

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO SEGURO PELA TÉCNICA DE PCR EM
TEMPO REAL PARA DETECÇÃO DE DEZ ESPÉCIES ANIMAIS EM PRODUTOS
CÁRNEOS**

LISSANDRA SOUSA DALSECCO

BELO HORIZONTE

2018

LISSANDRA SOUSA DALSECCO

**DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO SEGURO PELA TÉCNICA DE PCR EM
TEMPO REAL PARA DETECÇÃO DE DEZ ESPÉCIES ANIMAIS EM PRODUTOS
CÁRNEOS**

Tese apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Zootecnia.

Área de Concentração: Genética e Melhoramento Animal.

Orientadora: Prof.^a Denise Aparecida Andrade de Oliveira.

Coorientadoras: Dr.^a Marcela Gonçalves Drummond
Prof.^a Lilian Viana Teixeira.

BELO HORIZONTE

2018

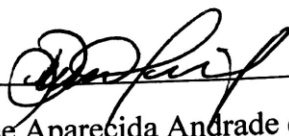
D151d Dalsecco, Lissandra Sousa, 1988-
Desenvolvimento de um método seguro pela técnica de PCR em tempo real para
detecção de dez espécies animais em produtos cárneos / Lissandra Sousa Dalsecco. –
2018.
58 p. : il.

Orientadora: Denise Aparecida Andrade de Oliveira
Coorientadoras: Marcela Gonçalves Drummond, Lilian Viana Teixeira
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

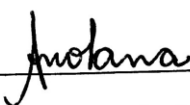
1. Alimentos de origem animal – Adulteração e inspeção – Teses. 2. Alimentos de
origem animal – Análise – Teses. 3. Carne – Inspeção – Teses. 4. Reação em cadeia de
polimerase – Teses. 5. Rotulagem – Inspeção – Teses. I. Oliveira, Denise Aparecida
Andrade de. II. Drummond, Marcela Gonçalves. III. Teixeira, Lilian Viana.
IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. V. Título.

CDD – 664.07

TESE defendida e aprovada em 04 de dezembro de 2017 pela Comissão Examinadora
composta pelos seguintes membros:



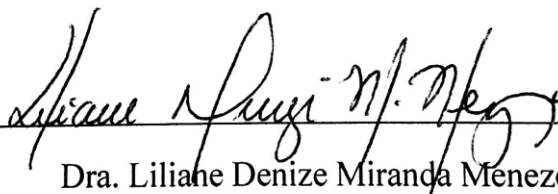
Prof.^a Denise Aparecida Andrade de Oliveira



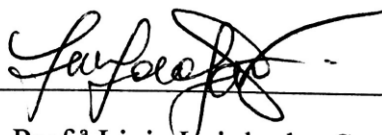
Prof.^a Ângela Maria Quintão Lana



Prof. Marcelo Resende de Souza



Dra. Liliahe Denize Miranda Menezes



Prof.^a Livia Loiola dos Santos

“... science and everyday life cannot and should not be separated.”

Rosalind Franklin, 1940.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram diretamente na construção deste trabalho e a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para meu crescimento intelectual, profissional e pessoal durante esses anos:

À minha mãe Letícia e avó Irma, meu infinito agradecimento pelo apoio e amor, por acreditarem no meu potencial e principalmente pelos exemplos de mulheres fortes e independentes que sempre me inspiraram.

À Professora Denise de Oliveira, pela orientação, pela confiança em mim depositada, pela oportunidade que me foi dada de estar no LGEV desde à época do estágio, mestrado e doutorado e pela referência profissional e pessoal para meu crescimento.

À Dra. Marcela Drummond, pela orientação, dedicação, colaboração na idealização e execução do trabalho e pelos ensinamentos teóricos e práticos que permanecerão por toda vida.

À Professora Lilian Teixeira, pela orientação, pelos ensinamentos e principalmente pelos incentivos e oportunidades dadas desde à época da graduação.

À Professora Ângela Lana, ao Professor Marcelo Resende e à Dra. Liliane Menezes pela disposição em compor a banca examinadora de qualificação e de defesa de tese e pelos conhecimentos e sugestões que foram essenciais para enriquecer este trabalho.

À Professora Lívia dos Santos, pela disposição em compor a banca de defesa de tese e, claro, pelo apoio e amizade nesses anos de doutorado.

À toda equipe do LGEV, pela amizade, convívio e ensinamentos. E em especial à Dra. Cláudia, por se disponibilizar a ser suplente da banca de defesa.

Ao pessoal da Myleus, em especial à Pollyana e ao Rafael, pela ajuda na idealização e execução do trabalho, vocês foram essenciais para a realização dele!

A todos os professores, funcionários e colegas da Escola de Veterinária da UFMG pela companhia, atenção e profissionalismo. Vocês fizeram parte desta que foi a minha segunda casa por quase doze anos!

Às Professoras Natália Ocarino e Aurora Gouveia pela contribuição na aquisição de amostras essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao INCT de Informação Genético Sanitária da Pecuária Brasileira (INCT-Pecuária), financiado pelo CNPq (INCT 573899/2008-8) e FAPEMIG (INCT APQ-0084/08), pelos recursos fornecidos ao trabalho. Agradeço à CAPES pela bolsa de doutorado (Programa de Demanda Social).

Ao Gustavo, pelo companheirismo, paciência, compreensão, apoio, amor e por estar sempre comigo nessa e em outras caminhadas.

À Marina, minha irmã de coração, e aos grandes amigos, Mariana e Rodrigo, pelo carinho e pela honra de tê-los presentes na minha vida.

E por fim, agradeço à Belinha, Pandora, Lupito e aos gatinhos, por me lembrarem todos os dias o porquê de ter escolhido a Medicina Veterinária como formação e a me inspirarem a ser uma pessoa melhor.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
<i>ABSTRACT</i>	12
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1. Fraude alimentar	15
2.1.1. Fraude por substituição de espécies	16
2.1.2. Legislação de alimentos	18
2.1.3. Implicações da substituição de espécies	20
2.2. Testes de detecção de espécies em alimentos	21
2.2.1. Testes de DNA	22
2.2.2. PCR em Tempo Real	24
3. ARTIGO: A fast and reliable Real-time PCR method for the detection of ten animal species in meat products	26
Abstract / KeyWords / Practical application	27
3.1. Introduction	28
3.2. Materials and methods	30
3.2.1. Sample collection	30
3.2.2. DNA isolation	31
3.2.3. Primer design	31
3.2.4. Species identity confirmation by Sanger sequencing	34
3.2.5. Real-time PCR	34
3.2.6. Method sensitivity and specificity	35
3.2.7. Test application on reference meat mixtures and commercial samples	35
3.3 Results and discussion	36
3.3.1 Method sensitivity	39
3.3.2 Reference mixtures	40
3.3.3 Commercial samples	44
3.4 Conclusion	46
Acknowledgments / Disclosure statement / Funding source	47
Supplementary material	48

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	51
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

LISTA DE TABELAS

Table 1	Primers used in the study	33
Table 2	Data from efficiency experiments of species-specific real-time PCR assays	40
Table 3	Composition of reference meat mixtures and species detected by real-time PCR method performed in LGEV and MYLEUS laboratories	41
Table 4	Application of the method on commercial meat products	45

LISTA DE FIGURAS

- | | | |
|-------------------|---|-----------|
| Figure 1 | Melting profiles from species-specific (solid lines) and IPC (dashed lines) real-time PCR assays for each species. The charts show the negative derivative of the fluorescence (F) over temperature (T , $-dF/dT$) against the Temperature. The melting temperature values are average \pm standard deviation for 2-3 independent experiments. | 37 |
| Figure 2 | Melting profiles from species-specific real-time PCR assays of reference meat mixtures n° 22, 31, 37 and 42. The charts show the negative derivative of the fluorescence (F) over temperature (T , $-dF/dT$) against the Temperature. Solid lines indicate melting profiles from positive reactions of target species (proportions are indicated as w/w). Dashed lines indicate melting profiles from positive control amplification for each species. | 43 |
| Figure A.1 | Evolutionary relationships of taxa. The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method. The optimal tree with the sum of branch length = 1.25278201 is shown. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (3000 replicates) are shown next to the branches. The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. The evolutionary distances were computed using the Maximum Composite Likelihood method and are in the units of the number of base substitutions per site. All positions containing gaps and missing data were eliminated. There was a total of 228 positions in the final dataset. | 48 |
| Figure A.2 | Standard curves for <i>Bos taurus</i> , <i>Sus scrofa</i> , <i>Equus caballus</i> , <i>Bubalus bubalis</i> , <i>Gallus gallus</i> , <i>Capra hircus</i> , <i>Ovis aries</i> , <i>Meleagris gallopavo</i> , <i>Felis catus</i> and <i>Canis familiaris</i> . The curves were obtained by dilutions (1:5 factor) of pure DNA from each species and amplified with specific primers (Target). The 7500 Software plotted the curve (DNA quantities against the Ct) and calculated the Slope, Y-intercept (Y-Inter), determination coefficient (R^2) and the amplification efficiency (Eff%) for each species. | 49 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Art. - artigo

bp - *base pairs*

BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*

cm³ - centímetros cúbicos

dNTP - desoxirribonucleotídeos fosfatados

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

g - grama

°C - grau Celsius

µg - micrograma

µL - microlitro

mg - miligrama

mL - mililitro

mM – milimolar

min - minuto

M - molar

ng – nanograma

nm - nanômetro

nM - nanomolar

nº - número

pb - pares de bases

pg – picograma

R² - coeficiente de determinação

SDS - dodecil sulfato de sódio

s - segundo

™ - *trademark*

U - unidade

w/w - peso/peso

RESUMO

A identificação de espécies em alimentos é assunto de grande interesse para toda a cadeia de produção, para a fiscalização e nos meios acadêmicos. As fraudes pela adição ou substituição de espécies infringem as legislações vigentes no Brasil e podem trazer graves consequências, incluindo perdas econômicas e riscos à saúde pública. Diversas técnicas estão disponíveis para a identificação da origem dos alimentos. Dentre essas, os métodos baseados na análise de DNA provaram ser práticos, confiáveis, específicos e extremamente sensíveis para a detecção de fraude. O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de teste de detecção de DNA das espécies *Bos taurus*, *Sus scrofa*, *Ovis aries*, *Capra hircus*, *Gallus gallus*, *Meleagris gallopavo*, *Bubalus bubalis*, *Equus caballus*, *Felis catus* e *Canis familiaris* em produtos cárneos. O método baseia-se na técnica de PCR em Tempo Real e combina o uso de iniciadores universais (utilizados como controle interno) e iniciadores específicos para a detecção do DNA alvo. Após cada reação de PCR, os produtos são submetidos à curva de dissociação, para confirmar se o DNA amplificado corresponde ao fragmento esperado de cada espécie. A precisão do método foi avaliada em 45 misturas experimentais de carnes nas proporções de 50-50% ou 99-1% e em uma mistura com 10% de cada espécie do teste. O método detectou corretamente as espécies em cada mistura, inclusive aquelas presentes em 1% do total. Em seguida, o método foi aplicado na análise de 14 produtos comerciais e os resultados revelaram que seis desses continham material bovino e/ou de frango, não declarado no rótulo. Os testes das misturas experimentais e dos produtos comerciais foram realizados nos dois laboratórios participantes (LGEV e Myleus), obtendo-se 100% de reprodutibilidade. O teste desenvolvido provou ser eficaz e confiável para uma rotina de detecção de espécies em produtos cárneos.

Palavras-chave: Produtos cárneos; substituição de espécies; rotulagem inadequada; PCR em Tempo Real.

ABSTRACT

*Species identification in food is a subject of significant interest for the entire production chain, for government inspection and in academic circles. Fraud by addition or substitution of species is against the law in Brazil and can lead to serious consequences, including economic losses and public health risks. Several methods are available for identifying the origin of food and, among these, the DNA techniques have proven to be practical, reliable, specific and highly sensitive for fraud detection. The present work is aimed at the development of a test to detect DNA from *Bos taurus*, *Sus scrofa*, *Ovis aries*, *Capra hircus*, *Gallus gallus*, *Meleagris gallopavo*, *Bubalus bubalis*, *Equus caballus*, *Felis catus* and *Canis familiaris* in meat products. The method is based on real-time PCR and combines the use of universal primers (for internal positive control) and species-specific primers for the detection of target DNA. After each reaction, the PCR products are subject to melt curve analysis to check if the amplified DNA corresponds to the expected fragment of each species. Method precision was evaluated on 45 experimental meat mixtures in proportions of 50-50% or 99-1% plus one mixture with 10% of each species. The test correctly detected the species in each mixture, including those present in 1% of the total content. The method was then applied to the analysis of 14 commercial meat products and the results revealed that six of these had non-declared bovine and/or chicken material. The experimental mixtures and commercial products analyses were carried out in the two participating laboratories (LGEV and Myleus), obtaining 100% reproducibility. The developed test proved to be effective and reliable for a routine of species detection in meat products.*

Keywords: *Meat products; species substitution; mislabeling; real-time PCR.*

1. INTRODUÇÃO

A substituição de espécies em alimentos é um tipo comum de fraude alimentar impulsionada por ganhos econômicos, quando uma espécie de menor valor comercial ou mais disponível substitui outra mais cara, desejável ou com oferta limitada. Além do prejuízo financeiro, as fraudes podem colocar em risco a saúde dos consumidores por meio da ingestão de ingredientes alergênicos (Clark, 2015). A fraude alimentar, incluindo a substituição de espécies, é assunto de grande importância para a indústria alimentícia e para órgãos fiscalizadores, uma vez considerada a natureza global e complexa da cadeia de produção de alimentos (Patel, 2013). Além disso, os consumidores modernos estão cada vez mais conscientes de sua saúde e estão exigindo informações mais completas sobre a origem, composição e segurança dos alimentos que consomem (Cawthorn et al., 2013; Sentandreu e Sentandreu, 2014).

Atualmente, grande atenção vem sendo dada para a rotulagem de alimentos, especialmente os processados, nos quais a identificação dos ingredientes é mais difícil devido a mudanças na aparência, textura e sabor e, com isso, a origem dos constituintes pode ser facilmente mascarada (Bottero e Dalmaso, 2011; Cawthorn et al., 2013). Dessa forma, a disponibilização de metodologias rápidas e confiáveis para a detecção de fraudes em alimentos é de suma importância para a proteção de consumidores e produtores, assegurando a competitividade e a qualidade dos produtos.

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de teste de detecção do material genético (DNA) de dez espécies animais: bovina (*Bos taurus* / *Bos indicus*), suína (*Sus scrofa*), bubalina (*Bubalus bubalis*), caprina (*Capra hircus*), ovina (*Ovis aries*), frango (*Gallus gallus*), peru (*Meleagris gallopavo*), equina (*Equus caballus*), canina (*Canis lupus*) e felina (*Felis catus*). Para tanto, o método desenvolvido utiliza iniciadores universais e iniciadores específicos para a amplificação do DNA alvo de cada espécie, com base na técnica de PCR em Tempo Real. O método pode ser aplicado para análises de produtos de origem animal *in natura* (carne e leite) e produtos processados (derivados cárneos e lácteos).

O método desenvolvido para a análise da composição (com relação às espécies supracitadas) de carnes e produtos cárneos é objeto de Pedido de Patente de Invenção, depositado junto ao INPI (Instituto Nacional de Propriedade Intelectual - www.inpi.gov.br) com o título **Método e Kit para Detecção de Espécies em Produtos de Origem Animal** (Nº do processo: **BR 10**

2016 017282 9; data de depósito: 26/07/2016), de co-titularidade entre a UFMG, Myleus e FAPEMIG.

O desenvolvimento do método, bem como o seu emprego na análise de produtos cárneos comerciais para a verificação de autenticidade, é também assunto do artigo de pesquisa intitulado *A Fast and Reliable Real-Time PCR Method for Detection of Ten Animal Species in Meat Products*. O artigo foi publicado revista científica *Journal of Food Science*, v. **83**, n. **2**, p. **258-265**, 2018 (DOI: 10.1111/1750-3841.14001).

Com a disponibilização do método proposto, testes robustos e confiáveis poderão ser utilizados para a detecção de fraude alimentar e a certificação de matérias-primas ou produtos originados de uma grande variedade de espécies animais, incluindo as principais utilizadas na alimentação humana e as possivelmente utilizáveis em fraudes por troca ou adição de componentes. Dessa forma, a metodologia será de grande valia tanto para entidades certificadoras como para órgãos fiscalizadores que pretendem verificar a origem dos produtos de origem animal produzidos no país, assegurando a sua confiabilidade no Brasil e em países desejáveis para exportação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fraude alimentar

Fraude alimentar é um conceito amplo que engloba as substituições, adições, adulterações e falsificações de alimentos, ingredientes ou embalagens alimentares e ainda as declarações falsas ou enganosas feitas sobre um produto alimentício (Spink e Moyer, 2011). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), especialmente nos países em desenvolvimento, os consumidores são frequentemente expostos à fraude alimentar, incluindo a adulteração de leite e produtos lácteos, carne, peixes, mel, especiarias, óleos, entre outros (Patel, 2013; *World Health Organization*, 2006).

No Brasil, oficialmente, são considerados fraudados as matérias-primas ou os produtos que apresentem adulterações ou falsificações, conforme disposto no Art. 504 do Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA, 2017) ¹:

I. Adulterações: a) as matérias-primas e os produtos que tenham sido privados parcial ou totalmente de seus componentes característicos em razão da substituição por outros inertes ou estranhos, não atendendo ao disposto na legislação específica;

b) as matérias-primas e os produtos com adição de ingredientes, de aditivos, de coadjuvantes de tecnologia ou de substâncias de qualquer natureza com o objetivo de dissimular ou de ocultar alterações, deficiências de qualidade da matéria-prima, defeitos na elaboração ou de aumentar o volume ou o peso do produto;

c) os produtos que na manipulação ou na elaboração tenham sido empregados matérias-primas ou ingredientes impróprios ou que não atendam ao disposto no Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade ou na formulação indicada no registro do produto;

d) os produtos em que tenham sido empregados ingredientes, aditivos ou coadjuvantes de tecnologia diferentes daqueles expressos na formulação original ou sem prévia autorização do Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal; ou

e) os produtos que sofram alterações na data de fabricação, na data ou no prazo de validade;

II. Falsificações: a) quando tenham sido utilizadas denominações diferentes das previstas neste Decreto, em normas complementares ou no registro de produtos junto ao Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal;

b) os que tenham sido elaborados, fracionados ou reembalados, expostos ou não ao consumo, com a aparência e as características gerais de um outro produto registrado junto Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal e que se denominem como este, sem que o seja;

c) quando o rótulo do produto contenha dizeres, gravuras ou qualquer expressão que

¹ Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal, instituído pelo Decreto nº 9.013 de 29 de março de 2017, alterado pelo Decreto nº 9.069, de 31 de maio de 2017, que Regulamenta a Lei nº 1.283 de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, Brasil.

induza o consumidor a erro ou confusão quanto à origem, à natureza ou à qualidade do produto ou lhe atribua qualidade terapêutica ou medicamentosa;

d) os que tenham sido elaborados de espécie diferente da declarada no rótulo ou divergente da indicada no registro do produto; ou

e) os que não tenham sofrido o processamento especificado em seu registro, expostos ou não ao consumo, e que estejam indicados como um produto processado.

As perdas econômicas provocadas por fraudes na indústria de alimentos foram estimadas entre 10 e 15 bilhões de dólares por ano em todo o mundo, afetando aproximadamente 10% de todos os produtos alimentares comercializados. Porém, essas estimativas podem representar apenas uma fração do número real de incidentes, uma vez que a maioria das fraudes não são detectadas por não provocar, geralmente, riscos à inocuidade alimentar. No entanto, casos de fraudes alimentares que resultam em riscos para a saúde pública podem causar perdas, em termos de vendas perdidas, entre 2 e 15% das receitas anuais de uma indústria ou empresa de alimentos, além de possíveis falências (*Grocery Manufacturers Association and A. T. Kearney, 2010*).

2.1.1 Fraude por substituição de espécies

A adulteração de espécies em produtos alimentícios é baseada na substituição parcial ou completa de matéria-prima de uma espécie por outra, com o objetivo principal a maximização do lucro e praticada sempre sem o conhecimento do comprador (Moore et al., 2012; Hrbek et al., 2014). As substituições de espécies podem também ser impulsionadas por uma pressão da cadeia de produção de alimentos, quando, por exemplo, a oferta de um produto não consegue satisfazer a sua demanda de mercado (*Grocery Manufacturers Association and A. T. Kearney, 2010*).

É grande o número de estudos que relatam a substituição fraudulenta de espécies em produtos comercializados em diversos países. Devido ao seu alto valor de mercado, os produtos cárneos são frequentemente alvo de adulteração de espécies. Casos típicos de adulteração intencional nesse tipo de produto envolvem a substituição ou adição de proteínas de origem animal (de espécies normalmente mais baratas) ou proteínas vegetais (como a soja) sem a sua declaração na lista de ingredientes (Amaral et al., 2014; Cawthorn et al., 2013; Mousavi et al., 2015).

Em janeiro de 2013, a Autoridade de Segurança Alimentar da Irlanda (FSAI - *Food Safety Authority of Ireland*) anunciou a descoberta de carne de cavalo e de suíno adicionadas de forma não declarada em produtos cárneos bovinos, desencadeando uma crise em toda a Europa em

relação à autenticidade desse tipo de produto. À época, 85% dos produtos analisados pela FSAI foram positivos para DNA suíno e 37% para DNA equino (*Department of Agriculture, Food and the Marine, 2013*). Logo em seguida, no Reino Unido, uma investigação urgente realizada pela FSA (*Food Standards Agency of the U.K.*) encontrou vários produtos cárneos bovinos contendo carne de cavalo, resultando na remoção em larga escala de produtos de diversos varejistas e fornecedores do mercado Europeu (*Department of Agriculture, Food and the Marine, 2013*).

O “Escândalo da Carne de Cavalo” (como ficou conhecido o caso) impulsionou a criação de um mecanismo para assegurar o rápido intercâmbio de informações entre as autoridades nacionais da Europa e a Comissão Europeia em casos suspeitos de práticas fraudulentas em alimentos. Esse mecanismo ficou conhecido como *Food Fraud Network* (FFN) e está em operação desde julho de 2013 em todos os Estados-Membros da União Europeia. Em 2014, dos 60 casos de fraude avaliados pela FFN, 17% corresponderam à substituição de espécies de maior valor por espécies de menor valor econômico, sendo os produtos cárneos a categoria de alimentos mais afetada, seguida por pescados e mel (*European Commission, 2014*). Em 2015, dos 108 casos avaliados pela FFN, 5% corresponderam à substituição de espécies e, em 2016, apenas dois dos 156 casos (aproximadamente 1%) estavam relacionados à fraude por adulteração de espécies (*European Commission, 2015, 2016*).

O leite e produtos lácteos também são alvos frequentes de adulterações, pois o leite é uma matéria-prima relativamente cara e pode ser facilmente substituída (Hrbek et al., 2014; Sakaridis et al., 2013a). De fato, uma das práticas fraudulentas mais comuns na indústria de laticínios é a mistura de leite de maior valor comercial (como o leite de cabra, ovelha ou búfala) com leite de menor valor e alta disponibilidade, geralmente o leite de vaca (Calvano et al., 2013; Hrbek et al., 2014). Em 2013, foi conduzido um estudo no Laboratório de Genética da Escola de Veterinária da UFMG (LGEV) em parceria com o Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia da Informação Genético-Sanitária da Pecuária Brasileira (INCT-Pecuária). A pesquisa foi baseada na técnica de PCR em Tempo Real para detectar e quantificar material de origem bovina em produtos derivados de leite de búfala. Entre as 204 amostras comerciais de indústrias brasileiras analisadas, 31% possuíam mais de 1% de material bovino em sua composição. O estudo utilizou uma metodologia desenvolvida pelo grupo de pesquisa do LGEV (Pedido de Patente: Método e Kit para Quantificação de Material de Origem Bovina e Bubalina em Produtos de Origem Animal pela técnica de PCR em Tempo Real - INPI número: 14110002844, Data: 16/09/2011; Dalsecco, 2013; Drummond, et al., 2013). Diversos trabalhos demonstram

que as fraudes em produtos lácteos não estão restritas ao Brasil. Os trabalhos de Sakaridis et al. (2013a) e Ganopoulos et al. (2013), conduzidos na Grécia, o trabalho de Lopparelli et al. (2007) conduzido na Itália, entre outros, revelam produtos contendo leite de espécies não declaradas.

2.1.2 Legislação de alimentos

O aumento das relações comerciais entre os países, nos quais os alimentos ocupam lugar de destaque, tem contribuído para o estabelecimento de padrões de qualidade e normas técnicas comuns, visando harmonizar o fluxo de mercadorias. No que diz respeito ao comércio de alimentos, o *Codex Alimentarius*² se evidencia como a principal norma regulamentadora adotada em escala global. Um dos objetivos do *Codex* é recomendar normas para padronização de alimentos, delineando especificações técnicas para produtos e práticas de produção, assegurando não apenas o livre comércio de produtos, mas a garantia de proteção da saúde do consumidor (*Codex Alimentarius Commission*, 2001).

Em âmbito nacional, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e o Ministério da Saúde, por meio da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), se empenham em garantir a segurança e a inocuidade dos alimentos, desde a sua obtenção até o seu consumo, promovendo a proteção da saúde de todos os brasileiros. Essas autoridades se baseiam no Decreto-Lei nº 986, de 21 de outubro de 1969, considerado como marco na legislação de alimentos no Brasil e ainda em vigência, que institui as Normas Básicas para Alimentos com recomendações de ordem geral. O MAPA e a ANVISA se baseiam ainda em legislações próprias que caracterizam todo o processo de produção, rotulagem, registro e fiscalização de alimentos de origem animal ou vegetal. As competências de cada instituição foram instituídas pelo Decreto nº 69.502, de 5 de novembro de 1971, atribuindo ao MAPA a realização da inspeção, do registro e da padronização de alimentos, além da fiscalização dos estabelecimentos. Ao Ministério da Saúde cabe a fiscalização do comércio e dos serviços, visando impedir que alimentos impróprios cheguem ao consumidor.

Em 30 de março de 2017, entrou em vigor o novo RIISPOA, principal legislação que regulamenta os produtos de origem animal no Brasil. Entre as mudanças introduzidas, estão a elevação das penalidades e o combate à fraude econômica. Em relação à fraude alimentar, o

² Programa conjunto da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) e Organização Mundial da Saúde (OMS). www.codexalimentarius.org

Art. 509 do RIISPOA (2017), considera infração grave o ato de, entre outros, “alterar ou fraudar qualquer matéria-prima, ingrediente ou produto de origem animal” e infração gravíssima o ato de, entre outros, “produzir ou expedir produtos que representem risco à saúde pública” ou que sejam impróprios ao consumo humano. Conforme já descrito, a substituição não declarada de espécies se enquadra como um tipo de falsificação de alimentos. As penalidades variam entre advertência, multa, apreensão de produtos, suspensão da atividade, interdição e até a cassação do registro do estabelecimento, dependendo da gravidade da infração.

A proteção dos brasileiros contra a fraude alimentar é também contemplada pelo Código de Defesa do Consumidor ³, que estabelece normas de proteção à saúde e segurança dos consumidores. Segundo o Código:

Art. 6º São direitos básicos do consumidor: (...) III a informação adequada e clara sobre os diferentes produtos e serviços, com especificação correta de quantidade, características, composição, qualidade e preço, bem como sobre os riscos que apresentem.

.....

Art. 8º Os produtos e serviços colocados no mercado de consumo não acarretarão riscos à saúde ou segurança dos consumidores, exceto os considerados normais e previsíveis em decorrência de sua natureza e fruição, obrigando-se os fornecedores, em qualquer hipótese, a dar as informações necessárias e adequadas a seu respeito.

.....

Art. 18º § 6º São impróprios ao uso e consumo: (...) II os produtos deteriorados, alterados, adulterados, avariados, falsificados, corrompidos, fraudados, nocivos à vida ou à saúde, perigosos ou, ainda, aqueles em desacordo com as normas regulamentares de fabricação, distribuição ou apresentação.

Por fim, o Código Penal Brasileiro ⁴, em seu capítulo III, considera como crime contra a saúde pública o ato de “Art. 272 - Corromper, adulterar, falsificar ou alterar substância alimentícia ou produto alimentício destinado a consumo, tornando-o nocivo à saúde ou reduzindo-lhe o valor nutritivo”, com pena de reclusão de quatro a oito anos e multa.

³ Código de Defesa do Consumidor, instituído pela Lei 8.078 de 11 de setembro de 1990, Brasil.

⁴ Código Penal, instituído pelo Decreto-Lei nº 2.848, de 7 de dezembro de 1940, alterado pela Lei nº 9.677, de 2 de julho de 1998, Brasil.

2.1.3 Implicações da substituição de espécies

A substituição de espécies em produtos de origem animal envolve questões econômicas, culturais e de saúde (Aida et al., 2007). De maneira geral, a substituição não declarada de matéria-prima de uma espécie por outra faz com que consumidores paguem um preço maior por um produto de menor valor (Jakes et al., 2015), além de submeter os produtores honestos a uma competição injusta (Ballin, 2010).

As questões culturais ou religiosas da substituição de espécies em alimentos envolvem a restrição de alguns ingredientes a mercados consumidores específicos: no vegetarianismo, por exemplo, é indesejável a presença de ingredientes cárneos (Bottero e Dalmaso, 2011), e no veganismo é indesejável qualquer ingrediente de origem animal. Para os Hindus, a vaca é considerada um animal sagrado e, portanto, o consumo de sua carne é considerado tabu e até proibido em diversos locais da Índia (Premanandh, 2013). Nas religiões islâmicas e judaicas, o consumo da carne ou de qualquer derivado de suínos é totalmente proibido aos fiéis (Aida et al., 2007; Premanandh, 2013; Sakaridis et al., 2013b).

Mais importante, a substituição de espécies em alimentos caracteriza-se como um problema de saúde pública, pois pode ocultar ingredientes com potencial alergênico para indivíduos sensíveis. A OMS considera as alergias alimentares como o sexto maior problema na saúde humana, afetando cerca de 1 a 3% dos adultos e 4 a 6% das crianças em todo o mundo. Ainda segundo a OMS, mais de 70 alimentos já foram relatados como causadores de alergias, sendo o leite e o ovo os principais alérgenos em crianças e os frutos do mar em adultos (*World Health Organization*, 2006). Em alguns casos, as fraudes alimentares economicamente motivadas, como a substituição de espécies, podem ser mais perigosas do que os riscos tradicionais de inocuidade alimentar (micro-organismos, toxinas ou substâncias químicas conhecidas) uma vez que os potenciais adulterantes são pouco convencionais e os métodos de detecção e intervenção atuais não estão focados nesses possíveis adulterantes (Spink e Moyer, 2011).

Embora as fraudes alimentares sejam motivadas economicamente, casos acidentais de adulteração de espécies podem ocorrer ocasionalmente como consequências da qualidade ruim de gestão, de fatores relacionados com o ambiente ou beneficiamento e ainda da rotulagem inadequada (Patel, 2013). Um exemplo é a contaminação cruzada, que pode ocorrer quando um equipamento indevidamente limpo é usado para processar material de mais de uma espécie

(Cawthorn et al., 2013) e, com isso, pequenas quantidades de material de uma espécie podem ser incorporadas de forma não intencional em produtos de uma outra. Mesmo em pequenas quantidades, ingredientes de origem animal como carnes, leites, ovos, peixes e crustáceos podem causar graves e até fatais reações alérgicas em indivíduos sensíveis, sendo a única forma de controle evitar seu consumo (*World Health Organization*, 2006). Desse modo, a correta declaração das espécies presentes no rótulo dos alimentos é essencial para facilitar o acesso aos ingredientes de um produto e proteger consumidores alérgicos, evitando assim o consumo de alimentos perigosos (van Hengel, 2007; Sentandreu e Sentandreu, 2014).

Ainda na questão de saúde pública, a presença de carne de cavalo em produtos de origem bovina não representa em si um risco para a saúde, a menos que ela tenha entrado ilegalmente na cadeia de produção, conforme aconteceu na Europa em 2013 (*European Food Safety Authority e European Medicines Agency*, 2013). A presença indevida da carne de cavalo implica em falhas na garantia da origem de toda matéria-prima utilizada. Tais falhas provocam questionamentos sobre inocuidade alimentar, pois carnes sem garantia de procedência ou impróprias para consumo humano podem ter sido utilizadas, o que poderia representar riscos para a saúde humana (Cawthorn et al., 2013; Jakes et al., 2015). Da mesma forma, não é possível conhecer as condições de criação dos animais, bem como a utilização de drogas banidas aos animais destinados ao consumo humano. A fenilbutazona, por exemplo, é um potente anti-inflamatório amplamente utilizado para tratamento de distúrbios musculoesqueléticos em equinos, porém, sua utilização é proibida nos animais se destinem ao consumo humano por causar sérios efeitos adversos no homem (Dodman et al., 2010; *European Food Safety Authority e European Medicines Agency*, 2013). De acordo com Dodman et al. (2010), a falta de fiscalização para evitar que equinos tratados com fenilbutazona sejam enviados ao abate para consumo humano indica uma grave lacuna na inocuidade alimentar e constitui um risco significativo à saúde pública.

2.2 Testes de detecção de espécies em alimentos

Devido a inúmeros escândalos alimentares já relatados em todo o mundo, o desenvolvimento de um método econômico e confiável para a detecção/identificação de espécies em produtos de origem animal tornou-se um grande desafio (Floren et al., 2015). Várias metodologias foram desenvolvidas ao longo dos últimos anos para a detecção de adulterações em alimentos. Muitos

desses métodos são baseados na análise de lipídeos, proteínas e DNA para a identificação de adulterações em carne ou leite (e seus derivados) de diferentes espécies.

A detecção de lipídeos e proteínas é realizada por meio de técnicas cromatográficas, imunoenzimáticas ou, mais recentemente, por espectrometria de massas (Calvano et al., 2013; Hrbek et al., 2014; Jakes et al., 2015). No entanto, esses métodos são laboriosos e muitas vezes não são aplicáveis na rotina, uma vez que a estrutura terciária das proteínas pode ser alterada pela alta temperatura, pressão e processos químicos, entre outras manipulações sofridas pelos alimentos durante o processamento, provocando, dessa forma, possíveis resultados falsos negativos em relação à presença de material de uma espécie (Ballin et al., 2009; López-Calleja et al., 2007; Sentandreu e Sentandreu, 2014). Apesar de muitas vantagens, as técnicas imunológicas possuem ainda outras limitações para a análises de alimentos, como a necessidade de anticorpos específicos. Problemas relacionados com reações cruzadas e resultados falsos positivos podem ocorrer se, por exemplo, os anticorpos não forem altamente específicos de uma espécie (Sentandreu e Sentandreu, 2014). Dessa forma, técnicas como o teste ELISA (imunoensaio amplamente utilizado na autenticação de alimentos) podem apresentar pouca ou nenhuma resolução na discriminação de espécies filogeneticamente próximas como frango e peru ou caprino e ovino (Zhang et al., 2007).

2.2.1 Testes de DNA

As técnicas moleculares baseadas na detecção de DNA têm superado as limitações associadas aos métodos de lipídeos e proteínas e estão sendo cada vez mais utilizadas para a detecção de espécies em alimentos. A partir da década de 1990, a *International Standards Organization* (ISO) passou a aprovar testes laboratoriais de identificação de espécies com base em análises de biologia molecular (Clark, 2015). Comparativamente, essas técnicas são mais práticas, sensíveis e robustas, permitindo a análise de alimentos processados (Zhang et al., 2007), devido principalmente à ubiquidade e alta estabilidade das moléculas de DNA em todos os tipos de células (Amaral et al., 2014; Cammà et al., 2012).

Metodologias baseadas na detecção de DNA se valem de diferenças na sequência de bases do genoma de cada espécie, os chamados polimorfismos de DNA, sendo esta a molécula de escolha para diferenciar espécies estreitamente relacionadas (Cawthorn et al., 2013; Sentandreu e

Sentandreu, 2014). A grande maioria desses métodos consiste na amplificação de um ou mais fragmentos específicos de DNA por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR - *Polimerase Chain Reaction*), considerada a técnica molecular mais bem-sucedida até o momento, devido a sua simplicidade, rapidez, alta especificidade e sensibilidade (Amaral et al., 2014; Bottero e Dalmaso, 2011). A amplificação pela PCR é baseada no anelamento de pares de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), específicos ou não de uma determinada espécie e síntese *in vitro* de milhões de cópias do DNA alvo (Bottero e Dalmaso, 2011).

A PCR pode ser utilizada de diversas maneiras para indicar a presença ou ausência de material genético de uma espécie em um alimento. Boa parte dos métodos utiliza *primers* específicos da (s) espécie (s) em análise em reações de amplificação por PCR convencional, na qual a PCR é seguida por uma etapa de eletroforese para a detecção do DNA amplificado. Os trabalhos de Amaral et al. (2014) e Nejad et al. (2014), por exemplo, partem desse princípio para identificar as espécies utilizadas na fabricação de salsichas em Portugal e no Irã, respectivamente. O método descrito por Amaral et al. (2014) permite a detecção de carnes bovina, suína, de coelho, de lebre e de veado, e o método de Nejad et al. (2014) permite a identificação de carnes de frango, jumento, camelo, ovino e bovino. Em ambos trabalhos, após a amplificação do DNA, é feita a etapa de eletroforese em gel para a detecção da presença ou ausência do material genético de uma determinada espécie em uma amostra, o que torna esses métodos demorados e laboriosos, além de envolver agentes tóxicos e/ou luz ultravioleta, oferecendo riscos à saúde do manipulador (López-Calleja et al., 2007).

Outras técnicas moleculares comumente utilizadas para a detecção de material genético em alimentos envolvem o sequenciamento de DNA e RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). A PCR-RFLP consiste em submeter os fragmentos de DNA resultantes da PCR (*amplicons*) à digestão por enzimas de restrição e posterior visualização por eletroforese em gel (Bottero e Dalmaso, 2011). Cada espécie apresenta um padrão eletroforético único (com fragmentos de tamanhos diferentes) permitindo a sua discriminação (Ballin et al., 2009). Como exemplos, os trabalhos de Aida et al. (2007) e Chen et al. (2010) utilizam a técnica de PCR-RFLP para a autenticação de espécies em produtos cárneos. Apesar de a técnica ser amplamente utilizada na discriminação de espécies próximas, é possível, porém, que resultados falsos ocorram devido a mutações pontuais (troca de nucleotídeos) nos sítios de restrição da (s) enzima (s) ou a presença de pseudogenes (sequências semelhantes a genes conhecidos, porém não produzem proteínas funcionais) e, dessa forma, a técnica deve ser utilizada com precaução (Ballin et al., 2009; Bottero e Dalmaso, 2011).

O sequenciamento de DNA, ou seja, a determinação de cada base de um fragmento de DNA, pode ser aplicado para a identificação de espécies, mas depende da disponibilidade de sequências conhecidas para a comparação (Ballin et al., 2009). Muita informação pode ser obtida de bancos de dados como, por exemplo, o *GenBank*⁵, que possui um grande número de sequências de espécies comuns de animais. Dessa forma, o sequenciamento de DNA, em conjunto com os bancos de dados, pode ser utilizado para identificar espécies em amostras desconhecidas, mesmo se não houver material de referência disponível (Ballin et al., 2009). A metodologia, porém, não é aplicável para análise de matrizes mistas (duas ou mais espécies), a menos que os diferentes produtos de PCR possam ser clonados separadamente, não sendo adequada para testes de diagnóstico de rotina (Bottero e Dalmaso, 2011).

2.2.2 PCR em Tempo Real

Segundo Ballin et al. (2009), em sua revisão sobre a identificação de espécies em produtos cárneos, a PCR em Tempo Real é, no momento, o método de escolha para a detecção e quantificação de adulterações nesse tipo de produto. Além da grande eficácia apresentada pela tecnologia, a PCR em Tempo Real possui ainda a vantagem de apresentar maior sensibilidade do que métodos convencionais de PCR, permitindo a detecção de quantidades muito pequenas (traços) de DNA em uma amostra. A técnica também oferece maior praticidade ao dispensar a etapa de eletroforese (Bottero e Dalmaso, 2011; Cammà et al., 2012; Safdar e Junejo, 2015).

A amplificação de DNA por PCR em Tempo Real é feita combinando-se os *primers* com sondas fluorescentes ou com agentes fluorescentes intercalantes de DNA. Diversas tecnologias podem ser utilizadas, sendo as mais comuns as tecnologias *TaqMan*[®] e *Sybr Green*[®] (Ballin et al., 2009). Cammà et al. (2012) desenvolveram um método para a identificação de DNA de peru, frango, suíno e ovelha em produtos cárneos e, da mesma forma, Espiñeira e Vieites (2015) desenvolveram um método para identificação de DNA de cão e gato em produtos para alimentação animal. Ambos os trabalhos utilizaram sondas específicas do tipo *TaqMan*[®] para PCR em Tempo Real em conjunto com *primers* específicos de cada espécie em análise. Embora sejam métodos práticos e extremamente específicos, a necessidade do desenho e da otimização

⁵ *GenBank* é um banco de dados aberto e *on line* de sequências de nucleotídeos publicamente disponíveis e suas traduções proteicas. O *GenBank* é produzido e mantido pelo *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) - www.ncbi.nlm.nih.gov/.

de sondas fluorescentes deixa os métodos muito mais onerosos (Safdar e Junejo, 2015), especialmente quando o objetivo é apenas avaliar a presença ou ausência de uma espécie.

Os trabalhos publicados por Safdar e Junejo (2015) e Soares et al. (2013) utilizam o agente fluorescente *Sybr Green*[®] como uma alternativa de menor custo, se comparada às sondas *TaqMan*[®], para a identificação de espécies animais em alimentos. O *Sybr Green*[®] é um agente que se liga às fitas duplas de DNA na etapa de amplificação e emite uma fluorescência detectável pelo aparelho de PCR em Tempo Real (Ballin et al., 2009). Por ser uma ligação inespecífica, é necessária uma segunda etapa, chamada curva de dissociação (ou curva de *melting*) para confirmar se o DNA amplificado corresponde ao fragmento esperado, além de identificar se resultados falsos positivos podem ser atribuídos a amplificações inespecíficas ou dímeros de *primers* (Soares et al., 2013).

A etapa da curva de dissociação é baseada no aumento gradual da temperatura, de forma que ocorra a desnaturação das fitas duplas de DNA (geradas na PCR) em fitas simples. A temperatura em que metade do DNA se encontra desnaturada é chamada temperatura de *melting* (T_m), a qual depende do tamanho e do conteúdo de guanina-citosina (GC) do fragmento, sendo, portanto, utilizada para identificar os diferentes fragmentos gerados na reação de PCR em Tempo Real (Druml e Cichna-Markl, 2014). A curva de dissociação pode ser realizada em alta resolução pela técnica de *High Resolution Melting* (HRM). O HRM utiliza agentes fluorescentes intercalantes de DNA (*Syto9*[®], *Eva Green*[®], entre outros), da mesma forma que o *Sybr Green*[®], porém saturantes, ou seja, preenchem toda a fita dupla de DNA. A saturação do DNA permite uma maior resolução na curva de dissociação e aumenta, dessa forma, a precisão nas análises de identificação das espécies presentes em uma amostra. Além disso, os agentes saturantes são significativamente mais sensíveis e estáveis do que o *Sybr Green*[®] e permitem resultados altamente reprodutíveis (Monis et al., 2005; Gudnason et al., 2007; Eischeid, 2011).

3. ARTIGO

A Fast and Reliable Real-time PCR Method for Detection of Ten Animal Species in Meat Products

Lissandra Sousa Dalsecco ^{1*}, Rafael Melo Palhares ², Pollyana Carvalho Oliveira ², Lilian Viana Teixeira ¹, Marcela Gonçalves Drummond ² and Denise Aparecida Andrade Oliveira ¹

¹ Laboratório de Genética Animal (LGEV), Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antônio Carlos 6627, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

² Myleus Biotechnology, Avenida José Cândido da Silveira 2100, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

* Corresponding author:

Lissandra Sousa Dalsecco

Laboratório de Genética Animal (LGEV), Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antônio Carlos 6627, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

E-mail address: lissdalsecco@gmail.com

ABSTRACT

Species substitution in meat products is a common problem reported worldwide. This type of food fraud is, typically, an intentional act for economic gain, using sources of low-priced meats in high-value meat products. Consequences include economic, health, and religious concerns. Highly sensitive and efficient techniques are thus required to detect meat species. This paper describes a method based on real-time PCR to detect ten animal species (*Bos taurus*, *Sus scrofa*, *Ovis aries*, *Capra hircus*, *Gallus gallus*, *Meleagris gallopavo*, *Bubalus bubalis*, *Equus caballus*, *Felis catus* and *Canis familiaris*) in meat products. The method combines species-specific and universal (used here as internal positive control) primers, and applies melt curve analysis for amplicon checking. Method accuracy was evaluated on 46 experimental meat mixtures and all species were correctly identified in all cases, at 1% test sensitivity. Analysis of 14 commercial meat products revealed that 6 of 14 samples had nondeclared bovine and/or chicken material. We performed an interlaboratory comparison using the reference meat mixtures and commercial samples, achieving 100% of reproducibility. The developed test proved to be effective and reliable for routine analysis of meat products.

KEYWORDS

Food safety; meat; mislabeling; real-time PCR; species substitution.

PRACTICAL APPLICATION

This paper describes a fast and reliable method for species detection in meat products based on real-time PCR. It can be applied for analysis of *in natura* or processed meat. The method proposed here can play an important role in controlling the origin of meat products, ensuring their quality and safety for the entire food industry - producers to consumers.

INTRODUCTION

Species adulteration in food is, typically, an intentional act for economic gain, using sources of low-priced meats, such as pork and chicken, in high value meat products (Premanandh, 2013). Pork, for example, is a potential source of replacement for beef and lamb due to the color and texture similarities (Sakalar et al., 2015). The presence of undeclared species in food products may also be unintentional in some cases, due to negligence in production or cross-contamination, when, for example, improperly cleaned equipment is used to process meat from different species (Cawthorn et al., 2013). Besides the economic impact caused by unfair trade competition, the species adulteration in food involves health concerns, lifestyles and religious beliefs. The Islamic law, for example, forbids the consumption of meat or ingredients derived from pork and animals with canine teeth or fangs, such as dogs, cats and rats (Ali et al., 2015). Hindu diet avoids beef and beef products (Premanandh, 2013; Cawthorn et al., 2013). Occidental cultures do not consume meat from pet animals, such as dogs or cats, and vegetarians do not eat any kind of meat (Ballin, 2010; Rogberg-Muñoz et al., 2013). In addition, the improper presence of a species material may lead to a potential risk for allergic people. Individuals with food allergies should avoid consuming allergic ingredients to prevent the incidence of reactions (Druml and Cichna-Markl, 2014).

In this way, the ingredients listed on a product label should reflect exactly the total food content so that consumers can safely choose what to consume (Premanandh, 2013). Although national and international food laws require the complete content declaration on label, these regulations, unfortunately, are not enough to prevent that adulterated food reach the market (Ballin, 2010; Druml and Cichna-Markl, 2014). Thus, food traceability, using several approaches and technologies already developed, has become a necessary monitoring routine for verification of food authentication and labeling issues (Premanandh, 2013). Although recent improvements provide highly sensitive techniques for traceability, the species identification methods still face big challenges related to highly processed food analysis, due to the major disruptions of tissue structures and protein degradation by food processing (Rogberg-Muñoz et al., 2013; Soares et al., 2013).

These challenges make the processed meat products often prone to adulteration practices. This has been confirmed by several recent reports, which have detected a high rate of species adulteration. A study conducted in South Africa, for example, revealed that 68% of processed

meat products contained meat from species not declared on label (Cawthorn et al., 2013). In the beginning of 2013, Europe went through a scandal regarding the authenticity of processed beef products, which showed undeclared addition of horse meat and pork (Department of Agriculture Food and the Marine, 2013).

The available techniques for species detection and identification in food are based on protein or DNA analyses. Protein methods have limitations when applied to highly processed products due to the harsh conditions applied, such as high temperature and pressure (Kim et al., 2016). On the other hand, DNA is a well-accepted molecule to be used for species identification because it offers species-specific information, stability (Druml and Cichna-Markl, 2014) and can be retrieved from processed products (Bertolini et al., 2015). Among the DNA based methods, Sanger sequencing and Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) have been widely used for species identification, mostly using mitochondrial genes. However, these methods are time consuming and susceptible to contamination due to the multi-step analysis (Naue et al., 2014) and even inadequate for highly processed products and/or meat mixtures analysis (Cammà et al., 2012).

Currently, real-time PCR is the technique of choice for species detection in meat and meat products (Ballin, 2010) due to its high sensitivity and specificity plus a lower risk of contamination (Kesmen et al., 2012; Soares et al., 2013; Navarro et al., 2015). The DNA amplification performed in closed-tube assays, represent a cheaper, faster and less laborious analysis, and is more appropriate for high sample throughput than alternative DNA approaches, for example, DNA sequencing and RFLP (Druml and Cichna-Markl, 2014; Navarro et al., 2015). There are two main groups of real-time PCR fluorescent agents to monitor the amplification: double-stranded DNA intercalating dyes (e.g. SYBR Green I, SYTO and EvaGreen) and fluorophore-labeled oligonucleotides, such as TaqMan probes (Navarro et al., 2015). Although the chemistries of the latter are sequence-specific, they are more expensive and time-consuming considering the probe design and optimization (Safdar and Junejo, 2015). To verify the specificity of amplified products when DNA binding dyes are used, melt curve analysis is performed after PCR to distinguish false positive signals due to nonspecific amplification or primer-dimers (Soares et al., 2013; Druml and Cichna-Markl, 2014). Among the common used DNA intercalating dyes, EvaGreen and SYTO (-9, -13 and -82) are significantly more sensitive, stable and enable better reproducible results than SYBR Green I (Monis et al., 2005; Gudnason et al., 2007; Eischeid, 2011).

Here we demonstrate a method based on real-time PCR followed by melt curve analysis using the SYTO-9 dye to detect ten animal species (*Bos taurus*, *Sus scrofa*, *Ovis aries*, *Capra hircus*, *Gallus gallus*, *Meleagris gallopavo*, *Bubalus bubalis*, *Equus caballus*, *Felis catus* and *Canis familiaris*) in raw or processed meat products. The developed method was validated using forty-six meat mixtures and applied on fourteen commercial meat products for labelling verification.

3.1 MATERIALS AND METHODS

The method development was conducted at the *Laboratório de Genética Animal* from *Universidade Federal de Minas Gerais* (LGEV), Brazil (www.vet.ufmg.br) and at the Laboratory of *Myleus Biotecnologia* (MYLEUS), Brazil (www.myleus.com).

3.1.1 Sample collection

In this study, we selected seven meat species used for human consumption in Brazil (beef, pork, chicken, lamb, goat, turkey and buffalo) and three meats possibly used in fraud (horse, dog and cat). Meat samples from beef (*B. taurus taurus* or *B. taurus indicus*), pork (*S. scrofa*), lamb (*O. aries*), chicken (*G. gallus*) and turkey (*M. gallopavo*) were purchased from local markets in Belo Horizonte, Brazil. Prof. Eduardo Bastianetto (*Universidade Federal de Minas Gerais*) gently provided buffalo meat samples (*B. bubalis*). A goat meat sample (*C. hircus*) was obtained from *Associação dos Criadores de Caprinos e Ovinos de Minas Gerais* (www.caprileite.com.br) and the horse meat samples (*E. caballus*) were obtained from the *Cavalaria da Polícia Militar de Minas Gerais*, Brazil. Cat (*F. catus*) and dog (*C. familiaris*) meat samples were provided by the *Hospital Veterinário* at the *Universidade Federal de Minas Gerais*. The meat samples were produced in facilities under government inspection or were obtained from the necropsy of animals that died of non-infectious causes. The species identity of these reference samples was confirmed by Sanger sequencing.

For method validation, 45 experimental reference meat mixtures were prepared with tissues from two species in proportions of 50:50 or 99:1 (w/w). One mixture was prepared with meats from all species (10% [w/w] each). The mixtures were obtained by weighting, in a precision scale, the reference samples to a final weight of 1.0 g, which was then homogenized using

porcelain mortar and pestle. Ten of these experimental meat mixtures were prepared in duplicates to verify the method repeatability.

Additionally, the performance of the method was also evaluated on 14 meat products purchased from local markets in Belo Horizonte, Brazil. Sample testing included different types of matrices and manufacturing process: hamburgers (lamb and beef, $n = 4$) sausages (lamb, pork, hot-dog, calabrese and guanabara, $n = 5$), salami ($n = 1$), smoked chicken breast ($n = 1$), canadian bacon ($n = 1$), beef meat balls ($n = 1$) and nugget ($n = 1$). All samples were stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for further analyses in both laboratories.

3.1.2 DNA isolation

The DNA was extracted from samples using salting out method with modifications. Approximately 50 mg of pure or commercial samples (or 500 mg of reference mixtures) were incubated overnight at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ with 500 μL of TEN buffer (59 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM EDTA, 400 mM NaCl), 20 μL of proteinase K (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) and 100 μL of 20% SDS solution. The samples were then added with 600 μL of 3 M sodium acetate, centrifuged (30 min, 15,339 \times g) and the supernatant was transferred to a second tube with 450 μL of 100% ethanol. The solution was incubated at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 3 to 4 hours, centrifuged (10 min, 15,339 \times g) and the supernatant was discarded. The DNA pellet was washed with 300 μL of 70% ethanol (centrifuged at 15,339 \times g for 10 min) and dried by incubation at $52\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 5 min. The DNA was recovered by adding 100 μL of TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) and incubated for 1 hour at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. DNA quantity and quality were assessed at LGEV using a NanoDrop Lite Spectrophotometer TM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The 260/280 nm measurement was considered a marker of DNA quality. DNA quantity was assessed at MYLEUS using a Qubit Fluorometer 2.0 TM (Thermo Fisher Scientific). The DNA was stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until use.

3.1.3 Primer design

Buffalo-specific primers used in this study were described by Drummond et al. (2013) and bovine-specific primers were modified from those described by Zhang et al. (2007; Table 1). The species-specific primers for the remaining eight species were designed using published

sequences from *CytB* gene (accession numbers presented in Table 1), with support from Primer-BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast) by NCBI (National Center for Biotechnology Information) and the Primer Express Software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). BLASTN search analyses using the NCBI database (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) were used to determine the specificity of each primer and the *in silico* analysis confirmed their specificity.

At least three *CytB* gene sequences (or complete mitochondrial genome) from each species were retrieved from the NCBI nucleotide database (accession numbers presented in Table 1) and aligned using the MUSCLE algorithm (Edgar, 2004) in MEGA v.7 software (Kumar et al., 2016). The sequence alignment was performed for visualization of conserved and variable regions among the species in order to guide the universal primer design. Three universal primers containing several degenerations (Table 1) were designed based on the high similarity regions from the *CytB* of the diverse species. Two of those primers (CytBuF and CytBuR2) were designed to amplify a fragment of approximately 650 bp for use by Sanger Sequencing to confirm the species identity of samples used as reference. A third universal primer (CytBuR3) was designed as an alternative reverse primer for CytBuF (126 bp) to perform internal positive control (IPC) of the real-time PCR assays. The IPC was used on the developed test in order to verify if the lack of amplification of an unknown sample by species-specific primers could be attributed to PCR inhibition, failures in DNA extraction or to the species absence in a given sample.

Table 1 - Primers used in the study

Primer ^a	Sequence (5' → 3')	Target	Amplicon size (bp)	Reference or GenBank accession n°
Bub2F Bub2R	TCAGCCCAAAGAAAAATAAACCA GTCACCCCAACCGAAACTGT	<i>16S (Bubalus bubalis)</i>	79	Drummond et al. (2013)
BosF BosR	CGGAGTAATCCTTCTGCTCACAGT GGATTGCTGATAAGAGGTTGGTG	<i>CytB (Bos taurus)</i>	114	Zhang et al. (2007)
Sus2F Sus2R	TATCCCTTATATCGGAACAGACCTC GCTGCGAGGGCGGTAA	<i>CytB (Sus scrofa)</i>	126	AB015077.1 AB015080.1 AB015081.1
Gal3F Gal4R	TCCTTCAAAGACATTCTGGGCT TGGGGGAGAATAGGGCTAGTG	<i>CytB (Gallus gallus)</i>	70	GU261719.1 EU839454.1
EquF EquR	CCAAGTGGCCTCAATCCTC GGTGCTTGCAGTGGTATAAAA	<i>CytB (Equus caballus)</i>	60	JF511455.1 JF511457.1 JF511459.1
Ovi2F Ovi3R	TATACCCCTCCTCCATACATCAAAG TTGGTCGGAATATTATGCTCCGTT	<i>CytB (Ovis aries)</i>	50	JX567829.1 JX567830.1 JX567831.1
CapF Cap2R	CTCCTGCTCGCGACAATG GATTGCTGAAAGAAGATTAGTG	<i>CytB (Capra hircus)</i>	106	AB044307.1 AB044308.1 AB110597.1
MelF MelR	TGCCCTGACAATCCTCATAACA TTGGGAGGTCGATTAATGAGTTGTTG	<i>CytB (Meleagris gallopavo)</i>	116	AB110597.1 L08381.1 NC_0101952
CanF CanR	TCCACACATCTAAGCAACGCA AGATTGAAGCGACTTGTCCGATAA	<i>CytB (Canis familiaris)</i>	150	KJ660977.1 KJ660979.1 KJ660981.1
FelF FelR	ATCCTCACCGGCCTCTTTTTG AACTGATGAAAAGGCGGTTATTGTG	<i>CytB (Felis catus)</i>	66	NC_001700.1 AB004237.1 AB004238.1
CytBuF CytBuR3 CytBuR2	CMTGRGGMCAAATRTCMTTYTGAG ^b ATCGKGTDAGRGTGSKTTGTC ^b GGGRTRWAGYTDCTGGGTCYCC ^b	<i>CytB (from ten species)</i>	126	All accession n° above plus: GU249571.1 GU249572.1 GU249573.1 JQ241281.1 FJ467750.1 FJ467883.1

^a F = forward primer, R = reverse primer.

^b Universal primers targeting *CytB* gene were designed to undergo degeneration. According to the International Union of Pure and Applied Chemistry: R = G or A, M = A or C, Y = T or C, K = G or T, S = G or C, W = A or T, D = G or A or T.

3.1.4 Species identity confirmation by Sanger sequencing

To confirm the authenticity of meat samples used as reference in this study, a fragment of the *CytB* gene from each sample was sequenced using Sanger method and the CytBuF and CytBuR2 primers. The PCR amplifications were performed in a total volume of 25.0 μ L containing 1.25 U of GoTaq Flexi DNA Polymerase in GoTaq Flexi Buffer TM (Promega, Madison, WI, USA), 2.0 mM of MgCl₂ (Promega), 0.1 mM of mixed dNTP (10 mM, Promega), 96 nM of each primer and 200 ng of target DNA. The amplification was performed using a Veriti Thermal Cycler TM (Applied Biosystems). PCR conditions comprised an initial step of 1 min at 94 °C, followed by 35 cycles of 1 min at 94 °C, 1.5 min at 54 °C, 1 min at 72 °C and one final step of 5 min at 72 °C. PCR products were visualized in 1% agarose gel colored with GelRed TM (Biotium, Fremont, CA, USA) for amplification check. DNA sequencing was conducted in both directions using the BigDye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit TM (Applied Biosystems) following the manufacturer protocol at Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer TM. The obtained DNA sequences were analyzed with the Sequencing Analysis Software (Applied Biosystems) and later edited using SeqScape TM v. 2.7 Software (Applied Biosystems). Bases with quality values (QV) lower than 15 (probability of error of 3.2%) were manually edited. The consensus sequences were assessed for sequence similarity by BLASTN search and alignment with sequences available in the GenBank database (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank). Phylogenetic analysis and tree assembly were performed using the Neighbor-Joining Method (Felsenstein, 1985; Tamura et al., 2004) in MEGA v. 7 Software (Kumar et al., 2016), forming a cluster with similarity \geq 99%. The results for the species confirmation on the positive controls are shown in Figure A.1 (Supplementary Material).

3.1.5 Real-time PCR

All real-time PCR amplifications were carried out on duplicates in 96-well plates using the 7500 Fast Real-Time PCR System TM (Applied Biosystems). The reactions were performed in singleplex in a total volume of 12.0 μ L containing 6.0 μ L of MeltDoctor HRM Master Mix TM (containing the intercalating dye SYTO-9, Thermo Fisher Scientific), 250 nM of each (specific or universal) primer, 3.4 μ L of Milli-Q water and 2.0 μ L (at 10 ng / μ L in LGEV and at 2.5 ng / μ L at MYLEUS) of target DNA. The cycling conditions were applied as follows: 50 °C for 2 min, 95 °C for 10 min and 35 cycles of 95 °C for 15 s, 58 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. Melt

curve analysis was performed immediately after the amplification protocol under the following conditions: 95 °C for 15 s, 60 °C for 1 min, 95 °C for 30 s (ramp rate of 1%) and 60 °C for 15 s. Non-template controls (NTC) and positive controls (DNA from reference samples) were included for each target in all runs. The reactions were analyzed using the 7500 Software™ (Thermo Fisher Scientific). The baseline was set on cycles 3 to 12 and thresholds were set at 200,000 for all targets. For analysis purposes, Cycle threshold (Ct) values greater than 30 were not considered in the following analyses.

3.1.6 Method sensitivity and specificity

DNA from reference samples was used to verify the amplification capacity of primers in real-time PCR assays. Melt temperatures (T_m) were automatically determined by the 7500 Software and used to calculate the average T_m for each amplicon. The sensitivity of the method was demonstrated using dilutions of reference DNA in a 1:5 factor curve followed by amplification with specific primers. Each curve was constructed and amplified twice, totalizing four replicates of each point. The amplification efficiencies, slopes and R^2 values were calculated using the 7500 Software and the limits of detection (LOD) were observed for each target. According to the technical report from the European Network of GMO Laboratories (ENGL, 2015), LOD can be defined as the lowest concentration of the analyte in a sample which can be reliably detected. Here, the LOD was considered as the lowest DNA concentration that resulted in positive amplifications (Ct value ≤ 30) on all replicates. The specificity of method, besides the BLASTN analyses of primers, was tested by amplifications containing species-specific primers and DNA from the nine other non-target species from this study.

3.1.7 Test application on reference meat mixtures and commercial samples

The accuracy of the method for correctly detecting the meats present in known mixed samples was evaluated by testing the 46 reference meat mixtures using the complete ten-species panel and IPC. The analysis consisted of checking the presence or absence of amplification followed by melt curve analysis of fragments. The repeatability of the method was verified by testing the replicates of the selected meat mixtures (ten samples).

In order to demonstrate the performance of the present method on the analysis of products subjected to different meat processing and compositions, the 14 commercially available products were analyzed following the defined methodology for ten-species detection.

Aiming to evaluate the test reproducibility, the experiments with reference meat mixtures and commercial products were performed in both laboratories participating in this study (LGEV and MYLEUS). The interlaboratory comparison was carried out by splitting common samples, followed by independent DNA extraction and amplification. In the case of the replicated mixtures, the tests were performed using the same DNA extract followed by independent analyses. The results were compared in respect of the species detected in each sample.

3.2 RESULTS AND DISCUSSION

The method for ten-species detection developed in the present study is based on the principles of species-specific real-time PCR, combined with amplification of a *CytB* gene fragment by universal primers (used here as IPC) and the use of melt curve analysis for amplicon check. Several real-time PCR methods are available for species detection in meat and meat products, most of them concerning the use of TaqMan probes (Zhang et al., 2007; Cammà et al., 2012; Kesmen et al., 2012; Drummond et al., 2013; Kim et al., 2016). Some methods are based on the DNA intercalating dye SYBR green to detect pork in poultry meat products (Soares et al., 2013) and bovine and poultry in foodstuffs (Safdar and Junejo, 2015). A few publications are focused on the use of EvaGreen dye to identify pork and horse meat (Sakalar et al., 2015) and to detect beef and soybean in sausages (Safdar and Abasıyanık, 2013), for example. To the best of our knowledge, this is the first study to use the real-time PCR and melt curve analysis using an SYTO fluorescence dye to detect animal species in meat products. The SYTO-9 was chosen here as the reporter dye for real-time PCR assays because it offers lower PCR inhibition, higher melting curve reproducibility and easier use compared to the commonly used SYBR Green I (Monis et al., 2005; Gudnason et al., 2007; Eischeid, 2011). The green SYTO dyes (including the SYTO-9) also represents a good alternative to EvaGreen for real-time PCR (Eischeid, 2011).

The melting profiles and observed T_m values from reference samples obtained in this study are shown in Figure 1. The species-specific assays displayed single peaks and a low deviation on T_m measurements for each species (Figure 1). Each primer pair showed no cross-reactivity when tested against non-target DNA from the other species in this study (data not shown). The IPC reactions have presented melting peaks at different T_m among species, ranging from 76.08°C (*O. aries*) to 78.96°C (*G. gallus*) (Figure1). Considering an expected fragment length of 126 bp for all species, this wide range of T_m values can be attributed to the sequence composition of

CytB gene fragment among species, since T_m depends on both length and guanine-cytosine (GC) content (Druml and Cichna-Markl, 2014). The IPC was included in the method for analysis of unknown samples in order to confirm the presence of amplifiable DNA from *CytB* gene, thereby identifying possible failures in DNA extraction. The IPC can also act as a preliminary screening of species not covered by the ten-species panel when an unknown sample is positive for IPC but negative for species-specific assays. In this case, further analysis is required to identify the species of the unexpected content, e.g. sequencing of the amplification product to provide detailed information of the differences at nucleotide level as suggested by Jaakola et al. (2010) and Naue et al. (2014).

In this way, the detection of a species in this study is based on the presence of IPC amplification combined with the presence/absence of amplification by specific primers on real-time PCR. The melting profiles were observed in every reaction to confirm the specificity of the PCR products.

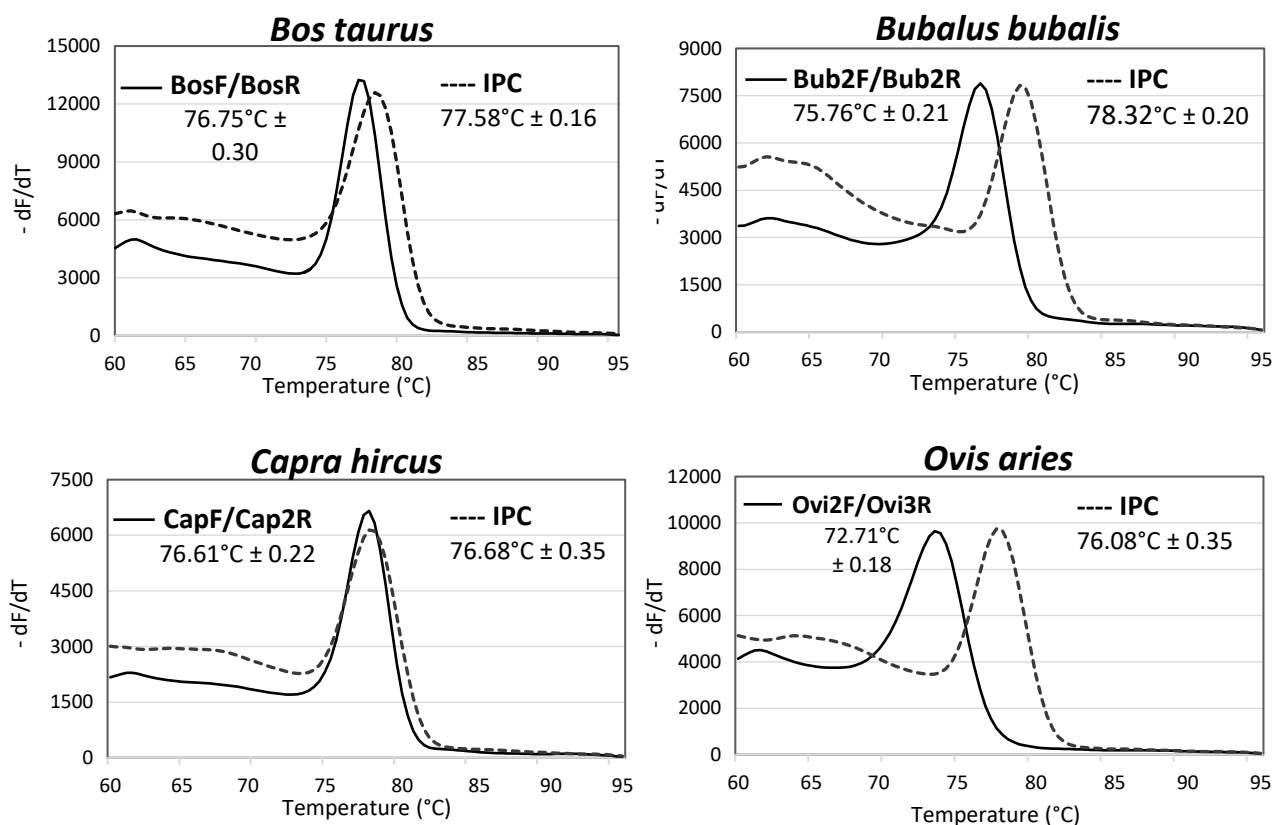


Figure 1. Melting profiles from species-specific (solid lines) and IPC (dashed lines) real-time PCR assays for each species. The charts show the negative derivative of the fluorescence (F) over temperature (T) (- dF/dT) against the temperature. The melting temperature values are average \pm standard deviation for 2-3 independent experiments.

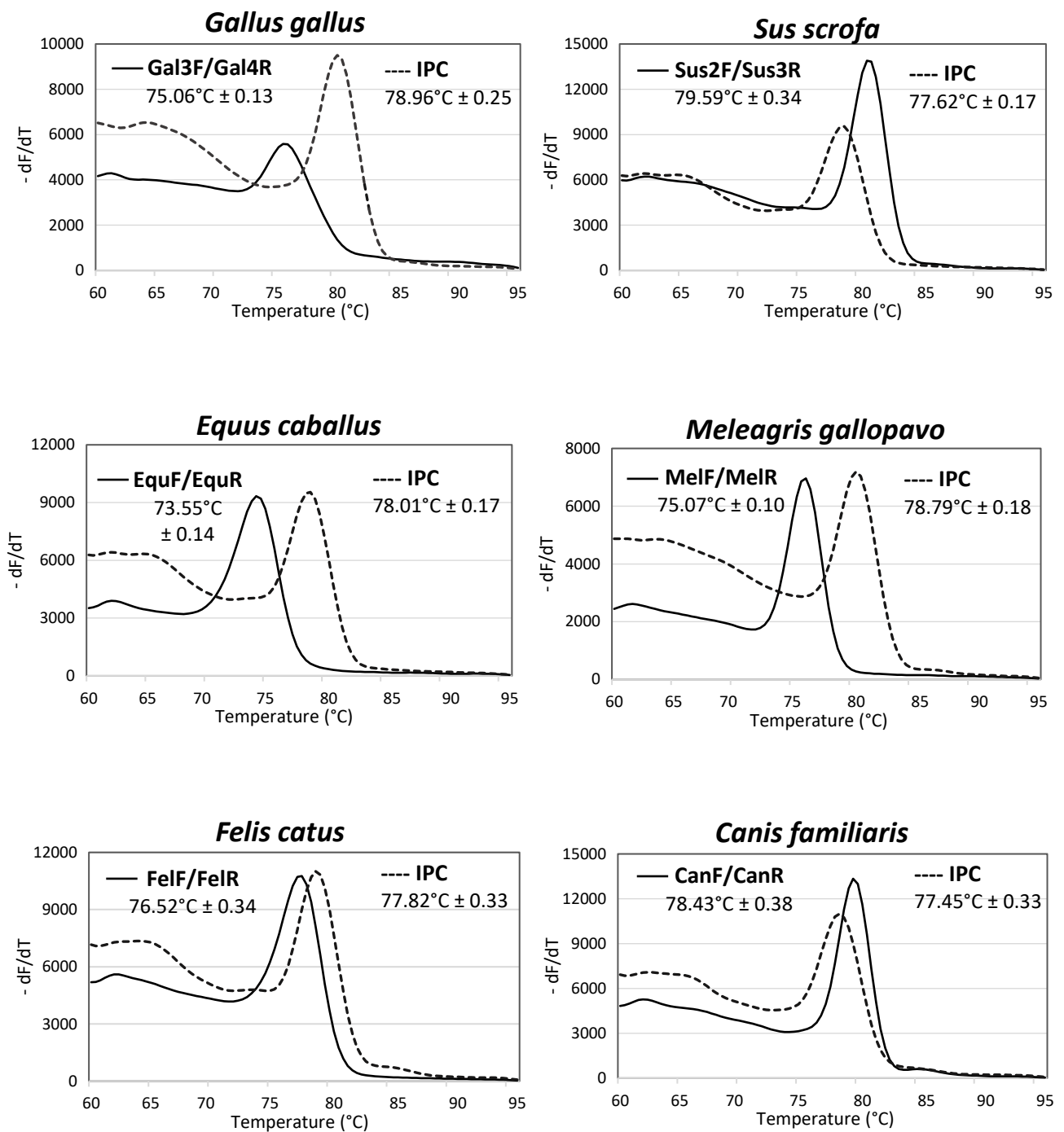


Figure 1. (Continuation) Melting profiles from species-specific (solid lines) and IPC (dashed lines) real-time PCR assays for each species. The charts show the negative derivative of the fluorescence (F) over temperature (T ; $-dF/dT$) against the temperature. The melting temperature values are average \pm standard deviation for 2-3 independent experiments.

3.2.1 Method sensitivity

The amplification sensitivity and limits of detection for species-specific reactions were evaluated using two eight-point dilution curves (1:5 factor) from 32 ng to 0.41 pg of each target DNA in Milli-Q water, a total of four replicates of each point. The 7500 Software calculated the amplification efficiency (E) for each set of primers according to equation: $E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$. The efficiencies were satisfactory, ranging from 94.67% to 104.35%, with the determination coefficient (R^2 value) above 0.99 for all targets. The LOD (lowest DNA amount detected as positive on all four replicates) ranged from 2.05 to 10.24 pg of target DNA in a reaction, demonstrating the high sensitivity of the method in detecting small amounts of DNA. The slopes, E , R^2 values and limit of detection are presented in Table 2. The standard curve for each species are shown in Fig. A.2 (Supplementary Material).

Table 2 - Data from efficiency experiments of species-specific real-time PCR assays

Species	Slope	<i>E</i> (%)	R ²	LOD (pg) ^a
<i>Bos taurus</i>	- 3.40	96.8	0.999	2.05
<i>Sus scrofa</i>	- 3.22	104.4	0.999	10.24
<i>Equus caballus</i>	- 3.35	99.0	0.997	2.05
<i>Bubalus bubalis</i>	- 3.34	99.2	0.998	10.24
<i>Gallus gallus</i>	- 3.15	107.8	0.997	10.24
<i>Capra hircus</i>	- 3.23	104.2	0.997	10.24
<i>Ovis aries</i>	- 3.36	98.4	0.998	10.24
<i>Meleagris gallopavo</i>	- 3.28	101.8	0.997	10.24
<i>Felis catus</i>	- 3.33	99.4	0.999	2.05
<i>Canis familiaris</i>	- 3.28	101.7	0.997	2.05

^aThe LOD (limit of detection) is the lowest DNA concentration detected (Ct value \leq 30) on all replicates.

3.2.2 Reference mixtures

The 46 reference meat mixtures prepared for this study were analyzed following the developed method for ten-species detection. The species detection for all mixtures was identical in the two laboratories and in accordance with the expected for each one (Table 3). The IPC reactions were positive on all mixtures, reinforcing the presence of amplifiable DNA in samples, with T_m within the range obtained for pure reference samples (76.08 to 78.96°C, Figure 1). The species-specific real-time PCR assays correctly detected the DNA from the species present in all mixtures (Table 3) and the melting curve results matched the expectations for each one (as exemplified on Figure 2), indicating that the T_m and specificity of the peaks are not affected by the presence of non-target DNA. Reactions to absent meat species in a mixture presented, in all tests, negative results, confirming the absence of these species DNA (data not shown). Such results provide evidence of the developed method's sensitivity in detecting species present in only 1% of the total mixed sample content.

Table 3 - Composition of reference meat mixtures and species detected by real-time PCR method performed in LGEV and MYLEUS laboratories

Mixture n°	Meat species (w/w %)	Species detected	
		LGEV	MYLEUS
1	beef, horse (50, 50)	beef, horse	beef, horse
2	beef, horse (99, 1)	beef, horse	beef, horse
3	beef, pork (50, 50)	beef, pork	beef, pork
4	beef, pork (99, 1)	beef, pork	beef, pork
5 ^a	beef, chicken (50, 50)	beef, chicken	beef, chicken
6	beef, chicken (99, 1)	beef, chicken	beef, chicken
7	chicken, turkey (50, 50)	chicken, turkey	chicken, turkey
8	turkey, chicken (99, 1)	chicken, turkey	chicken, turkey
9	beef, cat (50, 50)	beef, cat	beef, cat
10 ^a	beef, cat (99, 1)	beef, cat	beef, cat
11 ^a	beef, dog (50, 50)	beef, dog	beef, dog
12 ^a	beef, dog (99, 1)	beef, dog	beef, dog
13	beef, buffalo (50, 50)	beef, buffalo	beef, buffalo
14	beef, buffalo (99, 1)	beef, buffalo	beef, buffalo
15	beef, buffalo (1, 99)	beef, buffalo	beef, buffalo
16	beef, goat (50, 50)	beef, goat	beef, goat
17 ^a	beef, goat (1, 99)	beef, goat	beef, goat
18	beef, lamb (50, 50)	beef, lamb	beef, lamb
19	beef, lamb (1, 99)	beef, lamb	beef, lamb
20	goat, lamb (99, 1)	goat, lamb	goat, lamb
21	goat, lamb (1, 99)	goat, lamb	goat, lamb
22 ^a	pork, goat (1, 99)	pork, goat	pork, goat
23	pork, lamb (1, 99)	pork, lamb	pork, lamb
24	chicken, lamb (99, 1)	chicken, lamb	chicken, lamb
25	beef, lamb (99, 1)	beef, lamb	beef, lamb
26	pork, lamb (99, 1)	pork, lamb	pork, lamb
27	turkey, chicken (1, 99)	turkey, chicken	turkey, chicken

Table 3 - (Continuation) Composition of reference meat mixtures and species detected by real-time PCR method performed in LGEV and MYLEUS laboratories

Mixture n ^o	Meat species (w/w %)	Species detected	
		LGEV	MYLEUS
28	turkey, pork (1, 99)	turkey, pork	turkey, pork
29	chicken, pork (50, 50)	chicken, pork	chicken, pork
30	chicken, lamb (50, 50)	chicken, lamb	chicken, lamb
31 ^a	horse, pork (50, 50)	horse, pork	horse, pork
32	horse, lamb (50, 50)	horse, lamb	horse, lamb
33	lamb, pork (50, 50)	lamb, pork	lamb, pork
34	chicken, pork (1, 99)	chicken, pork	chicken, pork
35	chicken, lamb (1, 99)	chicken, lamb	chicken, lamb
36	beef, chicken (1, 99)	beef, chicken	beef, chicken
37 ^a	beef, pork (1, 99)	beef, pork	beef, pork
38	horse, pork (1, 99)	horse, pork	horse, pork
39	horse, lamb (1, 99)	horse, lamb	horse, lamb
40	pork, chicken (1, 99)	pork, chicken	pork, chicken
41	cat, pork (1, 99)	cat, pork	cat, pork
42 ^a	cat, lamb (1, 99)	cat, lamb	cat, lamb
43 ^a	dog, pork (1, 99)	dog, pork	dog, pork
44	dog, lamb (1, 99)	dog, lamb	dog, lamb
45	goat, beef (1, 99)	goat, beef	goat, beef
46	all ten species (10 each)	beef, pork, horse, chicken, goat, lamb, buffalo, turkey, cat and dog	beef, pork, horse, chicken, goat, lamb, buffalo, turkey, cat and dog

^a Mixtures n^o 5, 10, 11, 12, 17, 22, 31, 37, 42 and 43 were prepared, extracted and analyzed for a second time for verification of method repeatability, presenting the same shown results.

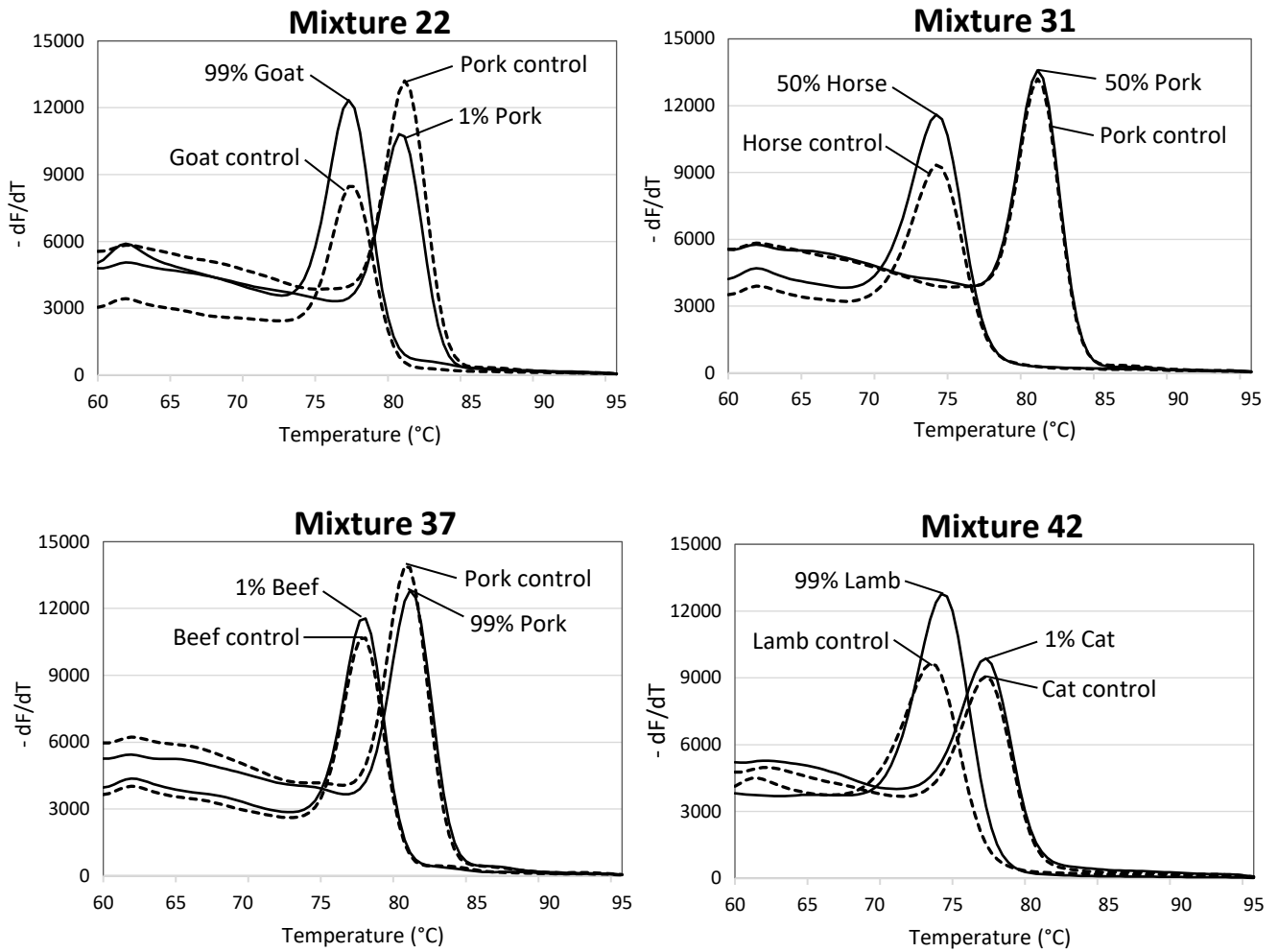


Figure 2. Melting profiles from species-specific real-time PCR assays of reference meat mixtures n° 22, 31, 37 and 42. The charts show the negative derivative of the fluorescence (F) over temperature (T ; $-dF/dT$) against the temperature. Solid lines indicate melting profiles from positive reactions of target species (proportions are indicated as w/w). Dashed lines indicate melting profiles from positive control amplification for each species.

3.2.3 Commercial samples

The method for ten-species detection was successfully applied for analysis of commercially available meat products, presenting the same results on both laboratories. The IPC reactions were positive for all samples and T_m within the expected range (76.08 to 78.96°C). The method detected the presence of genetic material from all reported species on product labels, with the exception of sample 8, whose presence of indicated beef content was not detected (Table 4). The method also detected the presence of bovine DNA in samples 1, 4 and 11, and chicken DNA in samples 11, 12, 13 and 14 (Table 4). Those species were not declared on the labels, indicating possible fraud by adding beef and/or chicken material in these products.

These findings are part of a high rate of adulterated meat products that have been reported by several studies worldwide. Chen et al. (2010), for example, reported beef products sold as Yak meat products in China, Soares et al. (2013) detected undeclared pork content on poultry products in Portugal and Mousavi et al. (2015) detected undeclared chicken content in meat products in Iran, besides, of course, the horsemeat scandal in commercial meat products across Europe in 2013 (Premanandh, 2013).

Table 4 - Application of the method on commercial meat products

Sample n°	Product description	Species declared	Species detected	
			LGEV	MYLEUS
1	Hamburger	lamb	lamb, beef	lamb, beef
2	SteakBurger	beef	beef	beef
3	Hamburger	beef	beef	beef
4	Lamb sausage	lamb	lamb, beef	lamb, beef
5	Hamburger	beef	beef	beef
6	Nugget	chicken	chicken	chicken
7	Salami	pork and cow milk	pork, beef	pork, beef
8	Hot-dog sausage	beef, pork and poultry	pork, chicken	pork, chicken
9	Smoked chicken breast	chicken	chicken	chicken
10	Calabrese sausage	pork and poultry (chicken and/or turkey)	pork, chicken	pork, chicken
11	Canadian bacon	pork	pork, beef, chicken	pork, beef, chicken
12	Beef meatballs	beef	beef, chicken	beef, chicken
13	Pork sausage	pork	pork, chicken	pork, chicken
14	Guanabara sausage	pork	pork, chicken	pork, chicken

3.3 CONCLUSION

Recent cases of fraud in meat products have raised significant attention to food safety and control, as meat adulterations can cause trade embargoes and even endanger public health. In 2017, Brazil's chicken and beef exports stopped when the Brazilian police found meat plants bribing inspectors to ignore contaminated or unacceptable meat in a probe called "Operation Weak Flesh". The impact on the global market was huge, as Brazil is the world's largest beef exporter. Although the Brazil's main markets have reopened their doors, doubts about the meat quality still persists. In this study, real-time PCR and melt curve analyses were employed to develop a novel method for species detection and authentication control of meat products. The internal positive control (IPC) was added to the method aiming to detect amplifiable DNA from *CytB* gene by universal primers, regardless of the present species. The accuracy of the ten-species detection method was attested by experiments conducted in two laboratories, wherein the results showed high consistency, indicating that the method is highly reproducible. The analyses of commercial products, besides confirming the accuracy of the method in interlaboratory analyses, revealed nonconformities in meat products available to consumers in Brazil: undeclared bovine and chicken material were detected in six of the fourteen analyzed products. These findings reinforce the demand for tests aimed at detecting fraud by addition or replacement of species in meat products, ensuring the quality and safety of these products for the entire food industry - producers to consumers. The method proposed here can play an important role in controlling the origin and quality of meat products.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. Eduardo Bastianetto and Dra. Aurora Maria G. Gouveia for their valuable contributions to this work.

DISCLOSURE STATEMENT

The method described here is the subject of the patent document BR 10 2016 017282 9 at Brazilian Patent Office (INPI - www.inpi.gov.br) and is protected under Brazilian regulations.

FUNDING SOURCE

This work was supported by the Brazilian agencies CNPq (INCT 573899/2008-8) and FAPEMIG (INCT APQ-0084/08, APQ-00505-13, APQ-03349-13 and BDP-00355-14). The funders had no role in study design, data collection, analyses and interpretation, writing or decision to publish.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

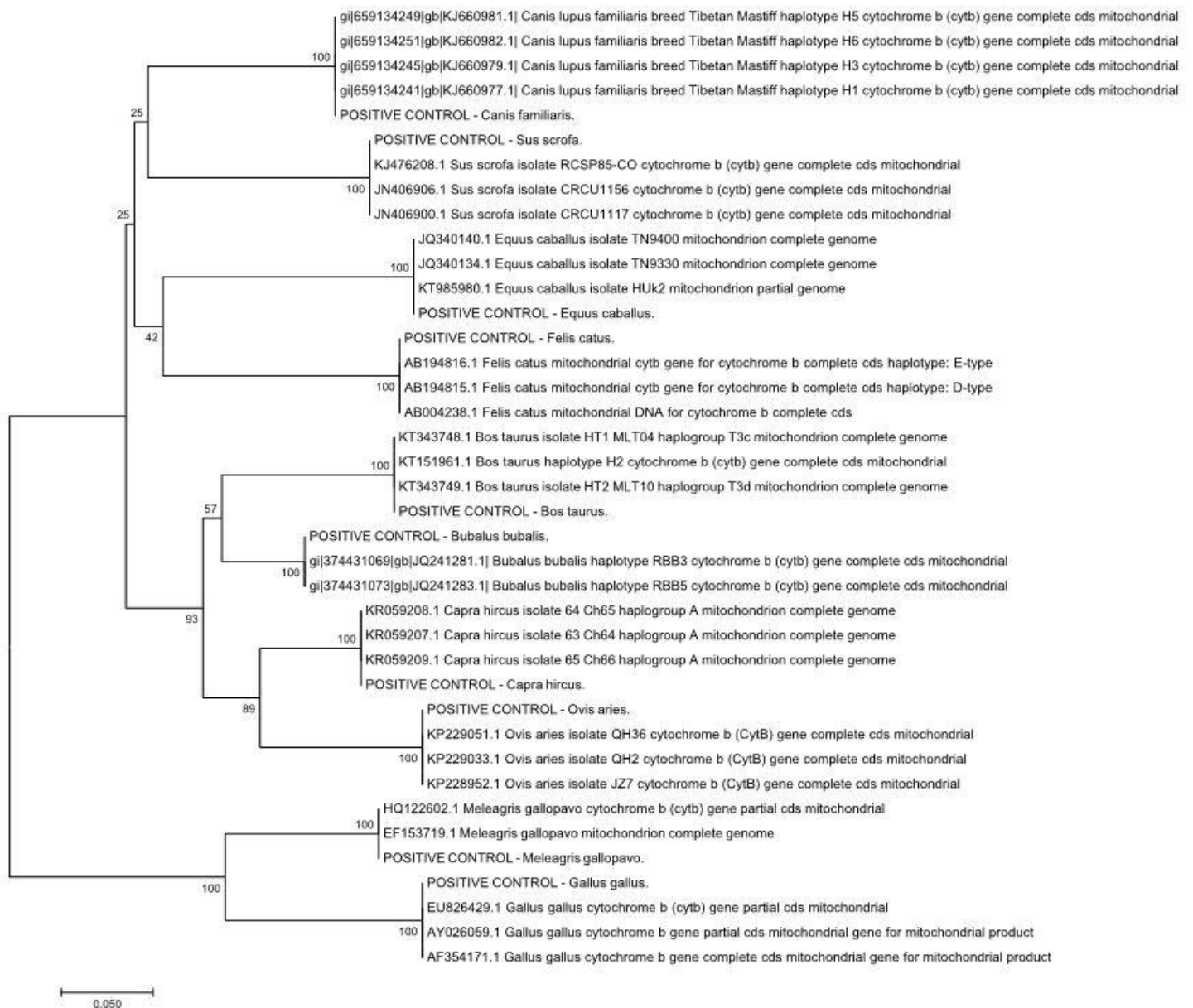


Figure A.1. Evolutionary relationships of taxa. The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method. The optimal tree with the sum of branch length = 1.25278201 is shown. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (3000 replicates) are shown next to the branches. The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. The evolutionary distances were computed using the Maximum Composite Likelihood method and are in the units of the number of base substitutions per site. All positions containing gaps and missing data were eliminated. There was a total of 228 positions in the final dataset.

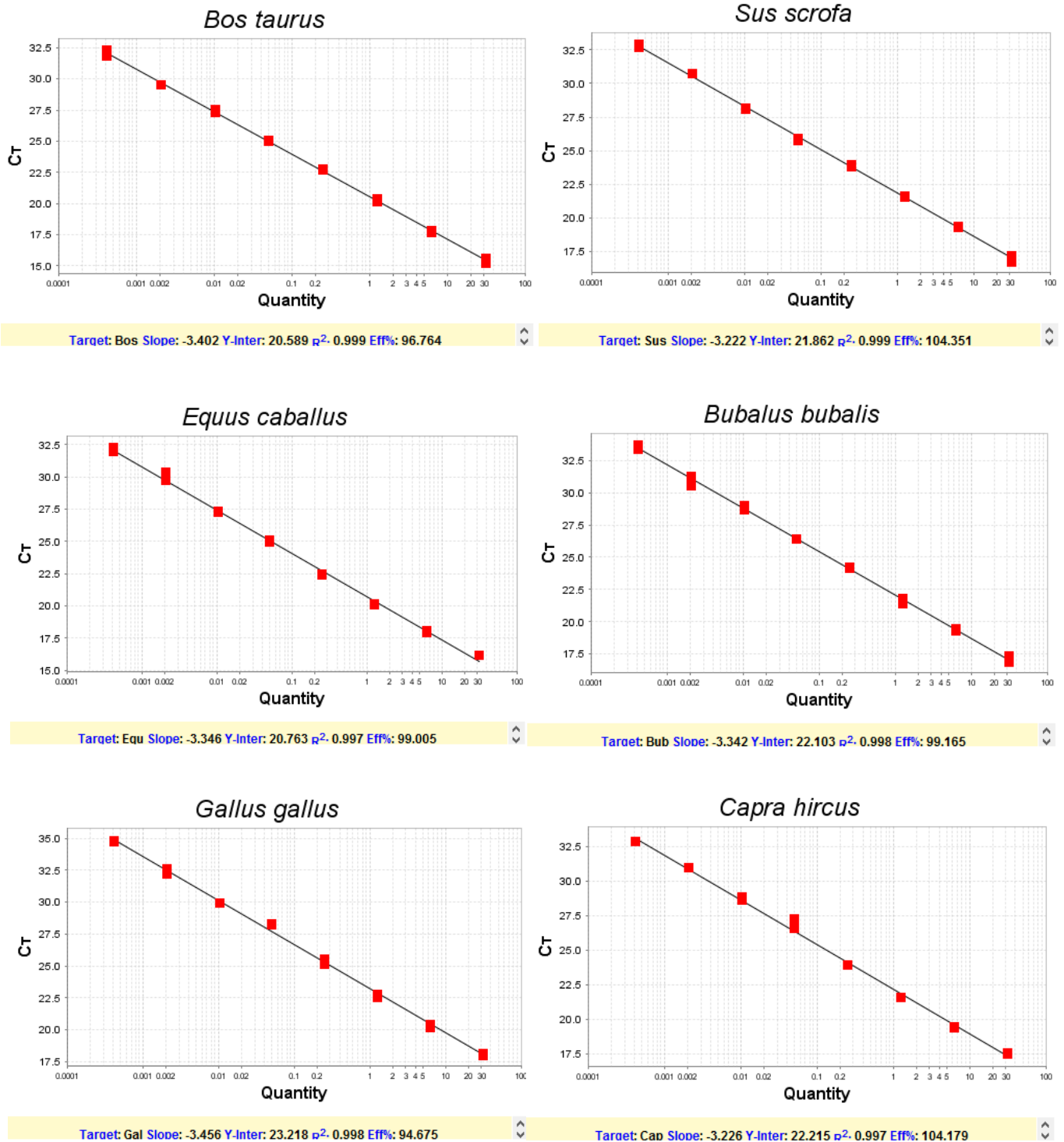


Figure A.2. Standard curve for *Bos taurus*, *Sus scrofa*, *Equus caballus*, *Bubalus bubalis*, *Gallus gallus*, *Capra hircus*, *Ovis aries*, *Meleagris gallopavo*, *Felis catus* and *Canis familiaris*. The curves were obtained by dilutions (1:5 factor) of pure DNA from each species and amplified with specific primers (Target). The 7500 Software plotted the curve (DNA quantity against the Ct) and calculated the Slope, Y-intercept (Y-Inter), determination coefficient (R^2) and the amplification efficiency (Eff%) for each species.

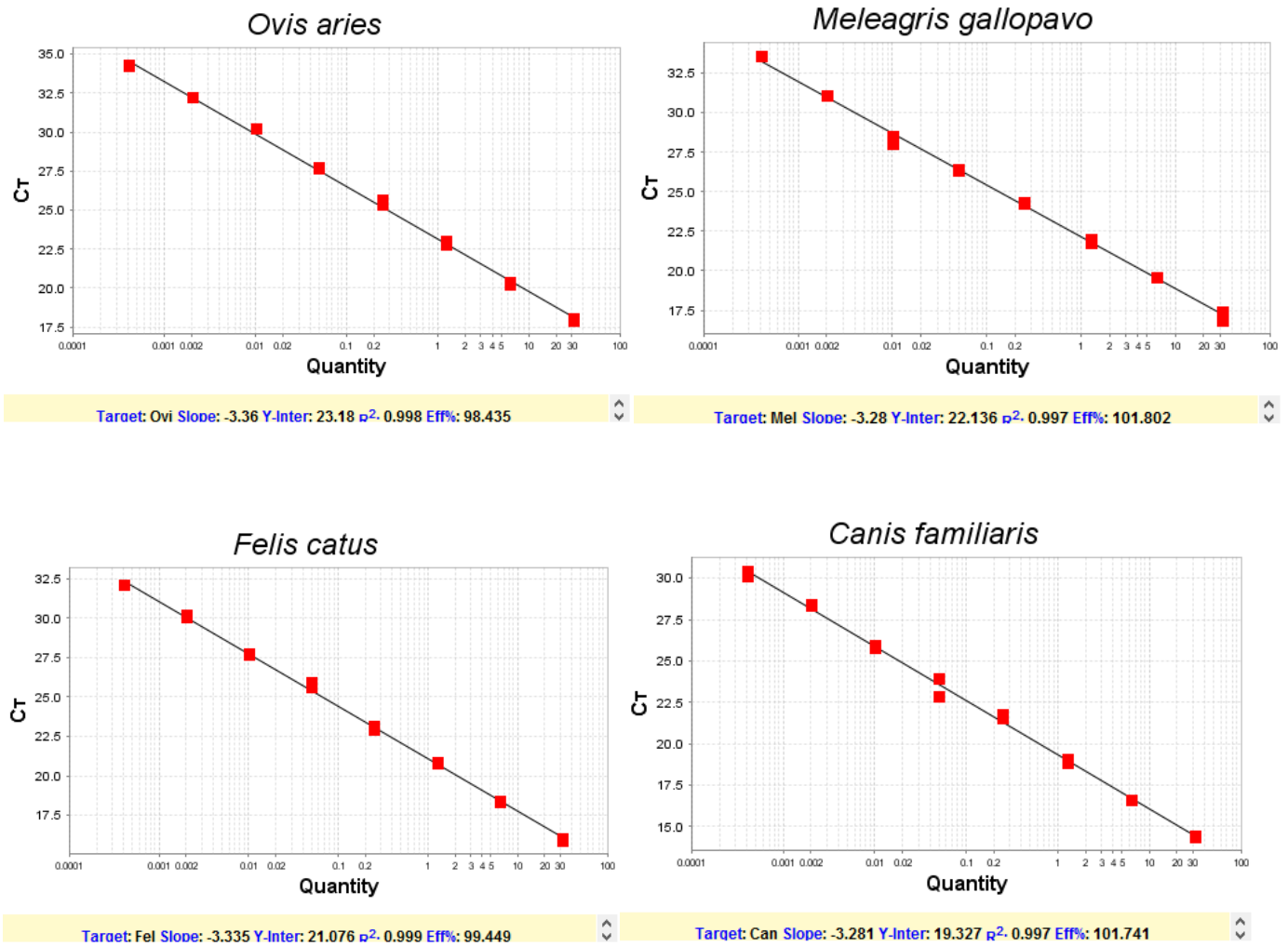


Figure A.2. (Continuation) Standard curve for *Bos taurus*, *Sus scrofa*, *Equus caballus*, *Bubalus bubalis*, *Gallus gallus*, *Capra hircus*, *Ovis aries*, *Meleagris gallopavo*, *Felis catus* and *Canis familiaris*. The curves were obtained by dilutions (1:5 factor) of pure DNA from each species and amplified with specific primers (Target). The 7500 Software plotted the curve (DNA quantity against the Ct) and calculated the Slope, Y-intercept (Y-Inter), determination coefficient (R^2) and the amplification efficiency (Eff%) for each species.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O grande número de estudos em todo o mundo que relatam casos de substituição de espécies em alimentos evidencia que este é um problema generalizado. As consequências desse tipo de fraude são graves, com impactos negativos para governos, produtores, meio ambiente e principalmente consumidores. Além da perda econômica e do risco de se ingerir ingredientes perigosos, os consumidores podem perder a confiança na autenticidade de certos produtos, uma vez que a fraude é divulgada. Com isso, toda a cadeia de produção se desestabiliza e os prejuízos podem ser irreversíveis. Dessa forma, a crescente demanda por políticas de proteção aos consumidores, quanto à garantia da origem da matéria-prima e à rotulagem adequada de alimentos, tem estimulado o desenvolvimento de métodos de controle capazes de detectar adulterações e falsificações.

No presente trabalho foi desenvolvido um método eficaz e confiável para uma rotina de detecção de espécies em produtos de origem animal. O teste é composto de um painel de dez espécies animais e poderá ser expandido para abranger outras espécies, caso exista a demanda. Apesar de o método ter sido validado para análise de carnes e produtos cárneos, resultados preliminares de experimentos conduzidos no Laboratório de Genética da Escola de Veterinária (UFMG) indicam que o teste desenvolvido pode ser aplicado para análise de leite e derivados lácteos utilizando a mesma metodologia, com pequenas adequações. O teste também já foi aplicado na análise de produtos lácteos comerciais de cabra e ovelha e relevou que alguns destes possuíam a presença de material bovino em sua composição, de forma não declarada na rotulagem. Esses achados indicam, portanto, que há uma demanda e uma urgência pela metodologia desenvolvida no presente trabalho e a necessidade do direcionamento de políticas públicas de controle da autenticidade de produtos de origem animal.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIDA, A. A.; CHE MAN, Y. B.; RAHA, R. B. et al. Detection of pig derivatives in food products for halal authentication by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.87, p.569-572, 2007.

ALI, E.; RAZZAK, A.; HAMID, S. B. et al. Multiplex PCR assay for the detection of five meat species forbidden in Islamic foods. *Food Chemistry*, v.177, p.214-224, 2015.

AMARAL, J. S.; SANTOS, C. G.; MELO, V. S. et al. Authentication of a traditional game meat sausage (Alheira) by species-specific PCR assays to detect hare, rabbit, red deer, pork and cow meats. *Food Research International*, v.60, p.140-145, 2014.

BALLIN, N. Z.; VOGENSEN, F. K.; KARLSSON, A. H. Species determination - Can we detect and quantify meat adulteration? *Meat science*, v.83, n.2, p.165-174, 2009.

BALLIN, N. Z. Authentication of meat and meat products. *Meat science*, v.86, p.577-587, 2010.

BERTOLINI, F.; GHIONDA, M. C.; D'ALESSANDRO, E. et al. A Next Generation Semiconductor Based Sequencing Approach for the Identification of Meat Species in DNA Mixtures. *PLoS ONE*, v.10, e0121701, 2015.

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

BRASIL, Lei nº 8.078, de 11 de setembro de 1990. Código de proteção e defesa do consumidor e legislação correlata. *Distrito Federal*, Brasília: Senado Federal, Subsecretaria de Edições Técnicas, 2012. 5. ed., 106 p. Disponível em: <https://www2.senado.leg.br/bdsf/bitstream/handle/id/496457/000970346.pdf?sequence=1>.

Acesso em: 21 de fevereiro de 2018.

BRASIL, Decreto-Lei nº 2.848, de 7 de dezembro de 1940. Código Penal. *Distrito Federal*, Brasília, 1984. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto-lei/Del2848compilado.htm Acesso em: 21 de fevereiro de 2018.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. *Distrito Federal, Brasília, 2017. Disponível em: <http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=30/03/2017&jornal=1&pagina=3&totalArquivos=240>. Acesso em: 21 de fevereiro de 2018.*

CALVANO, C. D.; DE CEGLIE, C.; ARESTA, A. et al. MALDI-TOF mass spectrometric determination of intact phospholipids as markers of illegal bovine milk adulteration of high-quality milk. *Analytical Biochemistry*, v.405, p.1641-1649, 2013.

CAMMÀ, C.; DOMENICO, M.; MONACO, F. Development and validation of fast Real-Time PCR assays for species identification in raw and cooked meat mixtures. *Food Control*, v.23, p.400-404, 2012.

CAWTHORN, D.; STEINMAN, H. A.; HOFFMAN, L. C. A high incidence of species substitution and mislabelling detected in meat products sold in South Africa. *Food Control*, v.32, p.440-449, 2013.

CHEN, S.; LIU, Y.; YAO, Y. Species authentication of commercial beef jerky based on PCR-RFLP analysis of the mitochondrial 12S rRNA gene. *Journal of Genetics and Genomics*, v.37, p.763-769, 2010.

CLARK, L. F. The current status of DNA barcoding technology for species identification in fish value chains. *Food Policy*, v.54, p.85-94, 2015.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. Strategic framework 2003-2007. *24th Session of the Codex Alimentarius Commission, 2001. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/004/y2361e/y2361e00.pdf> 21 de fevereiro de 2018. 18p.*

DALSECCO, L. S. *Análise da ocorrência de substituição de matéria-prima e quantificação do material bovino em produtos de origem bubalina: desenvolvimento da técnica por pcr em tempo real*. 2013. 62f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

DEPARTMENT OF AGRICULTURE, FOOD AND THE MARINE. Equine DNA & mislabelling of processed beef investigation, 2013. Disponível em:

https://www.fsai.ie/uploadedFiles/Enforcement_and_Audit/Horse_Meat/Equine-DNA-DAFM-March-2013.pdf Acesso: 21 de fevereiro de 2018. 28p.

DODMAN, N.; BLONDEAU, N.; MARINI, A. M. Association of phenylbutazone usage with horses bought for slaughter: A public health risk. *Food and Chemical Toxicology*, v.48, p.1270-1274, 2010.

DRUML, B.; CICHNA-MARKL, M. High resolution melting (HRM) analysis of DNA - Its role and potential in food analysis. *Food Chemistry*, v.158, p.245-254, 2014.

DRUMMOND, M. G.; BRASIL, B. S. A. F.; DALSECCO, L. S. et al. A versatile real-time PCR method to quantify bovine contamination in buffalo products. *Food Control*, v.29, p.131-137, 2013.

EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, v.32, n.5, p.1792-1797, 2004.

EISCHEID A. C. SYTO dyes and EvaGreen outperform SYBR Green in real-time PCR. *BMC Research Notes*, 2011. Disponível em: <https://bmresnotes.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/1756-0500-4-263?site=bmresnotes.biomedcentral.com>. Acessado em: 21 de fevereiro de 2018. 5p.

ESPIÑEIRA, M.; VIEITES, J. M. Detection of dog and cat traces in food, pet food and farm animal feed by real-time PCR. *European Food Research and Technology*, v.241, p.233-238, 2015.

EUROPEAN COMMISSION. Food Fraud Network Activity Report, 2014. Disponível em: ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/official-controls_food-fraud_network-activity-report_2014.pdf. 21 de fevereiro de 2018. 3p.

EUROPEAN COMMISSION. Food Fraud Network Activity Report, 2015. Disponível em: ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/official-controls_food-fraud_network-activity-report_2015.pdf. 21 de fevereiro de 2018. 3p.

EUROPEAN COMMISSION. The EU Food Fraud Network and the System for Administrative Assistance & Food Fraud - Annual Report, 2016. Disponível em: ec.europa.eu/food/sites/food/

[files/safety/docs/food-fraud_network_activity_report_2016.pdf](#) Acesso: 21 de fevereiro de 2018. 19p.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA); EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA). Joint statement of EFSA and EMA on the presence of residues of phenylbutazone in horse meat. *EFSA Journal*, v.11, 2013. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2013.3190/epdf> Acesso: 21 de fevereiro de 2018. 45p.

EUROPEAN NETWORK OF GMO LABORATORIES (ENGL). Definition of Minimum Performance Requirements for Analytical Methods of GMO Testing. JRC Technical Report, 2015. Disponível em: http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/doc/MPR%20Report%20Application%202010_2015.pdf Acesso: 21 de fevereiro de 2018. 24p.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, v.39, p.783-791, 1985.

FLOREN, C.; WIEDEMANN, I.; BRENIG, B. et al. Species identification and quantification in meat and meat products using droplet digital PCR (ddPCR). *Food Chemistry*, v.173, p.1054-1058, 2015.

GANOPOULOS, I.; SAKARIDIS, I.; ARGIRIOU, A. et al. A novel closed-tube method based on high resolution melting (HRM) analysis for authenticity testing and quantitative detection in Greek PDO Feta cheese. *Food Chemistry*, v.141, p.835-840, 2013.

GROCERY MANUFACTURERS ASSOCIATION; A. T. KEARNEY. Consumer Product Fraud: Deterrence and Detection, 2010. Disponível em: <http://www.gmaonline.org/downloads/research-and-reports/consumerproductfraud.pdf> Acesso: 21 de fevereiro de 2018. 28p.

GUDNASON, H.; DUFVA, M.; BANG, D. D. et al. Comparison of multiple DNA dyes for real-time PCR: effects of dye concentration and sequence composition on DNA amplification and melting temperature. *Nucleic Acids Research*. DOI: 10.1093/nar/gkm671, 2007.

van HENGEL, A. J. Food allergen detection methods and the challenge to protect food allergic consumers. *Analytical Biochemistry*, v.389, p.111–118, 2007.

HRBEK, V.; VACLAVIK, L.; ELICH, O. Authentication of milk and milk-based foods by direct analysis in real time ionization-high resolution mass spectrometry (DART-HRMS) technique: A critical assessment. *Food Control*, v.36, p.138-145, 2014.

JAAKOLA, L.; SUOKAS, M.; HAEGGMAN, H. Novel approaches based on DNA barcoding and high-resolution melting of amplicons for authenticity analyses of berry species. *Food Chemistry*, v.12, n.2, p.494-500, 2010.

JAKES, W.; GERDOVA, A.; DEFERNEZ, M. et al. Authentication of beef versus horse meat using 60 MHz ¹H NMR spectroscopy. *Food Chemistry*, v.175, p.1-9, 2015.

KESMEN, Z.; YETIMAN, A. E.; SAHIN, F. et al. Detection of chicken and turkey meat in meat mixtures by using real-time PCR assays. *Journal of Food Science*, v.77, p.167-173, 2012.

KIM, M.; YOO, I.; LEE, S. et al. Quantitative detection of pork in commercial meat products by TaqMan® real-time PCR assay targeting the mitochondrial D-loop region. *Food Chemistry*, v.210, p.102-106, 2016.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, v.33, p.1870-1874, 2016.

LÓPEZ-CALLEJA, I.; GONZÁLEZ, I.; FAJARDO, V. et al. Real-time *TaqMan* PCR for quantitative detection of cows' milk in ewes' milk mixtures. *International Dairy Journal*, v.17, p.729-736, 2007.

LOPPARELLI, R. M.; CARDAZZO, B.; BALZAN, S. 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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.55, p.3429–3434, 2007.

MONIS, P. T.; GIGLIO, S.; SAINT, C. P. Comparison of SYTO9 and SYBR Green I for real-time polymerase chain reaction and investigation of the effect of dye concentration on amplification and DNA melting curve analysis. *Analytical Biochemistry*, v.340, p.24-34, 2005.

MOORE, J. C.; SPINK, J.; LIPP, M. Development and Application of a Database of Food Ingredient Fraud and Economically Motivated Adulteration from 1980 to 2010. *Journal of Food Science*, v.77, p.118-126, 2012.

MOUSAVI, S. M.; KHANIKI, G. J.; ESKANDARI, S. et al. Applicability of species-specific polymerase chain reaction for fraud identification in raw ground meat commercially sold in Iran. *Journal of Food Composition and Analysis*, v.40, p.47-51, 2015.

NAUE, J.; HANSMANN, T.; SCHMIDT, U. High-resolution melting of 12S rRNA and cytochrome *b* DNA sequences for discrimination of species within distinct European animal families. *PLoS ONE*, v.9, n.12, e115575, 2014.

NAVARRO, E.; SERRANO-HERAS, G.; CASTAÑO, M. J. et al. Real-time PCR detection chemistry. *Clinica Chimica Acta*, v.439, p.231-250, 2015.

NEJAD, F. P.; TAFVIZI, F.; EBRAHIMI, M. T. et al. Optimization of multiplex PCR for the identification of animal species using mitochondrial genes in sausages. *European Food Research and Technology*, v. 239, p.533-541, 2014.

PATEL, M. White Paper: Food Fraud and Food Safety. *Leatherhead Food Research*, 2013. Disponível em: <http://www.apinews.com/en/news/item/download/1532>. Acesso: 20 de setembro de 2017. 4p.

PREMANANDH, J. Horse meat scandal: A wake-up call for regulatory authorities. *Food Control*, v.34, p.568-569, 2013.

ROGBERG-MUÑOZ, A.; POSIK, D. M.; RÍPOLI, M. V. et al. Recent patents for detecting the species of origin in animal feedstuff, raw and processed meat products. *Recent Patents on Food, Nutrition, and Agriculture*, v.5, p.3-8, 2013.

SAFDAR, M.; ABASIYANIK, M. F. Development of fast multiplex real-time PCR assays based on EvaGreen fluorescence dye for identification of beef and soybean origins in processed sausages. *Food Research International*, v.54, p.1652-1656, 2013.

SAFDAR, M.; JUNEJO, Y. Development and validation of fast duplex real-time PCR assays based on SYBER Green fluorescence for detection of bovine and poultry origins in feedstuffs. *Food Chemistry*, v.173, p.660-664, 2015.

SAKALAR, E.; ERGÜN, S.; AKAR, E. 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*, v.35, p.382-388, 2015.

SAKARIDIS, I.; GANOPOULOS, I.; ARGIRIOU, A. et al. High resolution melting analysis for quantitative detection of bovine milk in pure water buffalo mozzarella and other buffalo dairy products. *International Dairy Journal*, v.28, p.32-35, 2013a.

SAKARIDIS, I.; GANOPOULOS, I.; ARGIRIOU, A. et al. A fast and accurate method for controlling the correct labeling of products containing buffalo meat using High Resolution Melting (HRM) analysis. *Meat Science*, v.94, p.84-88, 2013b.

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

SOARES, S.; AMARAL, J. S.; OLIVEIRA, M. B. P.P. et al. A SYBR Green real-time PCR assay to detect and quantify pork meat in processed poultry meat products. *Meat Science*, v.94, p.115-120, 2013.

SPINK, J.; MOYER, D. C. Defining the public health threat of food fraud. *Journal of Food Science*, v.76, p.157-163, 2011.

TAMURA, K.; NEI M.; KUMAR S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.101, p.11030-11035, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Food Allergies*. International Food Safety Authorities Network (INFOSAN). Information Note N°. 3/2006 – Food Allergies. 9 June 2006. Disponível em: www.who.int/foodsafety/fs_management/No_03_allergy_June06_en.pdf Acesso: 20 de setembro de 2017. 4p.

ZHANG, C. L.; FOWLER, M. R.; SCOTT, N. W. 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.