



Universidade Federal do Amapá
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais



DANILO PELAES DE ALMEIDA

**ADULTERAÇÕES NA COMERCIALIZAÇÃO DE CARNE BOVINA PELO
ACRÉSCIMO OU MESCLA INTENCIONAL NÃO DECLARADA DE CARNE
BUBALINA NA REGIÃO METROPOLITANA DE MACAPÁ-AP**

MACAPÁ - AP
2021

DANILO PELAES DE ALMEIDA

**ADULTERAÇÕES NA COMERCIALIZAÇÃO DE CARNE BOVINA PELO
ACRÉSCIMO OU MESCLA INTENCIONAL NÃO DECLARADA DE CARNE
BUBALINA NA REGIÃO METROPOLITANA DE MACAPÁ-AP**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais (PPGCA) da Universidade Federal do Amapá, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais.

Orientador: Dr. Emerson Augusto Castilho Martins

MACAPÁ – AP
2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá
Elaborada por Cristina Fernandes – CRB-2/1569

Almeida, Danilo Pelaes de.

Adulterações na comercialização de carne bovina pelo acréscimo ou mescla intencional não declarada de carne bubalina na região metropolitana de Macapá - AP. / Danilo Pelaes de Almeida; orientador, Emerson Augusto Castilho Martins. – Macapá, 2021.

49 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Amapá, Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais.

1. Segurança alimentar. 3. Economia. 4. Consumidor. I. Martins, Emerson Augusto Castilho, orientador. II. Fundação Universidade Federal do Amapá. III. Título.

636.089 A447a

CDD. 22 ed.

DANILO PELAES DE ALMEIDA

**ADULTERAÇÕES NA COMERCIALIZAÇÃO DE CARNE BOVINA PELO
ACRÉSCIMO OU MESCLA INTENCIONAL NÃO DECLARADA DE CARNE
BUBALINA NA REGIÃO METROPOLITANA DE MACAPÁ-AP**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais (PPGCA) da Universidade Federal do Amapá, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais.

Aprovada em 09 de junho de 2021.

BANCA EXAMINADORA

Emerson Augusto Castilho Martins – UNIFAP

Alexandro Cezar Florentino – UNIFAP

Ana Carolina Stocco de Lima – IEC

Rafael Lima Resque – UNIFAP

RESUMO

ALMEIDA, Danilo Pelaes. **Adulterações na comercialização de carne bovina pelo acréscimo ou mescla intencional não declarada de carne bubalina na região metropolitana de Macapá-AP.** Dissertação – Departamento de Meio Ambiente e Desenvolvimento, Universidade Federal do Amapá, Macapá, 2021.

A identificação de espécies em alimentos é assunto de grande interesse para a fiscalização agropecuária e pesquisas científicas. As fraudes pela adição ou substituição de espécies infringem as legislações vigentes no Brasil e podem trazer consequências, incluindo perdas econômicas e riscos à saúde pública. O búfalo é um animal de grande importância econômica no Brasil, pertencente da família dos bovídeos, gênero *Bubalus* e espécie *Bubalus bubalis*, foi introduzido no Brasil a partir do século XIX. Este estudo objetivou verificar a ocorrência de fraudes na comercialização de carne moída pela substituição ou mescla de carne bovina pela bubalina em açougues na Região Metropolitana de Macapá (RMM). Foram coletadas e analisadas amostras de 100g de carne moída vendidas como bovinas de 37 açougues na RMM. A extração do DNA foi realizada por digestão com proteinase K seguida por extração orgânica por fenol/clorofórmio. Das 37 amostras analisadas, 21 (56,76%) foram provenientes de carne exclusivamente bovina, 11 (29,73%) amostras foram de carne bubalina e 05 (13,51%) foram positivas para carne bovina e bubalina, sendo chamadas de mesclas. Assim, detectou-se um total de 16 (43,24%) amostras adulteradas. A técnica de PCR-RFLP desenvolvida demonstrou boa eficiência e baixo custo econômico.

Palavras-chave: segurança alimentar, economia, consumidor.

ABSTRACT

ALMEIDA, Danilo Pelaes. **Adulterations in the sale of beef due to the intentional undeclared addition or blending of buffalo meat in the metropolitan region of Macapá-AP** 47 p. Master Thesis – Department of Environment and Development, Federal University of Amapá, Macapá, 2021.

The identification of species in food is a subject of great interest for agricultural inspection and scientific research. Fraud by adding or replacing species violates the laws in force in Brazil and can have consequences, including economic losses and risks to public health. The buffalo is an animal of great economic importance in Brazil, belonging to the bovine family, *Bubalus* genus and *Bubalus bubalis* species, it was introduced in Brazil from the 19th century. This study aimed to verify the occurrence of fraud in the commercialization of ground meat by substituting or mixing beef with buffalo in butchers in the Metropolitan Region of Macapá (RMM). Samples of 100g of ground meat sold as bovine from 37 butchers in RMM were collected and analyzed. DNA extraction was performed by digestion with proteinase K followed by organic extraction by phenol / chloroform. Of the 37 samples analyzed, 21 (56.76%) were exclusively beef, 11 (29.73%) were buffalo meat and 05 (13.51%) were positive for beef and buffalo, being called blends. Thus, a total of 16 (43.24%) adulterated samples were detected. The developed PCR-RFLP technique demonstrated good efficiency and low economic cost.

Keywords: food security, economy, consumer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Produção de carne bovina global dos anos de 1961 a 2018. Fonte: (FAO, 2019).	11
Figura 2 - Mapa de Produção de Carne Bovina em 2018. Fonte: (FAO, 2019).	12
Figura 3 - Variação do efetivo do rebanho de bubalinos no Brasil em 5 anos. Fonte: IBGE (2015 - 2019).	13
Figura 4 - Variação do efetivo do rebanho de bubalinos por Estado no ano de 2019. Fonte: IBGE (2020).	13
Figura 5 - Mapa com os pontos de coleta. Fonte: Amorim (2019); GOOGLE EARTH PRO, (2021).	32
Figura 6 - Digestão enzimática – PCR-RFLP através das enzimas de restrição TaqI, visualização em gel de agarose a 3%.	37
Figura 7 - Digestão enzimática – PCR-RFLP através das enzimas de restrição HinfI, visualização em gel de agarose a 3%.	37
Figura 8 - O alinhamento de sequência de primers específicos de carne bovina e carne de búfalo. O número de acesso de Bos taurus foi LC469831 e Bubalus bubalis foi MH718885.1.	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características dos atributos sensoriais de carne in natura.....	15
Tabela 2 - Enzimas utilizadas e seus respectivos fragmentos observáveis em gel de agarose quando utilizados em amostras de bovinos e bubalinos.....	34
Tabela 3 - Resultados das ampliações das extrações de DNA nas amostras de produtos cárneos.	36

Sumário

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	9
2. REFERENCIAL TEORICO.....	11
2.1. Produção de Carne de Bovina.....	11
2.2. Rebanho efetivo de búfalos no Brasil.....	12
2.3. Qualidade de carne.....	14
2.3.1. Aspecto Microbiológico:.....	14
2.3.2. Aspecto Sensorial:.....	15
2.3.3. Aspecto Nutricional:.....	16
2.4. Ameaças da fraude alimentar para a saúde pública.....	16
2.5. Técnicas para identificação de carnes de diferentes espécies.....	18
3. OBJETIVOS.....	21
3.1. Geral.....	21
3.2. Especifico.....	21
4. REFERENCIAS.....	22
5. ARTIGO.....	30
INTRODUÇÃO.....	31
MATERIAL E MÉTODOS.....	32
5.1. Área de Estudo e coleta de amostras.....	32
5.2. Análise Molecular.....	33
5.2.1. Extração de DNA.....	33
5.2.2. Amplificação por PCR.....	33
5.2.3. Identificação de fragmentos de DNA e Digestão.....	34
5.2.4. Confirmação da identidade da espécie por sequenciamento genético ...	35
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
CONCLUSÃO.....	42
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	48
ANEXOS.....	49

1. INTRODUÇÃO GERAL

A identificação e o combate a fraudes em alimentos dependem de recursos, fundamentados por conhecimento científico e disponibilidade tecnológica. Dentre as atividades dos serviços oficiais de fiscalização da produção e comercialização dos produtos de origem animal está, além da preservação da saúde pública e saúde animal, a identificação e controle de fraudes e adulterações de produtos.

Segundo Spink e Moyer (2011), fraude alimentar é um termo usado que engloba as substituições, adições, adulterações e falsificações de alimentos, bem como ingredientes alimentícios ou embalagens de alimentos, aquelas que são para ganhos econômicos, ditas como declarações falsas ou enganosas feitas sobre um produto alimentício.

Diante disso, os produtos de origem animal, por exemplo a carne bovina, são frequentemente alvos de adulterações devido ao seu alto valor de mercado (DALSECCO et al., 2018).

De acordo com Sakalar et al. (2015), a carne suína é uma fonte de substituição da carne bovina devido aos aspectos sensoriais da carne como a cor e a textura serem semelhantes. Diante disso, a adulteração de alimentos pela adição ou substituição de espécies é de grande importância para a saúde pública e de desenvolvimento econômico do país (COSTA; TEIXEIRA; MOREIRA, 2020).

A descoberta de alimentos adulterados é importante por várias razões, como por exemplo, as pessoas alérgicas e aquelas que mantêm crenças religiosas que especificam a ingestão permitida de certas espécies têm um interesse especial na rotulagem adequada dos alimentos que são consumidos (BALLIN; VOGENSEN; KARLSSON, 2009).

Atualmente, os consumidores estão muitos preocupados com a alimentação, e a escolha do alimento em relação a outro pode refletir aos aspectos do estilo de vida (por exemplo, vegetarianismo e alimentos orgânicos), religião (por exemplo, ausência de carne de porco em algumas dietas), dieta e preocupações com a saúde (por exemplo, ausência de alérgenos) (BALLIN, 2010).

Dessa forma, com os conteúdos disponibilizados por meio da internet devido ao avanço tecnológico em relação à saúde, segurança e autenticidade de alimentos, os consumidores estão cada vez mais interessados nas informações, principalmente naquelas que relacionadas aos alimentos consumidos diariamente (CAWTHORN; STEINMAN; HOFFMAN, 2013).

Hoje, no Brasil, existem três competências legais que exercem os serviços de inspeção sanitária e industrial de produtos de origem animal: O Serviço de Inspeção Federal, conhecido mundialmente pela sigla S.I.F. e vinculado ao Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal – DIPOA, é o responsável por assegurar a qualidade de produtos de origem animal comestíveis e não comestíveis destinados ao mercado interno e externo, bem como de produtos importados, no qual registram-se os estabelecimentos que comercializam produtos entre Estados e para exportação; há o Serviço de Inspeção Estadual (SIE), no qual são registrados os estabelecimentos que comercializam produtos para outro Município, e o Serviço de Inspeção Municipal (SIM) no qual são registrados os estabelecimentos que comercializam produtos dentro do Município. Assim, um produto licenciado pelo Serviço de Inspeção Municipal (SIM), só pode ser comercializado no âmbito do próprio Município. O mesmo ocorre nos Estados, quando o licenciamento é feito pelo Serviço de Inspeção Estadual (SIE). Somente obtendo a licença do Serviço de Inspeção Federal (SIF), o agricultor pode comercializar seu produto para todo o território nacional, restringindo a comercialização e os interesses da agricultura familiar brasileira (BRASIL, 2020).

Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar e verificar a ocorrência de fraude comercial pela substituição ou mescla de carne bovina por bubalina oriundos de frigoríficos da região metropolitana de Macapá aplicando técnicas de biologia molecular.

2. REFERENCIAL TEORICO

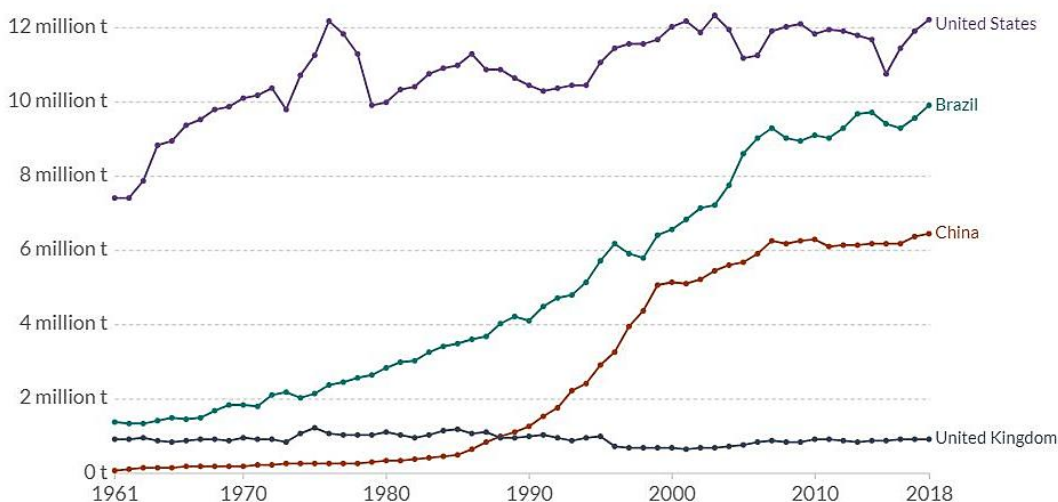
2.1. Produção de Carne de Bovina

A carne bovina é o produto de origem animal mais consumido no Brasil (ANUALPEC, 2019). A produção de carne bovina (inclui bovino e búfalo) globalmente é bastante significativa. Trata-se de um mercado que movimentava bilhões e, embora o total de produção varie, é inegável a força que a produção tem no mercado global. Na Figura 1, observa-se a produção global de carne bovina (bovina e bubalina) globalmente, a produção de carne bovina mais do que dobrou desde 1961 - aumentando de 28 milhões de toneladas por ano para 68 milhões de toneladas em 2014. Os Estados Unidos são o maior produtor mundial de carne bovina e de búfalo, produzindo aproximadamente 12 milhões de toneladas em 2018, assim como outros grandes produtores como Brasil e China, seguidos por Argentina, Austrália e Índia. No ano de 2020 temos os Estados Unidos liderando a produção com 12 milhões de toneladas, seguido do Brasil com 10 milhões de toneladas e China com 5,8 milhões (Figura 2) (FAO, 2021).

Produção de carne bovina, 1961 a 2018

+ Adicionar país

Our World
in Data



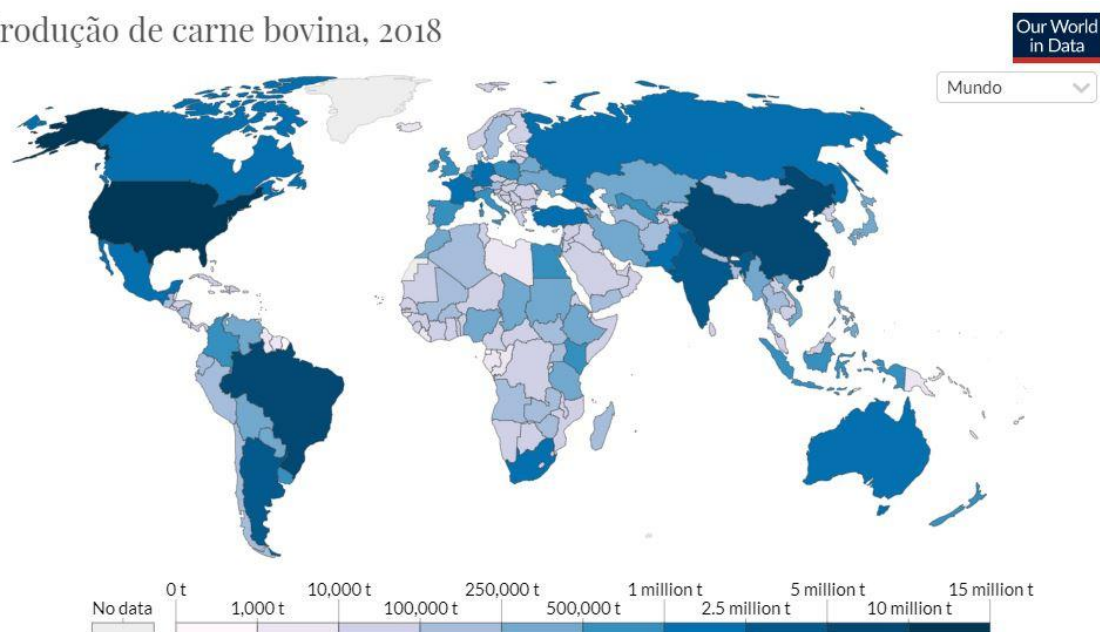
Fonte: Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO)

Nota: Produção de carne bovina e de búfalo (gado) tanto para abate comercial quanto para granja. Os dados são fornecidos em termos de peso da carcaça preparada, excluindo miudezas e gorduras de abate.

CC BY

Figura 1 - Produção de carne bovina global dos anos de 1961 a 2018. Fonte: (FAO, 2019).

Produção de carne bovina, 2018



Fonte: Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) CC BY
 Nota: Produção de carne bovina e de búfalo (gado) tanto para abate comercial quanto para granja. Os dados são fornecidos em termos de peso da carcaça preparada, excluindo miudezas e gorduras de abate.

Figura 2 - Mapa de Produção de Carne Bovina em 2018. Fonte: (FAO, 2019).

Em relação ao Brasil, no ano de 1961 tinha-se um total de 1,37 milhão de toneladas na produção de carne bovina e em 2018 aumentou para 9,90 milhões, resultando em um acréscimo de 8,53 milhões de toneladas, ou seja, aproximadamente 623% ao longo dos anos. De acordo com a EMBRAPA (2020), a produção de carne bovina em 2020, o Brasil foi o segundo maior produtor com 10 milhões de toneladas, equivalentes a 14,8% do total, superado apenas pelos Estados Unidos com 17,6%, dessa forma, nos últimos 20 anos a posição relativa do Brasil não teve mudança significativa.

2.2. Rebanho efetivo de búfalos no Brasil

O búfalo é um animal de grande importância econômica no Brasil, pertencente da família dos bovídeos, gênero *Bubalus* e espécie *Bubalus bubalis*, foi introduzido a partir do século XIX, através de pequenos lotes originários de países da Ásia, Europa e Caribe (BERNARDES, 2007).

Atualmente, a bubalinocultura encontra-se distribuída no país inteiro, com a maioria do rebanho na região Norte, nos estados do Pará, Amapá e Maranhão,

e uma parte na região Sudeste, no estado de São Paulo, totalizando 73% do efetivo nacional. Segundo estimativas do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2020), o efetivo de bubalinos no Brasil é de 1,43 milhões de cabeças. Na Figura 3, observa-se o crescimento do rebanho de bubalinos dos anos de 2015 a 2019, conforme dados divulgados pelo IBGE. O Estado do Amapá encontra-se como o segundo produtor nacional, ficando atrás somente do estado do Pará (Figura 4).

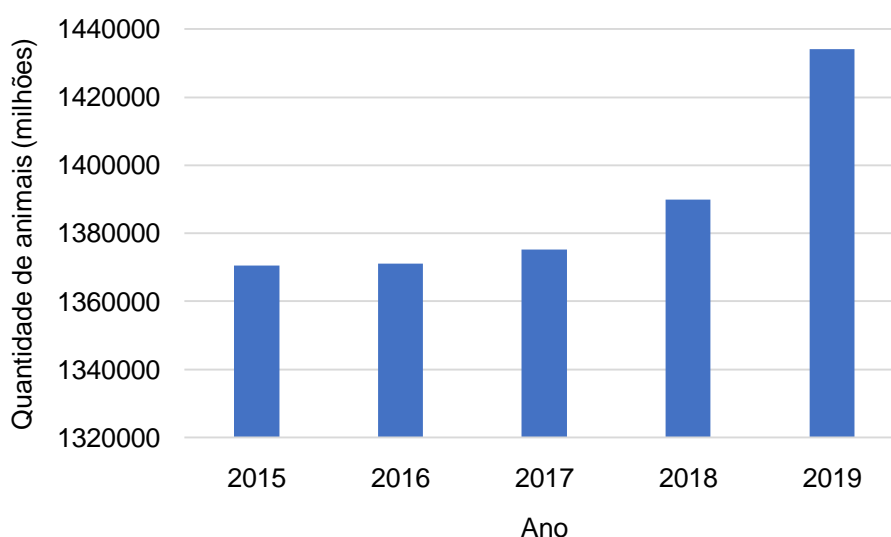


Figura 3 - Variação do efetivo do rebanho de bubalinos no Brasil em 5 anos. Fonte: IBGE (2015 - 2019).

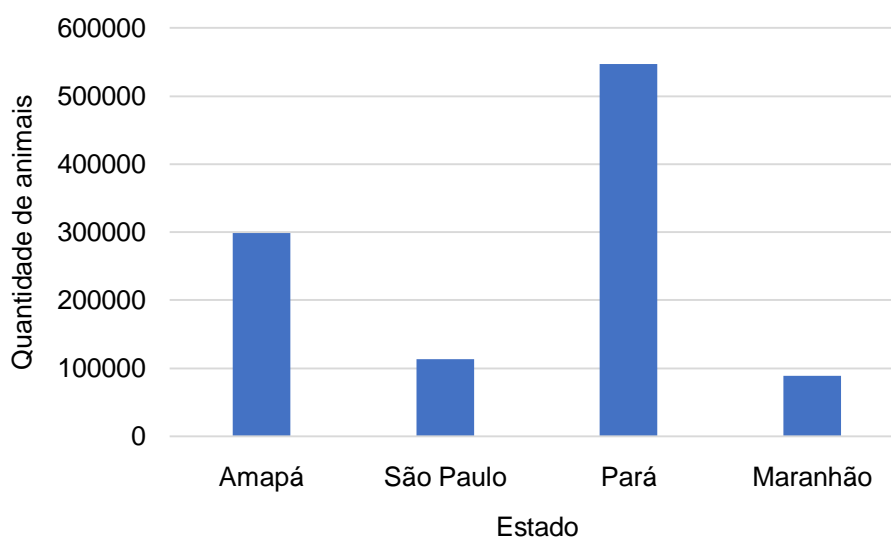


Figura 4 - Variação do efetivo do rebanho de bubalinos por Estado no ano de 2019. Fonte: IBGE (2020).

Segundo Bernardes (2007), são criadas quatro raças no Brasil, sendo elas: a Murrah, Jafarabadi, Carabao e Mediterrâneo. Durante a grande expansão do rebanho de bubalinos ocorridos entre os anos de 1960 e 1980, os criadores de búfalos buscaram aproveitar a produção de carne e, no decorrer do tempo, buscaram aproveitar a forte identidade anatômica e muscular das espécies bovina e bubalina, e optaram por não diferenciá-las no mercado, abatendo-as, desossando-as, embalando e distribuindo a carne de búfalos como se fosse bovino (BERNARDES, 2011). Entretanto, como o mercado de carne bovina já estava estruturado, e mesmo utilizando-se dessa vantagem para gerar lucros ao se abater bubalinos e vender como bovinos, não houve procura por produtos da espécie bubalina (BERNARDES, 2010).

Como consequência, de acordo com Corrêa e Tramoso (2004), a comercialização de carne bubalina brasileira foi vendida como carne bovina em grande parte do mercado brasileiro e sem o conhecimento da maioria dos consumidores.

2.3. Qualidade de carne

Um dos maiores problemas mundiais de produtos alimentares está relacionado a qualidade e autenticidade de produtos cárneos (EGITO et al., 2006). No que diz respeito a qualidade da carne, ela é composta por características que diferenciam os alimentos e compreende três principais aspectos: microbiológico, sensorial e nutricional (DUTCOSKY, 2013).

2.3.1. Aspecto Microbiológico:

As carnes *in natura* apresentam características próprias para o crescimento de agentes microbiológicos e tem, portanto, grande particularidade de sofrer contaminação por diferentes agentes etiológicos (LOPES; OLIVEIRA; KORN, 2007).

A maior parte da microbiota da carne *in natura* é encontrado em sua superfície, como as bactérias Gram-positivas dos gêneros *Enterococcus*, *Lactobacillus* e *Staphylococcus* e as Gram-negativas da família *Enterobacteriaceae* e do gênero *Pseudomonas*. Entretanto, a manipulação incorreta ocasiona o aparecimento de bactérias patogênicas, como *Salmonella* sp., *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, e *S. aureus* (SOARES et al., 2016).

De acordo com o Ministério da Saúde e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e visando à proteção da saúde da população, foram definidos padrões microbiológicos sanitários para *Salmonella sp* por exemplo, em carne bovina *in natura*, além do número mais provável por grama (NMP/g) de coliformes a 45° C para produtos cárneos crus, refrigerados ou congelados seguindo a Resolução-RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001).

2.3.2. Aspecto Sensorial:

Os principais atributos sensoriais da carne são a maciez, suculência, cor, sabor e aroma, sendo que a maciez e a cor são características importantes na decisão na hora da compra da carne pelo consumidor, em seguida, a suculência que é definida como a sensação de umidade observada nos primeiros movimentos de mastigação (ANDRIGHETTO et al., 2010); e o sabor e aroma que estão relacionados no preparo da carne (VARMAN; SUTHERLAND, 1998). Entretanto essas duas últimas características podem ser considerados sensações complexas que afetam os atributos sensoriais que envolvem a combinação de diversas outras características como odor, sabor, textura, temperatura e pH (MELO, 2017).

Na carne, a maciez é determinada como um dos principais parâmetros de qualidade, sem alterar a palatabilidade, assim como o fator que determina o diferencial de preço entre os tipos de cortes (CASTRO DA COSTA et al., 2002). De acordo com Lutz (2008), na Tabela 1 estão descritas as características dos atributos sensoriais das carnes *in natura*.

Tabela 1 - Características dos atributos sensoriais de carne *in natura*.

Atributo sensorial	Características das carnes <i>in natura</i>
Aparência	Uniforme, sem acúmulo de sangue, corpos estranhos e presença de limo na superfície. A gordura deve ter uma tonalidade que varia de branca a amarela e não deve apresentar pontos com sangue. A cor da carne deve ser uniforme, sem manchas escuras ou claras.
Textura	A gordura deve mostrar-se firme ao tato. Normalmente é firme, compacta, elástica e ligeiramente úmida.

Odor	Característico de cada espécie. A carne e a gordura devem ter odor suave e agradável.
Sabor	Suave e característico de cada espécie. Varia segundo a raça, idade e alimentação do animal. Um conjunto complexo de substâncias químicas é responsável pelo sabor da carne.

2.3.3. Aspecto Nutricional:

A carne é um alimento muito importante e nobre para o homem pelo valor nutricional, possuindo qualidade nas proteínas e ácidos graxos (RUIZ et al., 2005), além de ter uma excelente fonte de vitaminas, água e minerais (PARDI et al., 2005). Contêm vitamina A, vitaminas do complexo B, sendo uma das únicas fontes naturais de cobalamina (B12) (FREIRE et al., 2012; O'NEIL et al., 2011). O quantitativo de proteínas nas carnes é equivalente de 10 a 20% de ótima qualidade nutricional, sendo a carne bubalina considerada a carne vermelha mais saudável para o consumo humano, por conta de seu elevado valor nutritivo, possuindo um baixo teor de colesterol quando comparada à carne de bovinos (MELO, 2017; MURTHY; DEVADASON, 2003). Além disso, o perfil de ácidos graxos é diferente daqueles observados em carne de bovinos e suínos, apresentando menores quantidades de ácidos graxos saturados e presença de ácidos graxos polinsaturados (Omega-3) (ARANHA et al., 2012). Já em relação a carne bovina, de acordo com Medeiros (2008), ela possui elevada densidade energética e nutricional, tornando uma dieta balanceada e melhora a absorção de minerais (Fe e Zn) e contribui com ácidos graxos essenciais e de ação metabólica (Ácido linoléico conjugado e ômega-3).

2.4. Ameaças da fraude alimentar para a saúde pública

Com o grande número de casos de fraudes de alimentos existentes no Brasil, seja por substituição ou adição de diferentes espécies, principalmente por carnes bovinas, existem uma variada gama de afecções (FIGUEIRÓ; SARAIVA, 2018). Dentre diversas zoonoses que podem ser adquiridas a partir do consumo de carnes, algumas podem ser citadas:

- Brucelose: doença caracterizada como zoonótica, é transmitida principalmente por alimento, tem como fatores de risco, além da ingestão de alimentos contaminados, exercício de atividades em contato com animais. De acordo o Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE), em humanos é caracterizada por febre, suor profuso, perda de peso e mal estar generalizado, podendo ocorrer infecções graves do sistema Nervoso Central e do revestimento do coração (VRANJAC, 2011). Em estudo realizado na Região de Pedreiras – MA, o principal fator de risco associado à presença de foco no rebanho de bovinos foi a criação consorciada com ovinos, dessa forma, foi diagnosticada brucelose humana na região (CARVALHO et al., 2016).
- Febre aftosa: Doença causada por um vírus do qual existem 7 tipos. Em Bovinos pode ocorrer diversos sintomas como: Febre, inquietação, salivação (babeira), dificuldade de mastigar e engolir alimentos. O animal pode parar de se alimentar, e ficar recluso no pasto, o emagrecimento é notável devido à febre e à dificuldade de se alimentar, beber e locomover. A transmissão para seres humanos é raríssima. Só houve um registro de Febre Aftosa em humanos que foi na Grã Bretanha em 1966. Os efeitos gerais da doença em pessoas são muito similares à gripe com algumas aftas. A Febre Aftosa possui curta duração e é autolimitante. Apesar de existir diversas condições humanas com sintomas análogos, nenhuma delas tem relação com a Febre Aftosa. (MAPA, 2019).
- Encefalopatia espongiforme bovina (BSE): Conhecida como doença da "vaca louca", é uma zoonose descrita, que ocorre após o consumo de produtos cárneos contaminados com tecidos do sistema nervoso central de animais contaminados pelo príon, provocam degenerações fatais do cérebro e ocorrem tanto no homem como em animais (BRASIL, 2008; COSTA; BORGES, 2013).
- Complexo Teníase-Cisticercose: Pode ser definido como um conjunto de alterações patológicas provocadas pelas formas adultas e larvares de *Taenia saginata* que é caracterizada por uma parasitose extra intestinal, a cisticercose, provocada pela presença da forma larvar do parasita nos

tecidos de bovinos, suínos ou do próprio homem e *Taenia solium* sendo caracterizada por uma parasitose intestinal, a teníase, que acomete o homem(MAGALHÃES et al., 2017).

Além das zoonoses em si, tem-se também a segurança alimentar sendo um fator importante para o desenvolvimento econômico, que de acordo com Vieira et. al (2010), o Estado possui apriorismo no estabelecimento de padrões de segurança e controle da qualidade dos alimentos, entretanto que devido a sua estrutura complexa, no Brasil, as políticas são fragmentadas e talvez ineficientes, gerando desperdício de recursos, falta de integração e coordenação e conflito de interesses nas ações locais e federais.

2.5. Técnicas para identificação de carnes de diferentes espécies

O crescimento de estudos científicos relacionados à identificação de alimentos nos últimos anos se revelou um problema global, principalmente no que diz respeito a adulteração de alimentos (CHEN et al., 2020). Diante disso, diversas metodologias foram desenvolvidas para a detecção de adulterações em alimentos, os mais utilizados são os que usam o DNA e oferecem a possibilidade de detectar substâncias de origem animal em alimentos e identificar de quais espécies são oriundos. Dentre diversas técnicas utilizadas, pode-se citar as seguintes:

- PCR multiplex (mPCR)

É uma técnica que usa uma única reação de PCR para amplificar simultaneamente produtos de diferentes origens, ou seja, mais de um segmento genômico é amplificado numa única reação, cada um com seu par de primers específico. Essa técnica tem sido utilizada para a detecção de espécies de bovinos e bubalinos em produtos cárneos propriamente ditos (DANTAS et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2015, 2018; XU et al., 2018), bem como para outros estudos realizados com porco (MUTALIB et al., 2009), frango, pato, avestruz (LI et al., 2015), peru e ganso (HOU et al., 2015).

Assim como por exemplo, no estudo de Ghowvati (2009) que utiliza a técnica na identificação de ruminantes, aves e materiais suínos em alguns produtos cárneos industriais iranianos. A técnica também foi aplicada no estudo de Kitpipit et al. (2014), que utilizada para identificação de diversas espécies de carnes cruas em produtos alimentícios.

No entanto, o método multiplex, existe a possibilidade dos primers de amplificação de DNA de uma espécie se sobressaírem em uma concorrência com os primers de amplificação de DNA de outra espécie, de forma que na presença das duas se encontre somente um dos produtos.

- PCR em Tempo Real

A amplificação de DNA por PCR em Tempo Real é realizada combinando-se os primers com sondas fluorescentes, bem como agentes fluorescentes intercalantes de DNA, sendo as tecnologias mais utilizadas as de TaqMan, SYBR Green I, SYTO e EvaGreen (BALLIN; VOGENSEN; KARLSSON, 2009; NAVARRO et al., 2015). Zhang et al. (2007) desenvolveram um sistema de PCR em tempo real para a identificação e quantificação de DNA bovino em carnes, leites e queijos e, da mesma forma, Lopparelli et al. (2007) desenvolveram um método para identificação de DNA para quantificar a adição de leite bovino a produtos de queijo de búfala puro. Ambos os trabalhos utilizaram sondas específicas do tipo TaqMan para PCR em Tempo Real em conjunto com primers específicos de cada espécie em análise.

Os trabalhos publicados por Fajardo et al. (2008) e López-Andreo et al. (2006) utilizam o agente fluorescente SYBR Green I como uma alternativa de menor custo, se comparada às sondas TaqMan, para a identificação de espécies animais em alimentos.

Contudo, a degradação do DNA e a diminuição resultante no DNA amplificável devido ao processamento do produto (por exemplo, aquecimento) influencia a quantificação de PCR em tempo real, devido a isso, esse método necessita de mais um processo chamado de normalização (BALLIN; VOGENSEN; KARLSSON, 2009), tornando o método muitas vezes laborioso e, o alto custo do equipamento utilizado na técnica acaba tornando inviável para laboratórios de pequeno porte.

- PCR-RFLP

A diferenciação de espécies por análise de RFLP baseia-se em diferentes locais de restrição específicos reconhecidos pelas enzimas de restrição (utiliza enzimas endonucleases que clivam os ácidos nucleicos em sítios específicos), ou seja, submete os fragmentos de DNA resultantes da PCR (amplicons) à digestão por enzimas de restrição e posteriormente as amostras são visualizadas em eletroforese utilizando gel (BALLIN; VOGENSEN; KARLSSON, 2009; BOTTERO; DALMASSO, 2011).

Como exemplo, Doosti et al. (2014) avaliaram o uso da técnica de PCR-RFLP, utilizando o gene mitocondrial citocromo b para diferenciar carne bovina, ovina, carne de porco, frango, burro e carne de cavalo em produtos à base de carne, assim como em outros estudos, a técnica foi usada para identificar a presença de DNA originários de suínos (ERWANTO et al., 2011), peixes (COCOLIN et al., 2000), bovinos ou gêneros alimentícios (VERKAAR et al., 2002) e Chen et al. (2010) desenvolveu um método de PCR-RFLP utilizando o gene 12S rRNA mitocondrial para autenticação de espécies em produtos cárneos.

No estudo de Girish et al. (2007), ele identificou e diferenciou carnes de aves, como: frango, pato, codorna, galinha d'angola e peru. A técnica também foi usada com sucesso no estudo de Mane et al. (2009), em que foi utilizado para detecção em produtos processados e auto clavados para avaliações de rotina de autenticidade e qualidade de alimentos. De acordo com Ballin e colaboradores (2009), cada espécie apresenta um padrão com fragmentos de tamanhos diferentes (padrão eletroforético único) permitindo a sua discriminação.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Verificar a ocorrência de fraudes na comercialização de carne moída bovina por meio de adição ou mescla com carne bubalina em açougues na Região Metropolitana de Macapá (RMM).

3.2. Especifico

- 3.2.1. Avaliar a origem de carne comercializada em açougues na Região Metropolitana de Macapá (RMM) utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR-RFLP).
- 3.2.2. Verificar através do Sequenciamento genético a confirmação do tipo de carne comercializada nos açougues na RMM.

4. REFERENCIAS

AMORIM, João Paulo de Almeida. Processo de formação e metropolização da região metr de Macapá – The process of training and metropolization of the. **Geografia Ensino & Pesquisa**, [S. l.], v. 23, 2019.

ANDRIGHETTO, Cristiana; JORGE, André Mendes; NASSER, Maurício Dominguez; MAESTÁ, Sirlei Aparecida; RODRIGUES, Érico; FRANCISCO, Caroline de Lima. Características químicas e sensoriais da carne bovina. **Pubvet**, [S. l.], p. 781, 2010. ISSN: 1982-1263.

ANUALPEC. Anuário da Pecuária Brasileira (20th ed. Vol. 1). São Paulo, São Paulo, Brasil: Instituto FNP. [S. l.], v. 1, 2019.

ARANHA, A. S.; LUZ, P. A. C.; ANDRIGHETTO, C.; PENHA, D. S.; FUZIKAWA, I. H. S.; PENTEADO, E. E. G. Produção e características da carne bubalina. [S. l.], p. 1–4, 2012.

BALLIN, N. Z. Authentication of meat and meat products. **Meat Science**, [S. l.], v. 86, n. 3, p. 577–587, 2010. ISSN: 03091740. DOI: 10.1016/j.meatsci.2010.06.001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.06.001>.

BALLIN, N. Z.; VOGENSEN, F. K.; KARLSSON, A. H. Species determination - Can we detect and quantify meat adulteration? **Meat science**, [S. l.], v. 83, p. 165–174, 2009.

BERNARDES, Otavio. Bubalinocultura no Brasil : situação e importância econômica. **Revista brasileira de reprodução animal**, [S. l.], v. 31, n. 3, p. 293–298, 2007. Disponível em: www.cbra.org.br.

BERNARDES, Otavio. Bubalinocultura no Brasil e no Mundo - Perspectivas frente ao agronegócio. **I Simpósio de Ruminantes**, [S. l.], 2010.

BERNARDES, Otavio. Integração, associativismo e arranjos na cadeia produtiva da bubalinocultura: situação atual e perspectivas. *In*: SIMPOSIO DA CADEIA PRODUTIVA DA BUBALINOCULTURA, UNESP, 2011. BOTUCATU. 2011, **Anais [...]**. [s.l: s.n.] p. 1–10.

BOTTERO, M. T.; DALMASSO, A. Animal species identification in food products: Evolution of biomolecular methods. **The Veterinary Journal**, [S. l.], v. 190, p. 34–38, 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA. Resolução RDC nº12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União. Brasília, DF. 2001. Disponível em:

http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2001/res0012_02_01_2001.html.

BRASIL. Encefalopatia Espongiforme Bovina - EEB. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, [S. l.], p. 14, 2008. ISBN: 978-85-99851-36-4. Disponível em: [http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/programa_nacional_dos_herbivoros/Cartilha técnica EEB 2008.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/programa_nacional_dos_herbivoros/Cartilha_técnica_EEB_2008.pdf).

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br>>. Acessado em 14 dez 2020. 2020.

CARVALHO, Robert Ferreira Barroso De; SANTOS, Hamilton Perreira; MATHIAS, Luís Antonio; PEREIRA, Hélder de Moraes; PAIXÃO, Adriana Prazeres; COSTA FILHO, Valter Marchão; ALVES, Lúcia Maria Côelho. Frequência de brucelose bovina em rebanhos leiteiros e em seres humanos na região central do estado do Maranhão, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, [S. l.], v. 83, n. 0, p. 1–6, 2016. ISSN: 1808-1657. DOI: 10.1590/1808-1657001042014.

CASTRO DA COSTA, Eduardo; RESTLE, João; VAZ, Fabiano Nunes; CELETINO, Dari; FILHO, Alves; AUGUSTO, Regis; CARVALHO BERNARDES, L.; KUSS, Fernando. Características da Carcaça de Novilhos Red Angus Superprecoce Abatidos com Diferentes Pesos Carcass Traits of Young Red Angus Steers Slaughtered with Different Weights. [S. l.], v. 31, n. 1, p. 119–128, 2002.

CAWTHORN, Donna Mareè; STEINMAN, Harris A.; HOFFMAN, Louwrens C. A high incidence of species substitution and mislabelling detected in meat products sold in South Africa. **Food Control**, [S. l.], v. 32, n. 2, p. 440–449, 2013. ISSN: 09567135. DOI: 10.1016/j.foodcont.2013.01.008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.01.008>.

CHEN, Shi Yi; LIU, Yi Ping; YAO, Yong Gang. Species authentication of commercial beef jerky based on PCR-RFLP analysis of the mitochondrial 12S rRNA gene. **Journal of Genetics and Genomics**, [S. l.], v. 37, n. 11, p. 763–769, 2010. ISSN: 16738527. DOI: 10.1016/S1673-8527(09)60093-X. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S1673-8527\(09\)60093-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1673-8527(09)60093-X).

CHEN, Xiaoyu; LU, Lixia; XIONG, Xiaohui; XIONG, Xiong; LIU, Yuanjian. Development of a real-time PCR assay for the identification and quantification of bovine ingredient in processed meat products. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 1–10, 2020. ISSN: 20452322. DOI: 10.1038/s41598-020-59010-6. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-59010-6>.

COCOLIN, L.; D'AGARO, E.; MANZANO, M.; LANARI, D.; COMI, G. Rapid PCR-RFLP method for the identification of marine fish fillets (seabass, seabream, umbrine, and dentex). **Journal of Food Science**, [S. l.], v. 65, n. 8,

p. 1315–1317, 2000. ISSN: 00221147. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2000.tb10604.x.

CORRÊA, A.; TRAMOSO, E. Búfalos. **Revista Produz**, [S. l.], v. 1, p. 36–43, 2004.

COSTA, Ligia Maria Cantarino; BORGES, José Renato Junqueira. Encefalopatia Espongiforme Bovina – EEB / BSE Doença da Vaca Louca. [S. l.], p. 1–4, 2013.

COSTA, M. J; TEIXEIRA, P.; MOREIRA, R. Food Defense and Food Fraud in Food Chain. [S. l.], v. 20, p. 38–43, 2020. Disponível em: http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2183-59852020000100007.

DALSECCO, Lissandra Sousa; PALHARES, Rafael Melo; OLIVEIRA, Pollyana Carvalho; TEIXEIRA, Lilian Viana; DRUMMOND, Marcela Gonçalves; DE OLIVEIRA, Denise Aparecida Andrade. A Fast and Reliable Real-Time PCR Method for Detection of Ten Animal Species in Meat Products. **Journal of Food Science**, [S. l.], v. 83, n. 2, p. 258–265, 2018. ISSN: 17503841. DOI: 10.1111/1750-3841.14001.

DANTAS, Vanderson Vasconcelos et al. Application of a multiplex polymerase chain reaction (mPCR) assay to detect fraud by substitution of bovine meat cuts with water buffalo meat in Northern Brazil. **CYTA - Journal of Food**, [S. l.], v. 17, n. 1, p. 790–795, 2019. ISSN: 19476345. DOI: 10.1080/19476337.2019.1650832. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/19476337.2019.1650832>.

DOOSTI, Abbas; GHASEMI DEHKORDI, Payam; RAHIMI, Ebrahim. Molecular assay to fraud identification of meat products. **Journal of Food Science and Technology**, [S. l.], v. 51, n. 1, p. 148–152, 2014. ISSN: 00221155. DOI: 10.1007/s13197-011-0456-3.

DUTCOSKY, S. D. **Análise Sensorial de Alimentos**. Curitiba. [s.l.: s.n.], v. 4. ed.

EGITO, A. S.; ROSINHA, G. M. S.; LAGUNA, L. E.; MICLO, L.; GIRARDET, J. M.; GAILLARD, J. L. Método eletroforético rápido para detecção o da adulteração do leite caprino com leite bovino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, [S. l.], v. 58, n. 5, p. 932–939, 2006. ISSN: 01020935. DOI: 10.1590/S0102-09352006000500032.

EMBRAPA. **EMBRAPA TERRITORIAL. Agricultura e preservação ambiental: uma análise do cadastro ambiental rural**. Campinas, 2020. Disponível em: < www.embrapa.br >. Acesso em: 15 jun. 2021. 2020.

ERWANTO, Y.; ABIDIN, M. Z.; ROHMAN, A.; SISINDARI. PCR-RFLP using

BseDI enzyme for pork authentication in sausage and nugget products. **Media Peternakan**, [S. l.], v. 34, n. 1, p. 14–18, 2011. ISSN: 01260472. ISBN: 6227452157. DOI: 10.5398/medpet.2011.34.1.14.

FAJARDO, Violeta; GONZÁLEZ, Isabel; MARTÍN, Irene; ROJAS, María; HERNÁNDEZ, Pablo E.; GARCÍA, Teresa; MARTÍN, Rosario. Real-time PCR for detection and quantification of red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), and roe deer (*Capreolus capreolus*) in meat mixtures. **Meat Science**, [S. l.], v. 79, n. 2, p. 289–298, 2008. ISSN: 03091740. DOI: 10.1016/j.meatsci.2007.09.013.

FAO. **FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS**. Disponível em <[HTTP://www.fao.org](http://www.fao.org)>. Acessado em 02 dez 2020. 2019.

FAO. **FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS**. Disponível em <[HTTP://www.fao.org](http://www.fao.org)>. Acessado em 15 jun 2021. [S. l.], 2021.

FIGUEIRÓ, M. R.; SARAIVA, N. Z. **Principais estratégias de manejo sanitário na bubalinocultura**. [s.l: s.n.].

FREIRE, Ana Cláudia Alves; HARADA, Camila Martins; SILVA, Camila Mayara Oliveira Da; CUNHA, Débora Cristina Da; FERREIRA, Eric Batista; DELLA LUCIA, Flávia. Aspectos nutricionais e sensoriais da redução do teor de gordura em preparações de carne bovina. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, [S. l.], v. 10, n. 2, p. 270–278, 2012. ISSN: 15170276. DOI: 10.5892/ruvrv.2012.102.270278.

GIRISH, P. S.; ANJANEYULU, A. S. R.; VISWAS, K. N.; SANTHOSH, F. H.; BHILEGAONKAR, K. N.; AGARWAL, R. K.; KONDAIAH, N.; NAGAPPA, K. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism of mitochondrial 12S rRNA gene: A simple method for identification of poultry meat species. **Veterinary Research Communications**, [S. l.], v. 31, n. 4, p. 447–455, 2007. ISSN: 01657380. DOI: 10.1007/s11259-006-3390-5.

GOOGLE EARTH PRO. **Google Earth Pro 7.3. 2021. Região Metropolitana de Macapá, AP. Coordenadas 22N. E: 492612.45523273. Data de Visualização: 03/06/2021. Data da Imagem: 07/06/2021.** 2021.

HOU, Bo; MENG, Xianrong; ZHANG, Liyuan; GUO, Jinyue; LI, Shaowen; JIN, Hui. Development of a sensitive and specific multiplex PCR method for the simultaneous detection of chicken, duck and goose DNA in meat products. **Meat Science**, [S. l.], v. 101, p. 90–94, 2015. ISSN: 03091740. DOI: 10.1016/j.meatsci.2014.11.007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.11.007>.

IBGE. **Efetivo Bubalino Brasileiro, 2020.** Disponível em:

<<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939#resultado>>. Acesso em Dez 2020. 2020.

KITPIPIT, Thitika; SITTICHAN, Kuangtiwa; THANAKIATKRAI, Phuvadol. Direct-multiplex PCR assay for meat species identification in food products. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 163, p. 77–82, 2014. ISSN: 18737072. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.04.062. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.062>.

LI, Jingmei; HONG, Yeun; KIM, Jae Hwan; QIN, Pei; KIM, Mi Ju; KIM, Hae Yeong. Multiplex PCR for simultaneous identification of turkey, ostrich, chicken, and duck. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, [S. l.], v. 58, n. 6, p. 887–893, 2015. ISSN: 2234344X. DOI: 10.1007/s13765-015-0118-7.

LOPES, M. V.; OLIVEIRA, A. C.; KORN, M. Perfil físico-químico de carnes bovinas expostas ao consumo em Salvador, BA. *Higiene Alimentar*. [S. l.], n. 21(151), p. 82–87, 2007.

LÓPEZ-ANDREO, María; GARRIDO-PERTIERRA, Amando; PUYET, Antonio. Evaluation of post-polymerase chain reaction melting temperature analysis for meat species identification in mixed DNA samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 54, n. 21, p. 7973–7978, 2006. ISSN: 00218561. DOI: 10.1021/jf0615045.

LOPPARELLI, Rosa M.; CARDAZZO, Barbara; BALZAN, Stefania; GIACCONE, Valerio; NOVELLI, Enrico. Real-time TaqMan polymerase chain reaction detection and quantification of cow DNA in pure water buffalo mozzarella cheese: Method validation and its application on commercial samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 55, n. 9, p. 3429–3434, 2007. ISSN: 00218561. ISBN: 3904982729. DOI: 10.1021/jf0637271.

LUTZ, Instituto Adolfo. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos (Coord.) Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea -- São Paulo: Instituto Adolfo Lutz**. [s.l: s.n.].

MAGALHÃES, Fernanda C.; SANTOS, Thiago M.; ASSIS, Débora C.; ORNELLAS, Cleia D.; PINTO, Paulo A.; SANTOS, Wagner M. Diagnóstico e fatores de risco do complexo teníase-cisticercose bovina no município de Salinas, Minas Gerais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [S. l.], v. 37, n. 3, p. 205–209, 2017. ISSN: 16785150. DOI: 10.1590/S0100-736X2017000300001.

MANE, B. G.; MENDIRATTA, S. K.; TIWARI, A. K. Polymerase chain reaction assay for identification of chicken in meat and meat products. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 116, n. 3, p. 806–810, 2009. ISSN: 03088146. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.03.030. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.03.030>.

MAPA. Programa Nacional de Erradicação e Prevenção da Febre Aftosa – PNEFA. [S. l.], 2019.

MEDEIROS, Serhio Raposo. Valor nutricional da carne bovina e suas implicações para a saúde humana. [S. l.], p. 30, 2008.

MELO, S. **CARACTERÍSTICAS DA CARÇAÇA E QUALIDADE DA CARNE DE BÚFALOS (*Bubalus bubalis*) ALIMENTADOS COM CANA-DE-AÇÚCAR E DIFERENTES NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO DE ESPACIOS**. [s.l.: s.n.]. ISSN: 07981015.

MURTHY, T. R. K.; DEVADASON, I. P. Buffalo meat and meat products: an overview. **ASIAN BUFFALO CONGRESS ON BUFFALO FOR FOOD, SECURITY AND EMPLOYMENT**, [S. l.], p. 193–199, 2003.

MUTALIB, Sahilah Abd et al. Short communication. PCR detection of DNA of bovine, ovine-caprine and porcine origin in feed as part of a bovine spongiform encephalopathy control program. **Food Control**, [S. l.], v. 10, n. 2, p. 595–604, 2009. ISSN: 09567135. ISBN: 0141100028. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.03.030. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.002>.

NAVARRO, E.; SERRANO-HERAS, G.; CASTAÑO, M. J.; SOLERA, J. Real-time PCR detection chemistry. **Clinica Chimica Acta**, [S. l.], v. 439, p. 231–250, 2015. ISSN: 18733492. DOI: 10.1016/j.cca.2014.10.017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2014.10.017>.

O'NEIL, C. E.; ZANOVEC, M.; KEAST, D. R.; FULGONI, V. L.; NICKLAS, T. A. Nutrient contribution of total and lean beef in diets of US children and adolescents: National Health and Nutrition Examination Survey 1999–2004. **Meat Science**, [S. l.], v. 87, p. 250–256, 2011.

OLIVEIRA, Andrey Carlos do Sacramento De et al. Avaliação da técnica PCR multiplex para detecção de fraude por adição de carne bubalina em carne moída bovina TT - Evaluation of a multiplex PCR for detection of a fraud in the minced beef meat by adding buffalo meat. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, [S. l.], v. 74, n. 4, p. 371–379, 2015. Disponível em: <http://ses.sp.bvs.br/lildbi/docsonline/get.php?id=6262>.

OLIVEIRA, Andrey Carlos do Sacramento De et al. Brazilian ground beef authentication by multiplex polymerase chain reaction. **Ciência Rural**, [S. l.], v. 48, n. 2, p. 1–7, 2018. ISSN: 1678-4596. DOI: 10.1590/0103-8478cr20160574.

PARDI, C. M.; SANTOS, F. I.; SOUZA, R. E.; PARDI, S. H. Constituintes básicos da carne. Ciência, higiene e tecnologia da carne. Goiânia: Ed. UFG. **Revista UFG**, [S. l.], v. 2. ed., p. 1:52-70., 2005.

RUIZ, M. R.; MATSUSHITA, M.; SOUSA, N. E.; VISENTAINER, J. V. Anuário,

Sindicato do Comércio Varejista de Carnes Frescas do Estado de São Paulo, São Caetano do Sul. **RPM Editora**, [S. l.], p. 149–151, 2005.

SAKALAR, Ergün; ERGÜN, Seyma Özçirak; AKAR, Emine. A simultaneous analytical method for duplex identification of porcine and horse in the meat products by EvaGreen based real-time PCR. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**, [S. l.], v. 35, n. 3, p. 382–388, 2015. ISSN: 12258563. DOI: 10.5851/kosfa.2015.35.3.382.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. [s.l.: s.n.].

SOARES, K. M. P.; SILVA, J. B. A.; SOUZA, L. B.; MENDES, C. G.; ABRANTES, M. R.; CAMPELO, M. C. S.; SOUZA, A. S. Qualidade microbiológica de carne bovina comercializada na forma de bife. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, [S. l.], p. 22(3-4):206-210, 2016.

SPINK, John; MOYER, Douglas C. Defining the Public Health Threat of Food Fraud. **Journal of Food Science**, [S. l.], v. 76, n. 9, 2011. ISSN: 00221147. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2011.02417.x.

TEIXEIRA, L. V.; TEIXEIRA, C. S.; OLIVEIRA, D. A. A. Identificação espécie-específica de carnes e produtos cárneos de origem bubalina e bovina pela técnica de PCR-RFLP. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, [S. l.], v. 67, n. 1, p. 309–314, 2015. ISSN: 16784162. DOI: 10.1590/1678-7239.

VARMAN, A. H.; SUTHERLAND, J. P. Carne y productos cárnicos, tecnología, química y microbiología. **Editora Acríbia**, [S. l.], v. 3, p. 423, 1998.

VERKAAR, E. L. C.; NIJMAN, I. J.; BOUTAGA, K.; LENSTRA, J. A. Differentiation of cattle species in beef by PCR-RFLP of mitochondrial and satellite DNA. **Meat Science**, [S. l.], v. 60, n. 4, p. 365–369, 2002. ISSN: 03091740. DOI: 10.1016/S0309-1740(01)00144-9.

VIEIRA, A. C. P.; BUAINAIN, A. M.; SPERS, E. E. A Segurança do Alimento e a Necessidade da Informação aos Consumidores. **Cadernos de Direito**, [S. l.], v. 10, n. 19, p. 21–37, 2010. DOI: 10.15600/2238-1228/cd.v10n19p21-37.

VRANJAC, Alexandre. **CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA - CVE. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo – SES/SP. Manual das doenças transmitidas por alimento e água. São Paulo**. [s.l.: s.n.].

XU, Rusu; WEI, Shuang; ZHOU, Guangbiao; REN, Jiao; LIU, Zhongyong; TANG, Shuze; CHEUNG, Peter C. K.; WU, Xiyang. Multiplex TaqMan locked nucleic acid real-time PCR for the differential identification of various meat and meat products. **Meat Science**, [S. l.], v. 137, n. November 2017, p. 41–46, 2018. ISSN: 03091740. DOI: 10.1016/j.meatsci.2017.11.003. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.11.003>.

ZHANG, Chun Lai; FOWLER, Mark R.; SCOTT, Nigel W.; LAWSON, Graham; SLATER, Adrian. A TaqMan real-time PCR system for the identification and quantification of bovine DNA in meats, milks and cheeses. **Food Control**, [S. l.], v. 18, n. 9, p. 1149–1158, 2007. ISSN: 09567135. DOI: 10.1016/j.foodcont.2006.07.018.

5. ARTIGO

ADULTERAÇÕES NA COMERCIALIZAÇÃO DE CARNE BOVINA PELO ACRÉSCIMO OU MESCLA INTENCIONAL NÃO DECLARADA DE CARNE BUBALINA NA REGIÃO METROPOLITANA DE MACAPÁ-AP

¹Danilo Pelaes de Almeida, Biólogo pela Universidade Federal do Amapá, mestrando em Ciências Ambientais (UNIFAP).

²Rafaela dos Santos Silva Sanches, Bióloga pela Universidade Federal do Amapá, mestranda em Ciências da Saúde (UNIFAP).

³Mateus Goes Quintela, Biólogo pela Universidade Federal do Amapá, mestrando em Ciências da Saúde (UNIFAP).

⁴Gabriel Neto Oliveira, Biólogo pela Universidade Federal do Amapá, mestrando em Ciências da Saúde (UNIFAP).

⁵Emerson Augusto Castilho Martins, Doutor do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde/ Universidade Federal do Amapá. (UNIFAP)

RESUMO

O búfalo (*Bubalus bubalis*) é um animal de grande importância para o Brasil, especialmente na sua região Norte. O Amapá encontra-se como o segundo produtor nacional, ficando atrás somente do estado do Pará. Nesta pesquisa objetivou verificar a ocorrência de fraude comercial pela substituição ou mescla de carne bovina por/com bubalina em frigoríficos da região metropolitana de Macapá. Para isto, foram coletadas amostras de 100g de carne moída de 37 frigoríficos na Região metropolitana de Macapá. A extração do DNA foi realizada por digestão com proteinase K seguida por extração orgânica por fenol/clorofórmio. Para amplificação do gene *Cytb* foi realizado a técnica de PCR. A identificação de fragmentos de DNA para espécie de boi e búfalo, foi utilizada a técnica PCR-RFLP, fazendo uso de duas enzimas de restrição, a enzima *TaqI*, que digere carne de espécie bubalina e a enzima *HinfI*, digere carne bovina. Como resultado, após análise molecular, verificou-se que do total de 37 amostras coletadas na Região metropolitana de Macapá, 21 amostras são provenientes de carne bovina, o que representa 56,76%, 11 amostras são de carne bubalina (29,73%) e 05 amostras foram positivas para carne bovina e bubalina, sendo chamada de mesclas, o que representa 13,51% do total de amostras. Portanto, é possível confirmar que mais de 40% da carne comercializada em Macapá é adulterada, tendo em vista que essas carnes são vendidas ao consumidor como carne bovina.

Palavras chaves: Segurança Alimentar, Contaminação de Alimentos, Saúde Pública.

INTRODUÇÃO

O búfalo (*Bubalus bubalis*) é um animal de grande importância para o Brasil, especialmente na sua região Norte. O Amapá encontra-se como o segundo produtor nacional, ficando atrás somente do estado do Pará. No entanto, a criação bubalina no Amapá apresenta maior destaque ainda quando se compara a posição do estado no ranking de criação bovina, uma vez que apresenta o menor rebanho bovino das unidades federativas do país (IBGE, 2019). Apesar do impacto econômico, a cadeia produtiva bubalina nesta região é fragilizada pela produção extensiva, pouco investimento tecnológico e padrões precários de gestão e comercialização, contribuindo para a subvalorização e diminuição do preço de produtos cárneos bubalinos comparado à carne de boi (MARQUES et al. 2015). Quando avaliados os aspectos nutricionais e gustativos, as carnes bovinas e bubalinas se assemelham na coloração, aroma, textura e sabor, além dos cortes, o que dificulta a diferenciação do produto pelos consumidores (JOELE et al. 2017), possibilitando fraudes na comercialização de carne bubalina como bovina.

Segundo Hossain et al. (2017) e Kyrova et al. (2017) a adulteração está relacionada a fatores econômicos, em que, os produtores, visando os lucros, escolhem pela comercialização de produtos semelhantes, e mais baratos. Tal prática de fraude em produtos mesclados, segundo alguns pesquisadores, costuma também ser mais frequente entre alimentos que apresentam características organolépticas similares, como a carne bovina e a bubalina (JOELE et al. 2017; MANE et al. 2012). Por consequência, segundo relatório escrito por Omotosho et al. (2016), a adoção destas práticas fraudulentas eleva o grau de desconfiança dos consumidores, sobretudo nas questões sanitárias, já que ameaça à segurança alimentar e afeta diretamente a saúde da população, conforme demonstrado por Abrahão et al. (2005), já que os riscos de transmissão de zoonoses como a listeriose, tuberculose bovina, infecções por estafilococos e Salmonelose, além de toxoplasmose, são aumentados, além de poderem em alguns casos ocasionar algum tipo de reação alérgica (TANABE et al. 2007, TEIXEIRA et al. 2015) e afecções de origem bacteriana,

viral e parasitária (FIGUEIRO; SARAIVA, 2018). A partir destes aspectos importantes, este trabalho buscou aplicar técnicas de biologia molecular para verificar a ocorrência de fraude comercial pela substituição ou mescla de carne bovina por/com bubalina em frigoríficos da região metropolitana de Macapá.

MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Área de Estudo e coleta de amostras

A pesquisa foi desenvolvida na Região Metropolitana de Macapá (RMM), situada no estado do Amapá – AP. A RMM é composta por três municípios, o maior e mais desenvolvido é Macapá, capital do Estado, com população de 503 mil habitantes, seguido pelo município de Santana, com 121 mil habitantes e pelo município de Mazagão, com 22 mil habitantes. Foram coletadas, entre abril e agosto de 2019, amostras de 100 gramas de carne moída em 37 açougues da região, localizados em diferentes bairros dos municípios de Macapá e Santana e em um açougue localizado na região central do município de Mazagão (Figura 5). O material amostrado foi comprado e exigido que fosse carne bovina. Foram incluídos no estudo amostras de todos os estabelecimentos especializados no comércio de carnes e identificados como açougues, encontrados na RMM após busca ativa e virtual para encontrar os estabelecimentos. Após a compra, as amostras foram mantidas em temperatura de -20°C até a realização da análise molecular.



Figura 5 - Mapa com os pontos de coleta. Fonte: Amorim (2019); GOOGLE EARTH PRO, (2021).

5.2. Análise Molecular

5.2.1. Extração de DNA

O DNA celular total foi extraído das amostras por digestão com proteinase K seguida por extração orgânica por clorofórmio, conforme descrito por Sambrook & Russel (SAMBROOK; RUSSELL, 2001) com utilização de solução lise contendo 22,2µL de NaCl à 5M, 50µL de SDS à 10%, 1µL de EDTA à 0,5M, 5µL de Tris 1M, 5µL de Proteinase K e 416,8 µL de água de injeção, em seguida, cada amostra foi colocada em 500µL de solução lise, macerado utilizando um pistilo e, em seguida, colocada em banho-maria (*overnight*) à 42°C. Após isso, foram adicionadas em cada amostra 500µL de CHCl₃, vortexados por 1 minuto e em seguida colocados em centrifuga a 12000rpm em 4°C por 5 minutos, após o termino, foi recuperado o sobrenadante em novo eppendorff de 1,5µL. A etapa descrita foi repetida, em seguida, adicionou-se 50µL de NaOAc e 1ml de ETOH 100% à -20°C, vortexados por 30 segundos e colocados no freezer no mínimo 1 hora.

Após as etapas anteriores, as amostras retornaram à centrifuga à 12000rpm em 4°C por 15 minutos, em seguida, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 500µL de ETOH 70% à -20°C. Em seguida, elas retornam a centrifuga à 12000rpm em 4°C por 5 minutos, após, é descartado o sobrenadante e utiliza-se uma pipeta para retirar o restante de álcool. Após a retirada do álcool, as amostras ficaram secando em bancada por 5 minutos e em seguida, o DNA (*pellet*) foi re-suspensão em 100µL de água de injeção e vortexados para a mistura por aproximadamente 10 segundos.

5.2.2. Amplificação por PCR

O protocolo adotado na reação de PCR foi adaptado de Teixeira et al. (TEIXEIRA; TEIXEIRA; OLIVEIRA, 2015), cada amostra de reação continha 5µl de Burffer (Fermentas[®], 10X), 1µL de cada Primer (10µM), 4µL de MgCl₂ (25mM), 1µL de dNTP (10mM), 0,4µL da enzima Taq DNA Polymerase (Fermentas[®], 5U/µL), 2µL de DNA da amostra (~300ng) e 35,6µl de água para injeção, para volume final da reação em 50µL. Foi utilizado o Termociclador *Life Eco* da marca Bioer[®], com uma desnaturação inicial mantida em 94°C por

10 min, seguido de 30 ciclos com desnaturação à 94°C por 20 s, associação dos primers à 53°C por 20 s e extensão à 72°C por 30 s. Ao final do último ciclo a amostra foi mantida a 72°C durante 10 min, para que a enzima finalizasse a extensão de possíveis fragmentos.

Foram empregados os iniciadores universais de Citocromo B para artiodáctilos (ordem de mamíferos ungulados com um número par de dedos nas patas), conforme descritos por Verkaar, Nijman, Boutaga e Lenstra (VERKAAR et al., 2002), com sequência para amplificação de um fragmento de 271 pares de bases:

Forward 5'-ACA AAT CCT CAC AGG CCT ATT C-3'

Reverse 5'-TAG GAC GTA TCC TAT GAA TGC T-3'

5.2.3. Identificação de fragmentos de DNA e Digestão

Para a identificação de fragmentos de DNA para espécie de boi (*Bos taurus*) e búfalo (*Bubalus bubalis*), foi utilizada a técnica PCR-RFLP (polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição), que faz uso de enzimas endonucleases que clivam os ácidos nucleicos em sítios específicos.

Foram utilizadas duas enzimas de restrição (Tabela 2), a enzima *TaqI* T□ CGA para detecção de DNA da espécie bubalina e a enzima *Hinfi* G□ ANTC para detecção de DNA da espécie bovina.

Tabela 2 - Enzimas utilizadas e seus respectivos fragmentos observáveis em gel de agarose quando utilizados em amostras de bovinos e bubalinos.

	ENZIMA	FRAGMENTOS
BÚFALO	<i>TaqI</i>	108pb e 163pb
	<i>Hinfi</i>	271pb
BOI	<i>TaqI</i>	271pb
	<i>Hinfi</i>	101pb e 170pb

Todas as amostras foram submetidas à digestão pelas duas enzimas, para garantir a confiabilidade do resultado encontrado. Ambas enzimas foram citadas e utilizadas no trabalho de Teixeira et al. (2015).

Em seguida, foram acrescentados 22,0 µL do produto da PCR, 2,5 µL de tampão e 0,5 µL de enzima de restrição (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), posteriormente submetidos a 3 horas de digestão a 65,0 °C para a *TaqI* e a 37,0 °C para a *Hinfl*. Posteriormente, os fragmentos de DNA digeridos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 3,0% corado com Brometo de Etídeo, seguido da observação desses fragmentos em transiluminador UV.

5.2.4. *Confirmação da identidade da espécie por sequenciamento genético*

Para confirmar a autenticidade das amostras de carne utilizadas como referência neste estudo, um fragmento do gene CytB das amostras foram sequenciadas usando o método Sanger e os primers conforme descritos por Verkaar, Nijman, Boutaga e Lenstra (VERKAAR et al., 2002). As amostras 6, 7, 8 e 9 foram enviadas para purificação, quantificação e sequenciamento na empresa ACT Gene Análises Moleculares Ltda, utilizando o equipamento ABI-3500 (Applied Biosystems). As sequências de DNA obtidas foram analisadas e editadas usando o software QIAGEN CLC Genomics Workbench versão 5.5.2.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, realizou-se a avaliação da espécie de origem de carne comercialmente vendida em Macapá pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Diante de sua capacidade de gerar resultados rápidos e confiáveis, esta técnica tem sido um método bastante eficiente para identificar adulterações em produtos alimentícios, principalmente nos carnes (DAGUER et al. 2010; OLIVEIRA et al., 2015; ALI et al., 2015). Uma questão importante a se avaliar durante a escolha da região a ser amplificada é a quantidade de cópias da mesma no genoma. O DNA Mitocondrial é encontrado com centenas a milhares de cópias por célula nos tecidos musculares, e apresenta-se com vantagens em relação às duas cópias por célula encontradas do DNA nuclear (BARAZZONI et al., 2000). A região gênica do DNA mitocondrial mais utilizada em pesquisas são o Citocromo mitocondrial B (Cyt B) (PARSON et al., 2000) e a Subunidade 1 do Citocromo C Oxidase 1 (COI) (ZHU et al., 2013). A região alvo utilizada nesta pesquisa foi o Cyt B do DNA mitocondrial. Após análise molecular, verificou-se que do total de 37 amostras coletadas na Região metropolitana de Macapá, 21 amostras são provenientes de carne bovina, o

que representa 56,76%, 11 amostras são de carne bubalina (29,73%) e 05 amostras foram positivas para carne bovina e bubalina, sendo chamada de mesclas, o que representa 13,51% do total de amostras (Tabela 4). Considerando que as carnes foram adquiridas como carnes bovinas, observa-se então uma taxa de adulteração de 43,24% na região metropolitana de Macapá.

Tabela 3 - Resultados das ampliações das extrações de DNA nas amostras de produtos cárneos.

ANÁLISE MOLECULAR	Nº DE AMOSTRAS	PORCENTAGEM (%)
Carne bovina	21	56,76%
Carne bubalina	11	29,73%
Mescla	05	13,51%

De maneira geral, pode-se dizer que há preferência pela carne bovina em detrimento da bubalina. Para Marques et al. (2016), a carne de búfalo é bastante apreciada em alguns lugares do mundo como Egito, União Europeia e Vietnã, enquanto que no Brasil, em especial a região Norte do país, há baixa preferência pela carne bubalina, tornando-a de baixo valor comercial, sendo cerca de 20% mais barata. Este fator pode estar associado à cadeia produtiva bubalina fragilizada na região Norte, acentuada pela carência de regulamentação específica para o abate destes animais, que geralmente são realizados de forma clandestina ou em matadouros que não cumprem com a legislação sanitária. No estado do Amapá, a baixa fiscalização dos açougues e mercados autônomos leva à facilidade em obter produtos sem a verificação de sua procedência, contribuindo assim, para ações fraudulentas. No entanto, Lira et al. (2005) e Giordano et al. (2010) ressaltam que as qualidades que a carne bubalina apresenta, como baixos teores de gordura total e entremeada, composição de ácidos graxos com menor aterogenicidade e trombogenicidade, e elevados teores de ômega3/ômega-6. Nesse contexto, verifica-se que o problema da adulteração decorre tanto da falta de estrutura sanitária associada à certificação de origem, representando um risco para o consumo, bem como da falta de ações educativas e de publicidade para incentivo ao consumo da carne bubalina.

Na Figura 6 e 7 é possível verificar o resultado da digestão enzimática, em (A) a digestão foi feita com enzima *TaqI*, que cliva o produto de PCR em dois fragmentos DNA para produtos cárneos de origem bubalina, conforme amostras 13 e 10 e não o cliva o produto de PCR para carnes bovinas, conforme amostras 08 e 09. Em (B) foi usada a enzima *HinfI*, que cliva o produto de PCR de carne bovina em dois fragmentos conforme se observa nas amostras 08 e 09 e não cliva o produto de PCR derivado da carne bubalina conforme se observa em 13 e 10, conforme já descrito por Verkaar et al. (2002). Observa-se que os produtos de PCR das amostras 03 e 29 apresentam fragmentos correspondentes à digestão tanto pela enzima *TaqI* (A) quanto da enzima *HinfI* (B), demonstrando que se trata de amostra que apresenta carne bovina junto com bubalina. De forma bastante interessante, pode-se comparar a intensidade das bandas digeridas/não digeridas e concluir que a amostra 3 tem uma quantidade maior de carne bovina, enquanto que a amostra 29 tem uma quantidade maior de carne bubalina, uma vez que a banda mais forte não digerida para a amostra 3 encontra-se na reação de digestão de DNA para enzima de digestão de bubalino (A) e na amostra 29 a banda mais forte aparece em B, ou seja, quando se usa enzima de restrição que digere produto de PCR de DNA bovino.

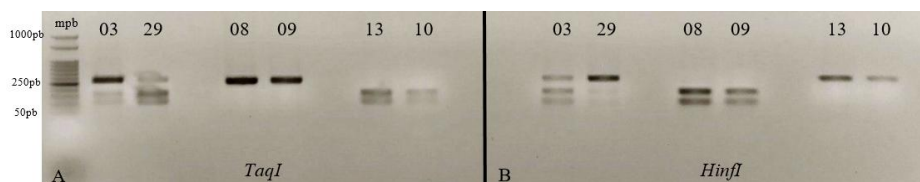


Figura 6 - Digestão enzimática – PCR-RFLP através das enzimas de restrição *TaqI*, visualização em gel de agarose a 3%.

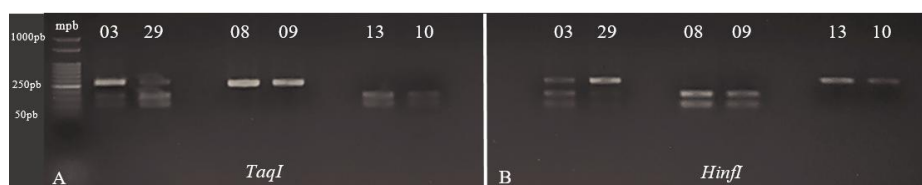


Figura 7 - Digestão enzimática – PCR-RFLP através das enzimas de restrição *HinfI*, visualização em gel de agarose a 3%.

Vários pesquisadores, de diferentes lugares, nos últimos anos vêm trabalhando em linhas de pesquisas ligadas a identificação de diversas fraudes que envolvam produtos alimentares, sendo um deles a carne. Tal assunto abrange

e envolve o comércio e consumo de diversas espécies de animais, como aves (ZHANG, 2013; MATSUNAGA et al.1999), suínos (GHOVVATI et al.2009; MATSUNAGA et al.1999), ruminantes (GHOVVATI et al. 2009; LUO et al.2008), peixes (COCOLIN et al. 2000; HSIEH, 2010) entre outros (KITPIPIIT et al., 2014; ALI et al.2012), onde as fraudes geralmente ocorrem por meio da adição ou substituição da carne anunciada por outro tipo, geralmente com produto de qualidade inferior. O reconhecimento e a diferenciação de carnes de diversas espécies objetivam principalmente coibir ou ainda limitar as possíveis fraudes e mesclas de produtos cárneos. Assim, a utilização de metodologias específicas para a detecção dos produtos de origem animal nos alimentos, como também, a identificação da espécie originária, se mostram altamente relevantes. (CORONA et al., 2007; KESMEN et al., 2009; LOPPARELLI et al., 2007; Dantas et al., 2019; ZHANG et al., 2007).

São diversas as técnicas utilizadas para a identificação de carnes de diferentes espécies animais, como a microscopia óptica clássica, os imunoenaios (ELISA e ORBIT) e a cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). Porém, algumas dessas técnicas não são aplicáveis na identificação de espécies filogeneticamente próximas, como é o caso do búfalo e o boi. Essas técnicas nem sempre permitem uma visualização e identificação satisfatórias dos seus resultados, e variáveis como o aquecimento da carne também dificultam a sua utilização, principalmente dos imunoenaios, pois as altas temperaturas podem danificar os epítomos, impossibilitando a ligação antígeno-anticorpo (HERMAN, 2001; BELLIS et al., 2003; LOPEZ-ANDREO et al., 2005; MAYER, 2005).

Estudos também têm demonstrado a eficiência das técnicas de PCR para detectar a adulteração de produtos de carnes, seja eles envolvendo bovídeos ou não. A técnica de PCR multiplex (mPCR), que usa uma única reação de PCR para amplificar simultaneamente produtos de diferentes origens, tem sido proposta para a detecção de espécies de bovinos e bubalinos em produtos cárneos propriamente ditos (Oliveira et al., 2015; Oliveira et al., 2018; Xu et al., 2018; Dantas et al., 2019). No estudo semelhante realizado poucos meses antes do presente estudo, Dantas et al. (2019) detectaram 6 amostras de carnes adulteradas de um total de 14 amostras de carnes em Macapá, ou seja, um total de 42,8% de adulteração. Este valor, apesar do tamanho amostral 50% menor, é compatível com os 43,24% que se encontrou no presente

estudo. No entanto, os autores não detectaram mescla de carne, que no presente estudo foi de 13,51% do total de amostras, ou seja, 31,24% das amostras positivas para carne bubalina.

A diferença pode ter se dado devido ao fato de que a metodologia molecular proposta por Dantas et al. (2019) utiliza o método de PCR multiplex, em que os iniciadores para ambas as espécies são adicionados na mesma reação de detecção. No método multiplex, existe a possibilidade dos primers de amplificação de DNA bubalino se sobressaírem em uma concorrência com os primers de amplificação de DNA bovino, de forma que na presença das duas carnes se encontre somente um dos produtos. Assim, o método que o presente estudo usa (PCR-RFLP) se mostra mais preciso para a avaliação correta da real situação de contaminação, uma vez que é usado apenas um par de primers, e como se pode observar na Figura 6 e 7 mostra a presença dos dois tipos de carne, descartando a possibilidade de concorrência por substrato derivada de maior afinidade de primers. Apesar de se poder usar o mPCR com detecção em tempo real por sonda, como fez Amaral et al. (2017) e Oliveira et al. (2018) em seus estudos, essa metodologia encarece bastante a avaliação proposta, uma vez que usa sonda fluorescente e exige equipamento nem sempre facilmente disponível. Considerando-se uma eventual possibilidade de comercialização regulamentada tanto de carne bovina quanto bubalina pelo mesmo açougue, o método aqui proposto tem o potencial de diferenciar a contaminação proposital de carne bovina com bubalina de eventuais falhas na higienização do moedor de carne previamente usado para carne bubalina e em seguida para a bovina, gerando um resultado confiável e com um custo bastante reduzido por amostra.

Para a confirmação da identidade das espécies das amostras realizadas neste estudo foi realizado o sequenciamento genético utilizando o método Sanger. As sequências resultantes foram comparadas com aquelas depositadas no GenBank usando a ferramenta de pesquisa de alinhamento local básica (BLAST) do banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI). Os números de acesso do GenBank para *Bos taurus* e *Bubalus bubalis* para as sequências utilizadas nas análises são anotadas na Figura 8.

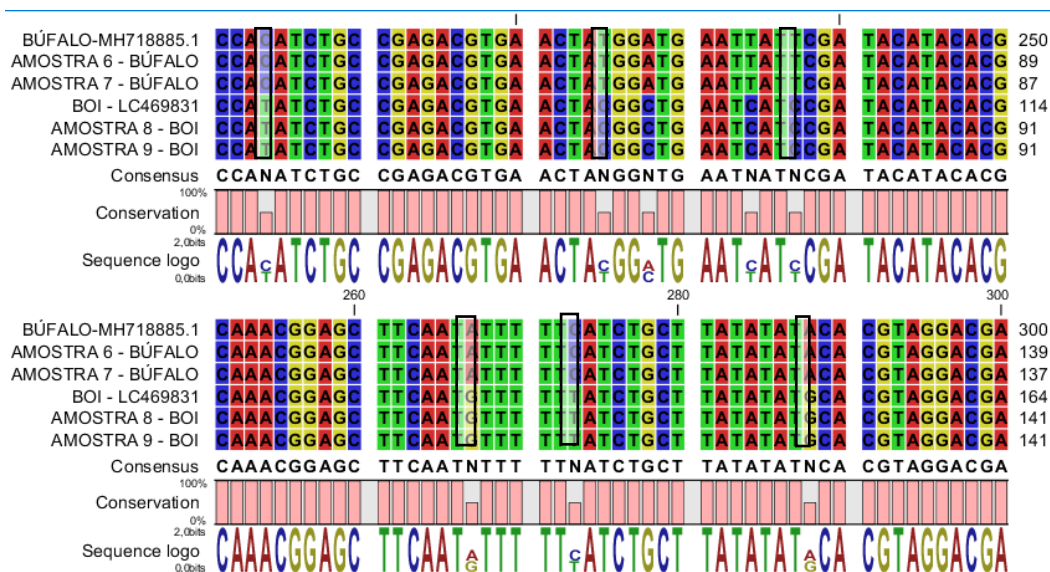


Figura 8 - O alinhamento de seqüência de primers específicos de carne bovina e carne de búfalo. O número de acesso de *Bos taurus* foi LC469831 e *Bubalus bubalis* foi MH718885.1.

O tamanho dos alvos sequenciados de boi possui o comprimento curto de 233pb na região DNA mitocondrial e de búfalo possui 224pb, uma vez que as seqüências de ácido nucleico de comprimento curto são extraordinariamente estáveis sob condições adversas e os genes mitocondriais estão presentes em múltiplas cópias. Dessa forma, obteve-se 99% de compatibilidade com os dados do GenBank. De acordo com Ballin et al. (2009), a técnica de sequenciamento genético é a forma mais direta e adequada de analisar amplicons de PCR e é frequentemente utilizada como uma análise confirmativa após resultados obtidos por eletroforese em gel e/ou outras técnicas de biologia molecular como o PCR-RFLP.

A técnica de PCR-RFLP também foi usada para identificar a presença de DNA oriundos de suínos ou bovinos em alimentos ou gêneros alimentícios, assim como para identificar várias espécies numa mesma amostra (VERKAAR et al., 2002; AIDA et al., 2005; MURUGIAH et al., 2009; MUTALIB et al., 2012; ERWANTO et al., 2011; ERWANTO et al., 2012). Doosti et al. (2014) avaliaram o uso da técnica de PCR-RFLP, utilizando o gene mitocondrial citocromo b para diferenciar carne bovina, ovina, carne de porco, frango, burro e carne de cavalo em produtos à base de carne, bem como no estudo de Girish et al. (2007) que identificou e diferenciou carnes de aves, como: frango, pato, codorna, galinha d'angola e peru. A técnica foi usada com sucesso também para detecção mesmo em produtos processados ou autoclavados (Mane et al.

2009) utilizando a técnica de PCR-RFLP, ressaltando assim, que a técnica PCR-RFLP é potencial para identificar e diferenciar a origem da carne, uma vez que possui alta eficácia porque é muito sensível e exige quantidades mínimas de DNA para ser realizado. A detecção utilizando iniciadores específicos para cada espécie é o que garante a alta eficiência do teste (EGITO et al., 2006).

CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que a técnica de PCR-RFLP é bastante eficaz na identificação de carnes de origem bovina e bubalina devido a sua alta especificidade, detectando com sucesso também os casos de mescla de carne, de forma rápida e barata, mostrando-se como uma opção no monitoramento sanitário da origem dos produtos. Além disso, chama a atenção a quantidade de fraudes em produtos cárneos comercializados na região metropolitana de Macapá, e sugere-se que sejam criadas medidas de vigilância mais eficazes na comercialização de carnes nos frigoríficos. Propõe-se o uso da metodologia também com novos alvos, de forma que a confiabilidade dos resultados seja ainda maior do que com um único alvo como atualmente utilizado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHÃO, R. M. C. D. M.; NOGUEIRA, P. A. & MALUCELLI, M. I. C. O comércio clandestino de carne e leite no Brasil e o risco da transmissão da tuberculose bovina e de outras doenças ao homem: um problema de saúde pública. *Archives of Veterinary Science*, 10(2). 2005.
- AIDA, A. A. et al. Analysis of raw meats and fats of pigs using polymerase chain reaction for Halal authentication. **Meat science**, v. 69, n. 1, p. 47-52, 2005.
- ALI, M. E. et al. 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
- ALI, M. E. et al. Multiplex PCR assay for the detection of five meat species forbidden in Islamic foods. *Food Chemistry*, 177, 214–224. 2015 doi:10.1016/j.foodchem.2014.12.098
- AMARAL, J. S. et al. Quantitative detection of pork meat by evagreen real-time PCR to assess the authenticity of processed meat products. *Food Control*, 72, 53–61. 2017 doi:10.1016/j.foodcont.2016.07.029
- BARAZZONI, R., SHORT, K. R., & NAIR, K. S. Effects of aging on mitochondrial DNA copy number and cytochrome oxidase gene expression in rat skeletal muscle, liver, and heart. *J. Biol. Chem.*, 275(5), 3343-7. 2000 doi:10.1074/jbc.275.5.3343
- BELLIS, C. *et al.* A molecular genetic approach for forensic animal species identification. *Forensic Sci. Int.* v.134, p.99-103, 2003
- COCOLIN, L. et al. Rapid PCR-RFLP method for the identification of marine fish fillets (seabass, seabream, umbrine, and dentex). **Journal of Food Science**, v. 65, n. 8, p. 1315-1317, 2000.
- CORONA, B. *et al.* Short communication. PCR detection of DNA of bovine, ovine-caprine and porcine origin in feed as part of a bovine spongiform encephalopathy control program. *Spanish J. Agric. Res.* v.5, p.312-317, 2007.
- DAGUER, H.; STEPHAN, M. P. & BERSOT, L. dos S. Perfil eletroforético de lombo suíno adicionado de proteínas não cárneas. *Ciência Rural*, 40(2), 404–410. 2010 doi:10.1590/s0103-84782010005000011
- DANTAS, V. V. et al. Application of a multiplex polymerase chain reaction (mPCR) assay to detect fraud by substitution of bovine meat cuts with water buffalo meat in Northern Brazil. *CyTA - Journal of Food*, 17(1), 790–795. 2019 doi:10.1080/19476337.2019.1650832

DOOSTI, A.; DEHKORDI, P. G.; RAHIMI, E.. Molecular assay to fraud identification of meat products. **Journal of food science and technology**, v. 51, n. 1, p. 148-152, 2014.

EGITO, A. S. et al. Método eletroforético rápido para detecção da adulteração do leite caprino com leite bovino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 5, p. 932-939, 2006.

ERWANTO, Y. et al. PCR-RFLP using BseDI enzyme for pork authentication in sausage and nugget products. **Media Peternakan**, v. 34, n. 1, p. 14, 2011.

ERWANTO, Y. et al. Identifikasi Daging Babi Menggunakan Metode PCR-RFLP Gen Cytochrome b dan PCR Primer Spesifik Gen Amelogenin. **Agritech**, v. 32, n. 4, 2012.

FIGUEIRO, M. R.; SARAIVA, N. Z. Principais estratégias de manejo sanitário na bubalinocultura. Belém, PA. Embrapa Amazônia Oriental - Documentos (INFOTECA-E), 2018.

GHOVVATI, S. et al. 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].

GIORDANO, G. et al. Beneficial impact on cardiovascular risk profile of water buffalo meat consumption. *European Journal of Clinical Nutrition*, v. 64, n.1, p.1000-1006, 2010.

GIRISH, P. S. et al. Polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism of mitochondrial 12S rRNA gene: a simple method for identification of poultry meat species. **Veterinary research communications**, v. 31, n. 4, p. 447-455, 2007.

GOOGLE EARTH PRO. **Google Earth Pro 7.3. 2021. Região Metropolitana de Macapá, AP. Coordenadas 22N. E: 492612.45523273. Data de Visualização: 03/06/2021. Data da Imagem: 07/06/2021. 2021.**

HERMAN, L. Indetermination of the animal origin of raw food by species-specific PCR. *J. Dairy Res.* v.68, p.429-439, 2001.

HOSSAIN, M. A. M. et al. Targeting double genes in multiplex PCR for discriminating bovine, buffalo and porcine materials in food chain. *Food Control*, 73, 175–184. 2017 doi:10.1016/j.foodcont.2016.08.008

HSIEH, Cheng-Hong et al. Puffer fish-based commercial fraud identification in a segment of cytochrome b region by PCR–RFLP analysis. **Food chemistry**, v. 121, n. 4, p. 1305-1311, 2010.

IBGE, Produção da Pecuária Municipal 2018; Rio de Janeiro: IBGE, 2019. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pesquisa/18/0?indicador=16535&localidade1=0>.

JOELE, M. R. S. P. et al. Meat quality of buffaloes finished in traditional or silvopastoral system in the Brazilian Eastern Amazon. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(6), 1740–1745. 2017 doi:10.1002/jsfa.7922.

KESMEN, Z. et al. Identification of meat species by TaqMan based real-time PCR assay. *Meat sci.* v.82, p.444-449, 2009.

KITPIPIT, T.; SITTICHAN, K.; THANAKIATKRAI, P. Multiplex PCR assay for meat species identification in food products. *Food Chem.* 2014. (163):77-82. [DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.04.062].

KYROVA, V. et al. Sea fish fraud? a confirmation of gadoid species food labelling. *British Food Journal*, 119(1), 122–130. 2017 doi:10.1108/BFJ-03-2016-0113

LIRA, G. M. et al. Composição centesimal, valor calórico, teor de colesterol e perfil de ácidos graxos da carne de búfalo (*Bubalisbubalis*) da cidade de São Luiz do Quitunde-AL. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v.64, n.1, p.31-8, 2005.

LOPEZ-ANDREO, M.; LUGO, L.; GARRIDO-PERTIERRA, A. Identification and quantification of species in complex DNA mixtures by real-time polymerase chain reaction. *Analytical Biochem.* v.339, p.73-82, 2005.

LOPPARELLI, R. M. et al. Real-time TaqMan polymerase chain reaction detection and quantification of cow DNA in pure water buffalo Mozzarella cheese: method validation and its application on commercial samples. *J. Agric. Food Chem.* v.55, p.3429-3434, 2007.

LUO, J. Q. et al. 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].

MANE, B. G.; MENDIRATTA, S. K. & TIWARI, A. K. Beef specific polymerase chain reaction assay for authentication of meat and meat products. *Food Control*, 28(2), 246–249. 2012 doi:10.1016/j.foodcont.2012.05.031

MANE, B. G.; MENDIRATTA, S. K.; TIWARI, A. K. 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].

MARQUES, C. S. S. et al. Profile of consumers of buffalo meat in Belem, Para State, Brazil. *Acta Veterinaria Brasilica*, 9(2), 126–133. 2015

MARQUES, C. S. S.; et al. Segmentation of the buffalo meat consumer market in Belém, Pará, Brazil. *Revista Brasileira De Zootecnia*, 45(6), 336–344. 2016 doi:10.1590/S1806- 92902016000600008

MATSUNAGA, T. 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].

MAYER, H. K. Milk species identification in cheese varieties using electrophoretic chromatographic and PCR techniques. *Int. Dairy J.* v.15, p.595-604, 2005.

MURUGAIAH, C. et al. Meat species identification and Halal authentication analysis using mitochondrial DNA. **Meat science**, v. 83, n. 1, p. 57-61, 2009.

MUTALIB, S. A. et al. Comparison between pork and wild boar meat (*Sus scrofa*) by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). **Sains Malaysiana**, v. 41, n. 2, p. 199-204, 2012.

OLIVEIRA, A. C. D. S. D. et al. Brazilian ground beef authentication by multiplex polymerase chain reaction. *Ciência Rural*, 48(2), 1–7. 2018 doi:10.1590/0103-8478cr20160574

OLIVEIRA, A. C. D. S. D. et al. Evaluation of a multiplex PCR for detection of a fraud in the minced beef meat by adding buffalo meat. *Revista Do Instituto Adolfo Lutz*, 74(4), 371–379. 2015

OMOTOSHO, O. O. et al. Pork Processing in Southwestern Nigeria: Peculiarities, Animal Welfare Concerns and Public Health Implications. *African Journal of Infectious Diseases*, 10(2), 146–155. 2016 doi:10.21010/ajid.v10i2.11

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2.ed. Cold Spring Harbor, 1989.

TANABE, S. et al. PCR Method of Detecting Pork in Foods for Verifying Allergen Labeling and for Identifying Hidden Pork Ingredients in Processed Foods. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71(7), 1663–1667. 2007 doi:10.1271/bbb.7007

TEIXEIRA, L. V.; TEIXEIRA, C. S.; OLIVEIRA, D. A. A. 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].

VERKAAR, E. L. C. et al. Differentiation of cattle species in beef by PCR-RFLP of mitochondrial and satellite DNA. *Meat Sci.* v.60, p.365-369, 2002.

XU, R. et al. Multiplex TaqMan locked nucleic acid real-time PCR for the differential identification of various meat and meat products. *Meat Science*, 137(October 2017), 41–46. 2018. doi:10.1016/j.meatsci.2017.11.003

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].

ZHANG, C. L. *et al.* A taqMan real-time PCR system for the identification and quantification of bovine DNA in meats, milks and cheeses. *Food control*. v.18, p.1149-1158, 2007.

ZHU, S. R. *et al.* (2013). Identification of *Channa* species using the partial cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene as a DNA barcoding marker. *Biochemical Systematics and Ecology*, 51, 117-22. doi:10.1016/j.bse.2013.08.01.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Existem diversos estudos e relatos acerca de casos de fraude alimentar por substituição de espécies em alimentos. As consequências desse tipo de fraude são gravíssimas, com impactos negativos em diversos níveis, seja ele para governos, produtores, meio ambiente e consumidores.

No presente trabalho foi aplicado a técnica de PCR-RFLP, um método eficiente e rápido com baixo custo econômico, para uma rotina de detecção de espécies que detectou com sucesso a mescla de carnes bovina pela bubalina. Esse achado indica, portanto, que há uma demanda e uma urgência do aprimoramento dos serviços estatais de fiscalização, especialmente na rede de distribuição de produtos cárneos, e a necessidade do direcionamento de políticas públicas de controle da autenticidade de produtos de origem animal e saúde pública.

O artigo científico com o título “Adulteração na comercialização de carne moída bovina pela bubalina: um problema sanitário” foi submetido a revista de Saúde Pública, que possui Qualis A2 para a área de Ciências Ambientais.

ANEXOS

Revista de Saúde Pública

RSP Revista de
Saúde Pública

Adulteração na comercialização de carne moída bovina pela bubalina: um problema sanitário

Journal:	<i>Revista de Saúde Pública</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Keyword - Go to DeCS to find your keywords.:	Segurança Alimentar e Nutricional, Contaminação de Alimentos, Saúde Pública

SCHOLARONE™
Manuscripts