



## IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CARNE DE FRANGO EM LINGUIÇA SUÍNA DO TIPO FRESCAL POR PCR EM TEMPO REAL

Bianca Mie **Kumata**<sup>1</sup>; Ana Lúcia S C **Lemos**<sup>2</sup>; Maristela V da Cunha **Aoki**<sup>3</sup>; Márcia Mayumi H **Haguiwara**<sup>4</sup>; Daniela Mary **Yamashita**<sup>5</sup>

Nº RE24210

**RESUMO** – Com a crescente conscientização dos consumidores com relação aos produtos cárneos, seja por questões ideológicas, religiosas ou de saúde, a rotulagem correta é fundamental para que não ocorra a ingestão de um alimento não desejado, assim como para evitar fraudes. Deste modo, a PCR em tempo real (qPCR) é frequentemente utilizada para a detecção e quantificação de uma sequência de DNA específica, sendo adequada para a determinação dos teores de ingredientes cárneos contidos nos produtos, visto que cada espécie possui um genoma característico. Este estudo teve como objetivo estabelecer um método que pudesse quantificar simultaneamente os teores das proteínas de frango e suíno em linguiças do tipo fresco, através da técnica multiplex da qPCR, tornando a quantificação mais ágil e podendo aplicá-la em casos de suspeita de adulterações em produtos cárneos. O método estabelecido foi aplicado em amostras conhecidas e em amostras adquiridas no comércio. Para a amostra controle preparada com 50% de frango e 50% de suíno, foram obtidos teores de 50,64% e 49,36%, respectivamente. Para a amostra contendo 20% de frango e 80% de suíno, obteve-se o resultado de 21,43% e 78,57%, respectivamente. As demais amostras conhecidas também apresentaram resultados coerentes com o esperado. Os resultados das amostras adquiridas no comércio confirmaram as informações declaradas pelos fabricantes em alguns dos casos, com relação à existência ou não das proteínas cárneas estudadas. Nenhuma das amostras informava a quantidade de frango e de suíno contida nos produtos.

**Palavras-chaves:** Linguiça fresco, produtos cárneos, PCR em tempo real, qPCR, quantificação absoluta, curva padrão.

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas-SP; biancamiekumata@gmail.com

2 Colaborador, Pesquisadora e diretora técnica do Centro de Tecnologia de Carnes, CTC/Ital, Campinas-SP.

3 Colaborador, Técnica de laboratório do Centro de Tecnologia de Carnes, CTC/Ital, Campinas-SP.

4. Co-orientador, Pesquisadora do Centro de Tecnologia de Carnes, CTC/Ital, Campinas-SP.

5. Orientador: Assistente técnico de pesquisa científica e tecnologia do Centro de Tecnologia de Carnes, CTC/Ital, Campinas-SP; [daniela@ital.sp.gov.br](mailto:daniela@ital.sp.gov.br).



**ABSTRACT** – *Correct labeling is crucial to preventing the consumption of undesired food and preventing fraud in light of consumers’ increasing awareness of meat products for ideological, religious, or health-related reasons. The real-time PCR (qPCR) technique is often employed for the identification and measurement of a particular DNA sequence, and as every species possesses a distinct genome, it is thus appropriate for validating the meat components found in the examined products. Using the multiplex real-time PCR methodology, the goal of this work was to develop a method that could simultaneously quantify the protein content of pork and chicken in fresh sausages. This increases quantification’s agility and can be used in situations where adulteration of meat products is suspected. The established method was applied in known and commercially acquired samples. For the control sample prepared with 50% of chicken meat and 50% of pork, levels of 50,64% and 49,36% were obtained, respectively. For the sample containing 20% of chicken and 80% of pork, the results were 21,43% and 78,57%, respectively. The other known samples also presented results consistent with expectations. The results of commercially acquired samples confirmed the information declared by the manufactures in some cases, regarding the existence or not of the meat proteins studied. None of the samples reported the amount of chicken and pork contained in the products.*

**Keywords:** *Fresh sausages, meat products, Real-time PCR, qPCR, absolute quantification, standard curve*

## 1. INTRODUÇÃO

A substituição de espécies animais em produtos cárneos é, infelizmente, um exemplo comum de fraude alimentar impulsionada por ganhos econômicos, especialmente se for trocado por uma espécie de menor valor comercial. Sendo que para o consumidor, além de gerar prejuízos financeiros, podem até causar danos a saúde, caso o consumidor for alérgico aos ingredientes adicionados sem sua devida rotulagem (DALSECCO, 2018). A título de exemplo, uma notícia do Globo Rural afirma que a OMC (Organização Mundial da Saúde) “deflagra sinal de alerta sobre aumento de comércio ilícito e fraudes no agroalimentar e bebidas” e ainda destaca que é um “problema crescente” e que embora seja difícil determinar o custo global da fraude no setor de alimentos, seja estimado de US\$ 30 bilhões a US\$ 50 bilhões (sem incluir perdas no comércio ilícito de bebidas alcoólicas).

A norma alimentar IFS Food versão 8 (2023) estabelece como fraude em alimentos “a substituição intencional, rotulagem enganosa, adulteração ou falsificação de alimentos de matérias-



primas ou materiais de embalagem disponibilizados no mercado para fins de ganhos econômicos. Essa definição também se aplica a processos terceirizados”.

A Instrução Normativa nº 75 (BRASIL, 2020) determina os requisitos técnicos para a declaração da rotulagem nutricional dos alimentos embalados. Entretanto pode ocorrer de haver falsificação do nome da marca, embalagem, formulação, diluição, produtos não declarados, etiquetagem incorreta, dentre outros agravantes (DALSECCO, 2018).

Em produtos cárneos, especialmente os processados, a rotulagem vem ganhando grande atenção, uma vez que nesses produtos a identificação dos ingredientes é mais difícil devido a mudanças na aparência, textura e sabor, podendo-se mascarar a origem dos ingredientes (DALSECCO, 2018).

Sendo assim, a utilização de técnicas rápidas e confiáveis para a detecção de fraudes em alimentos se torna imprescindível para a proteção dos consumidores e produtores, garantindo a competitividade, a qualidade e segurança dos produtos.

O objetivo desse trabalho é estabelecer um método que possa quantificar simultaneamente os teores das proteínas de frango e suíno em linguças do tipo frescal, através da técnica multiplex da qPCR em amostras de linguças do tipo frescal preparadas em planta piloto e em amostras adquiridas no comércio varejo.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Amostras**

As amostras de linguça frescal de frango - 125\* e 126\* - foram elaboradas em planta piloto do Centro de Tecnologia de Carnes do Instituto de Tecnologia de Alimentos (CTC – Itai), sendo que na amostra 125\* foi utilizado o recorte de peito de frango com pele e, na amostra 126\*, recorte de coxa e sobrecoxa de frango com pele. Em ambas as amostras foi adicionada, em menor proporção, papada suína. O restante da massa de ambas as amostras constituiu dos ingredientes básicos para elaboração de linguça frescal. Foram testadas também duas amostras de controle - SF50 e SF80 - para atestar a confiabilidade dos resultados. Essas amostras foram preparadas em laboratório com carnes suína e de frango in natura, em diferentes proporções e codificadas como mostrado na Tabela 1. Nesta tabela também encontram-se as amostras de linguça adquiridas no comércio que foram analisadas de acordo com o mesmo método.



**Tabela 1.** Amostras analisadas no estudo.

Identificação	Especificação da amostra	Objetivo
SF50	Mistura contendo 50% de carne suína e 50% de carne de frango	Amostra controle
SF80	Mistura contendo 80% de carne suína e 20% de carne de frango	Amostra controle
125*	Linguiça frescal: peito de frango com pele adicionado de papada suína	Amostra conhecida – testar método
126*	Linguiça frescal: coxa de frango com pele adicionado de papada suína	Amostra conhecida – testar método
189	Linguiça frescal suína - Fabricante A	Aplicar método
193	Linguiça frescal de frango - Fabricante B	Aplicar método
194	Linguiça frescal de frango - Fabricante C	Aplicar método
199	Linguiça frescal mista para churrasco - Fabricante D	Aplicar método
200	Linguiça frescal de frango fina - Fabricante D	Aplicar método
201	Linguiça fininha mista, cozida e defumada - Fabricante E	Aplicar método
202	Linguiça fininha mista, cozida e defumada - Fabricante F	Aplicar método

## 2.2. Análises moleculares

A extração do DNA foi feita com o auxílio do kit de extração de colunas ReliaPrep™ gDNA Tissue Miniprep System, Promega. A escolha dos primers utilizados para esse estudo, assim como as sondas de hidrólise, foi baseada no estudo de Fröder (2022). A Tabela 2 apresenta as informações dos primers e sondas utilizados.

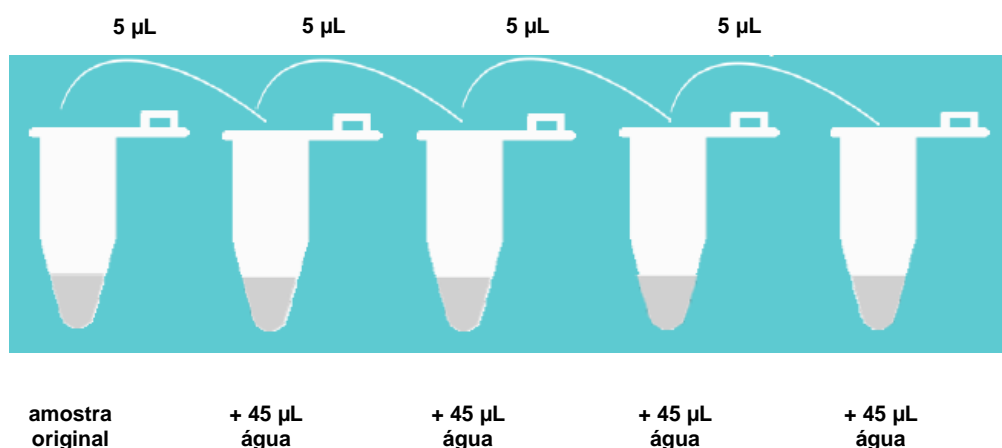
**Tabela 2.** Primers e sondas de hidrólise utilizados no estudo.

Nome	Gene de referência	Sequência	Alvo detectado
Porcine-97bp-F	Beta actina (DQ452569.1)	5'-CGTAGGTGCACAGTAGGTCTGAC-3'	Sus scrofa domesticus; S. scrofa
Porcine-97bp-R		5'-GGCCAGACTGGGGACATG-3'	
Porcine-97bp-P		5'-[FAM]-CCAGGTCGGGGAGTC-[NFQ-MGB]-3'	
Chicken-77bp-F	TGF-β3 (AY685072.1)	5'-CAGCTGGCCTGCCGGC-3'	Gallus gallus domesticus; G. gallus
Chicken-77bp-R		5'-GCCCAGTGGAATGTGGTATTCA-3'	
Chicken-77bp-P		5'-[FAM]-TGCCACTCCTCTGCACCCAGTGC-[TAMRA]-3'	

Para a quantificação das duas espécies em estudo, foi aplicada a técnica de qPCR, utilizando o método da curva padrão, o qual fornece os resultados da quantificação absoluta das amostras.

Para a execução do método foi utilizado o termociclador de PCR em tempo real QuantiStudio™ 3 Real-Time PCR Instrument – Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific. O método se baseia na detecção de fluorescência ao longo dos ciclos da amplificação do equipamento. Os fluoróforos são moléculas com a capacidade de absorver e emitir luz em um comprimento de onda específico. O composto fluorescente utilizado nessa análise foram as sondas TaqMan®, as quais são constituídas pelos fluoróforos “repórter” (localizado na extremidade 5’) e “quencher” (localizado na extremidade 3’). O quencher é capaz de absorver significativamente a fluorescência emitida pelo repórter enquanto a sonda estiver intacta, entretanto, se a sequência alvo estiver presente na amostra, a sonda se anela logo após um dos primers e é clivada através da nuclease 5’ da Taq DNA polimerase. Essa clivagem separa o repórter do quencher, aumentando então a fluorescência do corante repórter que é detectada e analisada pelo equipamento.

Para amplificação dos pontos da curva e das amostras foi utilizado o master mix da marca Promega, GoTaq Probe qPCR Master Mix, para uma reação de 10  $\mu\text{L}$ , sendo 1  $\mu\text{L}$  de amostra para 9  $\mu\text{L}$  da mistura do master mix, primers e sondas de hidrólise, como mostrado na Tabela 3. As curvas padrão das espécies de frango e suíno foram construídas separadamente, elaborando-se uma série de 5 diluições na proporção de 1:10 para cada, preparadas como mostra a Figura 1 a partir das amostras de carne de frango e suíno in natura. As condições de amplificação foram: ciclo inicial a 95 °C/2 min; 40 ciclos: 95 °C/15 s e 54 °C/1 min, de acordo com a orientação do protocolo do master mix. A temperatura de anelamento de 54 °C foi definida na primeira etapa do projeto, através dos testes de PCR convencional, feitos exclusivamente para os pares de primers do estudo.



**Figura 1.** Ilustração da preparação dos pontos das curvas padrão de frango e suíno.



**Tabela 3.** Preparo da mistura para amplificação do DNA das amostras para 10 µL de reação.

Reagente	Volume reagentes (µL)	
	Curvas padrão	Amostras
Master mix	5	5
Primer forward	0,5	0,5 (Suíno) + 0,5 (Frango)
Primer reverse	0,5	0,5 (Suíno) + 0,5 (Frango)
Sondas	0,5	0,5 (Suíno) + 0,5 (Frango)
Amostra	1	1
Água	2,5	1

### 2.3. Análises físico-químicas

A fim de caracterizar as amostras do estudo, foram realizadas as análises físico-químicas orientadas pelo regulamento técnico de identidade e qualidade de linguiça – IN n. 4 de 31/03/2000 (BRASIL, 2000). A Tabela 4 apresenta as características físico-químicas desejadas para linguiças.

**Tabela 4.** Características físico-químicas de linguiças, de acordo com a IN n. 4 de 31/03/2000.

Determinação (valor de referência)	Tipo de linguiça		
	Frescais	Cozidas	Dessecadas
Umidade (máx)	70%	60%	55%
Gordura (máx)	30%	35%	30%
Proteína (mín)	12%	14%	15%
Cálcio* (base seca) (máx)	0,1%	0,3%	0,1%

*\*Substituído pela determinação de cinzas (apenas para fins de caracterização, sem valores de referência para comparação)*

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. Análises moleculares

A Tabela 5 apresenta os resultados obtidos da análise quantitativa das amostras de controle (SF50 e SF80), das amostras de linguiças frescas conhecidas (preparadas em planta piloto – 125\* e 126\*) e amostras de linguiças frescas de frango (193, 194 e 200), de suíno (189) e mista (199), adquiridas no mercado. Com a finalidade de analisar um maior número de amostras e por não haver um número significativo de amostras de linguiças frescas declaradas como mistas no mercado varejo, foram analisadas também duas amostras de linguiças fininhas cozidas e defumadas, de diferentes fabricantes (201 e 202).



**Tabela 5.** Resultados obtidos da qPCR para as amostras de linguiça fresca, cozidas e amostras de controle.

Identificação das amostras	Proporção das espécies (%)				DNA (ng/reação)	Proporção calculada das espécies (%) <sup>(3)</sup>		
	Inicial <sup>(1)</sup>		Inicial normalizado <sup>(2)</sup>					
	Frango	Suíno	Frango	Suíno				
SF50 (controle)	50,00	50,00	50,00	50,00	15,997	15,592	50,64	49,36
SF80 (controle)	20,00	80,00	20,00	80,00	6,289	23,051	21,43	78,57
125* (conhecida)	73,85	8,00	90,23	9,77	15,397	1,915	88,94	11,06
126* (conhecida)	73,85	8,00	90,23	9,77	17,432	0,915	95,01	4,99
189	----	----	----	----	0,082	6,429	1,26	98,74
193	----	----	----	----	0,720	0,007	99,04	0,96
194	----	----	----	----	13,644	0,507	96,42	3,58
199	----	----	----	----	15,974	0,961	94,33	5,67
200	----	----	----	----	14,526	0,000	100,00	0,00
201	----	----	----	----	21,024	5,118	80,42	19,58
202	----	----	----	----	21,364	4,506	82,58	17,42

(1) *Proporção da massa usada na preparação das amostras. No caso das amostras de linguiça – 125\* e 126\* - essa proporção está relacionada com a massa total preparada, incluindo o restante dos ingredientes*

(2) *Proporção da massa utilizada na preparação das amostras, normalizada para as amostras de linguiça – 125\* e 126\* - e exclui o restante dos ingredientes, sendo considerada somente a massa de proteína suína e de frango*

(3) *Proporção calculada a partir do resultado de DNA fornecido pelo qPCR*

Comparando-se os resultados da proporção calculada com a proporção inicial das amostras de controle, nota-se que eles estão muito próximos à proporção preparada, indicando confiabilidade dos resultados. Ao comparar o teor de cada espécie nas amostras conhecidas de linguiça com a coluna da proporção inicial (normalizado), observa-se na amostra 125\* que o resultado também ficou bem perto do esperado, entretanto a amostra 126\* apresentou um desvio um pouco maior que o esperado para o teor inicial utilizado no preparo do produto cárneo. Isso pode ser explicado pela diferença dos cortes utilizados na preparação das linguiças, os quais podem apresentar variação de DNA ao longo da estrutura dos animais estudados. Pode-se supor também que os equipamentos utilizados na elaboração dos produtos possam ter resquícios do produto elaborado anteriormente a ele, e ter contribuído para o aumento do teor de DNA da espécie frango nesta amostra.

Com relação às amostras de linguiça de frango, é comum que elas contenham em sua composição a proteína suína devido ao uso de partes do porco com altos teores de gordura, importantes para contribuir no sabor, aroma e consistência específicos para os embutidos crus (LE MOS, 2008). As amostras 193 e 194 são vendidas como linguiças de frango, mas contêm em sua



lista de ingredientes a proteína suína, declarada adequadamente no rótulo do produto. Isto explica a porcentagem, mesmo que baixa, da proteína suína nos resultados obtidos. A amostra 200 não apresenta proteína suína na lista de ingredientes de sua embalagem e os resultados de qPCR comprovaram essa informação (0,00% de proteína suína).

A amostra 189, teoricamente elaborada exclusivamente com proteína suína, apresentou uma pequena porcentagem de carne de frango. Não é declarada na lista de ingredientes do produto essa proteína e é possível que tenha ocorrido contaminação durante a fabricação ou que seja usada a carne de frango, mesmo não declarada.

Com relação às amostras declaradas como mistas, a amostra 199 apresentou uma porcentagem predominante da proteína de frango, o que comprova a informação declarada na lista de ingredientes da sua embalagem, na qual a carne de frango aparece como primeiro item da lista, o que significa que a quantidade no produto é maior que o restante dos ingredientes. Os resultados das amostras 201 e 202, linguiças mistas cozidas e defumadas, também mostraram uma predominância da carne de frango com relação à carne suína. O fabricante da amostra 201 declara na lista de ingredientes a carne suína como proteína cárnea predominante. Entretanto o resultado de qPCR mostrou que o teor de frango é maior nessa amostra.





### 3.2. Análises físico-químicas

Os resultados da caracterização físico-química das amostras encontram-se na Tabela 6.

**Tabela 6.** Resultados médios da caracterização físico-química das amostras de linguiça e desvio-padrão entre parênteses.

Amostra	Umidade e voláteis (g/100g)	Gordura total (g/100g)	Proteína total (g/100g)	Cinzas (g/100g)
125*	70,32 (0,15)	8,41 (0,42)	16,68 (0,18)	3,46 (0,02)
126*	66,10 (0,39)	16,24 (0,33)	13,43 (0,56)	3,51 (0,09)
189	68,07 (0,58)	16,53 (0,83)	15,04 (0,26)	2,12 (0,02)
193	71,86 (0,20)	9,30 (0,34)	14,99 (0,05)	3,35 (0,11)
194	67,48 (0,36)	16,80 (0,07)	14,15 (0,23)	2,47 (0,05)
199	68,12 (0,10)	13,71 (0,74)	15,89 (0,17)	2,49 (0,01)
200	68,70 (0,22)	11,68 (0,20)	16,75 (0,19)	2,39 (0,01)
201	53,21 (0,06)	21,73 (0,07)	17,05 (0,02)	4,86 (0,05)
202	47,30 (0,24)	29,58 (0,08)	15,25 (0,01)	4,62 (0,02)

Com relação aos resultados de umidade das amostras de linguiças frescas, todas apresentaram-se dentro do limite máximo de 70% permitido pelo regulamento (BRASIL, 2000), exceto as amostras 193, com 71,86%, seguida da amostra 125\*, com 70,32%. Entretanto esses valores se distanciaram discretamente do limite permitido. As amostras 201 e 202 apresentaram valores abaixo do limite máximo de 60% permitido pela legislação para linguiças cozidas.

Todas as amostras estão abaixo do limite máximo permitido para o teor de gordura para linguiças frescas (30%) e linguiças cozidas (35%), assim como todas também atendem ao requisito mínimo de proteína total de 12% para linguiças frescas e de 14% para linguiças cozidas.

## 4. CONCLUSÃO

Pode-se concluir do estudo realizado que a técnica da curva padrão por qPCR se mostrou adequada para a quantificação de DNA das espécies frango e suíno nas amostras de linguiças e que o cálculo da proporção das espécies foi relativamente simples, tornando a técnica promissora para detecção de fraudes em produtos cárneos. É importante que seja dada continuidade ao estudo, incluindo a determinação dos limites de detecção e quantificação das espécies suína e frango por esse método e realizando testes em outras proteínas cárneas e vegetais, como a soja, por exemplo.



## 5. AGRADECIMENTOS

Agradeço ao CNPq pela bolsa concedida e ao Centro de Tecnologia de Carnes do Itai e todos os colaboradores envolvidos neste trabalho.

## 6. REFERÊNCIAS

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **Instrução Normativa - IN N° 75, de 8 de outubro de 2020**. Estabelece os requisitos técnicos para declaração da rotulagem nutricional nos alimentos embalados. Disponível em: [http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/3882585/IN\\_75\\_2020\\_COMP.pdf/e89784b5-ed18-4bdd-a4d4-139724a56d4d](http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/3882585/IN_75_2020_COMP.pdf/e89784b5-ed18-4bdd-a4d4-139724a56d4d). Acesso em: 05 mar. 2022.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA. Secretaria de Defesa Agropecuária - SDA 2000. **Instrução Normativa nº 4, 31 de março de 2000**. Regulamento técnico de identidade e qualidade de linguiça. Disponível em: [http://www.agais.com/normas/carne/carnes\\_linguiça.htm](http://www.agais.com/normas/carne/carnes_linguiça.htm). Acesso em: 03 jul. 2023.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA. **Instrução Normativa nº 20, 21 de julho de 1999**. Oficializa métodos analíticos físico-químicos para controle de produtos cárneos e seus ingredientes – sal e salmoura. Disponível em: [http://nimis.com.br/port/legislacao/geral\\_met\\_an\\_prod\\_carneos.htm](http://nimis.com.br/port/legislacao/geral_met_an_prod_carneos.htm). Acesso em: 03 jul. 2023.

BUSTIN, S. A. et al The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, Oxford, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009.

DALSECCO, L. S. **Desenvolvimento de um método seguro pela técnica de PCR em tempo real para detecção de dez espécies animais em produtos cárneos**. (Tese – Doutorado em Zootecnia). Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais, 2018. 59p.

ENGL, European Network of GMO Laboratories. (2015). **Definition of Minimum Performance Requirements for Analytical Methods of GMO Testing JRC Technical Report**. Chrome - extension://efaidnbmnnnibpcajpcgiclfndmkaj/https://gmocrl.jrc.ec.europa.eu/doc/MPR%20Report%20Application%202020\_10\_2015.pdf.

FRÖDER, H. Detecção de espécies animais utilizando PCR em tempo real (qPCR) para verificar fraudes em produtos cárneos processados. (Tese - Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Encantado, Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, 2022. 69p.

IFS – International Featured Standards. **IFS Food Versão 8**: norma para auditar a conformidade de produtos e processos em relação à segurança de alimentos e qualidade. Berlim: IFS, 2023. 160 p.

LEMOS, A. L. S. C.; Yamada, E. A.; Haguiwara, M. M. H. Processamento de embutidos cárneos. Campinas: Itai, Centro de Tecnologia de Carnes, 2008. 213p.

QUANDO seu filé pode ser de cavalo?. Disponível em <<https://globo.rural.globo.com/pecuaria/noticia/2024/05/quando-seu-file-pode-ser-carne-de-cavalo.ghtml>>. Acesso em: 04 jun. 2024