliação da técnica PCR *multiplex* para detecção de fraude por adição de carne bubalina em carne moída bovina

## Evaluation of a multiplex PCR for detection of a fraud in the minced beef meat by adding buffalo meat

RIALA6/1671

Andrey Carlos do Sacramento de OLIVEIRA<sup>1</sup>, Bárbara Cristina Amorim FERREIRA<sup>1</sup>, Gabrielle Virgínia Ferreira CARDOSO<sup>1</sup>, Cleyzer Lopes SILVA<sup>1</sup>, Andréia Silva da SILVA<sup>1</sup>, Flávio da SILVA<sup>1</sup>, Rafael Monteiro de MELO<sup>1</sup>, Diogo José CARDILLI<sup>2</sup>, Fábio Pereira Leivas LEITE<sup>3</sup>, Talita Bandeira ROOS<sup>1</sup>, Carina Martins de MORAES<sup>1\*</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Laboratório de Higiene e Qualidade de Alimentos e Laboratório de Microbiologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Programa de Pós-graduação em Saúde Animal na Amazônia, Universidade Federal do Pará (UFPA), Campus Castanhal. Instituto de Medicina Veterinária da UFPA, Campus Castanhal. BR 316, Km 62, Bairro Saudade, Castanhal, PA. CEP: 68740-970. Tel: 91 3711-4723. E-mail: carinamoraes@ufpa.br

<sup>2</sup>Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Vigilância Agropecuária Internacional – VIGIAGRO, Aeroporto Val-de Cans, Belém, Pará

<sup>3</sup>Laboratório de Bacteriologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico – CD Tec, Faculdade de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas (UFPel)

Recebido: 22.04.2015 - Aceito para publicação: 22.10.2015

### RESUMO

O presente trabalho avaliou a sensibilidade de uma modalidade de técnica de PCR *multiplex* para efetuar a detecção de fraude por adição intencional de carne moída bubalina em carne moída bovina. Neste contexto, as amostras de carnes moídas de bovinos com adição de 0,01 %, 0,1 %, 1,0 %, 5,0 %, 10,0 %, 25,0 %, 50,0 %, 75,0 %, 90,0 %, 95,0 %, 99,0 %, 99,9 %, 99,99 % de carne moída bubalina foram produzidas em triplicata com cinco réplicas. As carnes moídas exclusivamente de cada uma das espécies foram utilizadas como amostras controle. Cada uma das amostras produzidas foi analisada por meio de Reação em Cadeia da Polimerase *multiplex*. A fim de realizar a análise da sensibilidade do teste, percentagens conhecidas de amostras de DNA (0,01 %, 0,1 %, 1,0 %, 5,0 %, 10,0 %, 25,0 %, 50,0 %, 75,0 %, 90,0 %, 95,0 %, 99,0 %, 99,9 %, 99,99 %) das espécies *Bos taurus* e *Bubalus bubalis* foram diluídas e misturadas em um volume final de 10 µL; e estas foram também analisadas pela metodologia de PCR proposta. A técnica de PCR *multiplex* mostrou ser eficaz e de alta sensibilidade, capaz de detectar incrementos de 10,0 % (2,05 ng) de DNA bubalino e de 0,1 % (0,041 ng) de DNA bovino.

**Palavras-chave.** identificação de espécies, autenticidade de alimentos, adulteração.

### ABSTRACT

This study aimed at evaluating the sensitivity of a multiplex PCR technique for detecting fraud by the deliberate addition of buffalo meat into the minced bovine beef. The minced bovine beef containing 0.01 %, 0.1 %, 1.0 %, 5.0 %, 10.0 %, 25.0 %, 50.0 %, 75.0 %, 90.0 %, 95.0 %, 99 %, 99.9 %, 99.99 % of minced buffalo beef were produced in triplicate, with five replicates. The minced meats exclusively of each animal species were used as control samples. Every prepared sample was analyzed by means of multiplex polymerase chain reaction. For performing the assay sensitivity analysis, the known concentrations of DNA samples (0.01 %, 0.1 %, 1.0 %, 5.0 %, 10.0 %, 25.0 %, 50.0 %, 75.0 %, 90.0 %, 95.0 %, 99.0 %, 99.9 %, 99.99 %) from *Bos taurus* and *Bubalus bubalis* species were diluted and mixed into a final volume of 10 µL; and these DNA samples were also assayed by the proposed PCR methodology. The multiplex PCR showed to be is an effective and highly sensitive technique enough for detecting increments of 10 % (2.05 ng) of bubaline DNA and of 0.1 % (0.041 ng) of bovine DNA.

**Keywords.** species identification, food authenticity, adulteration.

## INTRODUÇÃO

De acordo com a Instrução Normativa (IN) nº 83 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), de 21 de novembro de 2003, entende-se por carne moída o produto cárneo obtido a partir da moagem de massas musculares de carcaças de bovinos, seguido de resfriamento ou congelamento. A referida IN acrescenta que esse regulamento aplica-se também ao produto obtido a partir da carne de búfalos, porém o critério de Designação (Denominação de Venda) do referido alimento determina que este deva ser designado de “Carne Moída”, seguido de expressões ou denominações que o caracterizem de acordo com sua temperatura e do nome da espécie da qual foi obtida<sup>1</sup>.

Com o objetivo de atingir públicos de todas as camadas sociais, a indústria de carne tem produzido alimentos com características diversificadas<sup>2</sup>. A carne moída é um alimento que se destaca entre os demais produtos cárneos especialmente por sua elevada aceitação pelo consumidor, ligada a sua praticidade e preços acessíveis<sup>3,4</sup>. No entanto, com a elevação dos custos dos cortes cárneos utilizados na produção de carne moída bovina, tem-se relatado que algumas indústrias, com o objetivo de tornar a produção menos onerosa, têm incorporado fraudulentamente tecidos inferiores ou matérias-primas cárneas de baixo valor comercial. Neste contexto, a carne bubalina vem sendo introduzida no mercado como carne bovina, visto que apesar de possuir um elevado valor nutricional, em alguns lugares pode vir a custar até 20 % menos que a carne bovina<sup>5</sup>, devido principalmente à baixa aceitação do consumidor ligada à ausência de informações que estimulem um nicho de mercado para o seu consumo, realidade que países como a Itália e Austrália já vivenciaram e superaram com a implementação de campanhas publicitárias a respeito da carne bubalina<sup>6</sup>. Portanto, em virtude de ser amplamente consumida, torna-se fundamental levantar as questões referentes a possíveis fraudes na comercialização de tais produtos<sup>2</sup>.

Segundo o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), entende-se por fraude a alteração ou modificação total ou parcial de um ou mais elementos normais do produto, quando as operações de manipulação e elaboração forem executadas com a intenção deliberada de estabelecer falsa impressão aos produtos fabricados, quando há supressão de um ou mais elementos e substituição por outros, ou ainda, quando há especificação total ou parcial na rotulagem de um determinado produto que não seja o contido na embalagem ou recipiente<sup>7</sup>. As ações fraudulentas privam o consumidor do direito de conhecer efetivamente o que está consumindo, podendo gerar problemas de saúde ligados ao desenvolvimento de processos alérgicos ou de intolerância, econômicos ou de cunho religioso<sup>8</sup>.

Alguns pesquisadores relatam que a prática de fraude em produtos miscigenados é mais frequente entre alimentos que apresentam características organolépticas semelhantes, destacando a carne bovina e bubalina nessa questão<sup>9</sup>. Segundo os dados recentes do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística<sup>10</sup>, o Brasil apresentava em 2012 um efetivo de rebanho bubalino de 1.261.922 cabeças, onde a região Norte representa o maior percentual de rebanho de bubalinos do país, sendo que o estado do Pará detém 36 % e o estado do Amapá 20,1 % de todo o plantel nacional. No entanto, a cadeia produtiva do búfalo não se encontra organizada no país, apresentando uma ausência de estratégias de coordenação. Apesar de percorrer diferentes níveis, esses não encontram-se integrados na referida cadeia produtiva, o que gera fragilidade no seguimento, aumentando a probabilidade de práticas fraudulentas<sup>5</sup>.

Faz-se necessário ressaltar o agravante dos abates clandestinos que distorcem os dados reais do consumo da carne bovina e bubalina e estes, por não serem supervisionados, ocorrem geralmente em locais não apropriados e em condições higiênicas precárias, chegando a ser responsáveis, em alguns estados do país, por 41 % da carne fornecida à população<sup>11</sup>. Por toda essa problemática, a avaliação de autenticidade das carnes

tornou-se um elemento relevante em procedimentos de controle de qualidade dos alimentos<sup>12</sup>.

Estudos descreveram diferentes métodos aplicados à análise de adulterações em produtos de origem animal em que diversas formas da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foram apontadas como viáveis para a detecção de fraude em produtos lácteos, tais como a PCR tradicional, PCR *multiplex* e a *Real Time* PCR<sup>9</sup>. Embora a referida técnica venha sendo descrita para utilização em amostras de leite e seus derivados, poucos estudos nacionais tem demonstrado sua eficiência para análise de produtos cárneos, como a carne moída.

Por esta razão, o presente trabalho tem por objetivo avaliar a sensibilidade de uma Reação em Cadeia da Polimerase *multiplex* para detecção de fraude por adição de carne bubalina à carne moída bovina, através da produção de carne moída experimentalmente fraudada contendo diferentes percentagens de carne moída bubalina.

## MATERIAL E MÉTODOS

Carnes moídas bovinas fraudadas experimentalmente foram fabricadas em triplicata no Laboratório de Higiene e Qualidade de Alimentos da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Pará – Campus Castanhal, através do incremento de 0,01 %, 0,1 %, 1 %, 5 %, 10 %, 25 %, 50 %, 75 %, 90 %, 95 %, 99 %, 99,9 %, 99,99 % de carne bubalina e carnes moídas exclusivamente de cada uma das espécies foram produzidas para serem usadas como grupo controle da variável em análise. As amostras foram preparadas para uma massa total de 10 g, sendo a sequência da moagem iniciada nas amostras com menor concentração de carne de búfalo. Após o preparo de todos os percentuais de fraude, cinco réplicas de cada grupo foram isoladas, perfazendo um total de 225 amostras.

O DNA das amostras foi extraído através do *kit Wizard Genomic DNA Purification* (Promega®) de acordo com as instruções do fabricante, com modificações na etapa de lise inicial, relacionadas com a adição de 20 mg

de Proteinase K e incubação *overnight* em banho-maria, a 65 °C. As amostras de DNA foram submetidas a eletroforese em gel de agarose a 1 %, corrida em tampão TBE a 0,5 % e em seguida o gel foi imerso em brometo de etídeo na concentração de 5 µg/mL, durante 30 minutos. A análise dos resultados da eletroforese foi realizada com o auxílio de um equipamento de foto documentação sobre luz ultravioleta associado ao *Software Total Lab*® TL 100v. 2006.

A fim de auxiliar a análise da sensibilidade do teste, concentrações conhecidas de DNA (0,01 %, 0,1 %, 1 %, 5 %, 10 %, 25 %, 50 %, 75 %, 90 %, 95 %, 99 %, 99,9 %, 99,99 %) das espécies (bovino e bubalino) foram diluídas previamente em tampão Tris-EDTA (TE) e misturadas em um volume final de 10 µL para serem utilizadas posteriormente como amostras controle durante a realização da PCR *multiplex* proposta.

Para a quantificação do DNA, utilizou-se o espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 UV-Vis e com o objetivo de se verificar a pureza das amostras, medição da absorbância a 280 nm foi realizada, correspondendo ao pico de absorção de raios ultra-violetas (UVs) de proteínas, e a 230 nm, que corresponde ao pico de absorção de UVs de contaminantes orgânicos.

Para a realização das reações de PCR *multiplex* foram utilizados iniciadores que amplificam sequências específicas para a espécie bubalina (*Primer reverse* 5' TTCATAATAACTTTTCGTGTTGTTGGGTGT 3'), para a espécie bovina (*Primer reverse* 5' AAATAGGGTTAGATGCACTGAATCCAT 3') e que amplificam sequências comuns as duas espécies (*Primer forward* 5' CTAGAGGAGCCTGTTCTATAATCGATA 3'), descritos previamente por López-Calleja et al<sup>13</sup>, que amplificam sequências de 220 pares de base (pb) para DNA bubalino e de 346 pb para bovinos. Os iniciadores foram preparados de acordo com a instrução do fabricante (Ludwing Biotec®), sendo diluídos em tampão TE pH 8,0, até a concentração de 100 pmol/µL.

A metodologia da PCR *multiplex* proposta foi realizada de acordo com o descrito anteriormente por Darwish et al<sup>14</sup> com modificações, sendo a solução para PCR calculada para um volume

final de 25  $\mu$ L para cada reação. Para tal, foram utilizados 50 mM de KCl e 10 mM Tris-HCl (tampão 1X), 10 mM dNTP *mix*, aproximadamente 8,2 ng de DNA molde, 1U Taq DNA Polimerase e 10 pmol de cada iniciador, sendo o volume completado com água ultra pura esterilizada. O termociclador foi programado para 30 ciclos, onde as temperaturas e os tempos utilizados para desnaturação, anelamento e extensão foram, respectivamente, 93 °C/30 s, 56 °C/30 s e 72 °C/30 s, acrescidos de desnaturação inicial a uma temperatura de 93 °C/3 min e extensão final a 72 °C/10 min.

Os *amplicons* obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,0 %, corrida em tampão TBE a 0,5 %, sendo em seguida imerso no brometo de etídeo na concentração de 5  $\mu$ g/mL, durante 30 minutos. A análise dos resultados foi realizada com o auxílio de um equipamento de foto documentação sobre luz ultravioleta associado ao *Software Total Lab*® TL 100v. 2006.

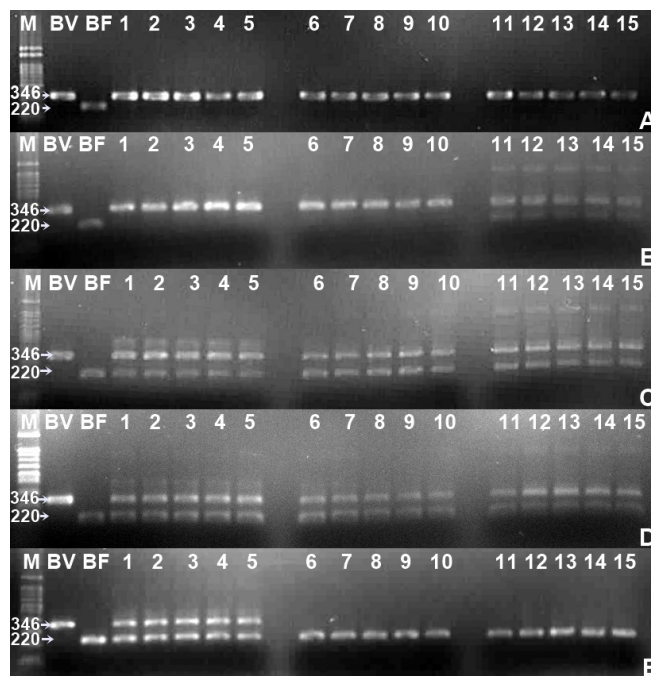
## RESULTADOS

Os resultados observados demonstraram que DNA foi obtido por meio da técnica proposta com qualidade e concentrações suficientes para a execução da PCR. A pureza e o rendimento do DNA total extraído foram verificados a partir da medição da absorbância a 230 nm, 260 nm e 280 nm, que indicaram valores com parâmetros de pureza e concentração média de DNA das amostras de 4,1 ng/ $\mu$ L.

A Figura 1 demonstra os resultados obtidos a partir da PCR *multiplex* realizada nos 15 grupos de carne moída experimentalmente fraudadas.

A Figura 2 demonstra os resultados obtidos a partir da PCR *multiplex* realizada nas diferentes diluições de DNA bovino e bubalino.

Os resultados demonstraram que a PCR *multiplex* proposta mostrou-se eficaz para a detecção simultânea de DNA de bovinos e bubalinos, com um limiar de 2,05 ng de DNA bubalino e 0,041 ng de DNA bovino, sendo capaz de identificar incrementos de 10 %, 25 %, 50 %, 75 %, 90 %, 95 %, 99 %, 99,9 %, 99,99 % e 100 % de carne bubalina em carnes moídas bovinas e



**Figura 1.** Gel de agarose 1,0 % demonstrando a presença de fragmentos de DNA bovino (346 pb) e bubalino (220 pb) obtidos através de PCR *multiplex* realizada a partir de amostras de carne moída experimentalmente fraudadas com diferentes percentagens de carne moída bubalina e suas replicatas.

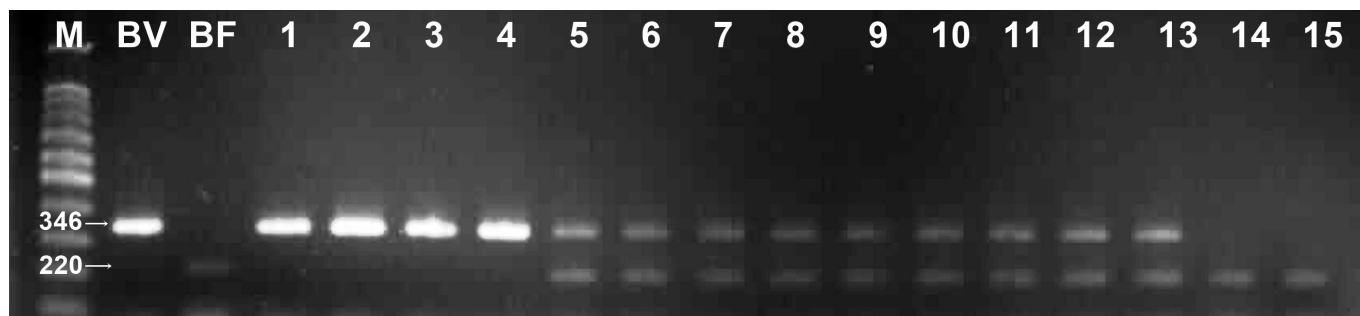
Para todas as corridas, M - marcador molecular 1 kb; BV - controle bovino (346 pb) e BF - controle bubalino (220 pb); Em A: canaletas 1 a 5 - carne moída 100 % bovina; canaletas 6 a 10 - carne experimentalmente fraudada contendo 0,01 % de carne moída bubalina; canaletas 11 a 15 - carne experimentalmente fraudada contendo 0,1 % de carne moída bubalina;

Em B: canaletas 1 a 5 - carne experimentalmente fraudada contendo 1 % de carne moída bubalina; canaletas 6 a 10 - carne experimentalmente fraudada contendo 5 % de carne moída bubalina; canaletas 11 a 15 - carne experimentalmente fraudada contendo 10 % de carne moída bubalina;

Em C: canaletas 1 a 5 - carne experimentalmente fraudada contendo 25 % de carne moída bubalina; canaletas 6 a 10 - carne experimentalmente fraudada contendo 50 % de carne moída bubalina; canaletas 11 a 15 - carne experimentalmente fraudada contendo 75 % de carne moída bubalina;

Em D: canaletas 1 a 5 - carne experimentalmente fraudada contendo 90 % de carne moída bubalina; canaletas 6 a 10 - carne experimentalmente fraudada contendo 95 % de carne moída bubalina; canaletas 11 a 15 - carne experimentalmente fraudada contendo 99 % de carne moída bubalina;

Em E: canaletas 1 a 5 - carne experimentalmente fraudada contendo 99,9 % de carne moída bubalina; canaletas 6 a 10 - carne experimentalmente fraudada contendo 99,99 % de carne moída bubalina e canaletas 11 a 15 - carne moída 100 % bubalina.



**Figura 2.** Gel de agarose 1,0 % demonstrando a presença de fragmentos de DNA bovino (346 pb) e bubalino (220 pb) obtidos através de PCR multiplex realizada a partir das diferentes diluições de DNA bovino e bubalino, onde: M - marcador molecular 1 kb; BV - controle bovino (346 pb); BF - controle bubalino (220 pb); canaleta 1 - DNA 100 % bovino; canaleta 2 - diluição de DNA contendo 0,01 % de DNA bubalino; canaleta 3 - diluição de DNA contendo 0,1 % de DNA bubalino; canaleta 4 - diluição de DNA contendo 1 % de DNA bubalino; canaleta 5 - diluição de DNA contendo 5 % de DNA bubalino; canaleta 6 - diluição de DNA contendo 10 % de DNA bubalino; canaleta 7 - diluição de DNA contendo 25 % de DNA bubalino; canaleta 8 - diluição de DNA contendo 50 % de DNA bubalino; canaleta 9 - diluição de DNA contendo 75 % de DNA bubalino; canaleta 10 - diluição de DNA contendo 90 % de DNA bubalino; canaleta 11 - diluição de DNA contendo 95 % de DNA bubalino; canaleta 12 - diluição de DNA contendo 99 % de DNA bubalino; canaleta 13 - diluição de DNA contendo 99,9 % de DNA bubalino; canaleta 14 - diluição de DNA contendo 99,99 % de DNA bubalino e canaleta 15 - DNA 100 % bubalino.

incrementos de 0,1 %, 1 %, 5 %, 10 %, 25 %, 50 %, 75 %, 90 %, 95 %, 99 %, 99,9 %, 99,99 % e 100 % de carne bovina em carnes moídas bubalinas.

## DISCUSSÃO

Diversos pesquisadores, de diversas partes do mundo, nos últimos anos vêm trabalhando em uma linha similar de pesquisa relacionada com fraude em alimentos, envolvendo carne de diversas espécies de animais, alguns detectando fraude por adição ou substituição de carnes de ruminantes<sup>15,16</sup>, de aves domésticas<sup>17,18</sup>, de suínos<sup>15,18</sup>, dentre outras<sup>19,20</sup>.

Vários estudos internacionais têm demonstrado a eficiência da utilização da técnica de PCR *multiplex* em identificar espécies diferentes em uma mesma reação, com metodologias e resultados similares aos obtidos na presente pesquisa. Alguns pesquisadores utilizaram iniciadores para detecção de fraude por adição e os resultados obtidos mostraram-se altamente específicos visto que, de 39 amostras analisadas (15 carnes cruas congeladas, 12 alimentos instantâneos congelados e 12 alimentos prontos para consumo comercializados por ambulantes) foi possível a detecção de fraude por adição de carne de frango (*Gallus gallus*) em carne de suíno (*Sus scrofa*) em

16,7 % dos alimentos instantâneos congelados e detecção de fraude por adição de carne de frango (*Gallus gallus*) e de ovino/caprino (*Ovis aries*) em carne de suíno (*Sus scrofa*) em 33,3 % das “comidas de rua” analisadas através da metodologia proposta por Kitpipit et al<sup>21</sup>.

O mesmo grupo incrementou a pesquisa citada acima com a identificação de mais três espécies além das propostas anteriormente, sendo estas carne de avestruz (*Struthio camelus*), equina (*Equus ferus caballus*) e bovina (*Bos indicus*), e a reação *multiplex* proposta foi capaz de identificar as seis espécies, sendo detectado em um total de 125 amostras de carne coletadas, 5 % de fraude por substituição de carne de avestruz (*Struthio camelus*) por carne de suíno (*Sus scrofa*) em carnes cruas congeladas e 64,7 % de fraude por substituição de carne de suíno (*Sus scrofa*) por carne de frango (*Gallus gallus*) em cortes frios analisados. O mesmo tipo de fraude envolvendo as duas espécies acima citadas foi detectada em carnes cruas congeladas (7,7 %) e em “comidas de rua” (33,3 %)<sup>22</sup>.

Da mesma forma, foi testada a técnica de PCR quanto à sua sensibilidade para detectar a carne bovina misturada com a carne bubalina, suína, caprina e de frango. Os resultados evidenciaram que a PCR foi capaz de identificar a espécie alvo a um nível inferior a 1 % de

incorporação<sup>9</sup>. Foi proposto também um método baseado em PCR *multiplex*, utilizando dois pares de iniciadores, em uma mesma reação, com o objetivo de amplificar dois fragmentos de DNA bovino de 121 e 290 pb. A pesquisa mostrou que a PCR *multiplex* é uma técnica rápida e segura, podendo ser considerada uma ferramenta útil no controle de carne e produtos cárneos de qualidade<sup>15</sup>.

No mesmo contexto, outro estudo utilizou uma PCR *multiplex* para avaliar a presença de carne fraudulenta em espécies de ruminantes (*Bos taurus*, *Capra hircus* e *Ovis aries*), aves domésticas (*Gallus gallus* e *Meleagris meleagris*) e de suíno (*Sus scrofa*) em carne moída, embutidos e cortes frescos. Foram coletadas 10 amostras de cada fonte, constatou-se que nenhuma das amostras apresentou resíduos de suíno, mas 40 % das amostras de embutidos e 30 % das amostras de corte fresco apresentaram DNA de aves, e não se constatou fraude nas carnes moídas analisadas<sup>15</sup>. Os resultados das pesquisas citadas acima juntamente com os apresentados no presente trabalho corroboram a informação de Veloso et al<sup>23</sup>, que afirmam que a utilização da PCR torna possível a identificação de uma espécie em diferentes produtos alimentares, detectando, assim uma possível adulteração.

No presente estudo iniciadores que amplificam sequências específicas da região alvo mitocondrial 12S do RNA ribossômico<sup>13</sup> foram utilizados e se mostraram altamente específicos e eficientes em detectar a fraude experimental realizada nas concentrações do presente trabalho, visto que a extração de DNA total das amostras das carnes moídas experimentalmente fraudadas, possibilitou a amplificação da sequência de DNA específica, referente às espécies de interesse.

Através da PCR *multiplex* realizada nas condições selecionadas no presente experimento foi possível se obter *amplicons* de 346 pb para carne moída bovina e 220 pb para carne moída bubalina (Figuras 1 e 2) e, através da fabricação de carnes moídas experimentalmente fraudadas com incremento de diferentes percentagens de carnes moídas bubalinas, observou-se que a PCR *multiplex* proposta foi capaz de detectar

a incorporação de carne moída bubalina em percentagens que variaram de 10 a 100 %, e a incorporação de carne bovina em percentagens que variaram de 0,1 a 100 %, semelhante ao relatado por López-Calleja et al<sup>13</sup> que desenharam os iniciadores e propuseram o uso de uma PCR tradicional para detecção de fraude em queijos.

Esses autores<sup>13</sup>, que desenharam um conjunto de iniciadores, dos quais três foram os utilizados no presente trabalho, analisaram misturas de queijo de leite de búfala e mozzarella de leite de búfala contendo diferentes percentagens de leite ou de queijo mozzarella bovina. Os resultados demonstraram um limiar de sensibilidade de 0,1 %. Os mesmos pesquisadores, em um outro experimento<sup>24</sup>, analisaram 5 séries independentes de misturas binárias de leite de vaca no leite de búfala, e os resultados da PCR *multiplex* nas misturas experimentais demonstraram capacidade de detecção de 0,1 a 100 % de leite de vaca no leite de búfala. Esse resultado foi reproduzido na presente pesquisa, onde o limite de detecção para a carne bovina foi de 0,1 % (Figura 2). No entanto, uma sensibilidade inferior foi apresentada na detecção de carne bubalina, sendo esta de 10 % (Figura 2). Não foi possível fazer uma correlação entre a sensibilidade de detecção de carne bubalina com os trabalhos citados anteriormente, visto que em nenhum de seus experimentos López-Calleja et al<sup>13, 24</sup> avaliaram a sensibilidade de detecção da espécie bubalina, em virtude de que o objetivo dos autores sempre foi o de determinar o limite de detecção da técnica para a detecção de DNA da espécie bovina adicionada em amostras bubalinas.

Essa capacidade diferenciada dos iniciadores em uma mesma reação de PCR, segundo Hou et al<sup>25</sup> evidencia que a sensibilidade da PCR *multiplex* varia de acordo com a espécie, gene alvo e tamanho do fragmento amplificado. Matsunaga et al<sup>18</sup> identificaram espécies de gado (*Bos taurus*), cabra (*Capra hircus*) e ovelha (*Ovis aries*), utilizando como região alvo o citocromo b, com um limite de detecção de 0,25 ng para todas as espécies. Outros autores<sup>26</sup> trabalhando com o gene alvo 12S do rRNA detectaram um limite de 0,002 % (0,0025 ng) para as mesmas

espécies de ruminantes. Zhang<sup>17</sup> trabalhando com alimentos pré-cozidos, cozidos e processados de carne bovina, utilizando como alvo o gene do citocromo b, detectaram o limite de 0,001 ng de DNA. Zha et al<sup>27</sup> amplificaram sequências da região do tRNA e encontraram limites diferenciados para as espécies em questão, sendo 0,5 % para bovinos (*Bos taurus*), 1 % para suínos (*Sus scrofa*) e 5 % para frangos (*Gallus gallus*). Estes dados demonstram que há uma carência de informações quanto a sensibilidade envolvendo a espécie *Bubalus bubalis*, porém os estudos acima mencionados e os resultados apresentados na presente pesquisa evidenciam que a variação na sensibilidade de detecção em pesquisas de PCR *multiplex* é um fenômeno natural e que varia de espécie para espécie, o que pode explicar o fato da sensibilidade aqui demonstrada para a carne bubalina ter sido inferior do que a para a carne bovina.

Os dados apresentados no presente trabalho demonstram que a técnica proposta pode ser uma importante ferramenta a ser utilizada pelos órgãos oficiais de fiscalização, pois apresentou elevada sensibilidade na análise de amostras de alimentos. O teste empregado foi capaz de identificar com exatidão as espécies em questão, demonstrando bandas específicas apenas a espécie alvo e não apresentando reação cruzada ou formação de dímeros, o que indica sua precisão. A técnica também se demonstrou altamente sensível, sendo capaz de detectar incrementos de 10 % (2,05 ng) de DNA bubalino e 0,1 % (0,041 ng) de DNA bovino, sendo essa sensibilidade compatível com a relatada por diversos autores<sup>13,14,17,18,24</sup>.

Embora os dados demonstrados sejam de extrema relevância, maiores estudos visando a quantificação de DNA bubalino em amostras obtidas no comércio devem ser realizados, objetivando o emprego rotineiro da metodologia em amostras em condições diferentes das propostas neste experimento. Para tal, o uso de *Real Time* PCR, que já vem sendo estudado no Brasil para utilização em produtos alimentícios a partir de matéria prima bubalina<sup>28,29</sup>, pode ser uma alternativa viável para detecção de fraude em produtos cárneos.

## CONCLUSÃO

Concluiu-se que a PCR *multiplex* proposta é uma técnica de elevada precisão, com capacidade de detecção das espécies *Bos taurus* e *Bubalus bubalis* sem pareamentos inespecíficos entre os iniciadores. A técnica mostrou-se de alta sensibilidade, capaz de detectar, de forma precisa, a presença de fraude (identificação simultânea) com um limiar de 2,05 ng de DNA bubalino e 0,041 ng de DNA bovino, e um limiar de detecção em incrementos de 10 %, 25 %, 50 %, 75 %, 90 %, 95 %, 99 %, 99,9 %, 99,99 % e 100 % de carne moída bubalina em carnes moídas bovinas e de 0,1 %, 1 %, 5 %, 10 %, 25 %, 50 %, 75 %, 90 %, 95 %, 99 %, 99,9 %, 99,99 % e 100 % de carne moída bovina em carne moída bubalina. Além disso, as repetições utilizadas evidenciaram a repetibilidade da técnica, podendo vir a ser uma alternativa na rotina de fiscalização oficial desses produtos.

## REFERÊNCIAS

1. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 83, de 21 de novembro de 2003. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Carne Moída de Bovino. Diário Oficial [da] União, 24 nov. 2003, Seção 1, p.29. [acesso 2014 Nov 20].Disponível em: [<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=4317>].
2. Torre JCM, Beraquete NJ. Composição centesimal e teor de colágeno em carne bovina moída. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2005;64(2):223-31.
3. Pigarro PMA, Santos M. Avaliação microbiológica da carne moída de duas redes de supermercados da cidade de Londrina- PR [monografia de especialização]. Universidade Castelo Branco; 2008.
4. Mendonça BS, Silva CS, Souza LM, Martins MLL. Qualidade microbiológica da carne moída comercializada na cidade Cariacica, ES. *Rev Hig Aliment*. 2012;26(208/209):101-5.

5. Marques CSS, Oaigen RP, Moraes CM, Tavares REB, Lima MM, Miranda AS. Caracterização da Cadeia Produtiva Bubalina no Brasil: Rebanho, Abates e Limitações. X Congresso Brasileiro de Buiatria; setembro de 2013; Belém: XXXVII Semana do Médico Veterinário do Pará - SEMAVET. p.173-88.
6. Ohly JJ. Prova organoléptica com carnes bubalinas e bovinas de animais criados nas pastagens de várzeas da Amazônia central. *Acta Amaz*. 1997;27(1): 33-42. [DOI:10.1590/1809-43921997271042].
7. Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal (RIISPOA). Diário Oficial [da] União. Brasília, DF, 7 jul. 1956.
8. Mane BG, Mendiratta SK, Tiwari AK. Polymerase chain reaction assay for identification of chicken in meat and meat products. *Food Chem*. 2009;116(3):806-10. [DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.03.030].
9. Mane BG, Mendiratta SK, Tiwari AK. Beef specific polymerase chain reaction assay for authentication of meat and meat products. *Food Chem*. 2012;(28):246-9. [DOI: 10.1016/j.foodcont.2012.05.031].
10. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (2012). Censo Agropecuário 2012. [acesso 2014 Nov 25]. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2012/default\_pdf.shtm].
11. Bender AE. Meat and meat products in human nutrition in developing. *Food and Nutrition Paper* 53. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome; 1992.
12. Karabasanavar NS, Singh SP, Umaphathi V, Kumar D, Patil G, Shebannavar SN. A highly specific PCR assay for identification of raw and heat treated mutton (*Ovis aries*) Small Ruminant Research. *Meat Sci*. 2011;100(2):153-8. [DOI:10.1016/j.smallrumres.2011.07.009].
13. López-Calleja I, González AI, Fajardo V, Rodríguez MA, Hernández PE, García T, et al. PCR detection of cows' milk in water buffalo milk and mozzarella cheese. *Int Dairy J*. 2005;15(11):1122-9. [DOI: 10.1016/j.idairyj.2004.12.003].
14. Darwish SF, Allam HA, Amin AS. Evaluation of PCR assay for detection of cow's Milk in water buffalo's milk. *World Appl Sci J*. 2009;7(4):461-7.
15. Ghovvati S, Nassiri MR, Mirhoseini SZ, Moussavi AH, Javadmanesh A. Fraud identification in industrial meat products by multiplex PCR assay. *Food Control*. 2009;20(8):696-9. [DOI:10.1016/j.foodcont.2008.09.002].
16. Luo JQ, Wang JQ, Bu DP, Dan L, Wang L, Wei HY. Development and application of a PCR approach for detection of bovis, sheep, pig, and chicken derived materials in feedstuff. *Agri Sci China*. 2008;7(10):1260-6. [DOI: 10.1016/S1671-2927(08)60173-X].
17. Zhang C. Semi-nested multiplex PCR enhanced method sensitivity of species detection in further-processed meats. *Food Control*. 2013;31(2):326-30. [DOI: 10.1016/j.foodcont.2012.11.002].
18. Matsunaga T, Chikuni K, Tanabe R, Muroya S, Shibata K, Yamada J, et al. A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. *Meat Sci*. 1999;51(2):143-8. [DOI: 10.1016/S0309-1740(98)00112-0].
19. Kitpipit T, Sittichan K, Thanakiatkrai P. Direct-multiplex PCR assay for meat species identification in food products. *Food Chem*. 2014;(163):77-82. [DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.04.062].
20. Ali ME, Kashif M, Uddin K, Hashim U, Mustafa S, Che Man YB. Species authentication methods in foods and feeds: the present, past, and future of halal forensics. *Food Anal Methods*. 2012;5(5):935-55. [DOI:10.1007/s12161-011-9357-3].
21. Kitpipit T, Sittichan K, Thanakiatkrai P. Are these food products fraudulent? Rapid and novel triplex-direct PCR assay for meat identification. *Forensic Sci Int Genet*. 2013;4(1):e33-4. [DOI:10.1016/j.fsigs.2013.10.016].
22. Bai WL, Yin RH, Zhao SJ, Li C, Ma ZJ, Yin RL, et al. A PCR assay for sex determination of yak (*Bos grunniens*) meat by amplification of the male-specific SRY gene. *Food Control*. 2010;21(5):726-31. [DOI:10.1016/j.foodcont.2009.10.016].



23. Veloso ACA, Teixeira N, Ferreira IMPLVO, Ferreira MA. Detecção de adulterações em produtos alimentares contendo leite e/ou proteínas lácteas. *Quim Nova*. 2002;25(4):609-15.
24. López-Calleja I, González I, Fajardo VA, Martín I, Hernández PE, García T, Martín R. Application of Polymerase Chain Reaction to Detect Adulteration of Sheep's Milk with Goats' Milk. *Int Dairy J*. 2005;15(6):3115-20. [DOI:10.3168/jds.S0022-0302(05)72993-3].
25. Hou B, Meng X, Zhang L, Guo J, Li S, Jin H. Development of a sensitive and specific multiplex PCR method for the simultaneous detection of chicken, duck and goose DNA in meat products. *Meat Sci*. 2015;(101):90-4. [DOI: 10.1016/j.meatsci.2014.11.007].
26. Ballin NZ. Authentication of meat and meat products. *Meat Sci*. 2010;86(3):577-87. [DOI:10.1016/j.meatsci.2010.06.001].
27. Zha D, Xing X, Yang F. A multiplex PCR assay for fraud identification of deer products. *Food Control*. 2010;21(10):1402-7. [DOI:10.1016/j.foodcont.2010.04.013].
28. Drumond MG, Brasil BSAF, Dalsecco LS, Brasil RSAF, Teixeira LV, Oliveira DAA. A versatile real-time PCR method to quantify bovine contamination in buffalo products. *Food Control*. 2013;(29):131-7. [DOI:10.1016/j.foodcont.2012.05.051].
29. Teixeira LV, Teixeira CS, Oliveira DAA. Identificação espécie-específica de carnes e produtos cárneos de origem bubalina e bovina pela técnica de PCR RFLP. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2015;67(1):309-14. [DOI:10.1590/1678-7239].