

Guilherme de Araújo Marcondes

**PRODUÇÃO DE ANTISSOROS ESPECÍFICOS PARA A DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE CARNES EM ALIMENTOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Ciência Animal pela Escola de Veterinária.

Curso: Mestrado em Ciência Animal  
Área: Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal

Orientadora: Dra. Prof. Silvana de Vasconcelos Cançado

Co-Orientador: Dr. Luiz Guilherme Dias Heneine

Belo Horizonte  
UFMG – Escola de Veterinária  
2011

M321p

Marcondes, Guilherme de Araújo, 1984-

Produção de antissoros específicos para a detecção e identificação de carnes em alimentos / Guilherme de Araújo Marcondes. – 2011.

39 p. : il.

Orientadora: Silvana de Vasconcelos Caçado

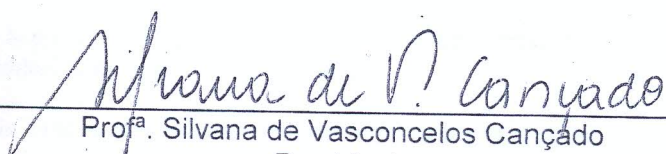
Co-orientador: Luiz Guilherme Dias Heneine

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária  
Inclui bibliografia

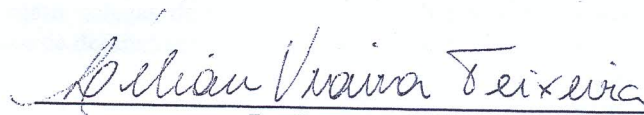
1. Carne – Análise – Teses. 2. Teste imunoenzimático – Teses. 3. Sorodiagnóstico – Teses. I. Caçado, Silvana de Vasconcelos. II. Heneine, Luiz Guilherme Dias. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. IV. Título.

CDD – 664.907

Dissertação defendida e aprovada em 21 de junho de 2011, pela Comissão Examinadora constituída por:

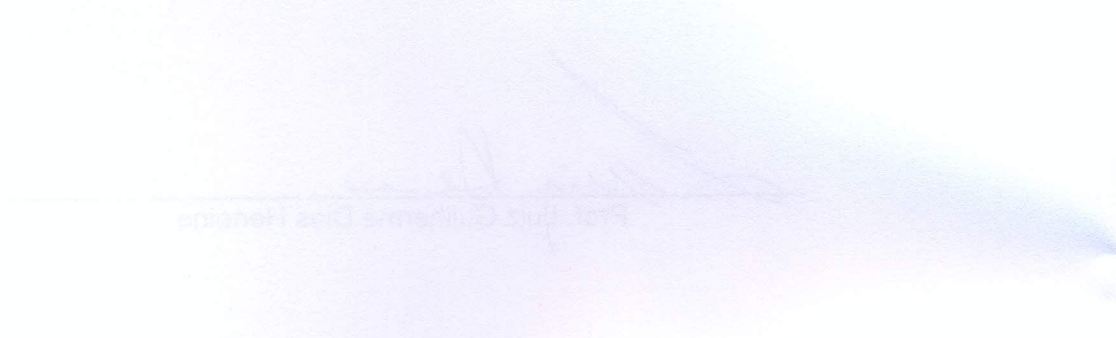
  
Prof<sup>a</sup>. Silvana de Vasconcelos Cançado  
Presidente

  
Prof. Luiz Guilherme Dias Heneine

  
Prof<sup>a</sup>. Lilian Vianna Teixeira

1984

*Miguel A. Alvarez*  
Prof. Sistema de Vacunación  
Presidencia



*Prof. Guillermo Díaz Hernández*

*Prof. Lilia Vázquez Texeira*

1984  
Cursos específicos para  
la zona de Araujo

Universidad  
de Veracruz

1984

Em primeiro lugar, agradeço a Deus pelas oportunidades, pelas vivências, pelas provações que causaram o meu engrandecimento através do aprendizado.

Aos meus pais, Francisco e Iracema, pelo carinho, dedicação, exemplo, paciência e conforto nos momentos de grandes dificuldades.

Aos meus irmãos Marcelo, Viviane e Gustavo, pelo companheirismo e pelos conselhos dados ao longo de minha trajetória.

Aos meus sobrinhos, Pedro e Filipe, pelos momentos de carinho incondicional, momentos de felicidade em dias muitas vezes nublados.

Aos meus cunhados Rodrigo e Ana Izabel, pela presença incontestável durante esta caminhada.

A minha orientadora, Dra. Prof. Silvana de Vasconcelos Cançado e ao meu co-orientador, Dr. Luiz Guilherme Dias Heneine pela orientação, direcionamento e auxílio em meu projeto.

Aos meus colegas de mestrado e de Laboratório de Imunologia da Fundação Ezequiel Dias, pelos momentos de descontração e pela oportunidade de convívio, amizade e estudo.

Ao Professor Francisco Carlos Faria Lobato, e ao funcionário Nelson Rodrigo da Silva Martins, ambos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, por disponibilizar as amostras de carnes e de soro utilizadas neste estudo.

Ao Cláudio Fonseca de Freitas, responsável pela Fazenda São Judas Tadeu, da FUNED, por de bom grado oferecer os carneiros utilizados neste estudo para imunizações; e ao responsável pela Unidade de Gerenciamento de Amostras da FUNED, Kleber Eduardo da Silva Batisata, por fornecer as amostras de hambúrgueres utilizadas por este estudo.

Agradeço a todos por fazerem parte da construção deste estudo, sem o qual a presença de vocês não seria possível.

## SUMÁRIO

	<b>RESUMO</b> .....	9
<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2.</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	12
2.1	A produção de carne no Brasil .....	12
2.2	Anticorpos .....	13
2.3	Antígenos .....	13
2.4	Imunoensaios .....	14
2.5	Métodos de Identificação de carnes de diferentes espécies .....	14
2.5.1	A microscopia óptica clássica .....	14
2.5.2	Eletroforese e técnicas de focalização isoeletrica .....	15
2.5.3	Métodos físico-químicos .....	15
2.5.3.1	Espectroscopia de Infravermelho (NIRS) .....	15
2.5.3.2	Cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) .....	16
2.5.4	Métodos moleculares/genéticos .....	16
2.5.5	Técnicas imunológicas .....	16
2.5.5.1	Imunodifusão em Gel de Agarose .....	16
2.5.5.2	Contra-Imunoeletroforese .....	16
2.5.5.3	Imunocromatografia .....	17
2.5.5.4	ELISA .....	17
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	18
3.1	Obtenção de amostras .....	18
3.2	Tratamento das amostras – Imunização .....	19
3.3	Obtenção de Anticorpos Específicos .....	19
3.4	Teste de Especificidade de Anticorpos Anti-espécie .....	20
3.5	Testes em Alimentos Processados (Hambúrgueres) .....	20
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	21
4.1	Especificidade de Anticorpos Não-adsorvidos Anti-espécie .....	21
4.2	Especificidade de Anticorpos Adsorvidos Anti-espécie .....	23
4.3	Especificidade dos antissoros em diluição seriada .....	25
4.4	Especificidade dos antissoros adsorvidos frente a diferentes concentrações de antígenos homólogos e heterólogos.....	29
4.5	Testes em Alimentos Processados (Hambúrgueres).....	31
4.6	Análise Estatística (Hambúrgueres).....	35
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	36
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	37

### LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Frequência do Antígeno de Boi em Marcas de Hambúrgueres .....	35
Tabela 2	Frequência do Antígeno de Cão em Marcas de Hambúrgueres .....	36
Tabela 3	Frequência do Antígeno de Cavalo em Marcas de Hambúrgueres .....	36
Tabela 4	Frequência do Antígeno de Coelho em Marcas de Hambúrgueres .....	36
Tabela 5	Frequência do Antígeno de Porco em Marcas de Hambúrgueres .....	36

### LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	ELISA. Incubação com antissoro in natura de boi; diluição seriada .....	21
Gráfico 2	Incubação com antissoro in natura de cão; diluição seriada .....	22
Gráfico 3	ELISA. Incubação com antissoro in natura de cavalo; diluição seriada .....	22
Gráfico 4	ELISA. Incubação com antissoro in natura de coelho; diluição seriada .....	23

Gráfico 5	ELISA. Incubação com adsorvido antissoro de boi; diluição seriada .....	24
Gráfico 6	Incubação com adsorvido antissoro de cão; diluição seriada .....	24
Gráfico 7	ELISA. Incubação com adsorvido antissoro de cavalo; diluição seriada .....	25
Gráfico 8	ELISA. Incubação com adsorvido antissoro de coelho; diluição seriada .....	25
Gráfico 9	ELISA. Diluição seriada do antissoro Anti-boi .....	26
Gráfico 10	ELISA. Diluição seriada do antissoro Anti-cão .....	27
Gráfico 11	ELISA. Diluição seriada do antissoro Anti-cavalo .....	27
Gráfico 12	ELISA. Diluição seriada do antissoro Anti-coelho .....	28
Gráfico 13	ELISA. Diluição seriada do antissoro Anti-porco.....	28
Gráfico 14	ELISA. Reação do antissoro anti-boi contra os soros homólogos e heterólogos .....	29
Gráfico 15	ELISA. Reação do antissoro anti-cão contra os soros homólogos e heterólogos .....	30
Gráfico 16	ELISA. Reação do antissoro anti-cavalo contra os soros homólogos e heterólogos .....	30
Gráfico 17	ELISA. Reação do antissoro anti-porco contra os soros homólogos e heterólogos .....	31
Gráfico 18	ELISA. Reatividade dos antissoros diante de alimentos processados (Hamburgueres).Neste gráfico, lotes de hambúrgueres compostos por carne de aves e bovina .....	32
Gráfico 19	Reatividade dos antissoros diante de alimentos processados (Hamburgueres).Neste gráfico, lotes de hambúrgueres compostos por carne de aves, bovina e gordura de suínos.....	32
Gráfico 20	Reatividade dos antissoros diante de alimentos processados (Hamburgueres).Neste gráfico, lotes de hambúrgueres compostos por carnes de aves, boi e porco.....	33
Gráfico 21	ELISA. Progresso da reatividade do antissoro de porco à medida que se adiciona o soro homólogo à composição de quatro amostras de hambúrguer .....	34
Gráfico 22	Reatividade dos antissoros diante de alimentos processados (Hamburgueres).Neste gráfico, lotes de hambúrgueres compostos por carne de frango .....	34
Gráfico 23	ELISA. Reatividade dos antissoros diante de alimentos processados (Hamburgueres).Neste gráfico, lotes de hambúrgueres compostos por carne de frango .....	35

---

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1	Estrutura Geral de um Anticorpo .....	13
Figura 2	Formatos de ensaios ELISA.....	18

## RESUMO

Antissoros espécie-específicos foram produzidos e testados pelo método imunológico de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), com o objetivo de demonstrar a capacidade de se verificar a origem de carnes de diferentes espécies de animais em produtos cárneos processados. Carnes de boi, cão, cavalo e coelho, bem como os soros de boi, cão, cavalo, coelho e porco, foram testados para provar esta imunoafinidade. Também foram realizados ensaios de imunoabsorbância em cinco marcas diferentes de hambúrgueres comercializados na região metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Os resultados demonstraram reatividade específica dos antissoros com seus antígenos homólogos, todavia, filtrados de músculos aquecidos dos animais reagiram de forma baixa, uma vez que suas proteínas foram altamente desnaturadas devido o aquecimento. Foi concluído que a metodologia de ELISA apresenta-se eficaz no controle de origem de carnes em produtos cárneos, sendo um método sensível e específico.

*Palavras-chave: ELISA, Produtos cárneos, Carnes, imunodiferenciação.*

## ABSTRACT

Species-specific antisera has been made and tested by ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) method, with the goal of demonstrating the capacity to verify origins of meat from different animal species in processed meat products. Bovine, dog, horse and rabbit meat, as well as bovine, dog, horse, rabbit and pig serum were tested to prove its immunospecificity in immunosorbent assay with five different hamburger products commercialized in the metropolitan region of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Results showed specific reactivity of the antisera with its homologous antigens, although heated muscle-tissue extracts of the animals, presented lower reactivity, probably because its proteins were highly denatured by heat. It has been concluded that the ELISA methodology could be applied in the control of meat origin in meat products, being a sensitive and specific method.

*Keywords: ELISA, Meat products, Meat, immunodiferenciation.*

Abstract of the 1975 Annual Meeting of the American Society for Microbiology, Washington, D.C., October 1-5, 1975. The meeting was held at the Washington Convention Center and was attended by approximately 1,000 microbiologists from around the world. The program included plenary sessions, symposia, and individual presentations. The topics covered a wide range of microbiological subjects, including immunology, molecular biology, and clinical microbiology. The meeting was a success and provided an excellent opportunity for scientists to exchange ideas and information.

ABSTRACT

The abstract section of the proceedings contains a summary of the key findings and presentations from the meeting. It covers a wide range of topics, including the latest research in immunology, molecular biology, and clinical microbiology. The abstracts are organized by topic and provide a concise overview of the current state of knowledge in each field. This section is an essential resource for researchers and students alike, providing a quick and easy way to stay up-to-date on the latest developments in microbiology.

- 1. Immunology: Recent advances in the understanding of the immune system and its role in disease.
- 2. Molecular Biology: New techniques for studying gene expression and regulation.
- 3. Clinical Microbiology: Advances in the diagnosis and treatment of infectious diseases.

## 1 - INTRODUÇÃO

No final dos anos 80 e início dos anos 90, a produção agropecuária internacional sofria com surtos cada vez mais constantes de casos de encefalopatia espongiforme bovina (*Bovine Spongiform Encephalopathy*, BSE), popularmente conhecida como “doença da vaca louca”. Casos foram amplamente divulgados em razão da sua transmissão a pessoas como uma nova variante da doença de Creutzfeldt – Jakob (vDCJ), que é caracterizada como uma doença degenerativa do cérebro, onde o tempo de sobrevida do paciente é de cerca de cinco meses. A doença fatal levou a óbito mais de 150 pessoas e, trouxe à tona a importância da garantia da autenticidade dos alimentos em escala global (Dall’Alba et al., 2004; Nitrini, 2001; Departamento de Saúde do Reino Unido, 2004).

Algumas espécies de carnes possuem restrições sérias ou até mesmo proibições em algumas culturas ou vertentes religiosas. No judaísmo, por exemplo, há uma parte da Torá dedicada à dieta dos seguidores desta religião, designando o termo *Kosher* como um código para os alimentos considerados corretos dentro do judaísmo, e proibindo, por exemplo, o consumo de carne de porco, crustáceos, e a mistura de carnes com leite e derivados, baseado em passagens do velho testamento bíblico. No islamismo, existem três classes destinadas à alimentação: o *Haram*, que é a orientação para alimentos proibidos entre os islâmicos, como o consumo de carne suína, cachorro, gato, cobra, tigre, insetos, animais carnívoros ou pratos preparados com qualquer tipo de sangue; o *Makruh*, código relacionado a alimentos que podem ser consumidos, embora não sejam os alimentos mais recomendáveis, como carne de cavalo entre outros; e o *Halal*, definição dada aos alimentos amplamente permitidos entre os muçulmanos, como carne de carneiro, ovelha, cabra, boi, vaca, frango, galinha, galo, desde que o animal tenha sido abatido seguindo os preceitos da religião islâmica.

O consumo de carnes apresenta questões de cunho social, sendo permitido ou proibido o seu consumo em algumas partes do mundo. Na Ásia, por exemplo, o consumo de carne de cães é bastante comum, porém deve-se ressaltar que é consumida uma raça em particular de cão, e esta raça, que é criada em fazendas específicas, existe

no continente asiático como criação para a indústria alimentícia.

A carne como alimento pode ser definida como todos os tecidos comestíveis de animais de açougue, englobando músculos, com ou sem base óssea, gorduras e vísceras, podendo os mesmos ser *in natura* ou processados, considerando como carnes vermelhas as carnes de bovinos, búfalos, ovinos, caprinos, suínos, eqüídeos e coelhos; e a carne branca como sendo carne proveniente de aves (galináceos e perus) e peixes (Brasil, 1997; EMBRAPA, acesso em 15 de abril de 2011).

A carne possui composição complexa tendo como principais constituintes proteínas musculares, sangue residual, material colagenoso, lipídios, pequenas quantidades de aminoácidos livres, enzimas, carboidratos e minerais. Ela pode se apresentar de diversas formas (cortada, processada e geralmente preparada a granel), cada uma oferecendo diferentes oportunidades para a adulteração e ou contaminação.

Os produtos de origem animal que foram adulterados, fraudados ou falsificados, segundo o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA, Brasil, 1997), são considerados impróprios para consumo, como um todo ou parte. São considerados fraudados os produtos em que tenham sido adicionadas substâncias de qualquer qualidade, espécie e tipo diferentes das de sua composição natural sem prévia autorização do Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

A adulteração de produtos cárneos não apenas constitui fraudes econômicas, mas também está relacionada com problemas de tabus religiosos, aversões de cunho moral ou alergias a espécies particulares de carne. Desta maneira, a identificação e a diferenciação de carnes das diferentes espécies visam, sobretudo, coibir a possibilidade de fraude e falsificação, quando a carne da espécie animal anunciada é substituída por outra de pior qualidade (Kesmen et al., 2007).

A possibilidade de substituição de carnes de determinados animais por outros na produção de

alimentos levam laboratórios e centros de pesquisa a criarem métodos de diagnóstico relevantes e cada vez mais específicos. Estes mesmos métodos são úteis para a saúde pública e também para discussões de razão ética e religiosa. Há um aumento da comercialização de produtos cárneos industrializados, onde o processo de fabricação altera suas características naturais e, dificulta sua identificação por inspeção visual e sensorial. Kits para exames de procedência de carnes, domésticos e comerciais baseados em ensaio imunoadsorvente ligado à enzima (ELISA) ou por reação em cadeia da polimerase (PCR) já se encontram disponíveis para este campo de estudo, mas suas performances ainda não são totalmente conhecidas (CTSCCV, 1997; Méret et al., 1998; Da-Riz & Demeulemester, 1999).

A identificação da espécie animal utilizada em um produto pode ser realizada pelas características morfológicas e físico-organolépticas, sempre que se trata da observação da carne e seus segmentos ou de órgãos e vísceras *in natura*. No entanto, em produtos picados, moídos ou processados é impositivo recorrer a métodos morfológicos, físicos e físico-organolépticos, pois o processo de fabricação altera as características naturais da carne e dificulta sua identificação por inspeção visual e sensorial (Patterson e Jones, 1990).

A cadeia de suprimentos de alimentos moderna é complexa e se amplia diuturnamente. A demanda por garantias de qualidade, segurança e autenticidade exigem a identificação de ingredientes e componentes individuais em alimentos formulados. Os aspectos éticos tais como: práticas específicas de produção (orgânico), tecnológicos (modificação genética), processuais (esterilização) ou religiosos associados à legislação (rotulagem) demandam tecnologias cada vez mais eficientes para monitorar e policiar a autenticidade e rastreabilidade de alimentos.

Com base nestes aspectos os objetivos deste trabalho foram demonstrar, através da metodologia de ELISA, a capacidade de se verificar a origem de carnes de diferentes espécies de animais em produtos cárneos processados.

## 2 - REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 - A produção de carne no Brasil

O Brasil detém o segundo maior rebanho bovino comercial do mundo e é o maior exportador mundial, além de ser o segundo em produção de equivalente em carcaça, perdendo apenas para os Estados Unidos da América. Aproximadamente 140 países compram a carne bovina brasileira, contudo, o esforço dos produtores brasileiros em relação à divulgação do produto para o mercado exterior é baixo, correndo altos riscos de perda de mercado por parte de países concorrentes em exportações como Argentina e Austrália. Apesar de sua supremacia na tonelagem de carne bovina exportada, o Brasil não exporta para mercados de alto valor agregado, pois, além dos constantes índices de febre aftosa nos rebanhos, a carne bovina brasileira não é considerada por muitos como um produto de alta qualidade. Apesar disso, há um constante debate com relação à qualificação que é dada à carne brasileira pelo mercado internacional (Luchiari Filho, 2006).

Com relação a produção de frango no Brasil, no ano de 2009 foram registradas a criação de 7,297 milhões de toneladas (3,228 bilhões de cabeças) direcionados ao consumo interno, registrando uma alta de 0,15% em relação ao ano anterior. A criação destinada ao mercado externo foi de 3,634 milhões de toneladas (2,02 bilhões de frangos abatidos), representando 33,3% do total produzido no país inteiro. Com relação à posição no ranking mundial de produtores, o Brasil detém o terceiro lugar, estando atrás dos Estados Unidos e China, além de estar em quarto em relação aos maiores consumidores de carne de frango, atrás destes mesmos países e da União Européia, constituindo todos os países formadores do bloco como um grupo único consumidor (UBA, 2009).

A carne suína é a proteína mais consumida no mundo, com uma produção de 115 milhões de toneladas, sendo quase a metade produzida na China e outro terço na União Europeia (UE) e nos Estados Unidos da América (EUA). A participação do Brasil tem crescido em importância no mercado mundial. O País é o quarto maior produtor, com 3% da produção e 11% das exportações. Em relação à sua produção interna, o Brasil tem acompanhado um

crescimento em relação à carne suína, com uma produção, em 2009, de cerca de 3,19 milhões de toneladas (ABIPECS, 2010).

## 2.2 - Anticorpos

Anticorpos são glicoproteínas (também conhecidas como imunoglobulinas; Ig) que são produzidos por animais vertebrados em resposta à introdução de um agente externo (antígeno), e que possui a habilidade de reconhecer este agente de forma específica e se ligar a ele (Fig. 1). Para se produzir anticorpos é necessário o uso de animais, pelo menos inicialmente (Krebs et al., 2001).

Os anticorpos podem ser produzidos sob o formato de anticorpos monoclonais e policlonais. Anticorpos policlonais são produzidos através das células de defesa do organismo, podendo atuar contra mais de um tipo de antígeno. Estes anticorpos possuem certas desvantagens como, por exemplo: produção limitada, afinidade variável, e vários requisitos para uma extensiva purificação com o objetivo de eliminar uma possível reatividade cruzada. Os anticorpos monoclonais, por sua vez, constituem uma população homogênea de anticorpos produzidos por hibridomas (células “imortalizadas” por um processo de conjugação de uma célula cancerosa com células do baço de um animal previamente imunizado, geralmente linhagens específicas de camundongos). Os monoclonais possuem uma atividade biológica definida, especificidade constante, e produção ilimitada (Hsieh et al., 1998).

Os anticorpos têm sido utilizados no desenvolvimento de imunoenaios destinados a diagnósticos. Para isto torna-se necessário o preparo de anticorpos com especificidade e afinidade desejável. Animais são imunizados com o antígeno e subsequentemente o soro contendo anticorpos policlonais deve ser coletado. Ensaio podem ser aprimorados pelo uso de anticorpos monoclonais, mais específicos que os policlonais. Células do baço também são utilizadas como fonte de DNA em técnicas para produção de anticorpos *recombinantes* por engenharia genética de células, animais ou bacterianas, enquanto células de animais não imunizados são usadas na tentativa de desenvolver *in vitro* métodos de imunização para

imunogênicos tóxicos (Kohler & Milstein, 1975; McCafferty et al., 1990; Bonwick et al., 1996).

Há vários tipos de classes de anticorpos, por exemplo, imunoglobulinas da classe G (IgG), imunoglobulina que proporciona a principal imunidade baseada em anticorpos contra os patógenos que invadem o corpo. É o único tipo de Ig que o bebê recebe da mãe; imunoglobulinas da classe M (IgM), que eliminam patógenos nos estágios iniciais da imunidade mediada pelas células B; etc. O especialista em estudo de alimentos deve estar atento à classe de anticorpos a serem usados no imunoensaio (Pier et al., 2004; Korpimaki *et al.*, 2003).

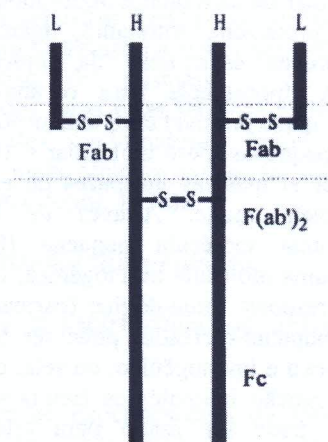


Figura 1: Estrutura geral de um anticorpo. Quatro cadeias de polipeptídeos, duas pesadas (H) e duas leves (L), são estabilizadas e ligadas por pontes dissulfeto (-s-s-) dando à molécula o formato de um Y. A porção inferior da molécula (fração Fc) é própria para ligações. A parte superior [fração F(ab')<sub>2</sub>] pode ser subdividida em frações Fab, cada uma possuindo uma cadeia leve e uma cadeia pesada. Na porção final de cada fração Fab está a região que se liga ao epítipo de um antígeno (Bonwick & Smith, 2004).

## 2.3 - Antígenos

Antígenos são substâncias capazes, sob condições apropriadas de serem reconhecidas especificamente por anticorpos (Bonwick & Smith, 2004).

A definição original de um antígeno era de uma molécula, com duas propriedades; a habilidade de induzir a formação de anticorpos, e a habilidade de reagir especificamente com estes anticorpos. A definição original foi baseada na observação pelos primeiros imunologistas que notaram que há restrições para os antígenos em

demonstrar estas duas propriedades, como por exemplo a influência do tamanho de um antígeno pode ser uma restrição quanto à sua capacidade de induzir uma formação de anticorpos; entretanto estudos posteriores demonstraram que estas duas propriedades podem ser separadas. Isto levou a redefinir os termos para imunogênio, que é uma estrutura molecular capaz de induzir a produção de um ou mais anticorpos, uma vez que um mesmo antígeno pode possuir diferentes epitopos (sítios reativos de um antígeno), com isto induzindo a formação de diferentes anticorpos (Janeway et al., 2004).

Tipicamente, um bom imunogênio deve ter um peso molecular de pelo menos 3000-5000 Da. Os anticorpos produzem, entretanto, ligantes para apenas porções específicas da molécula, o epitopo. A importância para o analista de alimentos é que é possível criar anticorpos contra moléculas pequenas (peso molecular < 1000 Da) que são por si mesmas incapazes de estimular uma resposta imune. Através de ligações químicas uma molécula pequena (hapteno) ligada por uma molécula imunogênica, capaz de criar uma resposta imunológica (carreadora), o complexo hapteno-carreador pode ser formado. Este complexo é imunogênico, ou seja, capaz de gerar uma reação imunológica (imunógeno). O imunógeno pode ser usado para criação de anticorpos, alguns dos quais irão exibir especificidade para pequenos haptenos que podem não ser necessariamente imunogênicos. Os anticorpos anti-hapteno então produzidos são capazes de ligarem tanto no hapteno livre ou no hapteno ligado a uma molécula afim ou superfície que apresenta o hapteno na orientação correta para ligação do anticorpo (Liddel e Weeks, 1995).

Em contraste com o restrito grupo de proteínas que possuem atividade de um anticorpo, uma variedade enorme de macromoléculas pode atuar como antígenos: quase todas as proteínas, muitos polissacarídeos, nucleoproteínas, lipoproteínas, polipeptídeos e até mesmo muitas moléculas menores, se sutilmente conjugadas a uma proteína ou polipeptídeo sintético (Tijssen, 1985).

#### 2.4 - Imunoensaios

Os imunoensaios são baseados em medições da ligação de um antígeno com seu anticorpo

correspondente. Originalmente, os imunoensaios foram desenvolvidos para facilitar os estudos em imunologia, particularmente as interações antígeno-anticorpo. Esta habilidade é uma característica de interesse para analistas de alimentos desejosos em realizar análises em matrizes mais complexas (Gosling, 2000). Atualmente, encontram aplicações em diversas áreas de pesquisa e diagnóstico.

Imunoensaios podem ser realizados com o auxílio de anticorpos tanto policlonais como monoclonais. Anticorpos policlonais são adquiridos através da imunização de animais, com antígenos contra os quais se deseja obter anticorpos. Apesar de anticorpos policlonais serem amplamente utilizados em diferentes tipos de imunoensaios, sua especificidade é baixa, podendo comprometer o desempenho dos imunoensaios. O ideal seria a produção de anticorpos monoclonais, mais específicos; porém sua produção é mais difícil, uma vez que requer técnicas de cultivo celular para o cultivo de hibridomas (tumores associados a tecido hepático de camundongos), que devem ser mantidos sempre em um ambiente altamente asséptico e em condições de temperatura e gases do ambiente ideais para a sua manutenção. Uma vez obtidos com sucesso, a produção de anticorpos é ilimitada e sempre com alta especificidade.

#### 2.5 - Métodos de Identificação de carnes de diferentes espécies

Existem na literatura revisões que discorrem sobre os vários métodos de identificação de carnes e seus pontos positivos e negativos (Patterson e Jones, 1990; Gizzi et al., 2003).

##### 2.5.1 - A microscopia óptica clássica

Constitui o único método oficial para a detecção de PAP's (Proteínas Animais Processadas) na União Européia (Diretiva da Comissão 2003/126/EC). A análise tem dois objetivos que são: a detecção de constituintes de origem animal e a detecção de proteínas de animais terrestres em alimentos de peixe. Técnicas de microscopia possuem limitações, pois dependem da experiência do observador, e da presença de algumas partículas, como: fibras musculares, ossos, pêlos, penas etc, para permitir a identificação. Outra restrição é seu emprego para

a identificação espécie-específica de carnes de diferentes origens presentes no mesmo alimento. Estudos colaborativos demonstraram bons resultados da microscopia na averiguação de produtos cárneos, embora a falta de harmonização no processo de preparo das amostras possa ser a causa de resultados discrepantes (Gizzi et al 2003; Veys et al., 2007; van Raamsdonk et al., 2008).

A microscopia de infravermelho usa o espectro infravermelho de partículas individuais na amostra para discriminar a origem dos componentes do alimento. O preparo da amostra segue o protocolo da microscopia óptica e equipamentos mais modernos permitem a análise de várias amostras simultaneamente, embora devido à superposição de espectros de grupos de animais diferentes a identificação exata da espécie pode ser apenas sugerida (Fumiére et al., 2009).

### **2.5.2 - Eletroforese e técnicas de focalização isoeletrica**

Métodos eletroforéticos consistem na separação de proteínas em um campo elétrico após sua extração do tecido muscular e em seguida depositados em um meio específico. A separação das proteínas por eletroforese podem ser conduzidas em géis compostos por poli(acrilamida) (PAGE), contendo ou não, um agente desnaturante de proteínas (como por exemplo o sulfato-dodecil de sódio, SDS-PAGE) ou por métodos de focalização isoeletrica (IEF) em um gel de Agar ou de poli(acrilamida) (PAGIF). O método IEF consiste na separação em um gel com um gradiente de pH, onde proteínas individualizadas (separadas por algum agente desnaturante) se deslocam pelo gel de acordo com seu ponto isoeletrico. No caso do PAGE, este é considerado como o teste na sua forma mais simples, onde a corrida das proteínas no gel ocorre sem a adição de qualquer agente desnaturante. A separação das proteínas depende de sua carga elétrica nativa e do tamanho das mesmas. No caso do SDS-PAGE, as proteínas são tratadas para adquirirem carga negativa similar e a separação se dá em função do seu peso molecular. Com isto, há uma correlação linear entre a distância percorrida pelas proteínas e o valor logarítmico do peso molecular, possibilitando determinar o peso molecular das

amostras, referenciando-as a um padrão (Monstowska e Pospiech, 2007).

Técnicas eletroforéticas e de focalização isoeletrica mostraram bons resultados para a identificação de espécies únicas de carnes não processadas e cruas. A focalização isoeletrica de mioglobulinas e de isoenzimas com espécie-especificidade foi capaz de discriminar diferentes espécies de carnes. Contudo, as técnicas eletroforéticas são imprecisas quando mais de uma espécie de carne está presente na amostra. Quando a carne está cozida, é necessário um longo processo de extração das proteínas com agentes solubilizantes, diálise e concentração. Embora seja possível identificar espécies de carnes de amostras cozidas os longos processos de preparo da amostra e sua pouca aplicabilidade na análise de misturas e de alimentos processados torna estas técnicas mais aplicáveis como testes confirmatórios, após o uso de técnicas mais simples como as imunológicas (Patterson e Jones, 1990).

### **2.5.3 - Métodos físico-químicos**

#### **2.5.3.1 - Espectroscopia de Infravermelho (NIRS)**

A técnica de Espectroscopia de Infravermelho (NIRS) tem como princípio o espectro de absorvância eletromagnética que ocorre na região perto do infravermelho, definida como os comprimentos de onda entre 780 e 2526 nm. As bandas de absorção são produzidas por moléculas específicas nas amostras analisadas. O NIRS foi utilizado para determinar a composição química de peito e coxa de aves (Berzaghi et al., 2005; Cozzolino et al., 1996), para a diferenciação de carne de bovinos fresca e congelada (Downey e Beuchêne 1997a, 1997b; Thyholt e Isaksson, 1970), e para a discriminação de espécies de carne (Rannou e Downey 1997; McElhinney et al., 1999; Ding et al., 1999; Downey et al., 2000).

O NIRS, uma das técnicas mais utilizadas na indústria de alimentos, é rápida, não utiliza reagentes perigosos, precisa de pequenas quantidades de amostra e tem resultados reproduzíveis. Por outro lado, é um método indireto que precisa de uma grande série de resultados de amostras certificadas para a formação de um padrão de referencia e formação

de um modelo de calibração. Precisa ainda de experiência profissional para o processamento e análise dos dados, além de ser um equipamento caro. A sensibilidade e a precisão precisam ser melhoradas para a obtenção de resultados confiáveis. Estas limitações dificultam a utilização desta técnica na análise de rotina de espécies de carne. (Fumiére et al., 2009).

#### 2.5.3.2 - Cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC)

Vários métodos de cromatografia líquida foram descritos para a identificação de espécies de carne. Tinbergen et al., (1976) descreveram a aplicação da técnica para a detecção de carne de galinha. A diferença da relação das concentrações de anserina e carnosina (a/c) presente em diversos músculos esqueléticos de suínos, bovinos e aves foi usado como medida de diferenciação. Foi possível detectar até 5% de carne de ave nas carnes de suínos cozidas e cruas. Carnegie et al., (1985) também utilizaram a diferença entre a relação de a/c para desenvolver um método de HPLC para detectar carne de ovinos, equinos e canguru em produtos cozidos. Saeed e outros (1988) utilizaram a técnica para diferenciar carne de porco de outras espécies.

#### 2.5.4 - Métodos moleculares/genéticos

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) consiste no método de criação de várias cópias de um fragmento de DNA (amplificação) para a identificação e seqüenciamento de genes de um determinado organismo, sendo atualmente a técnica de escolha. Vários trabalhos já demonstraram sua sensibilidade e especificidade. Dentre as limitações está a necessidade de obter amostras com o material genético íntegro, isto é, em condições de ser amplificado. O processamento da carne a altas temperaturas é um complicador, uma vez que pode ocorrer fragmentação do DNA. O método necessita de uma etapa de extração para isolar os ácidos nucléicos ainda presentes na amostra. Fragmentos curtos de DNA não são extraídos com a mesma eficiência de fragmentos maiores de DNA. Num estudo inter-laboratorial, a maioria das técnicas de PCR falharam em termos de sensibilidade e especificidade (Gizzi et al., 2003).

Em estudo publicado por Prado et al. (2007), três métodos de Real Time PCR foram avaliados para a identificação de espécies animais em alimentos. Os resultados mostraram que todos os testes detectaram até 0.1% de contaminação de amostras de bovinos em alimentos mesmo quando misturadas a amostras de outras espécies. Uma importante limitação do teste para testar carnes é que amostras de DNA podem estar presentes em outros constituintes do animal tais como: leite, sangue, gordura, proteínas, peles e ovos. Isto pode impedir que o teste seja aceito para a identificação de carnes. Bellorini et al. (2005) mostraram que a gordura de ruminantes pode ser identificada como resultado falso positivo quanto à presença de carne em produtos cárneos à base de outros animais.

#### 2.5.5 - Técnicas imunológicas

Técnicas Imunológicas são procedimentos fundamentados na interação específica do antígeno com o anticorpo podendo ser aplicado a misturas complexas de alimentos sem uma prévia separação de seus constituintes (Patterson e Jones, 1990).

##### 2.5.5.1 – Imunodifusão em Gel de Agarose

A imunodifusão em Gel de Agarose ou teste de Ouchterlony consiste em um procedimento simples em uma placa de agarose, onde através de difusão, o anticorpo, se desloca pelo gel, entrando em contato com os antígenos. A ligação antígeno-anticorpo é visualizada através de uma fina linha opaca de precipitação (Swart e Wilks, 1982).

A imunodifusão em gel já foi utilizada para a identificação de diversas espécies, como bovino, equinos, suínos, aves, ovinos e canguru. Um kit, o *Domino 5* foi disponibilizado comercialmente. A técnica de imunodifusão embora específica tem baixa sensibilidade, variando entre 2% a 20% dependendo das espécies analisada (Patterson e Jones, 1990).

##### 2.5.5.2 – Contra-Imunoelektroforese

A contra-imunoelektroforese é mais rápida e sensível do que a imunodifusão em gel, e como essa, é também limitada pelos antissoros específicos existentes. Outra limitação é a

diferenciação entre espécies próximas que depende de aparelhos mais sofisticados e de um maior grau de informação do técnico. Entretanto, quando se tem pouca amostra e níveis baixos de adulteração, é uma boa técnica tanto para amostras cruas ou cozidas, desde que haja o reconhecimento de epitopos lineares. Ensaio com anticorpos monoclonais específicos para aves, eqüinos e suínos foram desenvolvidos para a identificação da espécie de carnes. É um método sensível e rápido e pode distinguir entre espécies próximas. Contudo, depende também da obtenção de anticorpos específicos, que podem ser policlonais ou monoclonais. Uma vantagem do método é a possibilidade de ser aplicável tanto a amostras complexas "in natura" quanto processadas e ou aquecidas (Martin et al., 1988c, García et al., 1994, Morales et al., 1994, Billett et al., 1996).

Hsieh et al. (1998) produziram um anticorpo monoclonal capaz de diferenciar carnes cozidas (100 °C por 15 minutos) de bovinos, ovinos, equinos e cervídeos e de algumas espécies de aves (galinha, peru e pato) e sugeriram o uso deste anticorpo em ensaios de ELISA como um teste de triagem de alimentos. Kim et al., em 2005, publicaram um estudo onde o ELISA desenvolvido com anticorpos monoclonais foi capaz de diferenciar carne bovina de outras espécies utilizados na composição em alimentos comerciais, alimentos estes autoclavados e na proporção de 0.05% de contaminação.

#### 2.5.5.3 – Imunocromatografia

Outro teste imunológico é a imunocromatografia de difusão lateral (*dip-stick*). O método consiste na interação antígeno-anticorpo, onde o grau de ligação é verificado através da visualização de uma banda, em caso positivo, além da visualização de uma banda-controle. Kits comerciais foram testados para a identificação de carnes e mostraram resultados variáveis. Sensibilidade de até 0,1% foi alcançada por alguns kits enquanto outros não chegaram a 0.5%. Quanto à especificidade, os valores falsos variaram de 30% a 50% em razão do tipo de amostra. Carnes de alimentos com gordura ou tecido conjuntivo foram responsáveis por resultados falso-positivos (Ayob & Smith, 1990).

Num estudo publicado por Myers et al., em 2005, o kit *Reveal* mostrou ótima especificidade,

mas não atingiu a sensibilidade desejada de identificar 0.1% de contaminação. No mesmo estudo outro kit, o *Feedcheck*, mostrou boa sensibilidade chegando ao nível de 0.1%, mas obteve resultados muito ruins quanto à especificidade com resultados falso-positivos acima de 30%.

#### 2.5.5.4 - ELISA

O método de ELISA tornou-se o imunoenensaio principal entre muitos ensaios modernos utilizados atualmente. Essencialmente, o ELISA depende da imobilização de um a dois componentes, tanto antígeno quanto anticorpo, em uma superfície sólida. Neste método ocorre uma reação entre o componente ligado e o não-ligado, que pode ser um antígeno ou um anticorpo, que são fixados em uma superfície sólida e a simples remoção dos componentes não-ligantes por lavagem deixa os reagentes ligados em um formato de fácil medição. Esta medição apresentava uma dificuldade para quantificar o grau de ligações antígeno-anticorpo e foi superada pelo método de identificação através de um anticorpo ligado à uma enzima. O anticorpo identificado pode facilmente detectado fornecendo um substrato apropriado que reage à enzima a ser convertida. Essa conversão resulta em uma mudança detectável ou na liberação de íons, que reagem com um outro reagente, mudando visivelmente a cor do substrato (Bonwick e Smith, 2004).

O uso de antígenos (ELISA indireto), bem como de anticorpos (ELISA direto) imobilizados em uma placa fornece uma gama de formatos para o ensaio (Fig. 2). A forma mais simples do ELISA é o formato direto de captura do anticorpo, onde o antígeno é ligado a uma superfície sólida e um anticorpo específico, ligado a uma enzima, é responsável por ligá-lo. Após lavagem para remoção dos materiais não-ligantes a solução de substrato é adicionada, em que haverá reação com a enzima previamente marcada e o resultado é um produto corado. O grau de formação do produto corado, que representa a quantidade de ligação entre os anticorpos e os antígenos pode ser determinado através do uso de um espectrofotômetro. Se as amostras de anticorpos forem misturadas previamente com uma solução contendo o antígeno homólogo, como por exemplo um extrato cárneo, ocorrerá uma redução na quantidade de anticorpos ligantes à

superfície sólida (Bonwick e Smith, 2004; Asensio et al., 2008).

O método de ELISA competitivo direto baseado na captura de anticorpos depende de um número de fatores. Primeiro: a disponibilidade de antígenos autênticos para aderir à superfície sólida; segundo, o antígeno deve possuir uma molécula extensa, promovendo com isto uma aderência tanto do antígeno à superfície sólida como ao seu anticorpo homólogo; e terceiro, o anticorpo deve reconhecer os antígenos tanto ligantes como não ligantes com igual eficiência (Bonwinck & Smith, 2004).

Wittaker et al. (1983) foram os pioneiros no uso do ELISA como um imunoenensaio na detecção de origem de carnes, onde foram testadas carnes não-processadas de bovino, ovino, eqüino, canguru, porco e camelo. O estudo em questão tinha como objetivo testar a eficiência do ELISA em comparação com outro método imunológico bastante realizado na época, que era a imunodifusão em gel de agarose ou Teste de Ouchterlony. Os autores demonstraram que o ELISA possuía mais vantagens em relação à imunodifusão, como a capacidade de ser mais rápido, levando cerca de 3 horas; requerer menor volume de antissoros para a realização dos ensaios; os antissoros poderiam ser misturados, sem com isto comprometer sua capacidade de ligação e especificidade; a capacidade do ELISA possuir um procedimento semi-automático, diminuindo consideravelmente erros humanos provocados com frequência nestes ensaios e um aumento considerável na sensibilidade, onde no estudo em questão puderam detectar até 1 mg de fraudes.

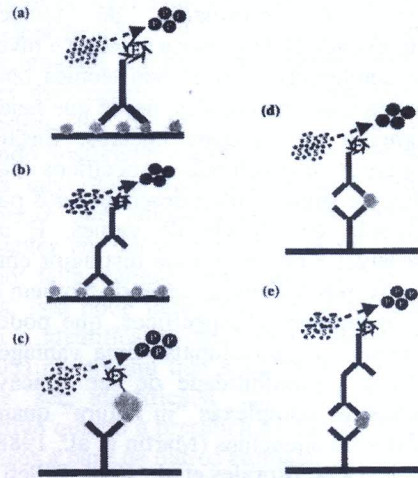


Figura 2: Formatos de ensaios ELISA. (a) ELISA direto (captura do anticorpo); (b) ELISA indireto (captura do antígeno): assim como em (a), porém com um anticorpo específico previamente marcado, permite o uso de anticorpos anti-espécie comercializados; (c) ELISA direto (captura do antígeno): permite uma competitividade adicionando um antígeno livre e assim bloqueando os sítios reativos com um ligante marcado; (d) ELISA "sanduíche" direto: o antígeno é capturado por um anticorpo imobilizado à placa e detectado por um segundo antígeno marcado; e (e) ELISA "sanduíche" indireto: o antígeno é capturado por um anticorpo imobilizado à placa e a ligação ao segundo anticorpo é detectado por um terceiro anticorpo marcado. Assim como em (b), é permitido o uso de anticorpos anti-espécie marcados comercializados (Bonwick & Smith, 2004).

### 3 - MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 - Obtenção de amostras

Amostras de soros de diferentes espécies animais (bovinos, caninos, eqüinos, coelhos e suínos) foram cedidas pela Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV-UFMG). Todas as amostras eram de animais perfeitamente saudáveis e em idade adulta. As amostras foram utilizadas como fonte de antígenos para os imunoenaios a serem realizados durante a fase experimental do trabalho.

As amostras foram separadas em alíquotas de 1 ml cada, submetidas a congelamento em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  e foram descongeladas apenas no momento do uso.

Amostras de músculos de diferentes espécies animais (bovinos, caninos, eqüinos e coelhos) foram cedidas pela mesma instituição. Da mesma forma que os soros, todas as amostras cárneas foram obtidas de animais em condições perfeitas de saúde. As amostras de carnes também foram utilizadas com o objetivo de obtenção de proteínas cárneas para os imunoenaios.

Para a produção de extratos musculares, as amostras de carnes foram trituradas e misturadas a uma solução de Tampão Salino-Fosfato (PBS) 0,1 M pH 7,4 até a obtenção de um composto homogêneo e, em seguida, foram dispostas em placas de vidro e aquecidas em uma estufa a 60°C *overnight* para sua devida secagem. Após a secagem, as amostras foram novamente trituradas e misturadas em solução PBS 0,1 M pH 7,4, filtradas com filtro de papel qualitativo Whatman n°4 (Fisher Scientific, NJ). Após estes procedimentos foram realizados ensaios de dosagem de proteínas e obteve-se um filtrado homogêneo e cristalino, onde em seguida foram separados em aliquotas de 1 ml cada e armazenados em freezer a -20°C até o momento do uso.

### 3.2 - Tratamento das amostras – Imunização

Para imunização foram utilizados 9 (nove) carneiros em idade adulta, cada um para um tipo de antígeno a ser inoculado, concedidos pela Fazenda São Judas Tadeu, (Fazenda experimental da Fundação Ezequiel Dias, localizada em Betim, MG, Brasil).

Para imunização, os soros e filtrados de músculos previamente descritos foram homogeneizados em adjuvante de Freund completo na proporção de 1:1 (uma parte de adjuvante para uma de soro ou filtrado de músculo). O adjuvante de Freund possui como princípio a lenta liberação da carga antigênica no animal a ser experimentado, com o objetivo de se obter grandes quantidades de anticorpos específicos.

Realizado a homogeneização, os antígenos foram inoculados nos carneiros com o auxílio de seringas de vidro, em doses de 2 ml. As inoculações dos soros e filtrados foram realizadas num intervalo de tempo de 15 dias entre uma e outra, totalizando quatro inoculações. Antes de cada inoculação retirava-

se cerca de 10 mL de sangue de cada carneiro e 14 dias após a última inoculação realizou-se a coleta de 200 mL de sangue de cada um dos animais. O sangue coletado foi coagulado e submetido à centrifugação a 10000 g por trinta minutos para a retirada do soro, armazenado em freezer a -20°C.

### 3.3 - Obtenção de Anticorpos Específicos

Para a produção de anticorpos específicos, os procedimentos aqui descritos foram adaptados de Avrameas e Ternynck (1969). Foram preparadas colunas de imunoafinidade (Colunas contendo antígenos, para posterior ligação com anticorpos) com o objetivo de aumentar a especificidade dos antissoros removendo os anticorpos com reatividade cruzada com os antígenos heterólogos. Para isso, os géis de especificidade foram preparados misturando todos os antígenos, exceto o específico desejado (soro homólogo), com albumina 1 mg/mL e glutaraldeído a 2,5%. Após incubação por uma hora, sem agitação, em temperatura ambiente ocorreu a formação do gel. O gel, foi triturado com uma espátula lavada em PBS 0,1 M pH 7,4 até a formação de partículas minúsculas. Em seguida as partículas foram centrifugadas para descartar o sobrenadante. Este processo foi repetido três vezes até a obtenção de partículas menores e consistência pastosa. Após a centrifugação, o gel foi misturado com HCl-Glicina 0,2 M e pH 2,8 por cerca de 10 minutos. Após outra centrifugação, o pH foi ajustado para pH 7,0 com K<sub>2</sub>PHO<sub>4</sub> 1 molar e lavado três vezes com água destilada. Bloqueou-se os sítios reativos restantes com Etanolamina, 0,1 M pH 8,0 em incubação *overnight* a 4° C e em seguida lavado novamente com PBS 0,1 M. Feito isto, os géis foram separados em colunas distintas e armazenados imersos em Tampão de Azida Sódica 0,01 M, que possui atividade bacteriostática, impedindo a contaminação por microrganismos.

Para a adsorção dos antissoros, as colunas foram novamente lavadas com PBS 0,1 M até a retirada total da Azida Sódica remanescente. Os antissoros foram diluídos na proporção 1:3 com tampão PBS e foram passadas pelas colunas heterólogas (colunas que não continham o antígeno específico para o antissoro sendo adsorvido). Por exemplo: o antissoro de boi foi adsorvido em uma coluna na qual soro ou

proteínas de músculo de boi, não estavam presentes. Assim, os anticorpos no soro anti-boi com reatividade cruzada para os antígenos das outras espécies de carne presentes no adsorvente, foram retidos e somente os anticorpos específicos para boi foram coletados. O soro adsorvido era armazenado em tubos Falcon de 15 mL. Para ter certeza de que todos os anticorpos foram coletados, foram realizadas periodicamente dosagem das proteínas.

#### 3.4 - Teste de Especificidade de Anticorpos Anti-espécie

Os testes de especificidades foram realizados através do método de ELISA indireto, utilizando-se microplacas de 96 poços fundo reto, marca Costar®. Todos os ensaios de ELISA foram realizados em duplicata.

Para os ensaios em leitor de ELISA, cada uma das amostras foi alíquotada em tampão de sensibilização pH 9,6 e distribuídos entre os poços nas concentrações de 10,0; 1,0; 0,1 e 0,01 µg por poço. A cada poço foram acrescentados 100 µL da amostra e as microplacas incubadas *overnight*, cobertas com papel alumínio a 4°C. No dia seguinte, as placas foram lavadas com solução de lavagem (NaCl + 5% Tween 20) e foi acrescentado em cada poço 100 µL de solução de bloqueio (Caseína 2%). Após estes procedimentos, as placas foram incubadas por uma hora a 37°C e lavadas em seguida.

Os antissoros adsorvidos ou antissoros não adsorvidos foram então diluídos em solução tampão de incubação (PBS 0,1 M com Tween 20, 0,05%) na proporção de 1:25 e adicionados às microplacas, sendo em seguida incubadas novamente durante uma hora a uma temperatura de 37°C. Novamente a placas foram lavadas.

Após a incubação, os poços foram preenchidos com conjugado anti-sheep 1:10000 (Sigma®), diluído em Caseína 2% e levado a estufa por mais uma hora. Em seguida, a microplaca foi lavada e preenchida com 100 µL cada poço com solução de substrato (Tampão Citrato pH 5,5 0,15M com 5 mg de OPD mais 5 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). A microplaca foi novamente incubada a 37 °C durante 20 minutos, para o desenvolvimento da cor. A reação foi interrompida adicionando-se H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 30% e a intensidade da cor foi medida em leitor de ELISA a 492 nm.

Para ensaios de eficiência dos anticorpos, a sensibilização se deu na concentração de 10µg/mL (1µg/poço) e a incubação se deu em diluições seriadas dos antissoros nas proporções 1:10, 1:20, 1:40 e 1:80.

Além destes ensaios, foram realizados experimentos para testar a eficiência dos antissoros antes e após as adsorções nas colunas de imunoafinidade (antissoros não-adsorvidos e antissoros adsorvidos três vezes nas colunas de imunoafinidade). As proporções dos antissoros utilizados na fase de incubação da placa foram 1:50, 1:100, 1:200 e 1:400. Em todos os resultados, aos valores eram subtraídos dos obtidos pelo controle (soro de carneiro pré-imunizado) realizando com isto um *cut-off* (corte).

#### 3.5 - Testes em Alimentos Processados (Hambúrgueres)

Seis amostras de seis lotes de cinco marcas de hambúrgueres foram adquiridas em supermercados da região metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Para o uso destas amostras, cerca de 5 gramas de cada uma foram trituradas dentro de Tubos Falcon® de 15 mL contendo solução salina durante uma hora, até a obtenção de uma mistura homogênea. Após este processo as amostras foram deixadas em repouso para decantação das partículas sólidas, centrifugadas a 10000 RPM e filtradas em filtros de papel Whatman nº 4 (Fisher Scientific, NJ) até a obtenção de um filtrado cristalino. Em seguida, foi realizada a dosagem de proteínas totais através da absorbância a 280 nm em um espectrofotômetro. Após a dosagem as amostras foram alíquotadas e preservadas em um freezer -18°C até o momento de uso. Os hambúrgueres foram separados em cinco grupos (Grupos G1, G2, G3, G4 e G5), de acordo com a composição de cada uma das marcas de hambúrgueres analisadas; cada grupo tendo como representantes seus lotes numerados de 01 a 06. As análises estatísticas foram realizadas com o software SAEG 9.1 e realizadas análises estatística-descritivas.

## 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 - Especificidade de Anticorpos Não-adsorvidos Anti-espécie

É importante ressaltar que os antíseros utilizados nesta etapa da pesquisa não foram ainda purificados em colunas de imunoafinidade. O antissor de porco não foi utilizado nesta modalidade de ensaio pelo fato de no período de realização destes experimentos o mesmo ainda não ter sido obtido.

O gráfico 1 demonstra as reações de afinidade com o antissor não-adsorvido de bovino e as outras espécies testadas. É possível notar através dos resultados apresentados que tanto o soro

quanto o filtrado do músculo de boi reagiram de forma específica com o antissor de boi, enquanto os demais antígenos demonstraram pouca reatividade. Todos os demais antígenos, com exceção do soro de coelho, obtiveram um mesmo padrão baixo de reatividade, mas mesmo o soro de coelho apresentou menor reatividade em relação ao soro de boi e filtrado de músculo bovino, apesar de se apresentar numa leitura próxima da apresentada no músculo bovino. Apesar do antissor anti-boi não ter sido filtrado na coluna de imunoafinidade, ainda assim observa-se maior especificidade com seus antígenos homólogos, no caso o soro e o filtrado do músculo de boi.

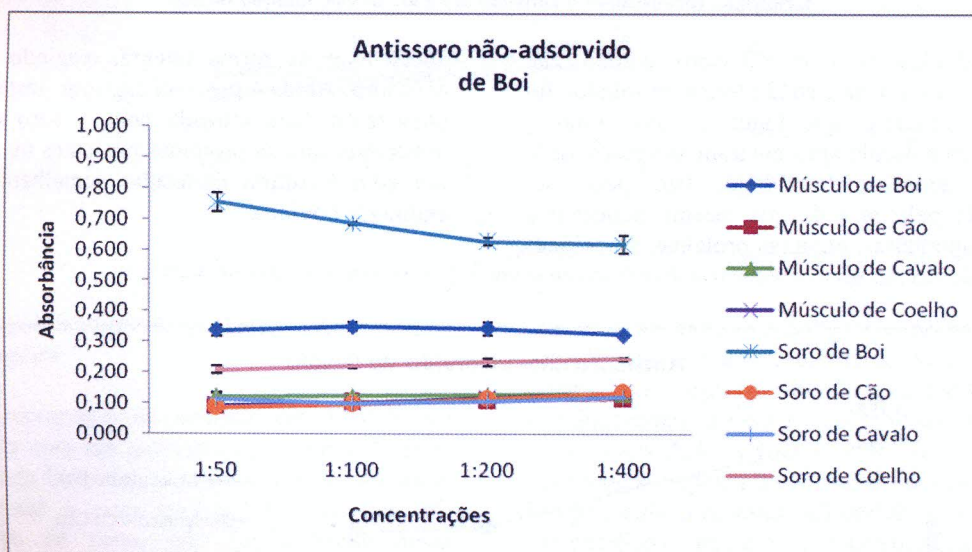


Gráfico 1: ELISA. Incubação com antissor in natura de boi; diluição seriada.

No gráfico 2 são apresentados os resultados de afinidade com o antissor de cão. Neste resultado, foi observado que, apesar do antissor de cão reagir com o soro homólogo, houve também reatividade cruzada em relação ao soro de boi. A explicação para esta alta reatividade com o soro de boi seria a presença de epitopos

comuns presente nos soros das espécies de cão e boi. Com relação ao músculo de cão, o mesmo apresentou reatividade na mesma faixa de intensidade dos demais antígenos heterólogos, mostrando com isto pouca especificidade com o anti-cão.

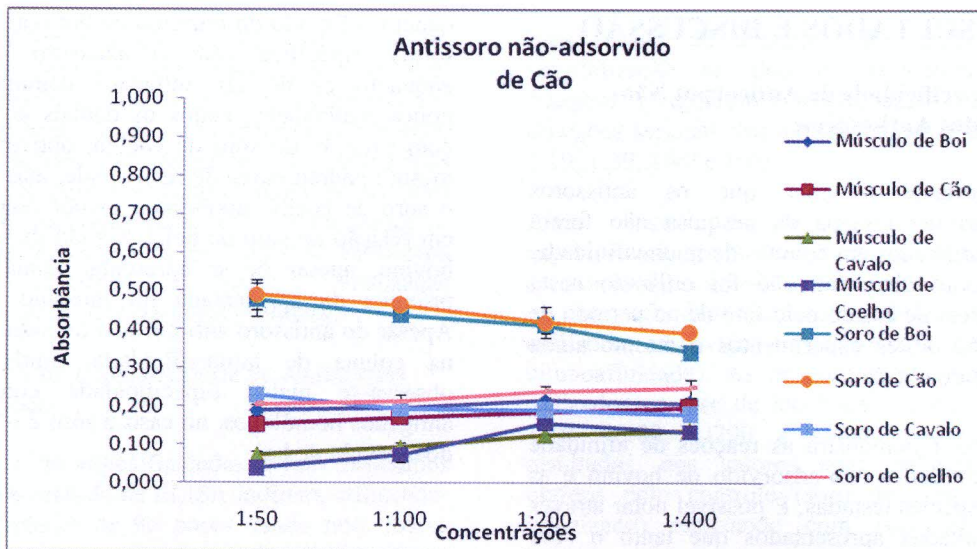


Gráfico 2: Incubação com antissoro *in natura* de cão; diluição seriada.

Os resultados com o antissoro equino são apresentados no gráfico 3. Neste resultado, foi possível observar que tanto o soro como o filtrado do músculo apresentaram alta reatividade com o antissoro homólogo. Isto pode ser explicado pelo fato de que mesmo aquecida a altas temperaturas, algumas proteínas específicas à carne de cavalo se

apresentam de forma íntegra, reagindo com o antissoro. Ainda é possível registrar neste ensaio uma reatividade cruzada com o soro de boi, mostrando que há proteínas presentes no soro de boi com estrutura molecular semelhante entre equinos e bovinos.

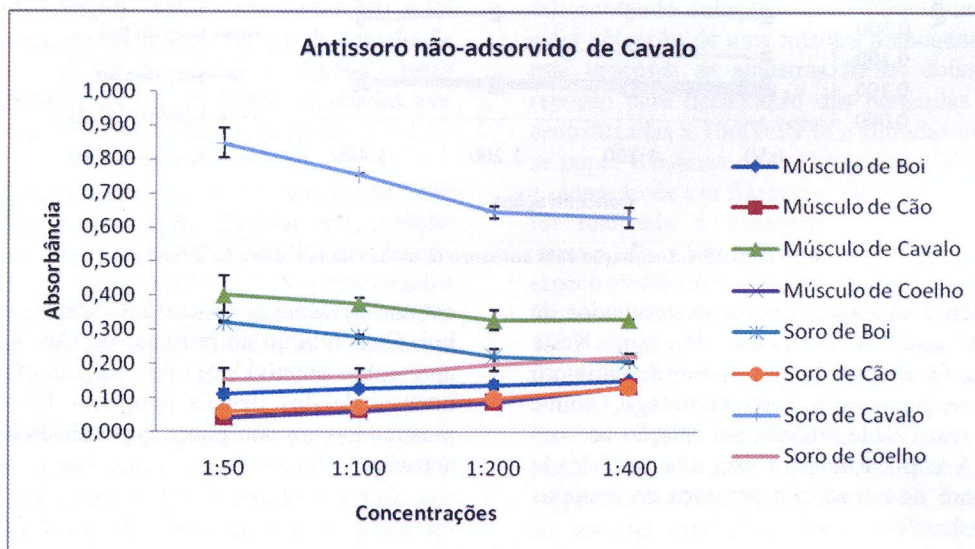


Gráfico 3: ELISA. Incubação com antissoro *in natura* de cavalo; diluição seriada.

Novamente foi observado uma maior especificidade do antissoro de coelho com seus antígenos homólogos (gráfico 4). Observa-se também uma reatividade cruzada do antissoro de coelho com os antígenos dos soros de boi e

cavalo. Uma explicação para isso seria que ainda há anticorpos que reagem de forma inespecífica com proteínas semelhantes às de coelho presentes no soro de cavalo e boi, ocorrendo uma reação cruzada. Quanto ao músculo de coelho,

era esperado uma maior reatividade frente ao antissoro de coelho. Esta reatividade não foi apresentada e uma possível explicação seria a desnaturação de suas proteínas após o tratamento térmico. A reatividade cruzada apresentada nestes resultados (gráficos 1 a 4) mostra a importância da adsorção dos antissoros para se

obter anticorpos mais específicos e com isto reduzir a inespecificidade do ensaio de identificação de diferentes tipos de carnes em produtos cárneos. Esta adsorção proporcionará também maior segurança quanto à exatidão do resultado de identificação.

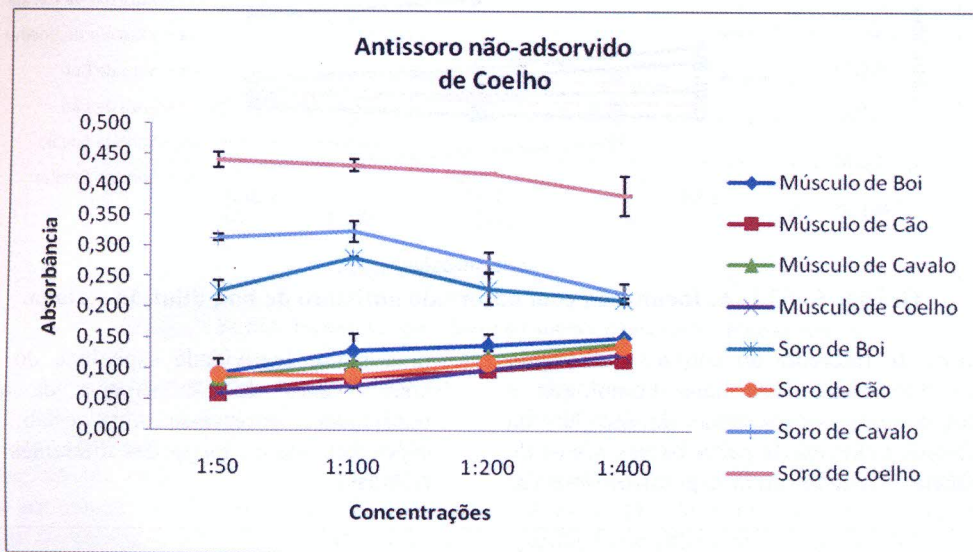


Gráfico 4: ELISA. Incubação com antissoro *in natura* de coelho; diluição seriada.

#### 4.2 - Especificidade de Anticorpos Adsorvidos Anti-espécie

Cada microplaca de ensaios em ELISA foi incubada com um antissoro adsorvido diferente, e em cada linha da placa um antígeno diferente, para testar a especificidade do adsorvido. O antissoro de porco não foi utilizado nesta modalidade de ensaio. Da mesma forma que nos ensaios anteriores, o mesmo não havia sido obtido durante esta parte do experimento.

No gráfico 5, observa-se o resultado referente à reação do antissoro de boi (adsorvido

três vezes) com os antígenos homólogos e heterólogos. A maior reatividade do antissoro é contra seus antígenos homólogos. Evidencia-se um distanciamento entre a reatividade específica e a reatividade cruzada com os antígenos heterólogos. Após a passagem do antissoro anti-boi pela coluna de imunoafinidade, os anticorpos inespecíficos ficaram retidos, aderidos aos antígenos heterólogos presentes na coluna de glutaraldeído. Como resultado, observa-se uma maior especificidade do antissoro adsorvido em relação aos seus homólogos quando comparado aos antígenos heterólogos.

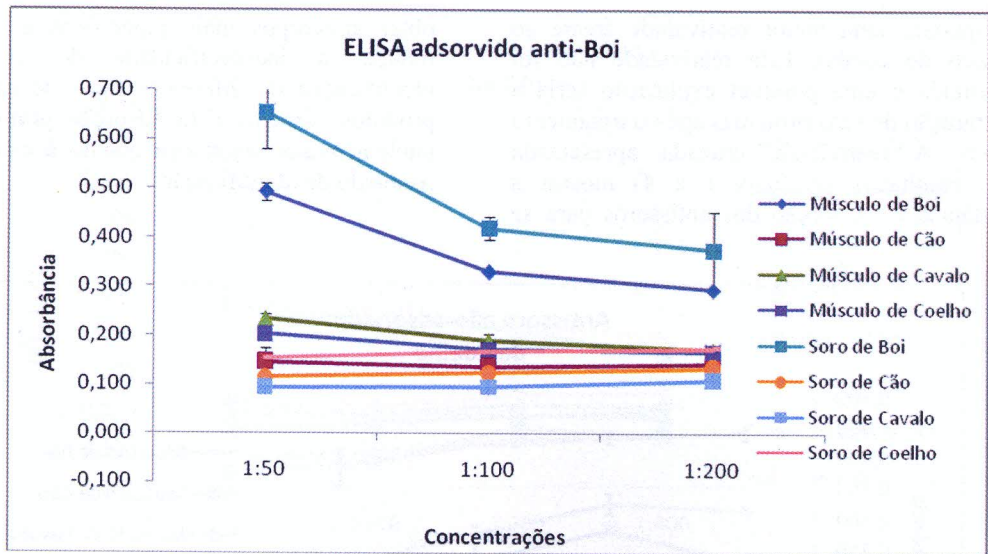


Gráfico 5: ELISA. Incubação com adsorvido antissoro de boi; diluição seriada.

No gráfico 6, referente ao antissoro adsorvido anti-cão em relação aos seus homólogos e heterólogos, observa-se uma diminuição da sensibilidade evidenciada pelos baixos níveis de absorbância. Contudo ainda é possível observar

uma maior reatividade específica do antissoro com o soro de cão. Apesar da queda na reatividade, observa-se uma estabilidade da especificidade ao longo das diferentes diluições testadas.

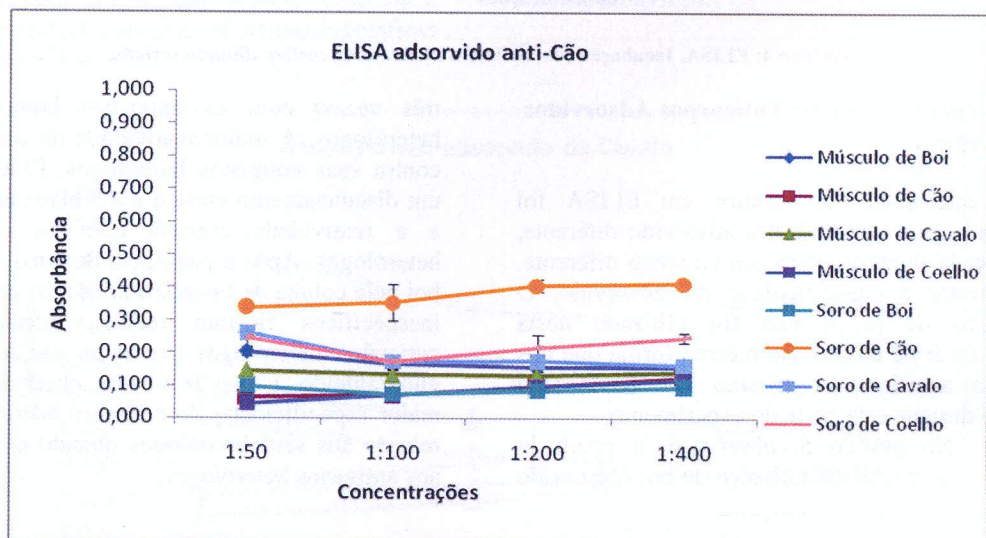


Gráfico 6: ELISA. Incubação com adsorvido antissoro de cão; diluição seriada.

No gráfico 7, que representa a reatividade do antissoro (adsorvido três vezes) de cavalo com antígenos homólogos e heterólogos, o antissoro de cavalo apresentou alta especificidade, reagindo de forma específica tanto com o soro

quanto com o filtrado de músculo homólogo. Para este antissoro, a especificidade adquirida não diminuiu a afinidade, evidenciada pela alta reatividade específica mesmo na maior diluição (1:400).

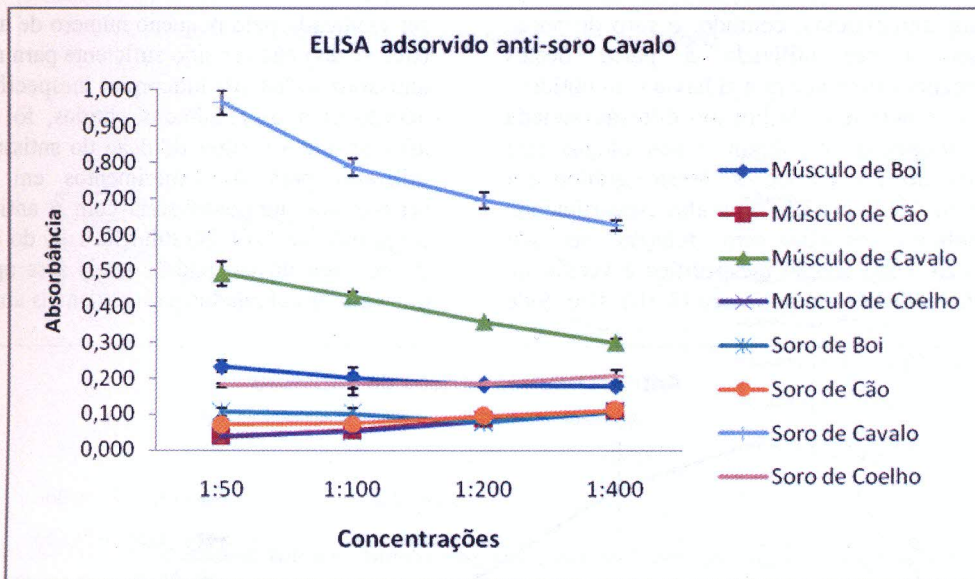


Gráfico 7: ELISA. Incubação com adsorvido antissoro de cavalo; diluição seriada

No gráfico 8, está representado a reatividade do antissoro de coelho com seus homólogos e heterólogos. Da mesma forma que nos ensaios anteriores, seu homólogo apresentou absorbância superior em relação aos demais, enquanto que os antígenos heterólogos apresentaram um mesmo padrão baixo de reatividade. Além disso,

observa-se um grau de separação da curva homóloga, relacionada ao soro de coelho em relação aos demais antígenos heterólogos. Observa-se também neste resultado uma manutenção da reatividade específica na maior diluição de antissoro testado (1:400).

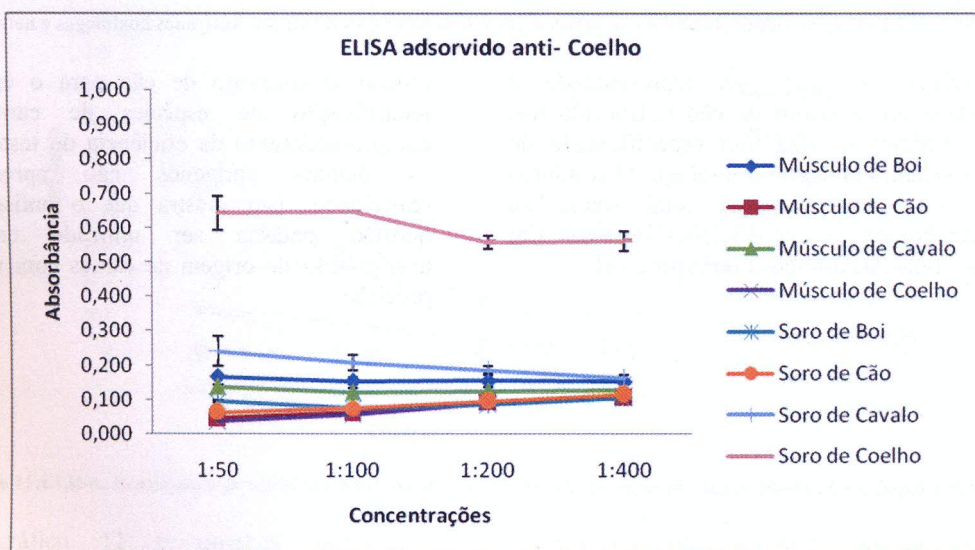


Gráfico 8: ELISA. Incubação com adsorvido antissoro de coelho; diluição seriada

#### 4.3 - Especificidade dos antissoros em diluição seriada

Nesta etapa, os antissoros já adsorvidos três vezes em colunas de imunoafinidade foram testados com o objetivo de observar qual seria a

melhor diluição para os ensaios de quantificação dos antígenos. O antígeno músculo de coelho não foi utilizado nesta modalidade de ensaio, uma vez que foi observado que a carne de coelho seria uma das poucas carnes que poderiam ser consideradas para questões de fraudes em

produtos alimentícios, contudo, o soro de porco começou a ser utilizado a partir destes experimentos, uma vez que já havia sido obtido.

O antissoro de boi em diluição seriada contra antígenos homólogos e heterólogos está representado no gráfico 9. Neste gráfico foi novamente demonstrado uma alta especificidade do antissoro anti-boi em relação ao seu homólogo. Uma reação inespecífica é verificada na menor diluição do antissoro (1:10). Isto pode

ser explicado pelo pequeno número de adsorções (três vezes) não ter sido suficiente para retirar do antissoro todos os anticorpos inespecíficos. De acordo com os resultados obtidos, foi possível afirmar que a melhor diluição do antissoro a ser utilizado para os experimentos em diluição seriada dos antígenos seria com o antissoro na proporção de 1:40. Na diluição 1:80 do antissoro de boi, seu desvio padrão tende a se aproximar dos valores calculados para as demais amostras.

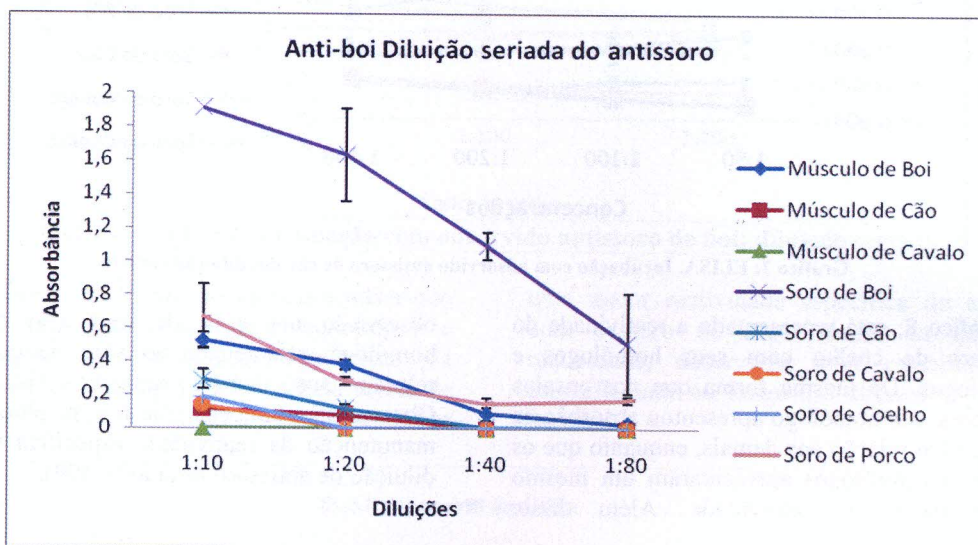


Gráfico 9: ELISA. Reatividade do antissoro Anti-boi adsorvido três vezes frente aos antígenos homólogos e heterólogos.

No gráfico 10, que está representando a reatividade do antissoro de cão (adsorvido três vezes), verifica-se uma alta especificidade do antissoro contra antígeno homólogo. O resultado mostra uma especificidade total frente ao antígeno homólogo nas diluições testadas. Em qualquer uma das diluições seria possível

utilizar o antissoro de cão para o ensaio de identificação de espécies de carne, sem comprometimento da eficiência do teste. Todos os demais antígenos não apresentaram reatividade. Isto mostra que o antissoro em questão poderia ser utilizado em uma averiguação de origem de carnes com uma alta precisão.

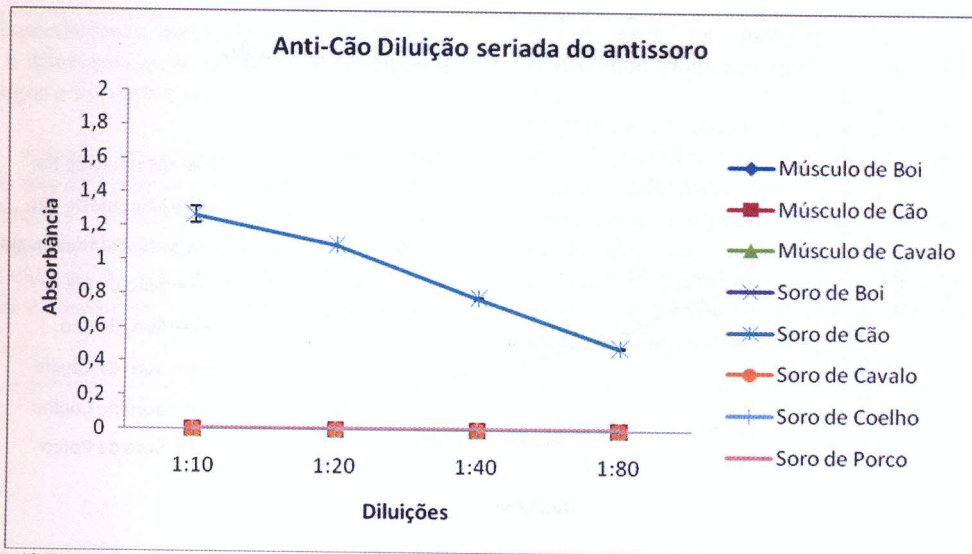


Gráfico 10:ELISA. Reatividade do antissoro Anti-cão adsorvido três vezes frente aos antígenos homólogos e heterólogos.

No gráfico 11, relacionado à efetividade do antissoro de cavalo adsorvido três vezes, o mesmo apresentou especificidade frente ao homólogo nas diferentes diluições utilizadas, à exceção da diluição 1:80. Apesar disso, percebe-se uma reatividade cruzada em menor

grau de intensidade com os heterólogos soro de cão e soro de porco. A explicação para este tipo de inespecificidade seria que, as três adsorções não foram suficientes para remover em sua totalidade os anticorpos inespecíficos.

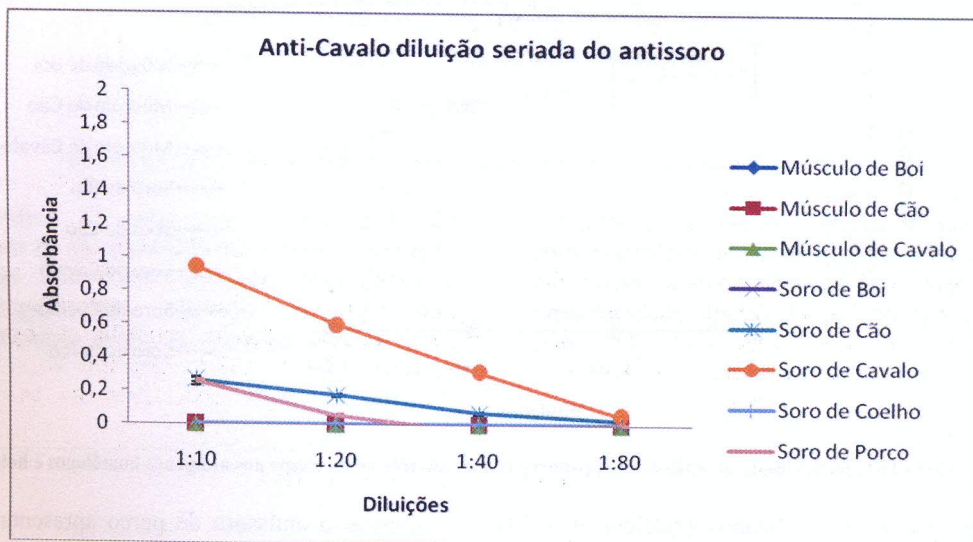


Gráfico 11:ELISA. Reatividade do antissoro Anti-cavalo adsorvido três vezes frente aos antígenos homólogos e heterólogos.

No gráfico 12 é possível observar a especificidade do antissoro de coelho (adsorvido três vezes), frente ao antígeno homólogo em todas as diluições testadas, ocorrendo uma alta reatividade do mesmo na diluição 1:10, atingindo

absorbância próximo de 1, enquanto os demais antígenos apresentaram reatividade nula com o antissoro. Neste caso, as três adsorções mostraram-se suficientes na remoção dos anticorpos inespecíficos.

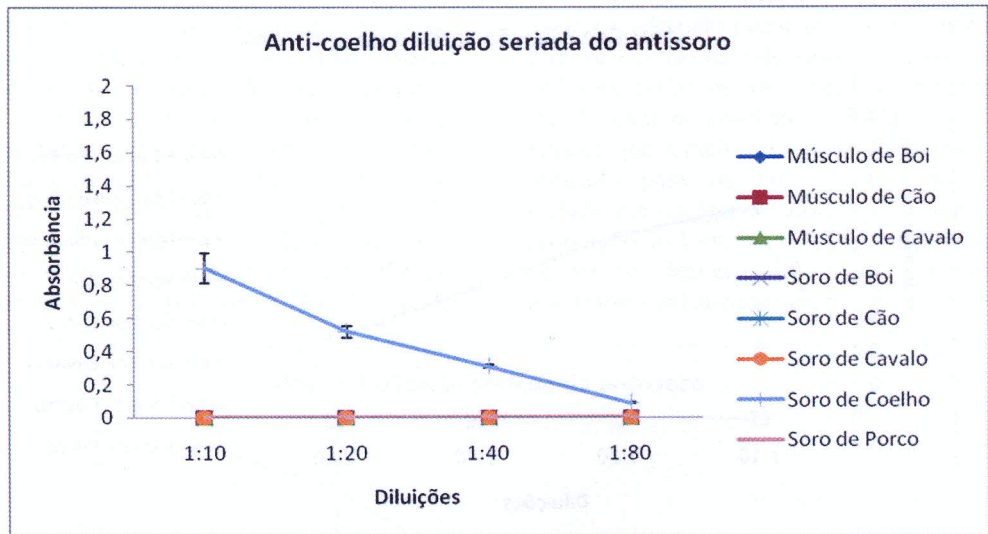


Gráfico 12: ELISA. Reatividade do antissoro Anti-coelho adsorvido três vezes frente aos antígenos homólogos e heterólogos.

O antissoro de porco adsorvido três vezes (gráfico 13), apresentou alta especificidade e sensibilidade frente ao antígeno homólogo, em

todas as diluições testadas. Novamente, para este antissoro as três adsorções foram suficientes para retirar os anticorpos inespecíficos.

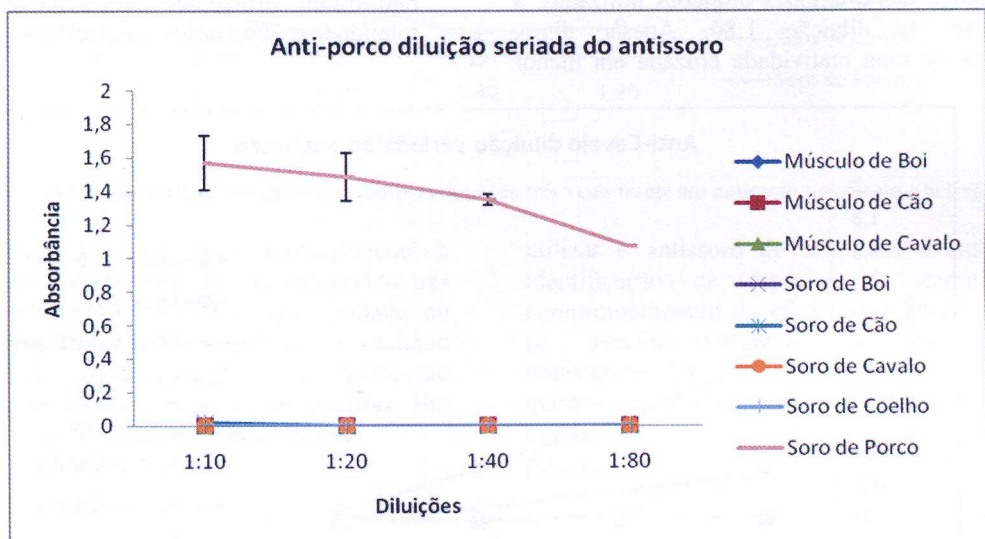


Gráfico 13: ELISA. Reatividade do antissoro Anti-porco adsorvido três vezes frente aos antígenos homólogos e heterólogos.

Os ensaios acima realizados (gráficos 9 a 13) tiveram como objetivo a determinação de diluições fixas dos diferentes antissoros adsorvidos para serem utilizados nos testes de identificação das espécies de carnes. Para o antissoro de boi, foi utilizada a diluição do antissoro na proporção 1:25; para o anti-cão, 1:50 (este valor foi definido após visualizar que,

mesmo o antissoro de porco apresentando uma boa reatividade em relação ao seu homólogo em todas as diluições, foi um valor próximo de 1,0 em sua absorbância); no antissoro anti-cavalo foi utilizada a diluição de 1:25; para o anti-coelho, 1:100; e finalmente, para o anti-porco, a diluição 1:25.

#### 4.4 - Especificidade dos antíseros adsorvidos frente a diferentes concentrações de antígenos homólogos e heterólogos

Nestes ensaios, os soros adsorvidos foram testados nas diluições acima determinadas frente a diferentes concentrações dos antígenos homólogos e heterólogos para confirmação da especificidade e sensibilidade obtidas. Os filtrados de músculos não foram utilizados nesta

etapa, pois os mesmos não apresentaram reatividade frente aos antíseros adsorvidos.

O gráfico 14, mostra a reatividade do antígeno de boi adsorvido três vezes na diluição fixa 1:25, frente a diferentes concentrações dos antígenos. Observa-se a especificidade frente ao antígeno homólogo, nas concentrações de antígenos testados 10 µg/ml a 0,1 µg/ml. Na concentração de 0,01 µg/ml não foi observado a especificidade frente ao antígeno homólogo.

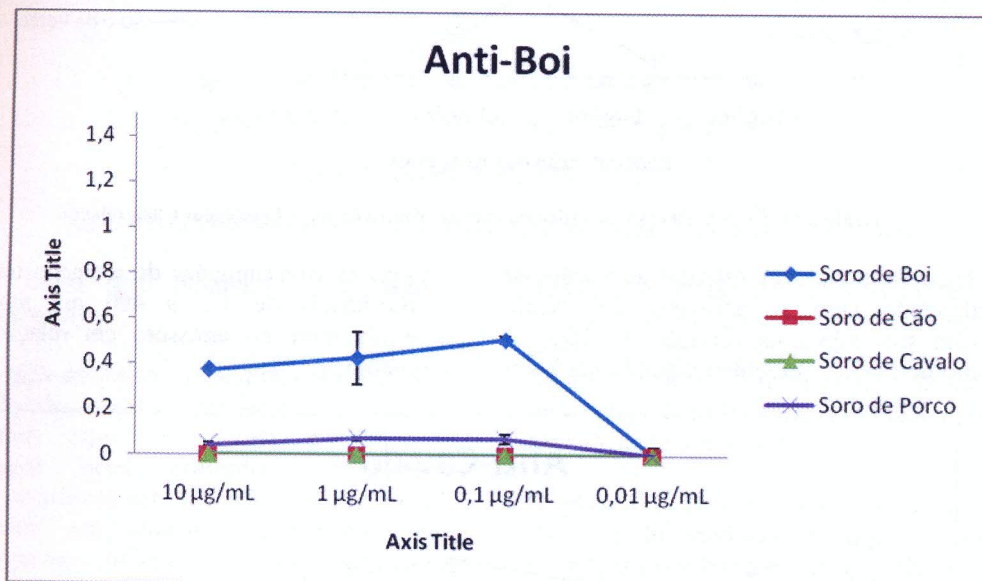


Gráfico 14: ELISA. Reatividade do antígeno anti-boi contra os soros homólogos e heterólogos.

No gráfico 15 observa-se a reatividade do antígeno de cão adsorvido três vezes, na diluição fixa de 1:50 contra antígenos homólogos e heterólogos. O resultado mostra uma especificidade frente as concentrações de 10 a

0,1 µ/ml. O resultado é similar ao apresentado com o antígeno de boi no que diz respeito à faixa de sensibilidade. Ambos não apresentaram especificidade frente à concentração de 0,01 µ/ml.

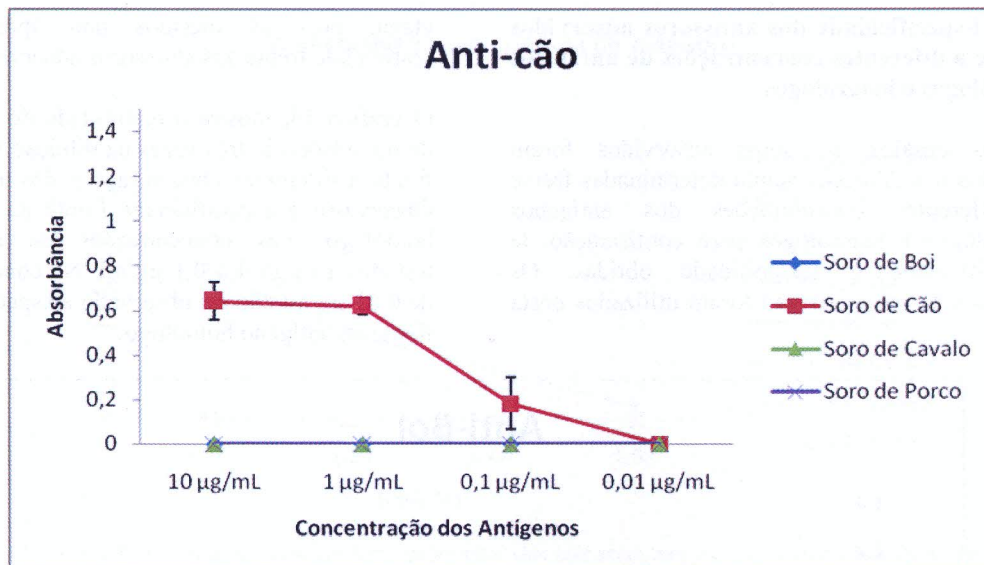


Gráfico 15: ELISA. Reação do antissoro anti-cão contra os soros homólogos e heterólogos.

No gráfico 16, estão demonstradas as reações de especificidade com o antissoro de cavalo adsorvido três vezes na diluição de 1:25. O antissoro de cavalo apresentou especificidade em

todas as concentrações de antígeno testadas. A absorbância de 1,2 a 490 nm mostra alta sensibilidade do antissoro em relação ao seu homólogo.

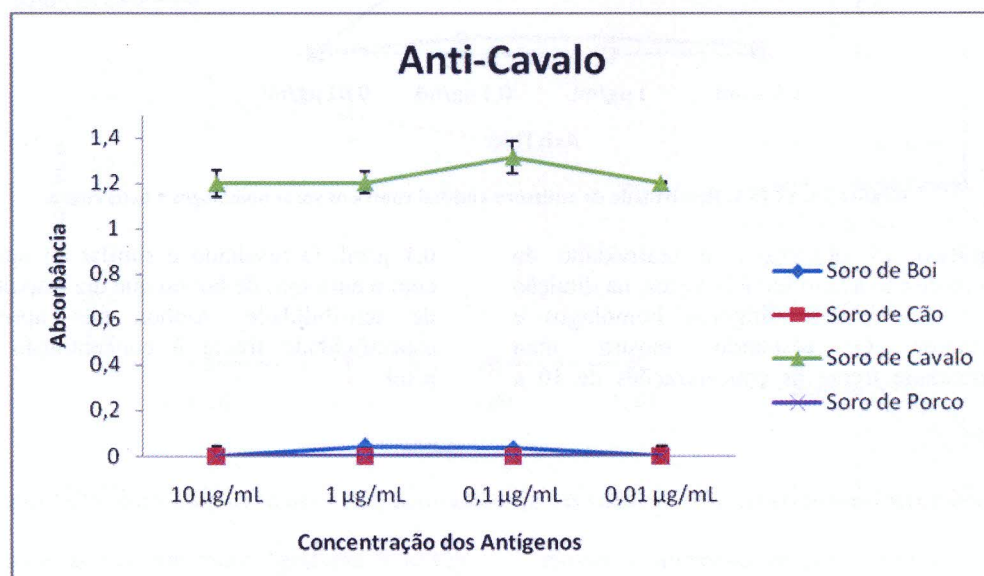


Gráfico 16: ELISA. Reação do antissoro anti-cavalo contra os soros homólogos e heterólogos.

No antissoro de porco adsorvido três vezes, diluição 1:25 (gráfico 17), houve um mesmo padrão de especificidade apresentados nos gráficos 14 e 15, com uma alta reatividade frente as diferentes concentrações do antígeno homólogo. A especificidade do antissoro é observada na faixa de concentração de antígeno de 10 a 0,1 µ/ml.

As diluições definidas anteriormente mostraram-se eficazes na identificação específica de antígenos de diferentes espécies de carnes. Os antissoros adsorvidos poderiam estar aptos a serem utilizados para testes de identificação em alimentos processados.

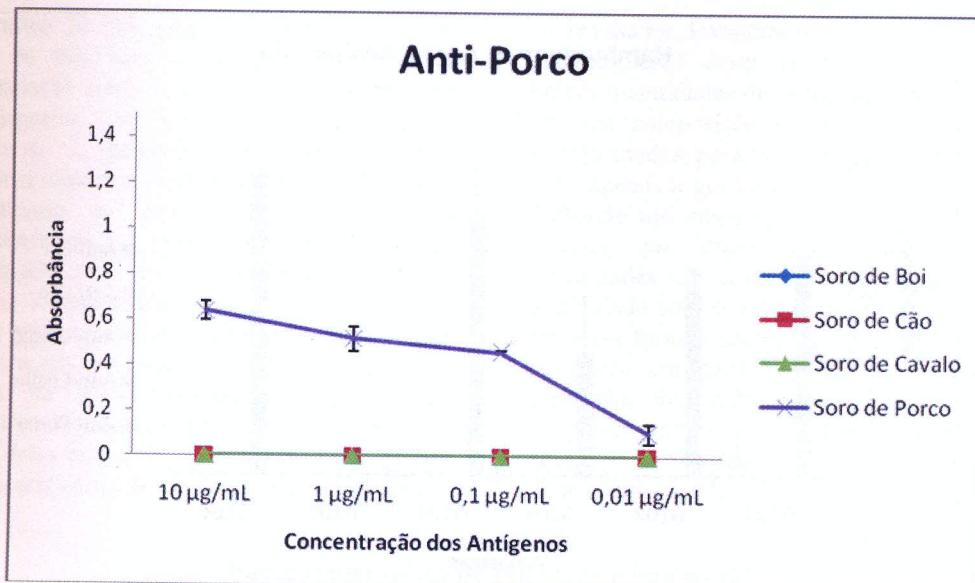


Gráfico 17: ELISA. Reação do antissoro anti-porco contra os soros homólogos e heterólogos.

#### 4.5 - Testes em Alimentos Processados (Hambúrgueres)

Nesta etapa do estudo, os antissoros adsorvidos nas diluições fixadas previamente e que se mostraram específicos frente a antígenos homólogos foram utilizados em ensaios imunoenzimáticos para identificação de espécies de carnes em alimentos processados. Os hambúrgueres utilizados nesta etapa do experimento foram analisados crus, com o intuito de ainda preservarem as características morfológicas de suas proteínas.

O gráfico 18 representa os seis lotes de uma marca de hambúrguer que possui em sua constituição carne de bovinos e de aves, onde foi testada a reatividade específica de todos os antissoros. No grupo G1 foi confirmada a especificidade demonstrada nos ensaios anteriores. Apenas o antissoro específico para boi mostrou reatividade frente às proteínas do alimento processado. Os demais antissoros não apresentaram reatividade, exceto o antissoro de

porco, que apresentou uma baixa reatividade, embora acima do *cut-off*. Esta reatividade poderia ser considerada como uma inespecificidade dentro da “zona cinzenta”, que é uma região de reatividade inespecífica onde deve ser solicitado um re-teste.

O grupo G1 apresentou em quase todos os seus lotes um alto resultado em relação à reatividade do antissoro de boi com seu homólogo, contudo, na amostra G105 não há nenhuma reatividade. Este resultado poderia ser interpretado de diversas formas: primeiro, a ausência do antígeno de boi no alimento; segundo, a presença de uma quantidade do antígeno de boi abaixo do nível de detecção do teste e por ultimo, a substituição do antígeno cárneo (protéico) por gorduras. Como foi abordada na revisão de literatura, uma série de fatores pode dificultar a inspeção de produtos, e o teor de gorduras não é uma exceção. A diferença de intensidade na reatividade do antissoro de boi poderia sugerir variação nas concentrações de proteínas de boi no alimento processado.

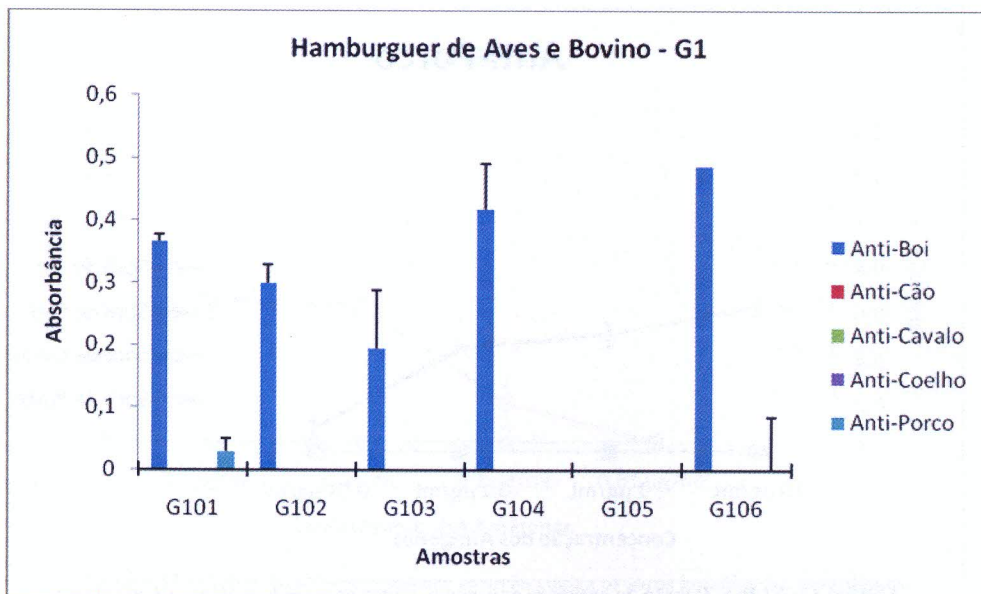


Gráfico 18: ELISA. Reatividade dos antissoros diante de alimentos processados (Hamburgueres). Neste gráfico, lotes de hambúrgueres compostos por carne de aves e bovina.

No gráfico 19 está representado o resultado para as amostras de hambúrgueres compostos por carnes de aves, bovina e suína (G2). Em todas as amostras foi detectado o conteúdo de carne de boi pelo antissoro específico. Observaram-se diferenças nos níveis de carne de boi detectadas nas diferentes

amostras. Apesar dos hambúrgueres aqui listados possuírem em sua composição gordura de porco listada no rótulo das embalagens, não observou-se reatividade pelo antissoro homólogo, indicando que a gordura animal adicionada ao hambúrguer não continha quantidade de proteínas dentro do limite de detecção do teste.

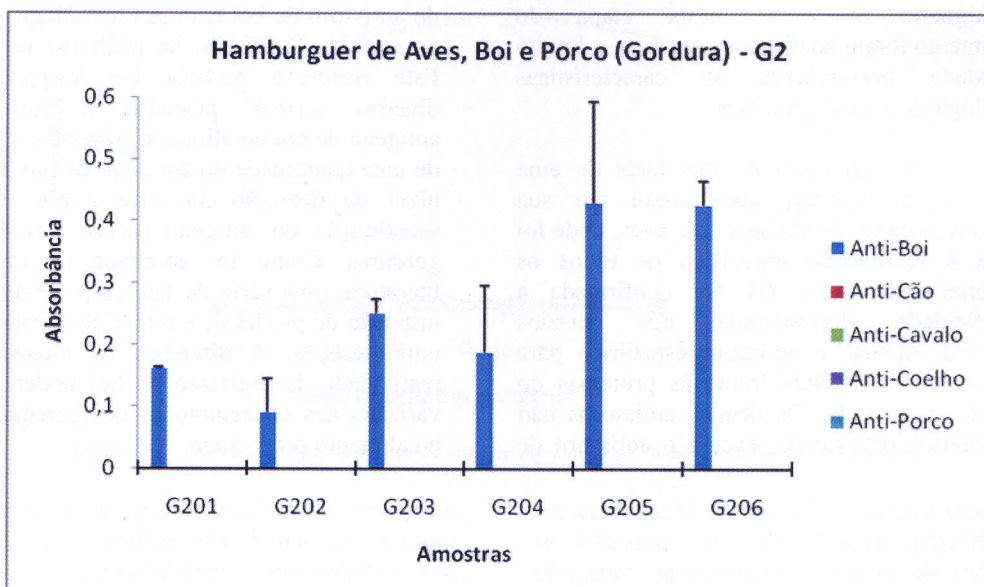


Gráfico 19: ELISA. Reatividade dos antissoros diante de alimentos processados (Hamburgueres). Neste gráfico, lotes de hambúrgueres compostos por carne de aves, bovina e gordura de suínos.

No gráfico 20 (G3, grupo de hambúrgueres de carne de boi, aves e porco), além da alta diferenciação entre os resultados das carnes de hambúrgueres, já observados nos ensaios anteriores, é possível notar também nos primeiros lotes uma reatividade inespecífica com o antissoro de cão, contudo, abaixo da absorvância de 0,1 pontos. O valor baixo foi considerado como margem de erro nos ensaios, ou uma inespecificidade ainda apresentada por alguns anticorpos com reatividade cruzada que poderiam estar presentes no antissoro de cão, que reagem de forma inespecífica com o seu respectivo homólogo. Além disso, apesar do rótulo desta marca de hambúrguer estar escrito que possuía carne de porco em sua composição,

os resultados levantaram a hipótese de que os hambúrgueres desta marca ou poderiam ter baixas quantidades de carne de porco adicionada em sua composição ou o material de suínos transformados para a obtenção do hambúrguer seria apenas a gordura de suínos. Para tanto, foi realizado um ensaio para tentar mostrar que, à medida que eram adicionados à amostra quantidades do soro de porco, ocorria uma reatividade com seu antissoro homólogo. Quatro amostras foram escolhidas e foi adicionado soro de porco em cada uma delas. A reatividade específica observada após a adição do antígeno de porco corrobora em parte a hipótese acima apresentada e confirma a reatividade específica do antissoro (gráfico 21).

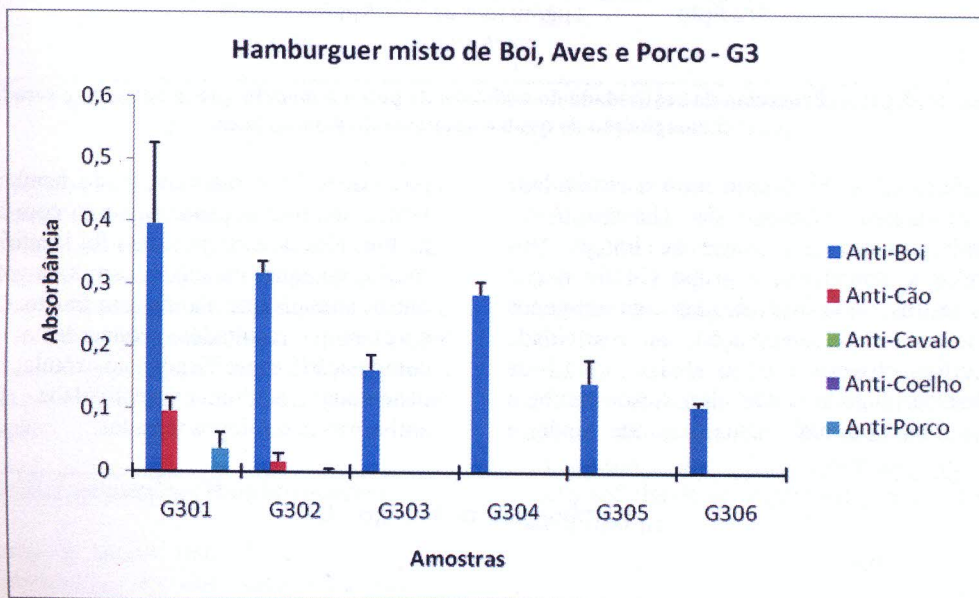


Gráfico 20: ELISA. Reatividade dos antissoros diante de alimentos processados (Hamburgueres). Neste gráfico, lotes de hambúrgueres compostos por carnes de aves, boi e porco.

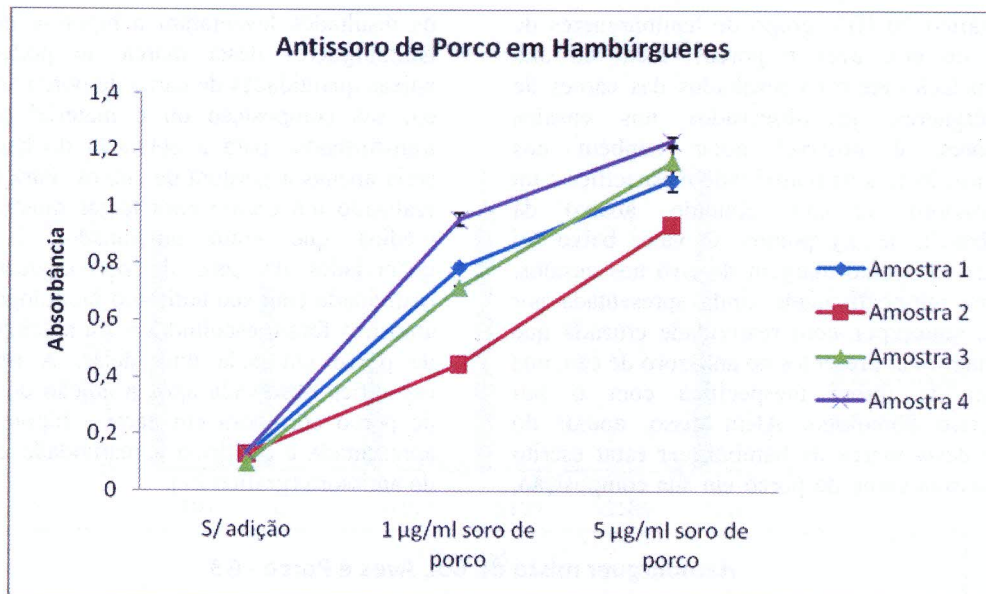


Gráfico 21: ELISA. Progresso da reatividade do antissoro de porco à medida que se adiciona o soro homogêneo à composição de quatro amostras de hambúrguer.

Os gráficos 22 e 23 demonstram a reatividade dos antissoros diante de hambúrgueres fabricados apenas com carne de frango. Nos resultados apresentados, o grupo G4 foi o que teve amostras ainda identificadas com antígenos de boi em sua composição. A reatividade inespecífica observada ficou abaixo de 0,1 de absorbância, e poderia ser classificada também como “zona cinzenta”. Uma segunda hipótese

poderia ser a contaminação do hambúrguer de frango durante o processamento com antígenos de boi. Nos dois grupos, não foi identificado nos rótulos qualquer menção a carnes ou gorduras de outros animais que não fossem frango. O grupo 5 apresentou resultados concordantes com a composição especificada no rótulo. Não foi observada nenhuma reatividade com os antissoros heterólogos testados.

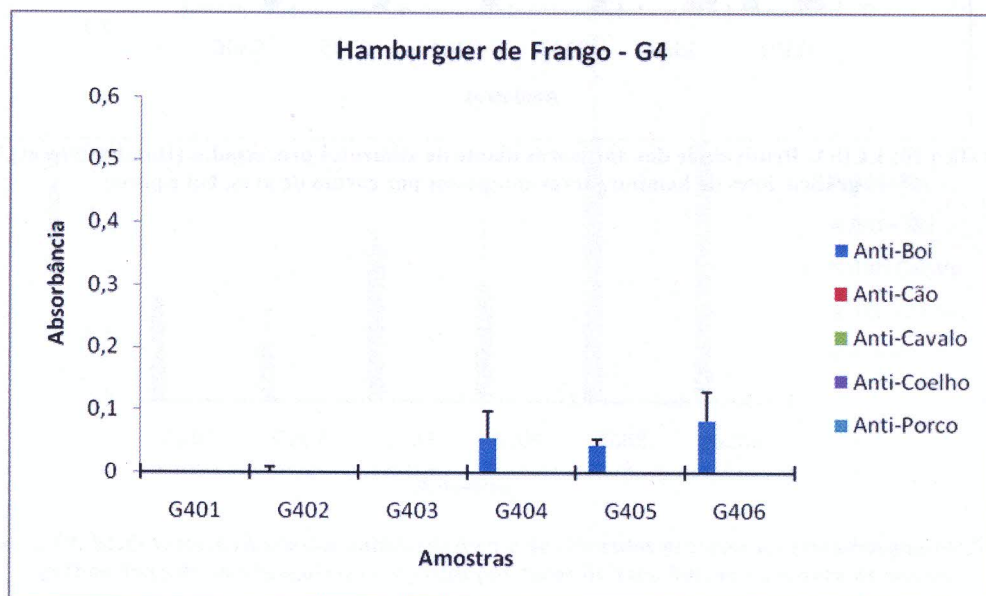


Gráfico 22: ELISA. Reatividade dos antissoros diante de alimentos processados (Hamburgueres). Neste gráfico, lotes de hambúrgueres compostos por carne de frango.

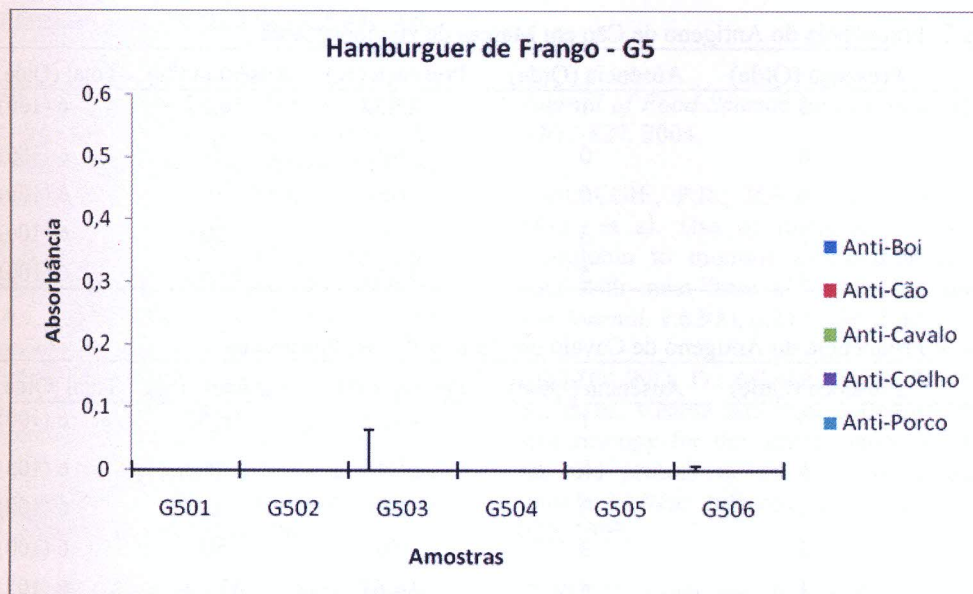


Gráfico 23: ELISA. Reatividade dos antissoros diante de alimentos processados (Hamburgueres). Neste gráfico, lotes de hambúrgueres compostos por carne de frango.

Apesar de uma pequena reatividade cruzada em alguns resultados, as leituras apresentaram-se satisfatórias, revelando um alto grau de especificidade e reatividade, mostrando que a metodologia empregada neste estudo mostra-se bastante eficaz e de grande auxílio para órgãos de vigilância sanitária no que diz respeito à procedência e qualidade de alimentos cárneos processados.

#### 4.6 – Análise Estatística (Hambúrgueres)

As tabelas a seguir (tab. 1, 2, 3, 4 e 5) demonstram o que foi observado em relação à

frequência de antígenos encontrados em cada um dos grupos de hambúrgueres amostrados. Todas as análises foram estatístico-descritivas. Nas tabelas de 1 a 5, é possível notar a presença ou ausência de algumas proteínas cárneas que não condizem com o especificado nos rótulos dos produtos, contudo, em comparação com os gráficos acima exibidos, é possível notar que apesar da incidência, as análises descritivas mostraram que há questões de baixa inespecificidade de alguns antígenos encontrados nas amostras.

Tabela 1: Frequência do Antígeno de Boi em Marcas de Hambúrgueres

	Presença (Qtde)	Ausência (Qtde)	Presença (%)	Ausência (%)	Total (Qtde, %)
G1	5	1	83,33	16,67	6 (100)
G2	6	0	100	0	6 (100)
G3	6	0	100	0	6 (100)
G4	3	3	50	50	6 (100)
G5	1	5	16,67	83,33	6 (100)

Tabela 2: Frequência do Antígeno de Cão em Marcas de Hambúrgueres

	Presença (Qtde)	Ausência (Qtde)	Presença (%)	Ausência (%)	Total (Qtde, %)
G1	5	1	83,33	16,67	6 (100)
G2	6	0	100	0	6 (100)
G3	6	0	100	0	6 (100)
G4	3	3	50	50	6 (100)
G5	1	5	16,67	83,33	6 (100)

Tabela 3: Frequência do Antígeno de Cavalo em Marcas de Hambúrgueres

	Presença (Qtde)	Ausência (Qtde)	Presença (%)	Ausência (%)	Total (Qtde, %)
G1	5	1	83,33	16,67	6 (100)
G2	6	0	100	0	6 (100)
G3	6	0	100	0	6 (100)
G4	3	3	50	50	6 (100)
G5	1	5	16,67	83,33	6 (100)

Tabela 4: Frequência do Antígeno de Coelho em Marcas de Hambúrgueres

	Presença (Qtde)	Ausência (Qtde)	Presença (%)	Ausência (%)	Total (Qtde, %)
G1	5	1	83,33	16,67	6 (100)
G2	6	0	100	0	6 (100)
G3	6	0	100	0	6 (100)
G4	3	3	50	50	6 (100)
G5	1	5	16,67	83,33	6 (100)

Tabela 5: Frequência do Antígeno de Porco em Marcas de Hambúrgueres

	Presença (Qtde)	Ausência (Qtde)	Presença (%)	Ausência (%)	Total (Qtde, %)
G1	5	1	83,33	16,67	6 (100)
G2	6	0	100	0	6 (100)
G3	6	0	100	0	6 (100)
G4	3	3	50	50	6 (100)
G5	1	5	16,67	83,33	6 (100)

Tabelas 1 a 5: Frequência estatística dos diferentes antígenos em cada uma das cinco marcas de hambúrgueres testados.

## 5 – CONCLUSÃO

A metodologia imunológica (ELISA) testada é eficaz na obtenção de resultados para a avaliação e controle de origem de carnes em produtos cárneos, sendo um método sensível e específico: sensível no que diz respeito a detectar quantidades mesmo que pequenas de proteínas

cárneas em amostras; e específico no que diz respeito a identificar o antígeno em questão em uma amostra.

Com relação a amostras de carnes cozidas, contudo, a reatividade dos antissoros produzidos ainda é baixa, uma vez que proteínas cárneas expostas ao calor podem-se desnaturar e comprometer a sua ligação com um anticorpo ou molécula que seria capaz de identificá-la.

## 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASENSIO, L.; GONZALEZ, I.; GARCIA, T.; et al. Determination of Food Authenticity by Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Food Control*, v.19, n.1, p.1-8, 2008.
- RELATÓRIO ANUAL 2009 (2010). *Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína*. 2010. 9p. Disponível em <http://www.abipecs.org.br/pt/relatorios.html>. Acesso em 20-05-2011.
- AVARAMEAS, S.; TERNYNCK, T. The cross-linking of protein with glutaraldehyde and its use for preparation of immunoadsorbents. *Immunochemistry*, v.6, p.43-52, 1969.
- AYOB, M.K.; SMITH, C.J. Immunoassay techniques for food analysis. *Sains Malaysiana*, nº19, p. 1-28, 1990.
- BELLORINI, S.; STRATHMANN, S.; BAETEN, V.; et al. Discriminating animal fats and their origins: assessing the potentials of Fourier transform infrared microscopy, gas chromatography, immunoassay and polymerase chain reaction techniques. *Anal. Bioanalytical Chem.*, v.382, p.1073-1083, 2005.
- BERZAGHI, P; DALLE ZOTTE, A.; JANSSON, L.M.; et al. Near-infrared reflectance spectroscopy as a method to predict chemical composition of breast meat and discriminate between different n-3 feeding sources. *Poultry Science*, v.84, n.1, p.128-136, 2005.
- BILLETT, E. E.; BEVAN, R.; SCANLON, B.; et al. The use of a poultryspecific murine monoclonal antibody directed to the insoluble muscle protein desmin in meat speciation. *Journal Science Food Agric*, v.70, n.3, p.396-404, 1996.
- BONWICK, G. A.; CRESSWELL, J. E.; TYREMAN, A. L.; et al. Production of murine monoclonal antibodies against sulcofurum and flucofurum by in vitro immunization. *Journal of Immunological Methods*, v.196, p.163-176, 1996.
- BONWICK, G. A.; SMITH, C.J. Immunoassays: their history, development and current place in food science and technology. *Internacional Journal of Food Science and Technology*, nº 39, p.817-827, 2004.
- CARNEGIE, P.R.; ILIC, M.Z.; ETHERIDGE, M.O.; et al. Use of histidine dipeptides and myoglobin to monitor adulteration of cooked beef with meat from other species. *Australian Vet Journal*, v.62(8), p.272-276, 1985.
- COZZOLINO, D.; MURRAY, I.; PATERSON, R.; et al. Visible and near infrared reflectance spectroscopy for the determination of moisture, fat and protein in chicken breast and thigh muscle. *J Near Infrared Spectrosc*, v.4, p.213-223, 1996.
- CTSCCV (*Code des Usages de la Charcuterie, de la Salaison et des Conserves de Viandes*). Maisons-Alfort, France: CTSCCV, 1997.
- DALL' ALBA, C.; HAUSSEN, D. C.; MARX, C. B.; et al. Relato de caso Creutzfeldt-Jakob: primeiro relato de caso no Rio Grande do Sul, *Revista da AMRIGS*, vol 48, ano 2, n. 73 , p. 99 – 102, 2004.
- DA-RIZ, V.; DEMEULEMESTER, C. Technologies des produits de charcuterie et des salaisons: Contrôle des produits au stade de la commercialisation. Londres: Tec & Doc, p. 449-509, 1999.
- Departamento de Saúde do Reino Unido. *Monthly CJD statistical figures*. UK Department of Health [WWW document]. Disponível em <http://www.dh.gov.uk/PolicyAndGuidance/HealthAndSocialCareTopics/CJD/CJDGeneralInformation/fs/en>. 2004. Acesso em 13 de Abril de 2008.
- DING, H. B.; XU, R. J.; CHAN, D. K. O. Identification of broiler chicken meat using a visible/near-infrared spectroscopic technique. *J Sci Food Agric*, v.79, p.1382-1388, 1999.
- DOWNEY, G.; MCELHINNEY, J.; FEARN, T. Species identification in selected raw homogenized meats by reflectance spectroscopy in the mid-infrared, near infrared and visible ranges. *Applied Spectroscopy*, v.54, p.894-899, 2000.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA EM AGROPECUÁRIA. *A carne como alimento*. Disponível em <http://www.cnpqc.embrapa.br/publicacoes/doc/doc77/02carnealimento.html>. Acesso em 15 de abril de 2011.

FUMIÉRE, O.; VEYS, P.; BOIX, A.; et al. Methods of Detection, Species Identification and Quantification of Processed Animal Proteins in Feedstuffs. *Boitechnol. Agron. Soc. Environ*, v.13(S), p.59-70, 2009.

GARCIA, T.; MARTIN, R.; MORALES, P.; et al. Production of a horse-specific monoclonal-antibody and detection of horse meat in raw meat mixtures by an indirect Elisa. *Journal Science Food Agric*, v.66(3) p.411-415, 1994.

GIOVANNACCI, I.; GUIZARD, C.; CARLIER, M.; et al. Species Identification of Meat Products by ELISA. *International Journal of Food Science and Technology*, n° 39, p. 863-867, 2004.

GIZZI, G.; VON HOLST, C.; BAETEN, V.; et al. Intercomparison study for the determination of processed animal proteins including meat and bone meal in animal feed. *Relatório final de contrato administrativo n° B5-1000/02/000483*. JCR-IRMM, 2003. 100p.

GOSLING, J. P. *Immunoassays: A Practical Approach*. Oxford University Press, Oxford. 2000. 304 p.

HSIEH, Y. H., SHEU, S. C., & BRIDGMAN, R. C. Development of a monoclonal antibody specific to cooked mammalian meat mixtures. *Meat Science*, v.15, p.1-13, 1998.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; HUNT, S.; et al. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 6ª ed. Londres, Churchill Livingstone, 2004. 848p.

KESMEN, Z.; SAHIN, F.; YETIM, H. PCR assay for the identification of animal species in cooked sausages. *Meat Science*, v.77, n.4, p. 649-653, 2007.

KIM, S. H.; HUANG, T. S.; SEYMOUR, A.; et al. Development of Immunoassay for Detection

of Meat and Bone Meal in Animal Feed. *Journal of Food Protection*, v. 68, n° 9, p. 1860-1865. 2005.

KOHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of pre-defined specificity. *Nature*, n°256, p. 495-497. 1975.

KORPIMAKI, T.; ROSENBERG, J.; VIRTANEN, P.; et al. Further improvement of broad specificity hapten recognition with protein engineering. *Protein Engineering*, n°16, p. 37-46, 2003.

KREBS, B.; RAUCHENBERGER, R.; SILKE, R. High-throughput generation and engineering of recombinant human antibodies. *Journal of Immunological Methods*, v.254, p. 67-84, 2001.

LIDDEL, E.; WEEKS, I. *Antibody Technology*. Oxford. Taylor & Francis Ltd., 1995. 160p.

LUCHIARI FILHO, A. Produção de Carne Bovina no Brasil: Qualidade, Quantidade ou Ambas?. *Simpósio sobre Desafios e Novas Tecnologias na Bovinocultura de Corte*. 10p. Brasil, 2006.

MARTIN, R.; AZCONA, J.I.; TORMO, J.; et al. Detection of chicken meat in raw meat mixtures by a sandwich enzyme assay. *International Journal of Food Science and Technology*, v.23, p.303-310, 1988.

MCCAFFERTY, J.; GRIFFITHS, A. D.; WINTER, G. et al. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*, v.348, p.552-554, 1990.

MCELHINNEY, J.; DOWNEY, G.; O'DONNELL, C. Quantitation of Lamb Content in Mixtures with Raw Minced Beef Using Visible, Near and Mid-Infrared Spectroscopy. *Journal of Food Science*, v.64, p.587-591, 1999.

MÉRET, V.; DA-RIZ, V.; GUIZARD, C.; et al. Méthodes d'indentication de l'origine des protéines animales et végétales dans les produits carnés. *Annales des Falsifications de l'Expertise Clinique & Toxicologique*, n° 92, p. 495-511, 1999.

- MORALES, P.; GARCÍA, T.; GONZÁLEZ I.; et al. Monoclonal antibody detection of porcine meat. *Journal of Food Protection*, v.57(2), p.146-149, 1994.
- MYERS, M. J.; YANCY, H. F.; FARRELL, D. E.; et al. Evaluation of two commercial lateral-flow test kits for detection of animal proteins in animal food. *Journal of Food Protection*, v.68(12), p.2656-2664, 2005.
- NITRINI, R. Nova variante da doença de Creutzfeld-Jakob: A doença priônica humana relacionada à encefalopatia espongiforme bovina – “Doença da Vaca Louca”. *Rev. Associação de Medicina Brasileira*, Vol.47 no.2 , p. 25 - 28, 2001.
- PATTERSON, R. L. S.; JONES, S. J. Review of Current Techniques for the Verification of the Species Origin of Meat. *Analyst*, n.115, p.501-506, 1990.
- PIER, G. B.; LYCZAK, J. B.; WETZLER, L.M. *Immunology, Infection and Immunity*. ASM Press, Washington. 718p, 2004.
- PRADO, M.; BERBEN, G.; FUMIÈRE, O.; et al. Detection of ruminant meat and bone meals in animal feed by real time polymerase chain reaction: result of an interlaboratory study. *J. Agric. Food Chem.*, v.55, p.7495-7501, 2007.
- RANNOU, H.; DOWNEY, G. Discrimination of raw pork, chicken and turkey meat by spectroscopy in the visible, near- and mid-infrared ranges. *Anal Commun* v.34, p.401-404, 1997.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. *Regulamento da Inspeção Industrial e sanitária de Produtos de Origem Animal*. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal, 1997.
- SAEED, T.; SAWAYA, W. N.; MAMEESH, M.; et al. Detection of pork in processed meat: Experimental comparison of methodology. *Food Chemistry*, v. 37, nº 3, p. 201-219, 1988.
- SWART, K. S.; WILKS, C. R. An Immunodiffusion Method for the Identification of the Species of Origin of Meat Samples. *Australian Veterinary Journal*, v.59. p.21-22, 1982.
- THYHOLT, K.; ISAKSSON, T. Differentiation of frozen and unfrozen beef using nearinfrared spectroscopy. *J Sci Food Agric* v.73, p.525-532, 1997.
- TIJSSSEN, P. The Nature of immunogens, antigens and haptens. In: BURDEN, R. H.; VAN KNIPPENBERG, P. H. (Ed.) *Practice and Theory of Enzyme Immunoassay*. 1. ed. Amsterdam, 1985. p. 39-41.
- TINBERGEN, B. J.; SLUMP, P. The detection of chicken meat in meat products by means of the anserine/carnosine ratio. *Z. Lebensm Unters Forsch*, v.161, p.7-11, 1976.
- RELATÓRIO ANUAL UBA 2009. *União Brasileira de Avicultura*. 40p, 2010. Disponível em [http://www.abef.com.br/ubabef/publicacoes\\_relatoriosanuais.php](http://www.abef.com.br/ubabef/publicacoes_relatoriosanuais.php). Acesso em 20-05-2011.
- VAN RAAMSDONK, L. W. D.; HEKMAN, W.; VLIEGE, J. M.; et al., The 2008 Dutch NRL/IAG proficiency test for detection of animal proteins in feed. <http://library.wur.nl/way/bestanden/clc/1876397.pdf> (acesso em 20.11.08), 2008.
- VEYS, P.; BAETEN, V. CRL-AP Interlaboratory study 2006 final report. [http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/resources/interlaboratory2006\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/resources/interlaboratory2006_en.pdf), (acesso em 18.11.08), 2007.
- WITTAKER, R. G.; SPENCER, T. L.; COPLAND, J. W. An Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Species Identification of Raw Meat. *Journal of Science Food Agriculture*, nº34, p. 1143-1148, 1983.
- ZAPPA, V.; PUZZI, M. B.; XAVIER, A.; et al. Encefalopatia Espongiforme Bovina. *Revista Científica Eletrônica De Medicina Veterinária*, Ano VI, nº 10, 2008.