

Quantificação de espécies animais utilizando PCR em tempo real quantitativa (qPCR) para verificar fraudes em produtos cárneos

Quantification of animal species using quantitative real-time PCR (qPCR) to verify fraud in meat products

Cuantificación de especies animales mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) para verificar el fraude en productos cárnicos

Recebido: 05/12/2022 | Revisado: 25/12/2022 | Aceitado: 26/12/2022 | Publicado: 01/01/2023

Hans Fröder

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1551-236X>
Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Brasil
E-mail: hfroder@hotmail.com

Eléia Righi

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2766-8719>
Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Brasil
E-mail: eleia-righi@uergs.edu.br

Resumo

A rotulagem de alimentos é fundamental para evitar a ingestão de uma espécie de carne específica por motivos religiosos e razões culturais, mas, principalmente, para evitar fraudes com o propósito de obter vantagens financeiras. O método real-time qPCR é comumente utilizado para quantificar o DNA em uma determinada amostra por quantificação relativa (concentração do DNA alvo específico sobre a concentração do DNA endógeno). Em estudos que usam qPCR para quantificar espécies contaminantes, a normalização é realizada usando um gene de referência de cópia única, como a miostatina, presente na maioria dos mamíferos e das aves. Esse estudo teve por objetivo padronizar a técnica real-time qPCR para a obtenção de resultados quantitativos relativos em carnes bovinas fraudadas. Para a padronização do método, o limite de detecção (LD) resultou em um sinal de fluorescência Cq de 36.80 ciclos em pelo menos 9 de 10 repetições (90%) na concentração de 0,008% em cavalo e Cq de 36.60 ciclos em pelo menos 7 de 10 repetições (70%) na concentração de 0,0005% em frango. A concentração mais baixa em que o desvio padrão relativo (RSD) foi $\leq 25\%$ estava entre 0,125% e 0,031% tanto para cavalo quanto para frango. Mesmo usando curvas padrões de quantificação contendo 50% de misturas de carnes ou 100% de carne pura do alvo, a inclinação da curva, a eficiência de amplificação e a correlação linear estiveram dentro do critério de aceitação recomendado. O ensaio é sensível e uma alternativa na rotina de fiscalização de produtos tanto para alimentação humana quanto animal.

Palavras-chave: Real-time qPCR; Validação; Carne bovina e frango; Miostatina.

Abstract

Food labeling is fundamental to avoid eating a specific kind of meat for religious and cultural reasons, but mainly to avoid fraud with the purpose of obtaining financial advantages. The real-time qPCR method is commonly used to quantify DNA in a given sample by relative quantification (concentration of specific target DNA over concentration of endogenous DNA). In studies that use qPCR to quantify contaminating species, normalization is performed using a single-copy reference gene, such as myostatin, present in most mammals and birds. This study aimed to standardize the real-time qPCR technique to obtain relative quantitative results in rigged beef. For method standardization, the limit of detection (LD) resulted in a Cq fluorescence signal of 36.80 cycles in at least 9 out of 10 repetitions (90%) at a concentration of 0.008% in horse and Cq of 36.60 cycles in at least 7 of 10 repetitions (70%) at a concentration of 0.0005% in chicken. The lowest concentration at which the relative standard deviation (RSD) was $\leq 25\%$ was between 0.125% and 0.031% for both horse and chicken. Even using standard quantitation curves containing 50% meat blends or 100% pure target meat, curve slope, amplification efficiency, and linear correlation were within recommended acceptance criteria. The test is sensitive and an alternative in the routine inspection of products for both human and animal consumption.

Keywords: Real-time qPCR; Validation; Beef and chicken meat; Myostatin.

Resumen

El etiquetado de los alimentos es fundamental para evitar el consumo de un determinado tipo de carne por motivos religiosos y culturales, pero principalmente para evitar fraudes con el fin de obtener ventajas económicas. El método de qPCR en tiempo real se usa comúnmente para cuantificar el ADN en una muestra determinada mediante la cuantificación relativa (concentración de ADN diana específica sobre la concentración de ADN endógeno). En estudios que usan qPCR para cuantificar especies contaminantes, la normalización se realiza usando un gen de referencia de una sola copia, como la miostatina, presente en la mayoría de los mamíferos y aves. Este estudio tuvo como objetivo estandarizar la técnica de qPCR en tiempo real para obtener resultados cuantitativos relativos en carne de res manipulada. Para la estandarización del método, el límite de detección (LD) resultó en una señal de fluorescencia C_q de 36,80 ciclos en al menos 9 de 10 repeticiones (90%) a una concentración de 0,008% en caballo y C_q de 36,60 ciclos en al menos 7 de 10 repeticiones (70%) a una concentración de 0,0005% en pollo. La concentración más baja a la que la desviación estándar relativa (RSD) fue $\leq 25\%$ estuvo entre 0,125% y 0,031% tanto para caballos como para pollos. Incluso usando curvas de cuantificación estándar que contenían 50 % de mezclas de carne o 100 % de carne objetivo pura, la pendiente de la curva, la eficiencia de amplificación y la correlación lineal estuvieron dentro de los criterios de aceptación recomendados. La prueba es sensible y una alternativa en la inspección de rutina de productos tanto para consumo humano como animal.

Palabras clave: qPCR en tiempo real; Validación; Carne de res y pollo; Miostatina.

1. Introdução

Desde que o comércio de alimentos foi introduzido, as fraudes alimentares existem e a maioria tem o propósito de obter benefícios financeiros através de enganar e danos aos consumidores e/ou de não conformidades ou de violações da lei alimentar feita por autoridades oficiais de controle (Visciano & Schirone, 2021). Um tópico que foi incluído nas normas de qualidade e segurança de alimentos é a fraude em alimentos (“*food fraud*”). A cada dia, esse assunto aparece nos veículos de comunicação e é de interesse tanto do consumidor quanto das indústrias produtoras de alimentos. A norma alimentar IFS (padrão internacional para alimentos), versão 7, de outubro de 2020, é reconhecida mundialmente na área de qualidade e segurança de alimentos e define fraude em alimentos como “a substituição intencional, rotulagem enganosa, adulteração ou falsificação de alimentos de matérias-primas ou materiais de embalagem disponibilizados no mercado para fins de ganhos econômicos” (IFS FOOD, 2020). Portanto, ela exige uma avaliação documental sobre a vulnerabilidade quanto à fraude em alimentos para determinar os riscos de atividades fraudulentas. Apesar de serem consideradas crime, as fraudes em alimentos sempre envolveram vantagem financeira e podem ou não afetar a saúde do consumidor.

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

A Instrução Normativa (IN) nº 75 estabelece os requisitos técnicos para a declaração da rotulagem nutricional nos alimentos embalados (Brasil, 2020). No entanto, outros tipos de fraudes alimentares que ocorrem são a falsificação do nome da marca; da embalagem; da formulação, substituindo um ingrediente de alto custo por outro de menor valor; de diluição, substituindo ou adulterando com adição de materiais desconhecidos e não declarados produtos alimentícios, visando melhorar atributos de qualidade; e de rotulagem e etiquetagem incorreta, com inclusão de falsas alegações, como adulteração de lote e de validade, ocultação de ingredientes ou de alergênicos presentes na fórmula da lista de ingredientes da embalagem ou, ainda, o peso líquido informado sendo menor do que o declarado no rótulo, dentre outros (Sincabima, 2022).

Embora o consumidor possa atentar aos detalhes do produto, como informações no rótulo, data de validade, sinais de adulteração, condições da embalagem etc., é importante destacar que não é apenas ele que sofre com a fraude em alimentos,

mas também a indústria, principalmente se não houver um controle rigoroso na escolha dos fornecedores. Embora as indústrias tenham (ou devessem ter) um programa de qualidade e de segurança de alimentos implantado, a maioria das fraudes em alimentos só pode ser detectada e/ou quantificada através de análises laboratoriais.

1.1 Detecção de espécie animal

Soares *et al.* (2013) destacam que os produtos cárneos processados são alvos suscetíveis à rotulagem fraudulenta devido ao lucro que resulta da venda de carnes mais baratas em substituição a carnes de alto valor. Quantidades de carne menores do que as declaradas no rótulo e a substituição da proteína muscular por vegetal também são preocupações comuns em produtos cárneos. Essas práticas têm motivação econômica, pois induzem a concorrência desleal entre os produtores; religiosa, uma vez que o consumo de determinadas espécies não é permitido em algumas religiões; e ética, refletindo estilos de vida e preocupações com a saúde. A preferência pessoal leva, por exemplo, vegetarianos e veganos a se abster de todos os tipos de carne e as reações alérgicas podem tornar alguns consumidores especialmente vulneráveis a ingredientes não listados e à contaminação. Assim, a questão da segurança e da rastreabilidade alimentar é uma responsabilidade que diz respeito a todos os países, particularmente num mercado alimentar global em constante expansão e com preços crescentes dos alimentos (Thanakiatkrai & Kitpipit, 2017).

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

A capacidade das moléculas de DNA de suportar o processamento de calor e pressão, quando comparadas às proteínas, e a sua presença em todos os tipos de células levaram à análise de DNA para identificação de espécies em alimentos processados. Nesse sentido, a amplificação do DNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR) é considerada rápida, sensível e altamente específica para identificação de espécies em carnes processadas (Soares *et al.*, 2013). Assim, um dos principais focos dos testes de autenticidade de alimentos é ter métodos de análise e, se necessário, desenvolver novos ou melhorar os existentes. Os resultados qualitativos são suficientes quando as amostras são rastreadas para obter uma ideia com relação à taxa de contaminação e para descobrir casos suspeitos. No entanto, em alimentos processados com vários ingredientes, nem sempre é suficiente detectar um ingrediente específico. Muitas vezes é mais importante saber se o teor de um ingrediente é maior que outro ou se a concentração de um ingrediente excede um certo limite. Para verificar a correta declaração de ingredientes de origem animal ou vegetal, uma estratégia é detectar uma sequência específica do ácido desoxirribonucleico (DNA) do ingrediente correspondente, o que é possível, pois cada espécie tem um genoma único (Thanakiatkrai & Kitpipit, 2017).

Com base nisso, Thanakiatkrai e Kitpipit (2017) desenvolveram e validaram um ensaio qPCR multiplex direto com análise de curva de fusão para a identificação de diferentes tipos de carne. O ensaio detectou seis espécies de carne, ofereceu facilidade de uso e reduziu o tempo de análise e o custo. Os primers espécie-específicos foram desenvolvidos a partir dos genes citocromo b, citocromo oxidase I e 16S rRNA para gerar produtos de PCR com picos de fusão específicos que diferenciam carne de porco, carne bovina, carne de cavalo, carne de pato, carne de avestruz e frango. Os pesquisadores salientam que a validação do ensaio mostrou robustez, especificidade e sensibilidade de até 0,32 ng de molde de DNA. Além do mais, levou

menos de uma hora para a obtenção do resultado e tem baixo custo por amostra. Ainda, pontuaram que 92,5% das amostras de carne crua e de produtos alimentícios foram amplificadas com sucesso.

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

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

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

1.2 Fraudes em alimentos detectadas por real-time qPCR

Ao longo dos anos, várias fraudes alimentares aconteceram tanto em países desenvolvidos quanto naqueles em desenvolvimento. No Quadro 1 encontra-se a técnica utilizada para a detecção, o tipo de alimento fraudado, o objetivo do estudo e os resultados obtidos pelos pesquisadores.

Quadro 1 - Fraudes em alimentos.

Autor	Técnica	Alimento	Objetivo
Giglioti <i>et al.</i> (2022)	PCR quantitativo em tempo real (qPCR).	Leite e produtos lácteos.	Detectar e quantificar a adulteração entre amostras de leite de vacas, búfalos, cabras e ovelhas.
Resultado: não foi verificada a presença de DNA de vaca nas amostras de queijo de ovelha e cabra. Já nas amostras de leite de búfala, o DNA de vaca foi detectado e quantificado em 12 amostras.			
Kang; Tanaka (2018)	SYBR Green real-time PCR.	Carne suína em produtos processados de carne bovina.	Comparar cinco métodos qPCR comuns de autenticação para determinar a melhor forma de quantificação.
Resultado: Resultados da diluição do DNA com base em espectrofluorométrico mostraram melhores resultados qPCR do que os baseados em espectrofotometria em termos de correlação, eficiência de amplificação e faixa dinâmica linear. Além disso, os métodos de normalização do gene 18S rRNA mostraram melhor veracidade (-11,79% a -6,73%) do que os métodos usando curvas padrão absolutas e relativas (-28,52% a -18,64%) em matriz-padrão. Ademais, estimaram com sucesso as quantidades de carne suína na faixa de 100%-0,01% em produtos de carne bovina.			
Marchetti <i>et al.</i> (2021)	Real-time PCR.	Leite bovino em iogurte de búfala.	Detectar a presença não declarada de leite bovino em iogurte de búfala.
Resultado: o ensaio PCR em tempo real mostrou a presença não declarada de DNA bovino além do DNA de búfalo em 18 das 72 amostras.			
Köppel <i>et al.</i> (2020)	qPCR multiplex.	Produtos veganos.	Desenvolver um qPCR multiplex para detectar simultaneamente DNA de animais, peixes e plantas em amostras de alimentos.
Resultado: sistema econômico que exibiu alta sensibilidade. Os testes de especificidade confirmaram que todas as espécies (peixe, planta e animal) foram detectadas. O sistema específico da planta serviu como controle de isolamento de DNA e foi usado para gerar resultados válidos. Uma grande seleção de amostras de mercado foi analisada e mostrou os resultados esperados e a robustez dessa ferramenta analítica em análises de rotina.			
Lubis <i>et al.</i> (2017)	qPCR.	Carne suína.	Desenvolver um ensaio qPCR para a detecção rápida e sensível de DNA suíno em amostras de alimentos.
Resultado: O ensaio detectou tão baixo quanto 1 pg/μL de DNA suíno e tão baixo quanto 0,001% de carne de porco na mistura de porco-frango cru.			

Fonte: Organizado pelos autores.

A técnica de qPCR permite que as etapas de amplificação e de detecção ocorram simultaneamente, possibilitando que a visualização dos resultados ocorra sem a necessidade de qualquer processamento após a amplificação, evitando contaminação e garantindo economia de tempo e custos (Lazaro, 2013). Durante a reação de amplificação, a sonda TaqMan® é hidrolisada, os dois corantes são separados e a fluorescência emitida é captada por filtros do equipamento qPCR.

Nesse sentido, a análise de DNA de alimentos é uma ferramenta capaz de identificar a composição de produtos, revelando os ingredientes animais que os compõem e auxiliando no rastreamento de possíveis fraudes e adulterações. Assim, um diagnóstico rápido e economicamente viável para serviços de inspeção e vigilância sanitária de alimentos se faz necessário. Este estudo objetivou avaliar e padronizar a técnica de PCR em tempo real (qPCR) para a quantificação de fraudes na composição cárnea em alimentos, obtendo resultados com a qualidade mínima exigida para a espécie animal avaliada.

2. Metodologia

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

2.1 Sistemas primers e sondas

Nesse trabalho, foram utilizados os primers/sondas já validados para a detecção de espécies animais e descritos na *International Standardization for Organization/Technical Specification (ISO/TS) 20224* (Quadro 2), partes 1 a 4 e 6.

Quadro 2 – Identificação, gene de referência, acesso no GenBank e os alvos detectados com os primers/sondas no experimento.

Identificação	Gene de referência/Acesso no GenBank	Alvo detectado	Referência
Bovino	beta actina nuclear do cromossomo 25 (NC_037352.1)	<i>Bison bison</i> ; <i>Bos taurus</i> ; <i>Bos indicus</i> ; <i>Bos mutus</i>	ISO/TS 20224-1
Ovino	receptor nuclear de prolactina ovina (PRLR) (AF041979.1)	<i>Ovis aries</i>	ISO/TS 20224-2
Suíno	beta actina (DQ452569.1)	<i>Sus scrofa domesticus</i> ; <i>S. scrofa</i>	ISO/TS 20224-3
Frango	TGF- β 3 (AY685072.1)	<i>Gallus gallus domesticus</i> ; <i>G. gallus</i>	ISO/TS 20224-4
Cavalo	cromossomo 28 (NC_009171.3)	<i>Equus caballus</i> (macho) x <i>Equus asinus</i> (fêmea); <i>E. caballus</i> ; <i>Equus caballus</i> (fêmea) x <i>Equus asinus</i> (macho); <i>E. przewalskii</i> ; <i>E. burchellii</i>	ISO/TS 20224-6
Miostatina (MY70)	miostatina (AF320998 para bovinos e AY448007 para aves)	Mamíferos; Aves	Druml <i>et al.</i> (2016); Laube <i>et al.</i> (2007)

Fonte: Autores.

2.2 Quantificação relativa de espécie animal

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

Segundo Iwobi *et al.* (2015), para uma quantificação confiável do conteúdo real de carne, são necessários materiais de referência adequados para cada produto à base de carne sob investigação. A produção de tais padrões adequados de carne pode ser demorada e trabalhosa. Além disso, devido à complexidade na fabricação de diversos produtos cárneos, com variações que acompanham as receitas e o estilo de produção dos fabricantes, produzir materiais de referência adequados para cada produto cárneo comercial pode não ser viável. Assim, foram adquiridos materiais de referência certificados (MRC) da LGC (Reino Unido) para cada espécie animal, sendo 100% (p/p) de carne de cavalo (LGC7220), bovina (LGC7221), suína (LGC7222), ovelha (LGC7223) e frango (LGC7224) usados para estabelecer a curva de quantificação e/ou como controle positivo.

2.2.1 Método real-time qPCR usando mistura de carnes

Para a validação do método real-time qPCR duplex quantitativo, foram utilizadas misturas de carnes como padrão no lugar da fabricação de uma matriz-padrão, cujo propósito foi verificar se o método é capaz de quantificar misturas de carnes em níveis muito baixos e produzidos em escala laboratorial. Foram pesadas diferentes alíquotas de carne de cavalo em carne bovina e de carne de frango em carne bovina. A fraude da carne bovina com a de aves pode ocorrer porque a moela tem a mesma pigmentação avermelhada, o que dificulta um discernimento entre as espécies. As misturas binárias de carnes seguiram conforme o Quadro 3, usando o padrão LGC para a carne equídea, bovina moída e de frango moída preparadas no laboratório de físico-química. Propositamente, foram combinadas quantidades mínimas de carne de cavalo e de frango em carne bovina a fim de verificar se o método é suficientemente sensível em detectar e quantificar quando há um nível de incerteza na massa crítica.

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

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

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

2.2.2 Curvas padrões de quantificação

Para a construção das curvas de quantificação, foram testadas duas abordagens, sendo a primeira baseada em misturas de carnes 50% (p/p) (DRUML *et al.*, 2015) e a segunda a partir de carne pura 100% (p/p) (ou DNA genômico puro) (IWOB *et al.*, 2015) das espécies animais cavalo (LGC7220) em carne bovina (LGC7221) e de frango (LGC7224) em carne bovina, quantificadas no Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) e o DNA genômico diluído em água grau PCR (Sigma) para produzir diluições seriais (1:4).

2.2.3 Estratégia de quantificação

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

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

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

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

2.2.4 Validação real-time qPCR duplex

O ensaio real-time qPCR duplex foi avaliado em relação à eficiência, à repetibilidade e ao limite de detecção e de quantificação (LD, LQ) em um processo de validação interno. O limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ) do ensaio

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

2.2.5 Eficiência do ensaio real-time qPCR duplex

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

2.2.6 Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

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

2.2.7 Repetibilidade

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

2.3 Extração do DNA

Para a extração total do ácido nucleico, foi utilizado o protocolo do kit DNeasy[®] mericon[®] Food (Qiagen, 2020). Foram pesadas alíquotas de 0,2 g dos padrões de carne da LGC, mantidos a -20 °C, e das amostras adquiridas comercialmente, mantidas entre 2 e 8 °C, em microtubos Eppendorf de 2 mL estéril. Para as combinações de carnes (Tabela 02), foi utilizada a balança analítica (Mettler Toledo, Brasil). Alíquota de 1 mL do tampão de lise e 2,5 μ L da solução de proteinase K foram adicionados ao microtubo. A suspensão foi homogeneizada até a completa distribuição e incubada em um termomixer (Thermo Fischer Scientific) por 30 min a 60 °C com agitação constante (1000 rpm). Foi realizada uma adaptação do método para um tempo de incubação de 30 min adicionais porque se percebeu que a amostra teve uma melhor distribuição (digestão enzimática) nessas condições.

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

2.4 Mistura de reação

2.4.1 QuantiNova™ probe PCR

O ensaio real-time qPCR foi realizado em duplex com sistemas primers/sondas específicos para cada espécie animal, conforme Quadro 2. A mistura de reação compreendeu 5 µL do mastermix 2X Probe PCR; 0,5 µL do corante de referência ROX (diluído 1:20); 0,4 µL de cada par de primers numa concentração final de 0,4 µM; e 0,2 µL de cada sonda na concentração final de 0,2 µM e 0,5 µL de água. Para o ensaio real-time qPCR, foram utilizados 8 µL da mistura de reação e 2 µL do DNA extraído em cada microtubo. Esse protocolo seguiu o descrito pelo fabricante (Qiagen, 2013), mas foram feitas alterações no volume por reação.

2.4.2 Condições térmicas da ciclagem da PCR

Por se tratar de um protocolo de início rápido, o QuantiNova™ Probe PCR Kit (Qiagen) estabelece uma etapa inicial de ativação a 95 °C por 2 minutos, 40 ciclos de 95 °C por 5 segundos e combinação das etapas de anelamento/extensão a 60 °C por 30 segundos para sistemas duplex (primer/sonda mix - referência miostatina e primer/sonda mix alvo específico).

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

2.5 Análise dos resultados

Os resultados obtidos pelo QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System foram avaliados pelo programa Design and Analysis Software 2.6.0 (ambos ThermoFisher Scientific) tanto para a detecção das matrizes comerciais quanto para a quantificação das carnes fraudadas artificialmente. Foi avaliado o valor C_q (*threshold cycle* - número de ciclos de PCR necessários para que o sinal da fluorescência cruze a linha de detecção) das amostras de carne espécie-específicas. O limiar de detecção (*threshold line*) foi ajustado manualmente observando a intensidade do sinal fluorescente. O *software* fornece automaticamente o gráfico da curva padrão e calcula a inclinação (*slope*), o coeficiente de correlação linear (R²), a interseção y (y-inter) e a porcentagem da eficiência de amplificação (Eff%).

3. Resultados e Discussão

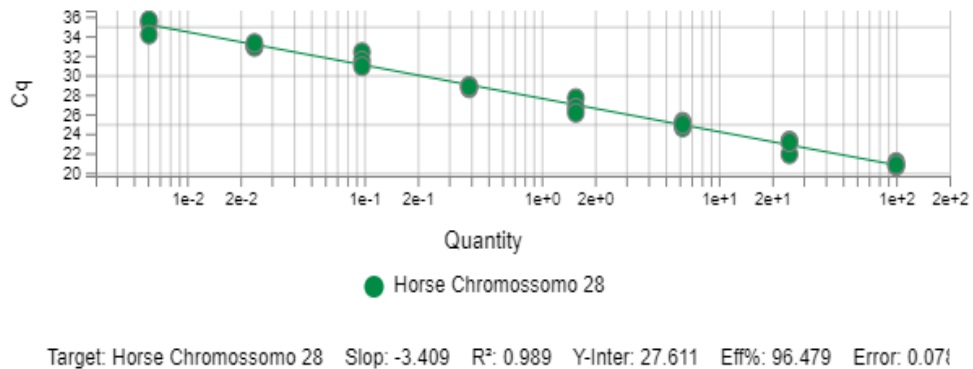
Alguns parâmetros de validação, como repetibilidade, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ), foram baseados em estudos conduzidos por Druml *et al.* (2015) e Iwobi *et al.* (2015) e previstos na ENGL (2015).

3.3.1 Eficiência de amplificação

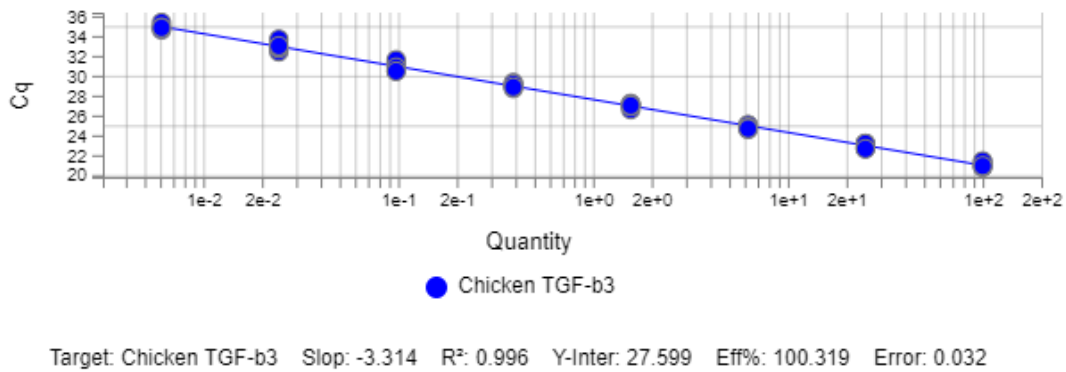
A eficiência de amplificação do ensaio qPCR foi determinada analisando o DNA extraído de 50% de carne de cavalo em carne bovina e de 50% de frango em carne bovina. Partindo de uma concentração de DNA de 100 ng/µL, o DNA foi diluído serialmente (1:4) em água até a concentração de 0,006 ng/µL. A curva de quantificação compreendeu uma faixa de oito pontos, pipetados em triplicata. O gráfico da curva padrão foi realizado através do valor C_q contra o logaritmo da concentração de DNA representado na Figura 1. Um coeficiente de correlação linear (R² = 0,989) foi encontrado nessa faixa de variação com oito pontos, com inclinação (*slope*) de -3.409, correspondendo a uma eficiência de amplificação de 96,48% para o alvo cavalo (Figura 1a). Para frango, um coeficiente de correlação linear (R² = 0,995) foi encontrado na faixa de variação ajustada para oito pontos, com inclinação de -3.314, correspondendo a uma eficiência de 100,32% para frango (Figura 1b).

Figura 1 - Eficiência da curva padrão obtida a partir do DNA de cavalo (a) e do DNA de frango (b). As curvas padrões de ambas as matrizes foram obtidas a partir de três extrações de DNA, realizadas em duplicata.

a)



b)



Fonte: Autores.

3.3.2 Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

O LD e o LQ do ensaio de qPCR foram determinados analisando extrações de DNA diluídos em série a partir de uma mistura de carne e pesados diretamente no microtubo Eppendorf de 2 mL estéril contendo 2% (p/p) da carne de cavalo em bovino e da carne de frango em bovino (misturas binárias). A concentração do alvo variou de 2% (p/p) a 0,008% (p/p). Os valores Cq de cada alvo estão resumidos nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1 - Determinação do LD e do LQ com diluição serial de DNA a partir de um padrão de carne contendo 2% de cavalo em carne bovina.

Conteúdo cavalo (%)	Cq	Média Cq	Média do [DNA] de cavalo (ng/ μ L)	Desvio padrão (ng/ μ L)	Desvio padrão relativo (RSD) (%)
2	26.95	27.44	139.26	1.96	1.41
	26.34				
	27.54				
	27.73				
	28.08				
	28.08				
	28.00				
	27.26				
	27.57				
	26.85				
	27.71				
	27.94				
	28.20				
	27.89				
1	28.80	28.48	77.1	5.17	6.71
	29.35				
	28.97				
	28.60				
	28.49				
	28.81				
	28.81				
	29.20				
	29.50				
	29.76				
0.5	30.68	29.81	39.94	3.95	9.88
	29.87				
	30.60				
	30.49				
	29.82				
	29.33				

	30.30				
	30.72				
	31.72				
	32.47				
0.125	32.35	31.78	9.54	1.85	19.42
	32.03				
	32.34				
	31.80				
	32.34				
	31.68				
	33.04				
	32.88				
	33.99				
	34.31				
0.031	34.63	34.14	2.52	0.65	25.63
	35.36				
	34.67				
	34.37				
	34.19				
	33.94				
	38.30				
	35.94				
	35.36				
	ND				
0.008	38.57	36.78	0.64	0.24	37.63
	37.03				
	37.32				
	36.84				
	36.02				
	35.64				

Legenda: ND (não detectado). Fonte: Autores.

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

Conteúdo frango (%)	Cq	Média Cq	Média do [DNA] de frango (ng/uL)	Desvio padrão (ng/uL)	Desvio padrão relativo (RSD) (%)
2	23.78	24.29	140.04	3.16	2.25
	24.10				
	24.54				
	24.49				
	24.30				
	24.32				
	24.43				
	24.33				
	24.30				
	24.34				
	25.51				
	25.54				
	25.40				
	25.69				
1	25.58	25.57	72.66	4.95	6.81
	25.53				
	25.56				
	25.64				
	25.62				
	25.61				
	26.49				
	26.54				
	26.63				
	26.84				
0.5	26.62	26.61	30.94	1.99	6.42
	26.61				
	26.51				
	26.68				
	26.53				
	26.67				

	28.46				
	28.60				
	28.58				
	28.65				
0.125	28.60	28.58	7.26	0.44	6.05
	28.75				
	28.60				
	28.17				
	28.87				
	28.52				
	31.09				
	30.47				
	30.73				
	30.83				
0.031	30.81	30.84	2.76	0.74	26.94
	30.95				
	30.94				
	31.02				
	30.82				
	30.71				
	32.88				
	33.15				
	33.18				
	32.93				
0.008	33.56	33.04	0.2	0.16	79.06
	32.56				
	32.26				
	33.12				
	33.49				
	33.25				
	37.53				
0.002	34.38	35.05	-0.14	0.51	-366.31
	34.12				
	34.46				

	35.44				
	34.84				
	35.23				
	34.10				
	34.45				
	35.94				
	35.37				
	ND				
	34.91				
	36.38				
0.0005	ND	36.60	-0.34	0.18	-53.43
	37.87				
	35.90				
	ND				
	37.24				
	38.56				

Legenda: ND (não detectado). Fonte: Autores.

O LD resultou em um sinal de fluorescência dentro de Cq de 36.80 ciclos em pelo menos 9 de 10 repetições (90%) na concentração de 0,008% em cavalo (Tabela 1) e Cq de 36.60 ciclos em pelo menos 7 de 10 repetições (70%) na concentração de 0,0005% em frango (Tabela 2). Foram necessárias mais duas diluições (1:4) para estabelecer o LD da mistura da carne de frango fraudada em carne bovina. Assim, para os conteúdos de frango 0,002 e 0,0005%, as concentrações médias de DNA foram negativas (Tabela 2) porque não há mais precisão no valor quantificado pelo nanodrop, no entanto, o real-time qPCR ainda as detectou. Ambas foram realizadas em outra corrida real-time qPCR e não na mesma que as demais concentrações. Nesse trabalho, os dois experimentos conduzidos também apresentaram um limite Cq de 37 ciclos (valores arredondados). Segundo Druml *et al.* (2015), o limite de 37 ciclos é definido na rotina analítica a fim de diminuir a probabilidade de obtenção de sinais falsos-positivos devido à reação cruzada. Outra perspectiva proposta pela ENGL (2015) estabelece um LD95%, que é definido como o LD no qual o ensaio detecta a presença do analito em pelo menos 95% do tempo (garantindo $\leq 5\%$ de resultados falsos-negativos).

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

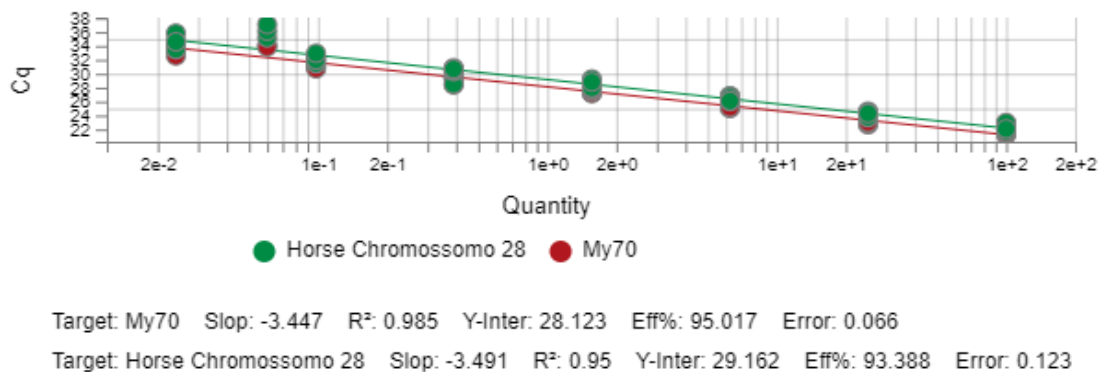
3.3.3 Repetibilidade

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

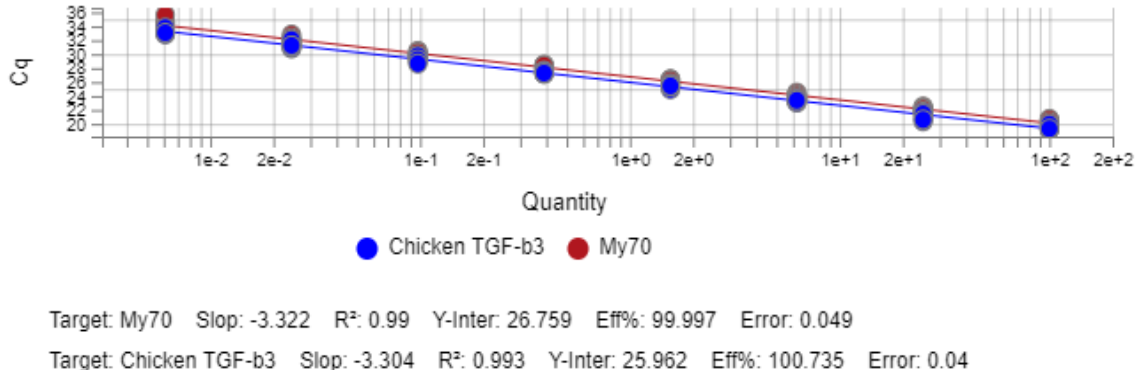
balança. Os resultados apresentados na Figura 2 indicam alta repetibilidade do método, tanto para o gene específico quanto para o de referência.

Figura 2 - Repetibilidade do ensaio qPCR: curvas padrão obtidas a partir de extrações de DNA diluídos serialmente de uma mistura de carne de: a) 50% de cavalo em bovino; e b) 50% de frango em bovino. Três extrações de DNA foram realizadas em duplicata e em dias diferentes. Cada extração de DNA foi analisada em duplicata, partindo da concentração de 100 ng/μL até 0,006 ng/μL.

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



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



Fonte: Autores.

Segundo o DOC-CGCRE 8 (INMETRO, 2016), a repetibilidade é um conjunto de condições que inclui o mesmo procedimento de medição, os mesmos operadores, as mesmas condições de operação e o mesmo local. As repetições devem ser independentes, ou seja, incluir todas as etapas de preparo do processo de medição. Para avaliar a repetibilidade do método, o número mínimo de repetições para cada nível de concentração varia, mas tipicamente são entre 6 e 15 por material usado no estudo. Nessa pesquisa, as três extrações em duplicata aconteceram em dias diferentes e a curva padrão foi construída com 6 réplicas e uma faixa de concentração contendo 8 pontos diferentes na curva de calibração (Figura 2a-b).

Embora a inclinação da reta e a eficiência de amplificação da mistura cavalo em bovino tenha ficado dentro da faixa ideal, observou-se que o coeficiente de correlação linear (R²) decaiu para 0,95. Para obter uma melhora nesse parâmetro, normalmente pode-se eliminar algum ponto da curva de calibração e avaliar os dados novamente. O ideal é que a curva padrão tenha pelo menos cinco pontos e que os valores fiquem dentro dos critérios de avaliação. Isso pode ser observado quando se

exclui um ponto da curva de quantificação, sendo que o coeficiente de variação melhora para $R^2 = 0.98$ (dados não apresentados).

3.4 Validação da quantificação

Para calibração, extrações de DNA foram diluídas serialmente (1:4) a partir de uma mistura contendo 50% (p/p) de cavalo em bovino e outra contendo 50% (p/p) de frango em bovino. Ambas foram analisadas pelos ensaios real-time qPCR, empregando os sistemas específicos para cavalo e para frango com o de referência para mamíferos e aves (miostatina). A concentração de DNA de cavalo e de DNA de frango, bem como o da carne total, variou de 0,006 ng/ μ L até 100 ng/ μ L. Para determinar o conteúdo da carne de cavalo em bovino a partir de misturas de carne realizadas em tubos Eppendorf estéreis, as extrações de DNA foram ajustadas para 10 ng/ μ L, cujo procedimento foi repetido para a carne de frango em bovino. As diluições decimais do DNA usadas para a curva de calibração e as extrações de DNA das diferentes concentrações foram analisadas na mesma corrida PCR por ambos os ensaios, sendo os específicos e o de referência. O conteúdo de cavalo e de frango na amostra foi calculado se referindo à concentração do DNA do alvo e à concentração do DNA total da carne.

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

Avaliando os resultados das curvas de quantificação usando a estratégia proposta por Druml *et al.* (2015) de empregar misturas de carne, e a outra utilizando curvas com DNA genômico puro como descrito por Iwobi *et al.* (2015), verificou-se que ambas podem ser utilizadas para estabelecer a quantificação relativa, como observado nos valores médios dos três dias avaliados (Tabelas 3 a 6).

Tabela 3 - Resultados obtidos de conteúdo de cavalo (%) na carne bovina através da curva padrão estabelecida com misturas de carne 50% (p/p).

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

Legenda: R (réplica). Fonte: Autores.

Tabela 4 - Resultados obtidos de conteúdo de cavalo (%) na carne bovina através da curva padrão estabelecida com carne de cavalo 100% (p/p).

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

Fonte: Autores.

No presente estudo quantitativo, os valores médios, tanto para cavalo (Tabelas 3 e 4) quanto para frango (Tabelas 5 e 6), não foram muito precisos com relação às porcentagens esperadas (10%, 25% e 50%). Isso também foi observado nos resultados quantitativos obtidos por Druml *et al.* (2015), realizando sete dias de extrações de DNA.

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

Tabela 5 - Resultados obtidos de conteúdo de frango (%) na carne bovina através da curva padrão estabelecida com misturas de carne 50% (p/p).

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

Fonte: Autores.

Tabela 6 - Resultados obtidos de conteúdo de frango (%) na carne bovina através da curva padrão estabelecida com carne de frango 100% (p/p).

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

Fonte: Autores.

Não se pode inferir qual curva de quantificação apresentou resultados melhores, mas é provável que os resultados fiquem mais corretos quando a carne a ser fraudada estiver em maior porcentagem. Além disso, a maioria dos estudos sobre quantificação de fraudes em alimentos emprega uma matriz-padrão com diferentes concentrações (Chen *et al.*, 2020; Sarlak *et al.*, 2022), sendo que o ideal, para fins de validação *in house*, é preparar uma matriz-padrão com diferentes concentrações, garantindo uma homogeneização adequada.

Nessa pesquisa, é possível ter uma repetibilidade interdiária do ensaio real-time qPCR empregando misturas com massas muito baixas (Quadro 3); porém, para uma melhora nos resultados, o ideal é iniciar com uma massa 10 vezes maior ou utilizar diferentes concentrações de matriz-padrão. Nesse caso, é fundamental ter homogeneidade e garantir a extração adequada do DNA, principalmente quando se utilizam misturas binárias de carnes com elevada porcentagem de gordura (IWObi *et al.*, 2015). Entretanto, mesmo usando curvas padrões de quantificação contendo 50% de misturas de carnes ou 100% de carne pura do alvo, a inclinação da curva, a eficiência de amplificação e a correlação linear estiveram dentro do critério de aceitação (dados não apresentados).

Oliveira *et al.* (2015) avaliou a sensibilidade da PCR multiplex para detectar fraude por adição intencional de carne moída bubalina em carne moída bovina. Esses pesquisadores produziram 13 concentrações diferentes (0,01%; 0,1%; 1%; 5%; 10%; 25%; 50%; 75%; 90%; 95%; 99%; 99,9%; e 99,99%) de carne moída bubalina e concluíram que a técnica foi eficaz, possui alta sensibilidade e foi capaz de detectar incrementos de 10% (2,05 ng) de DNA bubalino e de 0,1% (0,041 ng) de DNA bovino. Hou *et al.* (2015) mencionam que a sensibilidade da PCR multiplex varia de acordo com a espécie animal, o gene alvo e o tamanho do fragmento amplificado. No presente estudo, o método real-time qPCR foi capaz de amplificar o cromossomo 28 para cavalo em níveis de 2% a 0,008% (139,26 a 0,64 ng/μL) (Tabela 1) e o gene TGF-β3 para frango de 2% a 0,008% (140,04 a 0,20 ng/μL) (Tabela 2). Para estabelecer o LD de frango, foram necessárias duas diluições seriadas (1:4) adicionais (0,002% e 0,0005%); porém, para esses níveis, a média da concentração de DNA não é precisa (Tabela 2). Isso revela que a técnica de real-time qPCR é altamente sensível (Cq 37 arredondando) para ambas as carnes fraudadas.

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

espécies de carne por real-time PCR portátil com extração de DNA simplificada e detectaram 0,1% de carne de frango em carne suína.

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

4. Considerações Finais

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

Embora a quantificação de amostras de carnes fraudadas (cavalo em bovina e frango em bovina) com diferentes porcentagens (10%, 25% e 50%) tenha fornecido um erro sistemático alto, ela se mostrou sensível e reprodutível, pois detectou fraude empregando massa inicial muito baixa ou com incerteza alta. Isso revela que o método aqui validado tem potencial para ser utilizado na rotina de laboratórios, mas ainda precisa ser testado com amostras comercialmente disponíveis e/ou elaborando matriz-padrão. É provável que o erro sistemático diminua quando massas no mínimo 10 vezes maiores forem validadas ou, alternativamente, quando compilar as proporções desejadas a partir das digestões individuais.

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

Sugere-se que pesquisas empregando a técnica real-time qPCR sempre venham acompanhadas por um estudo de validação. Isso é importante, uma vez que se trata de uma técnica altamente sensível em que a homogeneização da amostra impacta os resultados finais, principalmente quando se refere a quantidades mínimas (ou traços) de outra matriz cárnea que podem contaminar a matriz alvo. Espera-se que futuramente se tenha um método quantitativo harmonizado, uma vez que os kits ainda são muito onerosos para laboratórios prestadores de serviço.

Agradecimentos

Ao Laboratório Unianálises pelo apoio na infraestrutura laboratorial.

Referências

- Alikord, M., Momtaz, H., Kadivar, M., & Rad, A. H. (2018). Species identification and animal authentication in meat products: a review. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12(1), 145-155.
- Ballin, N. Z. (2010). Authentication of meat and meat products. *Meat science*, 86(3), 577-587.
- Bariani, J. L. (2021). Food Safety Brazil. Escândalo da carne de cavalo: Brasil dez anos atrasado. Website Food Safety Brazil. <https://foodsafetybrazil.org/escandalo-da-carne-de-cavalo-brasil-dez-anos-atrasado/jose-luiz-bariani/2021/>.
- Brasil. (2020). Instrução Normativa - IN N° 75, de 8 de outubro de 2020. Estabelece os requisitos técnicos para declaração da rotulagem nutricional nos alimentos embalados. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/3882585/IN_75_2020_COMP.pdf/e89784b5-ed18-4bdd-a4d4-139724a56d4d.

- Chen, X., Lu, L., Xiong, X., Xiong, X., & Liu, Y. (2020). Development of a real-time PCR assay for the identification and quantification of bovine ingredient in processed meat products. *Scientific reports*, 10(1), 1-10.
- Dolch, K., Judas, M., Schwägele, F., & Brüggemann, D. A. (2019). Development and validation of two triplex real-time PCR systems for the simultaneous detection of six cereal species in processed meat products. *Food Control*, 101, 180-188.
- Druml, B., Mayer, W., Cichna-Markl, M., & Hohegger, R. (2015). Development and validation of a TaqMan real-time PCR assay for the identification and quantification of roe deer (*Capreolus capreolus*) in food to detect food adulteration. *Food Chemistry*, 178, 319-326.
- Druml, B., Kaltenbrunner, M., Hohegger, R., & Cichna-Markl, M. (2016). A novel reference real-time PCR assay for the relative quantification of (game) meat species in raw and heat-processed food. *Food Control*, 70, 392-400.
- Drummond, M. G., Brasil, B. S. A. F., Dalsecco, L. S., Brasil, R. S. A. F., Teixeira, L. V., & Oliveira, D. A. A. (2013). A versatile real-time PCR method to quantify bovine contamination in buffalo products. *Food Control*, 29(1), 131-137.
- ENGL, European Network of GMO Laboratories. (2015). Definition of Minimum Performance Requirements for Analytical Methods of GMO Testing. JRC Technical Report. [chrome-extension://efaidnbmnnpbpcjpcglclefindmkaj/https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/doc/MPR%20Report%20Application%2020_10_2015.pdf](https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/doc/MPR%20Report%20Application%2020_10_2015.pdf).
- Furutani, S., Hagihara, Y., & Nagai, H. (2017). On-site identification of meat species in processed foods by a rapid real-time polymerase chain reaction system. *Meat science*, 131, 56-59.
- Giglioti, R., Polli, H., Azevedo, B. T., Katiki, L. M., & Vercesi Filho, A. E. (2022). Detection and quantification of adulteration in milk and dairy products: A novel and sensitive qPCR-based method. *Food Chemistry: Molecular Sciences*, 4, 100074.
- 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.
- Ifs food. (2020). Norma para avaliar a conformidade de produtos e processos em relação à segurança de alimentos e qualidade. https://www.ifs-certification.com/images/standards/ifs_food7/documents/standards/IFS_Food7_pt.pdf.
- Inmetro. (2016). Coordenação Geral de Acreditação. Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos. DOQ-CGCRE-008. [chrome-extension://efaidnbmnnpbpcjpcglclefindmkaj/http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_05.pdf](http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_05.pdf).
- ISO. (2020). Organization for Standardization/Technical Specification. ISO/TS 20224-1. Molecular biomarker analysis – Detection of animal-derived materials in foodstuffs and feedstuffs by real-time PCR – Part 1: Bovine DNA detection method. 1st.Edition.
- ISO. (2020). Organization for Standardization/Technical Specification. ISO/TS 20224-2. Molecular biomarker analysis – Detection of animal-derived materials in foodstuffs and feedstuffs by real-time PCR – Part 2: Ovine DNA detection method. 1st.Edition.
- ISO. (2020). Organization for Standardization/Technical Specification. ISO/TS 20224-3. Molecular biomarker analysis – Detection of animal-derived materials in foodstuffs and feedstuffs by real-time PCR – Part 3: Porcine DNA detection method. 1st.Edition.
- ISO. (2020). Organization for Standardization/Technical Specification. ISO/TS 20224-4. Molecular biomarker analysis – Detection of animal-derived materials in foodstuffs and feedstuffs by real-time PCR – Part 4: Chicken DNA detection method. 1st.Edition.
- ISO. (2020). Organization for Standardization/Technical Specification. ISO/TS 20224-6. Molecular biomarker analysis – Detection of animal-derived materials in foodstuffs and feedstuffs by real-time PCR – Part 6: Horse DNA detection method. 1st.Edition.
- Iwobi, A., Sebah, D., Kraemer, I., Losher, C., Fischer, G., Busch, U., & Huber, I. (2015). A multiplex real-time PCR method for the quantification of beef and pork fractions in minced meat. *Food chemistry*, 169, 305-313.
- Kang, T. S., & Tanaka, T. (2018). Comparison of quantitative methods based on SYBR Green real-time qPCR to estimate pork meat adulteration in processed beef products. *Food chemistry*, 269, 549-558.
- Köppel, R., van Velsen, F., Ganeshan, A., Pietsch, K., Weber, S., Graf, C., & Licina, A. (2020). Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from chamois, roe, deer, pork and beef. *European Food Research and Technology*, 246(5), 1007-1015.
- Laube, I., Zagon, J., & Broll, H. (2007). Quantitative determination of commercially relevant species in foods by real-time PCR. *International journal of food science & technology*, 42(3), 336-341.
- Li, J., Li, J., Liu, R., Wei, Y., & Wang, S. (2021a). Identification of eleven meat species in foodstuff by a hexaplex real-time PCR with melting curve analysis. *Food Control*, 121, 107599.
- Li, T., Wang, J., Wang, Z., Qiao, L., Liu, R., Li, S., & Chen, A. (2021b). Quantitative determination of mutton adulteration with single-copy nuclear genes by real-time PCR. *Food Chemistry*, 344, 128622.
- Lubis, H., Salihah, N. T., Hossain, M. M., & Ahmed, M. U. (2017). Development of fast and sensitive real-time qPCR assay based on a novel probe for detection of porcine DNA in food sample. *LWT*, 84, 686-692.
- Marchetti, P., Mottola, A., Tantillo, G., Castrica, M., & Di Pinto, A. (2021). Detection of undeclared presence of bovine milk in buffalo yogurt. *Journal of Dairy Science*, 104(4), 4056-4061.
- Oliveira, A. C. D. S., Ferreira, B. C. A., Cardoso, G. V. F., Silva, C. L., da Silva, A. S., da Silva, F., & de Moraes, C. M. (2015). Avaliação da técnica PCR multiplex para detecção de fraude por adição de carne bubalina em carne moída bovina. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 74(4), 371-379.

- QIAGEN. (2020). DNeasy mericon Food Handbook. <https://www.qiagen.com/gb/resources/resourcedetail?id=bd9cc2a8-aa71-4cb5-b6f7-97b3d7fc306d&lang=en>.
- QIAGEN. (2013). QuantiNova™ Probe PCR Handbook. <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=5167d782-9fef-4202-bc79-95f358be7d8c&lang=en>.
- Lazaro, D. R. (2013). *Real-Time PCR in Food Science: Current Technology and Applications*. Caister Academic Press.
- Sarlak, Z., Shojae-Aliabadi, S., Rezvani, N., Hosseini, H., Rouhi, M., & Dastafkan, Z. (2022). Development and validation of TaqMan real-time PCR assays for quantification of chicken adulteration in hamburgers. *Journal of Food Composition and Analysis*, *106*, 104302.
- Sincabima. Fraude alimentar. Uma realidade no setor industrial. <https://sincabima.org.br/2019/03/18/fraude-alimentar-uma-realidade-no-setor-industrial/>.
- Soares, S., Amaral, J. S., Oliveira, M. B. P., & Mafra, I. (2013). A SYBR Green real-time PCR assay to detect and quantify pork meat in processed poultry meat products. *Meat Science*, *94*(1), 115-120.
- Thanakiatkrai, P., & Kitpipit, T. (2017). Meat species identification by two direct-triplex real-time PCR assays using low resolution melting. *Food chemistry*, *233*, 144-150.
- Visciano, P., & Schirone, M. (2021). Food frauds: Global incidents and misleading situations. *Trends in Food Science & Technology*, *114*, 424-442.
- 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*, 41-46.
- Zhang, C. (2013). Semi-nested multiplex PCR enhanced method sensitivity of species detection in further-processed meats. *Food Control*, *31*(2), 326-330.