

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 Cançado  
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. Cançado, Silvana de Vasconcelos. II. Heneine, Luiz Guilherme Dias.  
III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. IV. Título.

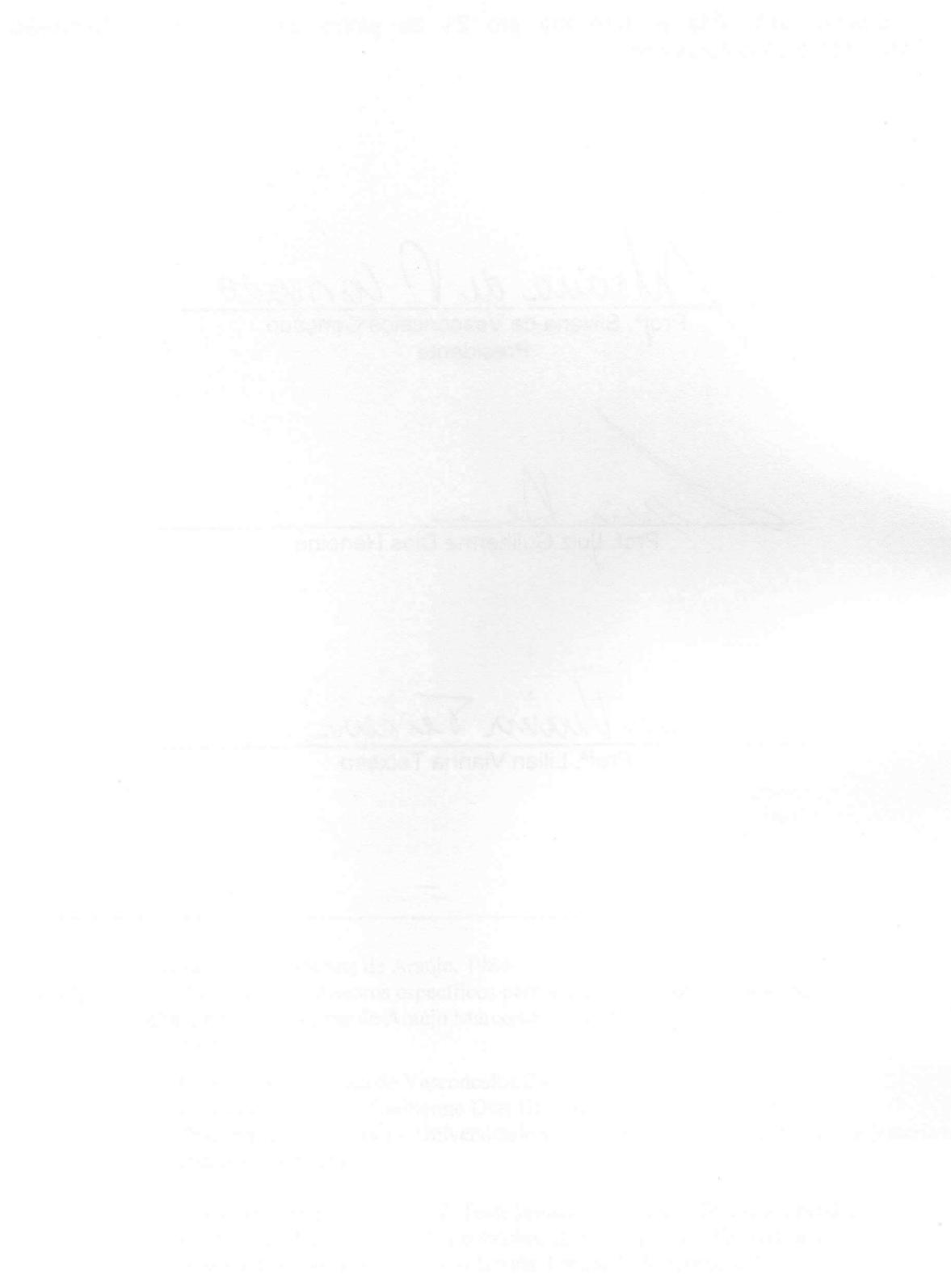
CDD – 664.907

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

Silvana de P. Cançado  
Profª. Silvana de Vasconcelos Cançado  
Presidente

Luiz Heneine  
Prof. Luiz Guilherme Dias Heneine

Lilian Vianna Teixeira  
Profª. Lilian Vianna Teixeira



Universidad de Antioquia. 1984

Investigaciones específicas para la conservación

de la arquitectura histórica

Universidad de Venezuela. C-

olección Documentos

Universitarios. 1984

Editorial Universitaria. Bogotá - Colombia. 1984

Impresión: Imprenta Universitaria. Bogotá - Colombia. 1984

Diseño: Gráfica Universitaria. Bogotá - Colombia. 1984

Diagramación: Gráfica Universitaria. Bogotá - Colombia. 1984

Revisión: Gráfica Universitaria. Bogotá - Colombia. 1984

Corrección: Gráfica Universitaria. Bogotá - Colombia. 1984

Reimpresión: Gráfica Universitaria. Bogotá - Colombia. 1984

Reimpresión: Gráfica Universitaria. Bogotá - Colombia. 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>	<b>9</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>12</b>
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 isoelétrica .....	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 Imuncromatografia .....	17
2.5.5.4 ELISA .....	17
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>18</b>
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 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>21</b>
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抗ígenos homólogos e heterólogos.....	29
4.5 Testes em Alimentos Processados (Hambúrgueres).....	31
4.6 Análise Estatística (Hambúrgueres).....	35
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>36</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>37</b>

---

### 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抗ígenos homólogos, todavia, filtrados de músculos aquecidos dos animais reagiram de forma baixa, uma vez que suas proteínas foram altamente desnaturadas devido ao 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 immunoassay 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.

## **Capítulo 2 - ADOLESCÊNCIA E JUVENTUDE: PROBLEMAS SOCIAIS**

Adolescência é um período de transição entre a infância e a idade adulta, quando o indivíduo se torna mais independente, mais consciente de suas ações e mais capaz de assumir responsabilidade por elas. É uma fase de intensa transformação, tanto física quanto emocional, que marca o final da infância e o início da vida adulta. Muitos adolescentes enfrentam desafios emocionais e sociais que podem afetar seu desenvolvimento e bem-estar.

**2.1. Problemas sociais na adolescência: fatores externos (familiares, escolares, sociais).**

### **PROBLEMAS**

Problemas sociais na adolescência são problemas que surgem de fatores externos ao indivíduo, como a família, a escola e a sociedade. Estes fatores podem ser tanto positivos quanto negativos, mas sempre têm impacto na vida do adolescente. Um exemplo de problema social é a violência doméstica, que pode causar danos emocionais e físicos ao jovem. Outro exemplo é a pressão social, que pode levar ao isolamento social e à ansiedade. Ainda, a falta de oportunidades de aprendizagem e de crescimento profissional também pode ser um problema social.

**2.2. Problemas sociais na adolescência: fatores internos (biológicos, psicológicos, sociais).**

### **PROBLEMAS**

Problemas sociais na adolescência também podem ser causados por fatores internos, como a biologia, a psicologia e a sociedade. Exemplos incluem a depressão, a ansiedade e a alienação social.

**2.3. Problemas sociais na adolescência: fatores familiares (relacionamentos, saúde mental).**

### **PROBLEMAS**

Problemas sociais na adolescência também podem ser causados por fatores familiares, como os relacionamentos entre pais e filhos e a saúde mental dos pais.

**2.4. Problemas sociais na adolescência: fatores escolares (desempenho acadêmico, relacionamentos com professores).**

### **PROBLEMAS**

Problemas sociais na adolescência também podem ser causados por fatores escolares, como o desempenho acadêmico e os relacionamentos com professores.

**2.5. Problemas sociais na adolescência: fatores sociais (racismo, violência, pobreza).**

### **PROBLEMAS**

Problemas sociais na adolescência também podem ser causados por fatores sociais, como o racismo, a violência e a pobreza.

**2.6. Problemas sociais na adolescência: fatores psicológicos (depressão, ansiedade).**

### **PROBLEMAS**

Problemas sociais na adolescência também podem ser causados por fatores psicológicos, como a depressão e a ansiedade.

## 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 imunoabsorvente 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 imunoensaios 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. Ensaios 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).

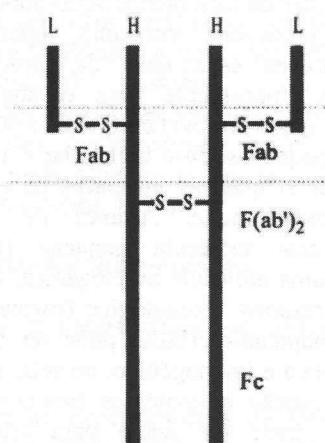


Figura 1: Estrutura geral de um anticorpo. Quatro cadeias de polipeptídeos, duas pesadas (H) e duas leves (L), são estabilizadas e ligadas por pontes dissulfeto (-S-S-) dando à molécula o formato de um Y. A porção inferior da molécula (fração Fc) é própria para ligações. A parte superior [fração F(ab')<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 epitopo de um antígeno (Bonwick & Smith, 2004).

## 2.3 - Antígenos

Antígenos são substâncias capazes, sob condições apropriadas de serem reconhecidas especificamente por anticorpos (Bonwick e 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抗ígenos 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抗原s: quase todas as proteínas, muitos polissacarídeos, nucleoproteínas, lipoproteínas, polipeptídeos e até mesmo muitas moléculas menores, se sutilemente 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抗原s 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 Europeia (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 isoelétrica**

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 poliacrilamida (PAGE), contendo ou não, um agente desnaturante de proteínas (como por exemplo o sulfato-dodecil de sódio, SDS-PAGE) ou por métodos de focalização isoelétrica (IEF) em um gel de Agar ou de poliacrilamida (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 isoelétrico. 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 isoelétrica mostraram bons resultados para a identificação de espécies únicas de carnes não processadas e cruas. A focalização isoelétrica 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 absorbância 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 referência e formaç

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抗ígenos. 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-Imunoelétroforese**

A contra-imunoelétroforese 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. Ensaios 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 imunoensaio 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抗ígenos 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抗ígenos autênticos para aderir à superfície sólida; segundo, o抗ígeno deve possuir uma molécula extensa, promovendo com isto uma aderência tanto do抗ígeno à superfície sólida como ao seu anticorpo homólogo; e terceiro, o anticorpo deve reconhecer os抗ígenos tanto ligantes como não ligantes com igual eficiência (Bonwinck & Smith, 2004).

Wittaker et al. (1983) foram os pioneiros no uso do ELISA como um imunoensaio 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 fraude.

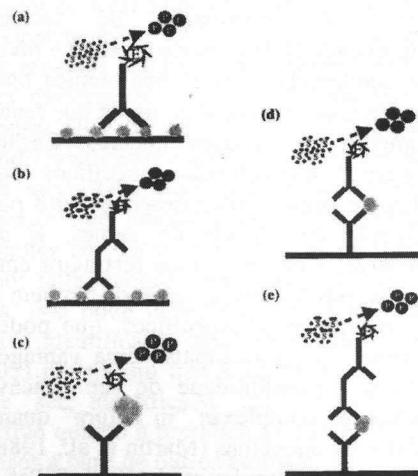


Figura 2: Formatos de ensaios ELISA. (a) ELISA direto (captura do anticorpo); (b) ELISA indireto (captura do anticorpo): assim como em (a), porém com um anticorpo específico previamente marcado, permite o uso de anticorpos anti-espécie comercializados; (c) ELISA direto (captura do抗ígeno): permite uma competitividade adicionando um抗ígeno livre e assim bloqueando os sítios reativos com um ligante marcado; (d) ELISA "sanduíche" direto: o抗ígeno é capturado por um anticorpo imobilizado à placa e detectado por um segundo抗ígeno marcado; e (e) ELISA "sanduíche" indireto: o抗ígeno é capturado por um anticorpo imobilizado à placa e a ligação ao segundo anticorpo é detectada 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抗ígenos para os imunoensaios a serem realizados durante a fase experimental do trabalho.

As amostras foram separadas em alíquotas de 1 ml cada, submetidas a congelação em freezer a -20°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 imunoensaios.

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 nº4 (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抗ígenos 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 Avarameas e Ternynck (1969). Foram preparadas colunas de imunoafinidade (Colunas contendo抗ígenos, para posterior ligação com anticorpos) com o objetivo de aumentar a especificidade dos antissoros removendo os anticorpos com reatividade cruzada com os抗ígenos heterólogos. Para isso, os géis de especificidade foram preparados misturando todos os抗ígenos, 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抗ígeno 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抗ígenos 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 aliquotada 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 10 µg/mL (1 µg/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 aliquotadas 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 antissoros utilizados nesta etapa da pesquisa não foram ainda purificados em colunas de imunoafinidade. O antissoro 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 antissoro 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 antissoro de boi, enquanto os demais抗ígenos demonstraram pouca reatividade. Todos os demais抗ígenos, 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 antissoro anti-boi não ter sido filtrado na coluna de imunoafinidade, ainda assim observa-se maior especificidade com seus抗ígenos homólogos, no caso o soro e o filtrado do músculo de boi.

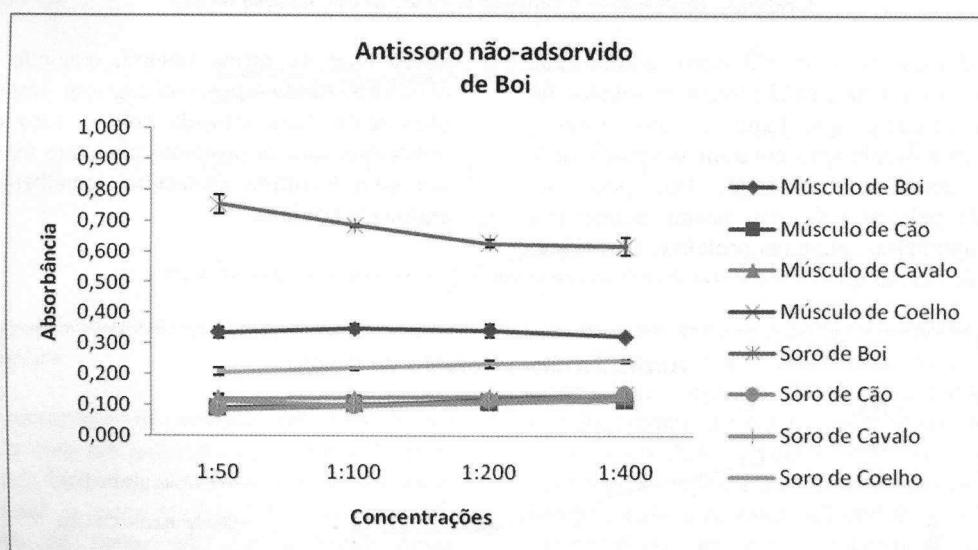


Gráfico 1: ELISA. Incubação com antissoro in natura de boi; diluição seriada.

No gráfico 2 são apresentados os resultados de afinidade com o antissoro de cão. Neste resultado, foi observado que, apesar do antissoro 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抗ígenos heterólogos, mostrando com isto pouca especificidade com o anti-cão.

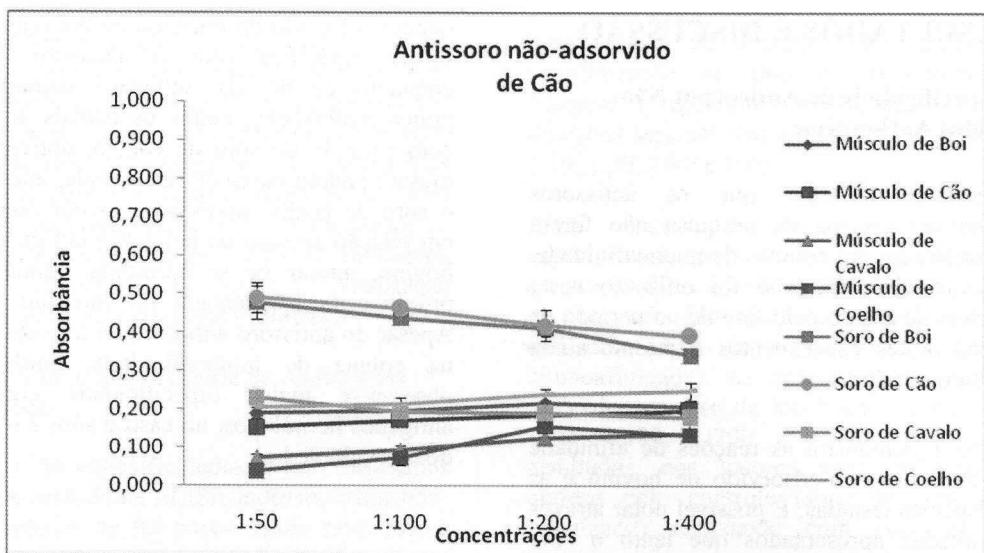


Gráfico 2: Incubação com antissoro *in natura* de cão; diluição seriada.

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.

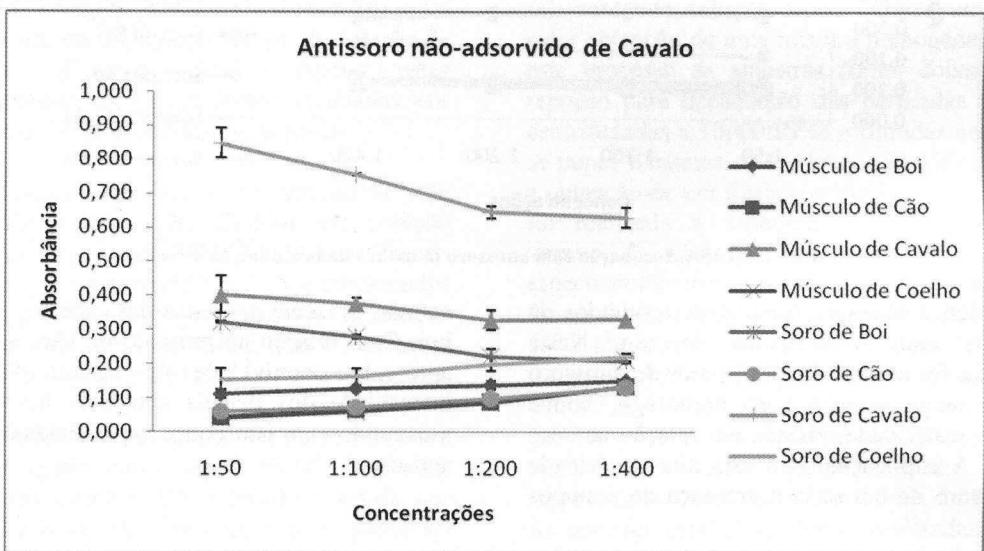


Gráfico 3:ELISA. Incubação com antissoro *in natura* de cavalo; diluição seriada.

Novamente foi observado uma maior especificidade do antissoro de coelho com seus抗ígenos homólogos (gráfico 4). Observa-se também uma reatividade cruzada do antissoro de coelho com os抗ígenos 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.

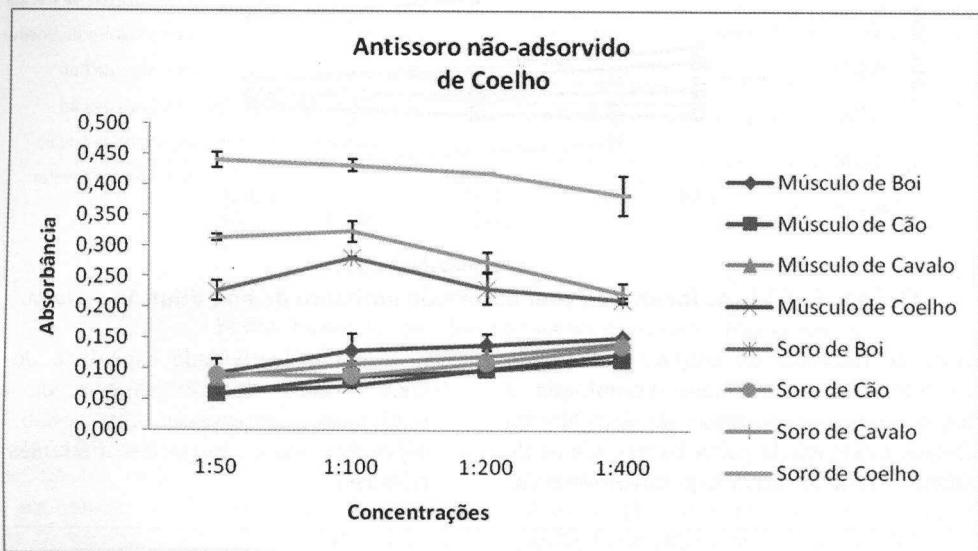


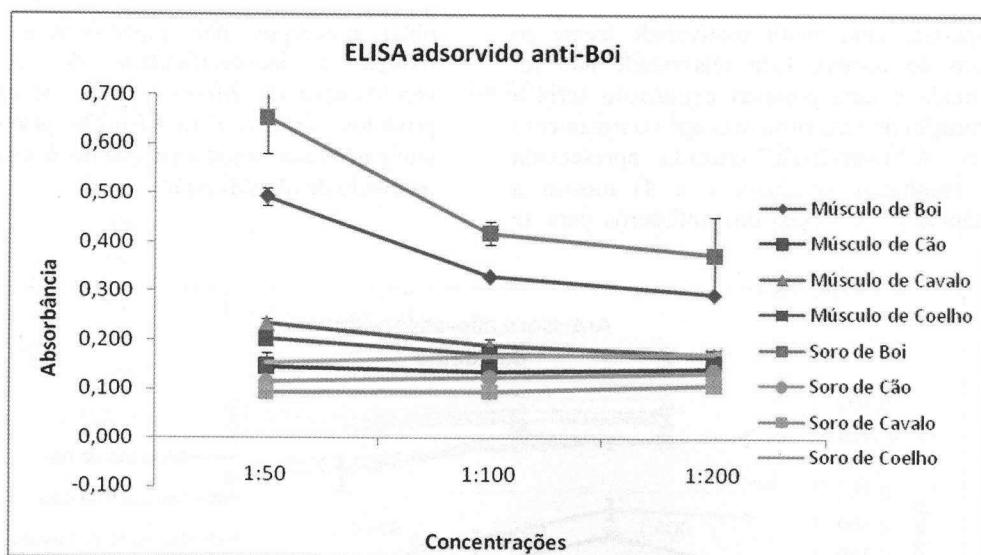
Gráfico 4: ELISA. Incubação com antissoro *in natura* de coelho; diluição seriada.

#### 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

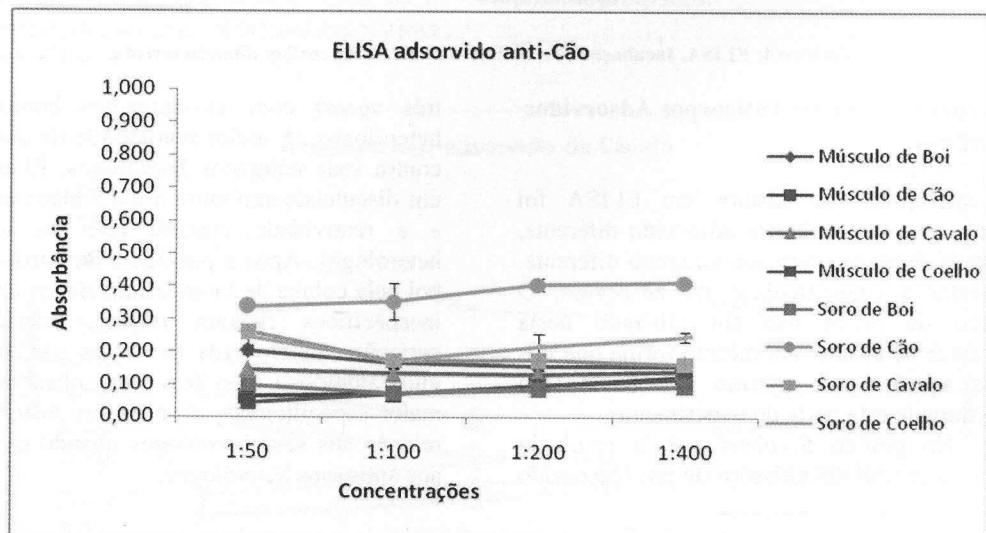
três vezes) com os抗ígenos homólogos e heterólogos. A maior reatividade do antissoro é contra seus抗ígenos homólogos. Evidencia-se um distanciamento entre a reatividade específica e a reatividade cruzada com os抗ígenos heterólogos. Após a passagem do antissoro anti-boi pela coluna de imunoafinidade, os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

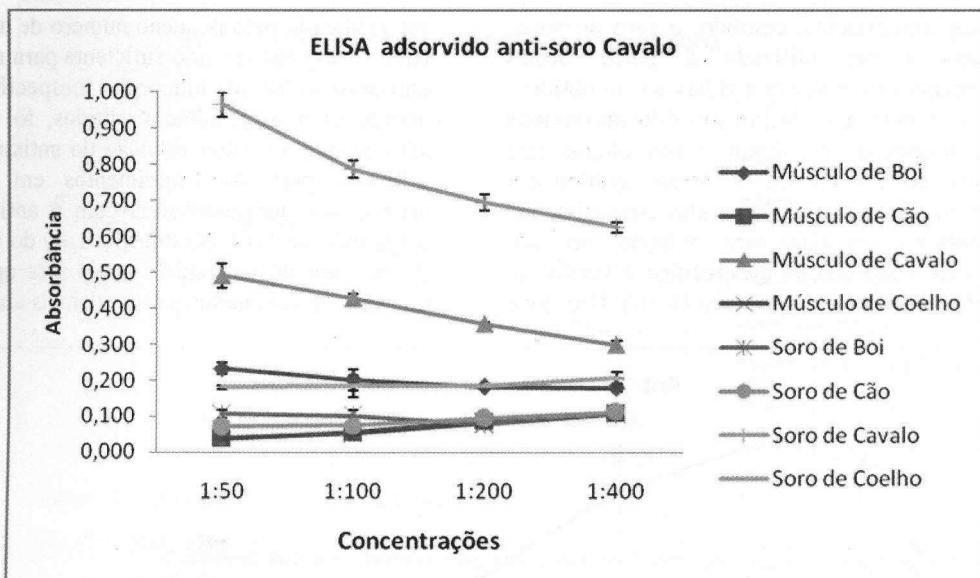


Gráfico 7: ELISA. Incubação com adsorvido antissoro de cavalo; diluição seriada

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抗ígenos 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抗ígenos heterólogos. Observa-se também neste resultado uma manutenção da reatividade específica na maior diluição de antissoro testado (1:400).

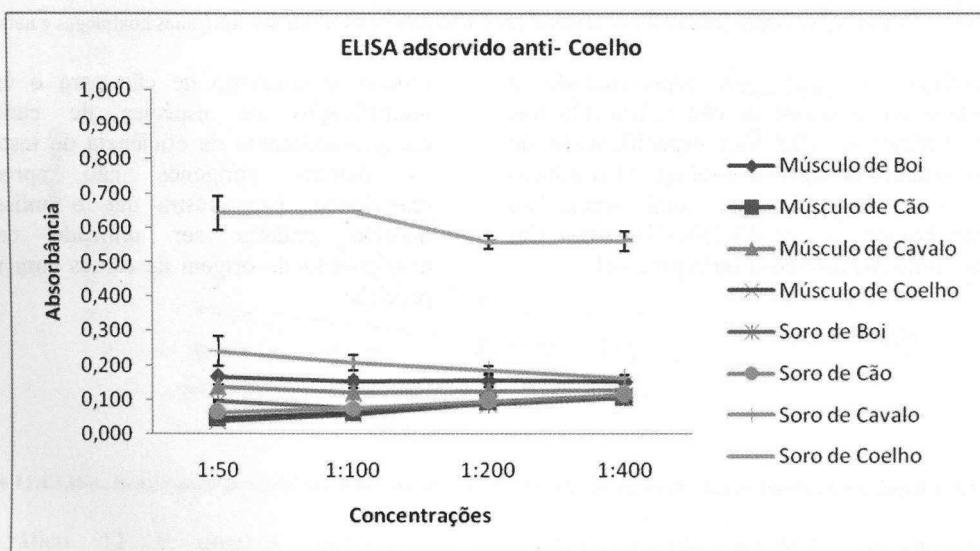


Gráfico 8:ELISA. Incubação com adsorvido antissoro de coelho; diluição seriada

#### 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抗ígenos. O抗ígeno 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抗ígenos 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抗ígenos 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.

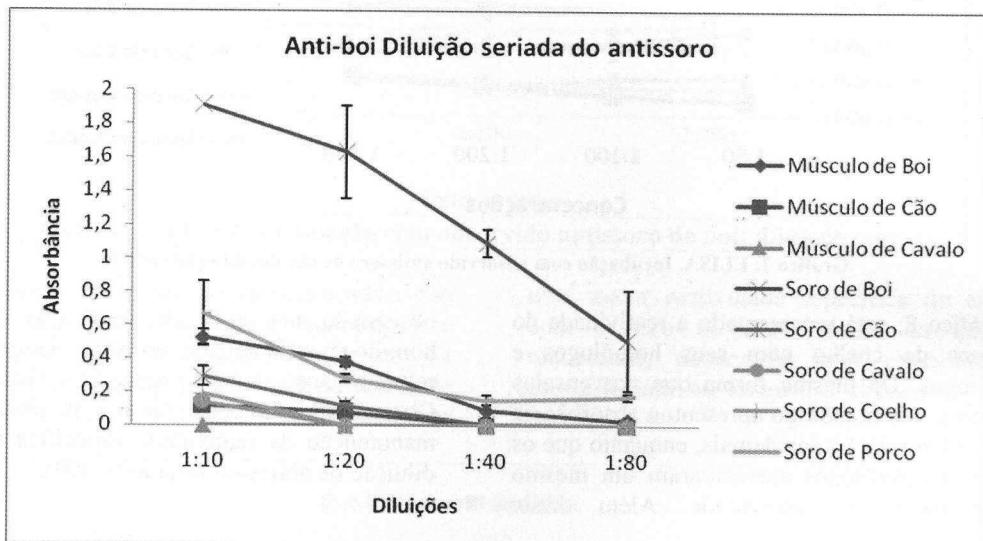


Gráfico 9: ELISA. Reatividade do antissoro Anti-boi adsorvido três vezes frente aos抗ígenos homólogos e heterólogos.

No gráfico 10, que está representando a reatividade do antissoro de cão (adsorvido três vezes), verifica-se uma alta especificidade do antissoro contra抗ígeno homólogo. O resultado mostra uma especificidade total frente ao抗ígeno 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抗ígenos não apresentaram reatividade. Isto mostra que o antissoro em questão poderia ser utilizado em uma averiguação de origem de carnes com uma alta precisão.

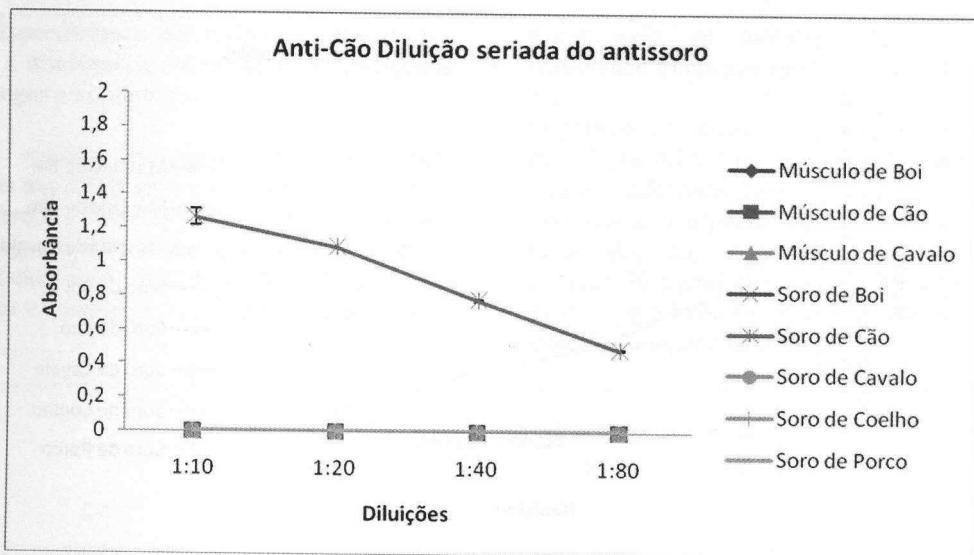


Gráfico 10:ELISA. Reatividade do antissoro Anti-cão adsorvido três vezes frente aos抗ígenos homólogos e heterólogos.

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.

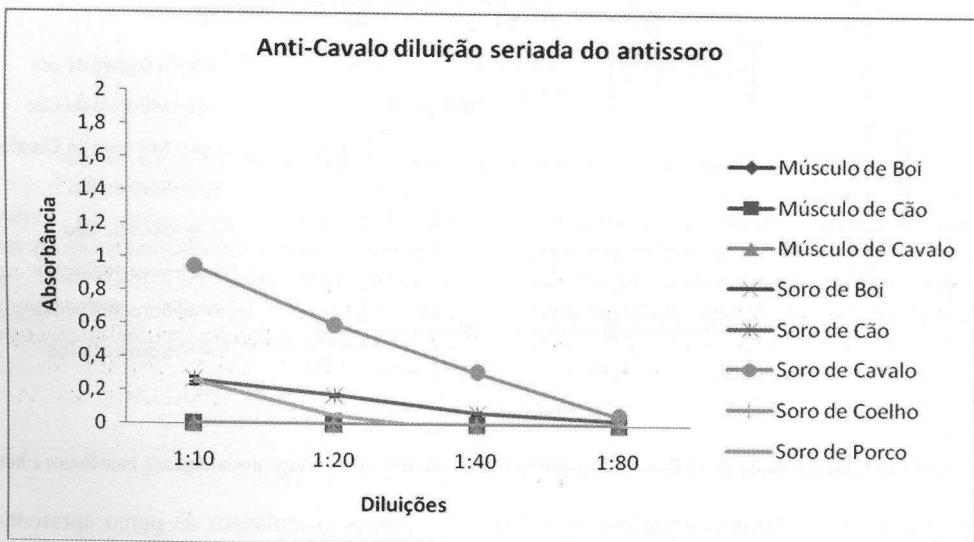


Gráfico 11:ELISA. Reatividade do antissoro Anti-cavalo adsorvido três vezes frente aos抗ígenos homólogos e heterólogos.

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抗ígenos apresentaram reatividade nula com o antissoro. Neste caso, as três adsorções mostraram-se suficientes na remoção dos anticorpos inespecíficos.

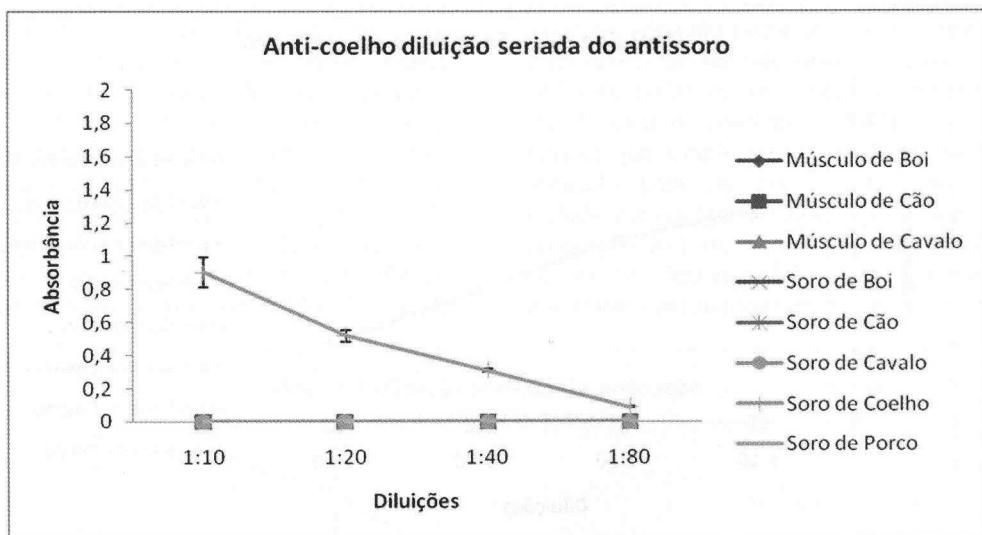


Gráfico 12: ELISA. Reatividade do antissoro Anti-coelho adsorvido três vezes frente aos抗ígenos homólogos e heterólogos.

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.

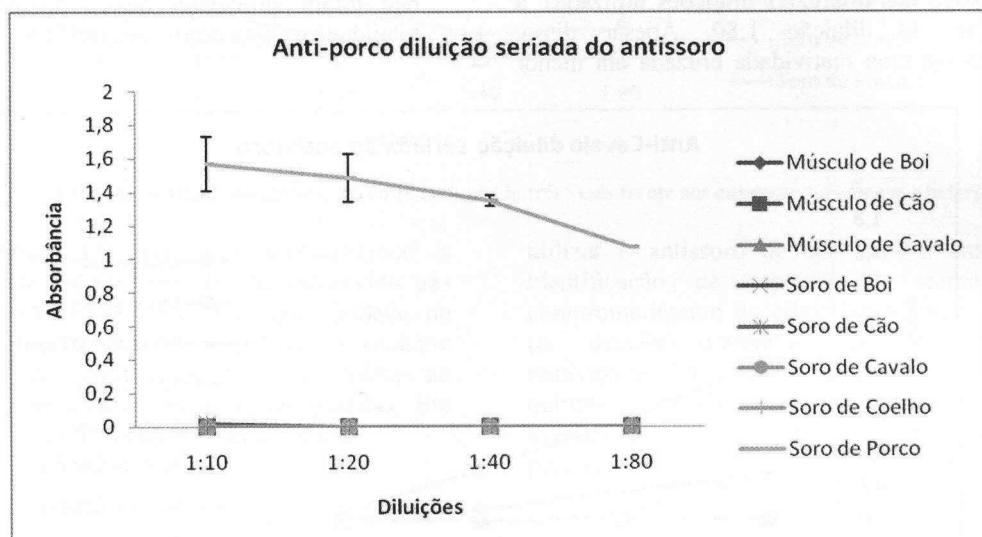


Gráfico 13:ELISA. Reatividade do antissoro Anti-porco adsorvido três vezes frente aos抗ígenos homólogos e heterólogos.

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 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-cavallo 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 antissoros adsorvidos frente a diferentes concentrações de抗igenos homólogos e heterólogos

Nestes ensaios, os soros adsorvidos foram testados nas diluições acima determinadas frente a diferentes concentrações dos抗igenos 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 antissoros adsorvidos.

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

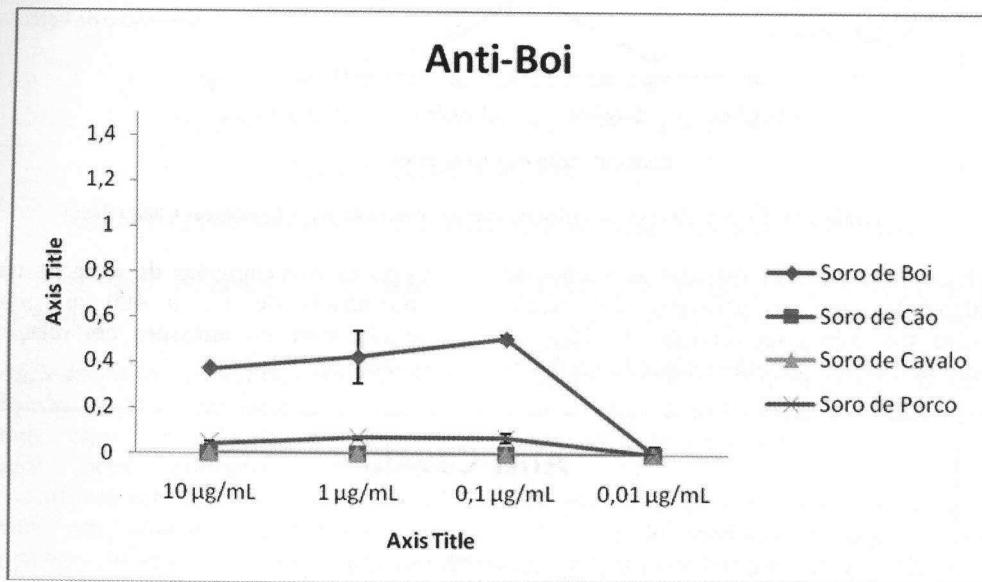


Gráfico 14: ELISA. Reatividade do antissoro anti-boi contra os soros homólogos e heterólogos.

No gráfico 15 observa-se a reatividade do antissoro de cão adsorvido três vezes, na diluição fixa de 1:50 contra抗igenos 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 antissoro de boi no que diz respeito à faixa de sensibilidade. Ambos não apresentaram especificidade frente à concentração de 0,01 μ/ml.

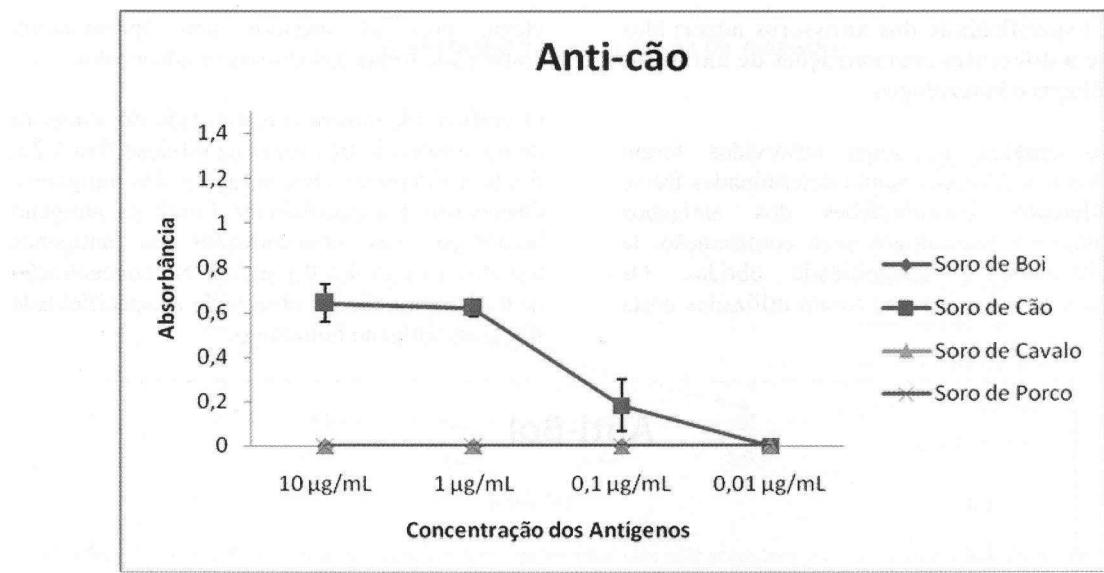


Gráfico 15: ELISA. Reação do antissoro anti-cão contra os soros homólogos e heterólogos.

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.

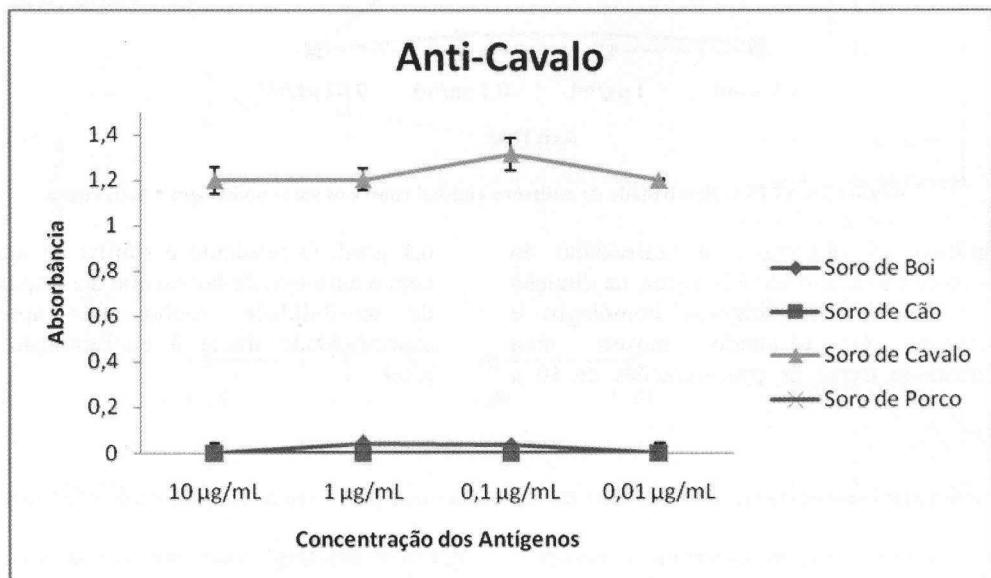


Gráfico 16: ELISA. Reação do antissoro anti-cavalo contra os soros homólogos e heterólogos.

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抗ígenos de diferentes espécies de carnes. Os antissoros adsorvidos poderiam estar aptos a serem utilizados para testes de identificação em alimentos processados.

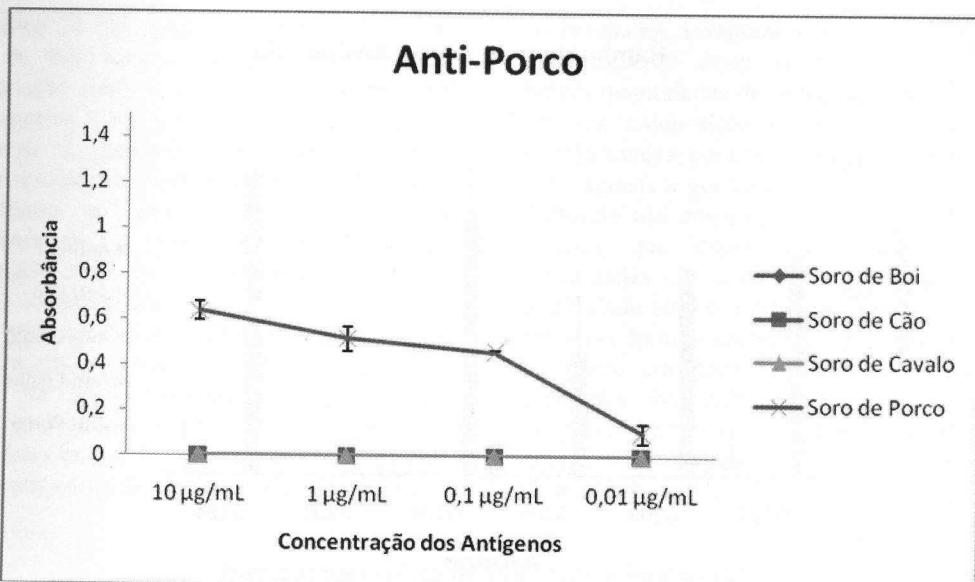


Gráfico 17: ELISA. Reação do antissoro anti-porco contra os soros homólogos e heterólogos.

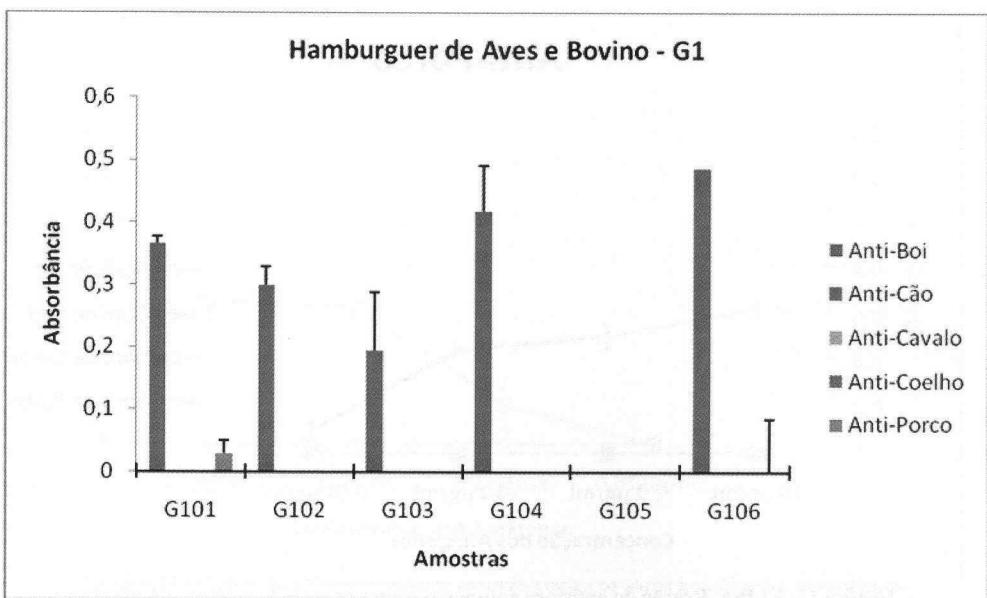
#### 4.5 - Testes em Alimentos Processados (Hambúrgueres)

Nesta etapa do estudo, os antissoros adsorvidos nas diluições fixadas previamente e que se mostraram específicos frente a抗原os 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.

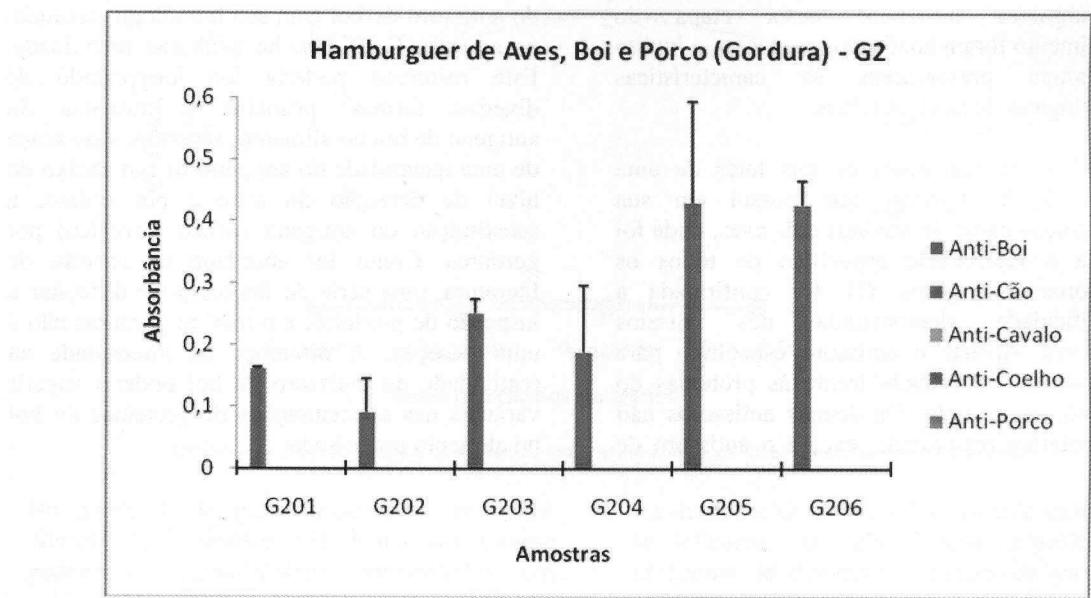
O grupo G1 apresentou em quase todos os seus lotes um alto resultado em relação à reatividade do antissoro de boi com seu homólogo, contudo, na amostra G105 não há nenhuma reatividade. Este resultado poderia ser interpretado de diversas formas: primeiro, a ausência do抗原o de boi no alimento; segundo, a presença de uma quantidade do抗原o de boi abaixo do nível de detecção do teste e por último, a substituição do抗原o 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 (Hamburgueses).** 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 (Hamburgueses).** 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 absorbância 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).

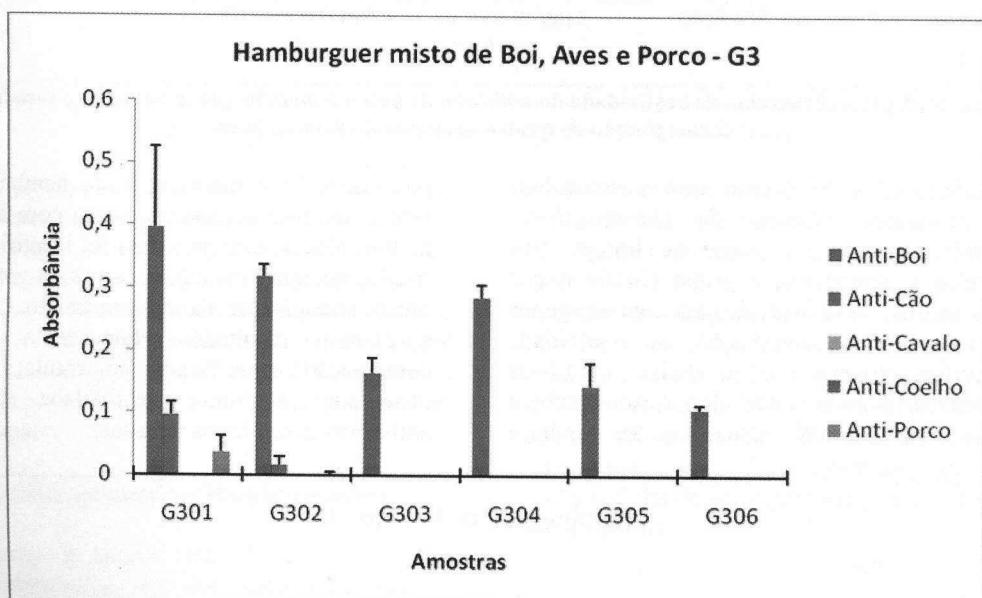
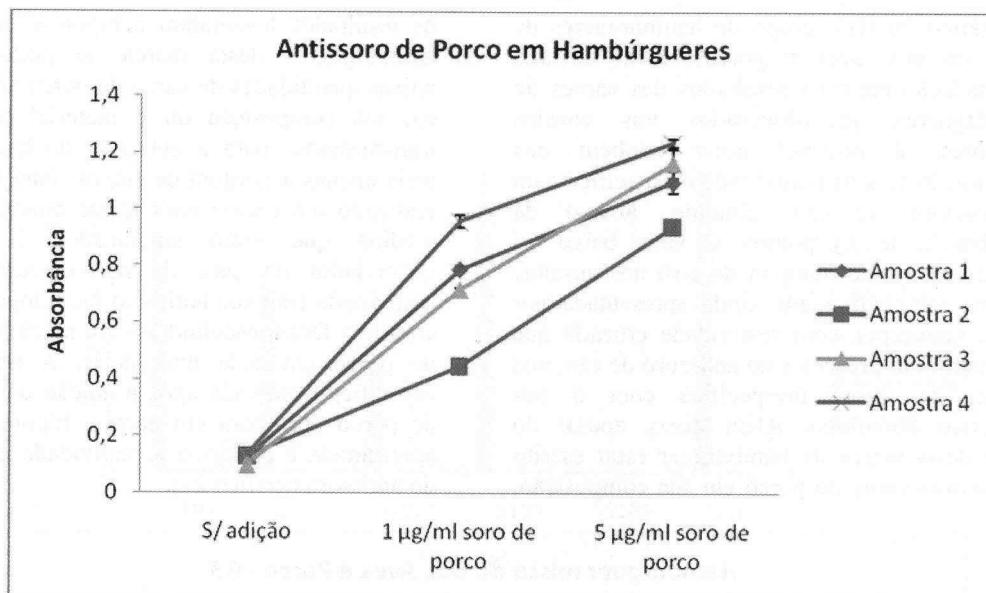


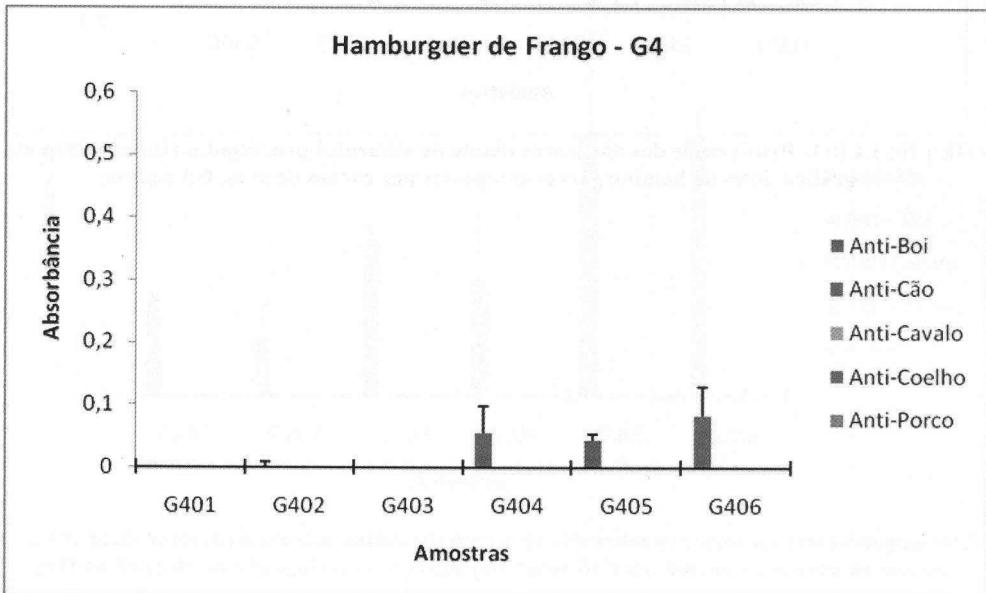
Gráfico 20: ELISA. Reatividade dos antissoros diante de alimentos processados (Hamburgueres). Neste gráfico, lotes de hambúrgueres compostos por carnes de aves, boi e porco.



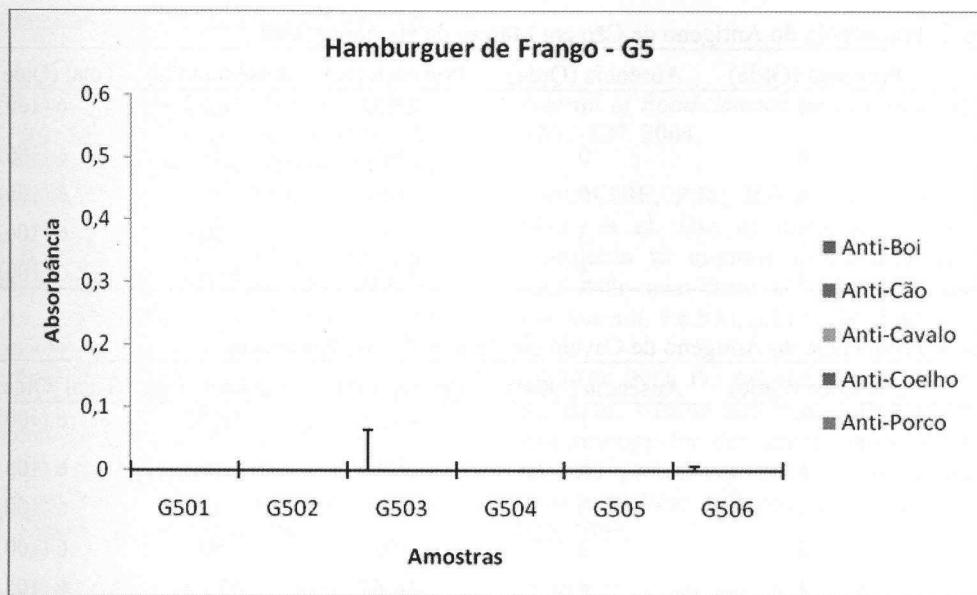
**Gráfico 21: ELISA. Progresso da reatividade do antissoro de porco à medida que se adiciona o soro homólogo à composição de quatro amostras de hambúrguer.**

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抗ígenos 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抗ígenos 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

freqüência de抗ígenos 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抗ígenos 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: Freqüência estatística dos diferentes抗ígenos 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 mesmas 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 anticorpos 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 immunoabsorbents. *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 poultyspecific 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 sulcofuron and flucofuron 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*, v.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.cnpgc.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. *Biotechnol. 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*, nº 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 nº 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*. 6<sup>a</sup> 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, nº 9, p. 1860-1865. 2005.

KOHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of pre-defined specificity. *Nature*, nº256, p. 495-497. 1975.

KORPIMAKI, T.; ROSENBERG, J.; VIRTANEN, P.; et al. Further improvement of broad specificity hapten recognition with protein engineering. *Protein Engineering*, nº16, 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'indentification de l'origine des protéines animales et végétales dans les produits carnés. *Annales des Falsifications de l'Expertise Clinique & Toxicologique*, nº 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.

TIJSSEN, 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.

Melina Matias Ribeiro De Oliveira Moraes

**PRODUÇÃO DE ANTISSORO ESPECÍFICO PARA A DETECÇÃO E  
IDENTIFICAÇÃO DE CARNE DE FRANGO EM ALIMENTOS**

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal.

Orientadora: Silvana de Vasconcelos Cançado.

Belo Horizonte

Escola de Veterinária da UFMG

2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do  
Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFMG

Moraes, Melina Matias Ribeiro De Oliveira

Produção de antissoro específico para detecção e identificação  
de carne de frango em alimentos [manuscrito] / Melina Matias  
Ribeiro De Oliveira Moraes. - 2014.

48 p. : il.

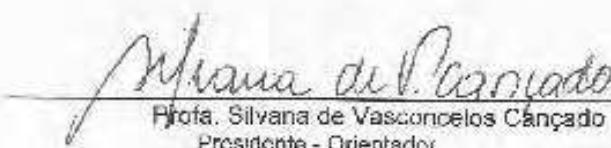
Orientadora: Silvana De Vasconcelos Cançado.

Coorientador: Luiz Guilherme Dias Heneine.

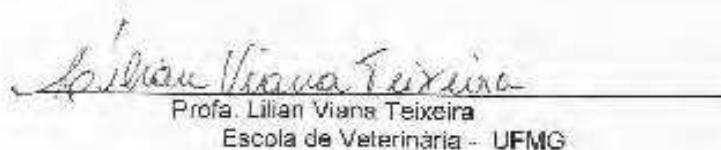
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais,  
Escola de Veterinária.

1.ELISA . 2.Carne de frango. 3.Imunoensaios. 4.anticorpos  
policlonais. I.Cançado, Silvana De Vasconcelos. II.Heneine, Luiz  
Guilherme Dias . III.Universidade Federal de Minas Gerais. Escola  
de Veterinária. IV.Título.

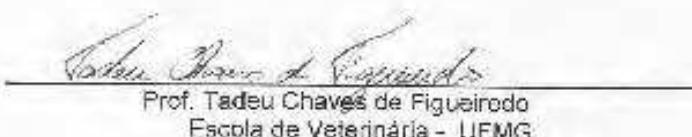
Dissertação defendida e aprovada em 25 de abril de 2014, pela Comissão Examinadora constituída por:

  
Prof. Silvana de Vasconcelos Cânçado  
Presidente - Orientador

  
Dr. Luiz Guilherme Dias Heneine  
FUNED

  
Prof. Lilian Viana Teixeira  
Escola de Veterinária - UFMG

  
Dra. Liane Denize Miranda Meneses  
IMA

  
Prof. Tadeu Chaves de Figueirodo  
Escola de Veterinária - UFMG

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pela vida.

Ao meu pai Ermelindo, pelo apoio, exemplo, dedicação, oportunidade, compreensão e todos os puxões de orelha.

Meus irmãos Flávia e Pablo pelo amor, conselhos e companheirismo de toda uma vida.

Ao meu filho Caio, o maior amor do mundo e a razão de tudo isso.

Ao meu primeiro orientador prof. Carlos Chavéz pela orientação nos primeiros passos no mundo da Imunologia.

Ao meu chefito Ricardo Andrez, pela paciência durante longos anos.

À querida Lili e a todos do IMA pela oportunidade de trabalho no Laboratório de Segurança Microbiológica em Alimentos.

À Debora e a Anna pelo companheirismo e aventuras nas idas à fazenda, discussões científicas e risadas.

À minha orientadora, Prof. Dra. Silvana de Vasconcelos Cançado pela paciência, orientação e auxílio.

Ao meu co-orientador, Dr. Luiz Guilherme Dias Heneine pelos ensinamentos, direcionamento e oportunidade na realização desse projeto.

À todos os amigos do Laboratório de Imunologia Aplicada da Funed.

Muito obrigada!

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	7
LISTA DE TABELAS .....	8
RESUMO .....	9
ABSTRACT .....	10
INTRODUÇÃO .....	11
REVISÃO DE LITERATURA.....	13
Legislação.....	13
Métodos de identificação de espécies de carnes em alimentos.....	14
Microscopia clássica .....	15
Eletroforese .....	15
Métodos Físico-químicos .....	16
Espectroscopia no infravermelho.....	16
Cromatografia Líquida de Alta Eficiência .....	16
Métodos moleculares/genéticos .....	17
Métodos Imunológicos.....	18
- Anticorpos .....	18
- Antígenos .....	19
Imunodifusão em gel de Agarose (IDGA) .....	20
Contra imunoelétroforese .....	20
ELISA .....	21
Aplicações da metodologia de ELISA para identificação de espécies de carnes em alimentos ..	22
MATERIAL E MÉTODOS.....	26
Obtenção de amostras .....	27
Tratamento das amostras.....	27
Imunização .....	27
Confecção das colunas de imunoafinidade.....	28
Obtenção de antissoros específicos .....	29

Teste de especificidade de anticorpos anti-frango de corte .....	30
Preparo das amostras experimentalmente contaminadas .....	31
Amostras experimentalmente contaminadas cruas .....	31
Amostras experimentalmente contaminadas tratadas termicamente.....	32
ELISA indireto para amostras experimentalmente contaminadas .....	33
Testes em alimentos processados (Hambúrgueres) .....	34
Delineamento experimental.....	34
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>34</b>
Título de anticorpos .....	34
Adsorção dos anticorpos em coluna heteróloga de imunoafinidade .....	35
Amostras experimentalmente contaminadas cruas .....	36
Amostras experimentalmente contaminadas tratadas termicamente.....	37
Testes em amostras de hambúrgueres .....	40
<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>41</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>41</b>
<b>ANEXO I .....</b>	<b>46</b>

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1: Estrutura geral de um anticorpo.....	19
Figura 2: Arranjo ELISA direto.....	21
Figura 3: Arranjo ELISA indireto.....	22
Figura 4: Arranjo ELISA sanduíche.....	22
Figura 5:Retirada do sangue total diretamente da veia jugular dos carneiros.....	29
Figura 6: Imunização com proteínas do músculo e soro de frango de corte.....	30
Figura 7: Pesagem das amostras experimentalmente contaminadas em diferentes proporções de carne de frango em carne bovina ou suína.....	32
Figura 8: Separação das proteínas solúveis em amostras experimentalmente fraudadas de carne crua.....	33
Figura 9: Título de anticorpos do soro coletado antes do início das imunizações (soro pré-imune) e após o ciclo de imunizações submetido a diluições sucessivas.....	35
Figura 10: Reatividade do soro antimúsculo adsorvido em coluna de imunoafinidade heteróloga frente extrato de músculo de frango de corte, bovinos, coelhos, equinos e suínos.....	36
Figura 11: Reatividade do soro antissoro adsorvido em coluna de imunoafinidade heteróloga frente soro de frango de corte, bovinos, coelhos, equinos e suínos.....	37
Figura 12: Relação entre a porcentagem de carne de frango de corte em carne bovina e a absorbância.....	38
Figura 13: Relação entre a porcentagem de carne de frango de corte em carne suína e a absorbância.....	39

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Porcentagem de carne de frango em amostras experimentalmente contaminadas e absorbâncias observadas em ELISA indireto.....	40
Tabela 2: Absorbâncias das amostras de hambúrgueres. Compostas por: grupo um: carne bovina, gordura suína e carne de aves; grupo 2: carne de aves.....	41

## RESUMO

Um ensaio de ELISA indireto, específico para detectar e identificar carne de frango de corte em amostras de alimentos, foi desenvolvido utilizando anticorpos policlonais produzidos em carneiros, e purificados em colunas de imunoafinidade. Foram utilizadas amostras de carne bovina e suína, cruas e processadas termicamente, que foram adicionadas de carne de frango nas proporções de cinco, 10, 35 e 50%. Para a avaliação da detecção de carne de frango em hambúrgueres foram utilizados dois tratamentos (duas marcas de hambúrgueres) com seis repetições cada. O método não revelou reatividade cruzada com proteínas musculares de bovinos, coelhos, equinos e suínos. Foi observado ajuste dos dados ao modelo de regressão linear apresentando coeficiente de determinação acima de 0,99 sendo efetivo para quantificação de carne de frango em carne bovina ou suína em porcentagens de 5 a 50% de contaminação, em amostras cruas. Em amostras termicamente tratadas foi possível classificá-las, de modo qualitativo, quanto a presença ou ausência de carne de frango. Ao testar amostras de hambúrgueres comerciais foi possível detectar proteínas cárneas de frango de corte, ainda que na presença de proteínas cárneas de outras espécies animais. Foi concluído que o método imunológico utilizado, ELISA indireto, mostrou seletividade na detecção de proteínas de carne de frango de corte em amostras cruas ou termicamente tratadas.

Palavras chave: carne de frango, ELISA indireto, ensaios imunoenzimáticos, anticorpos policlonais.

## **ABSTRACT**

An indirect ELISA specific for detecting and identifying broiler meat in food samples was developed using polyclonal antibodies produced in sheep, and purified on immunoaffinity columns. Beef and pork samples were used raw and heat-processed, and have been added to the chicken meat ratios of five, 10, 35 and 50%. For the evaluation of chicken detection on burgers were used two treatments (two brands of burgers) with six replicates each. The method revealed no cross-reactivity with bovine muscle proteins, rabbits, horses and pigs. It was observed data adjustment to the linear regression model showing determination coefficient above 0.99 and was effective quantification of chicken meat in beef or pork in percentages 5-50% contamination in raw samples. In heat-processed samples was possible to classify them, qualitatively, as the presence or absence of chicken. When testing samples of commercial burgers could be detected broiler meat proteins, even in the presence of meat proteins of the other species. It was concluded that the immune method, ELISA showed selectivity in the detection of broiler meat proteins in raw or heat-treated samples.

Key words: chicken, ELISA, immunoassays, polyclonal antibodies.

## INTRODUÇÃO

A avicultura do Brasil tem ganhado cada vez mais espaço no cenário mundial, e o país tem se destacado entre os grandes produtores e exportadores do ramo nos últimos anos. De acordo com os dados da União Brasileira de Avicultura foram produzidas 12,3 milhões de toneladas de carne de frango no ano de 2013. Deste volume total de carne produzido pelo país, 8,4 milhões de toneladas (68,4%) foi destinado ao consumo interno e 3,9 milhões (31,6%) para as exportações, mantendo o Brasil como maior exportador do mundo de carne de frango (ABPA, 2014).

Segundo a Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil (CNA) o agronegócio brasileiro representa boa parte do produto interno bruto (PIB) do país, contribuindo no ano de 2013 com 22,8% deste. A avicultura industrial contribuiu com, aproximadamente, 1,5% desse índice, o que demonstra a importância da atividade para a economia brasileira (CNA, 2014; ABPA, 2014).

Dentre os animais de produção terrestres, a carne suína é a fonte de proteína animal mais consumida mundialmente, porém, a carne de frango tem demonstrado grande potencial para atingir o topo do consumo dentro de alguns anos. O consumo per capita mundial de carne de frango tem apresentado rápido crescimento e, segundo estimativas, deverá ultrapassar o consumo de carne suína antes de 2020. No Brasil, a carne de frango já é a fonte de proteína mais consumida, seguida pela carne bovina e em terceiro lugar pela carne suína. O consumo de frango no país passou dos 11,8 kg per capita em 1988 para 41,8 kg em 2013, representando um aumento de 360% nos últimos 25 anos (FAO, 2013; ABPA, 2014).

A expressividade internacional do Brasil como exportador de alimentos de origem animal, assim como as crescentes exigências do próprio mercado interno, faz com que a cadeia produtiva se preocupe com a produção de alimentos seguros e de qualidade. A carne de frango é uma excelente fonte de proteínas, vitaminas do complexo B e de minerais, sendo considerado um alimento de alto teor nutricional. Desta maneira, para garantir o crescimento do setor avícola, é preciso aliar um preço competitivo a produtos de alta qualidade, pois o consumidor, cada vez mais exigente, não utiliza apenas o preço e as propriedades nutricionais dos alimentos como critério de decisão no momento em que vai adquirir o produto (Cawthorn et al., 2013).

Nos últimos anos tem havido um aumento da variedade de produtos cárneos disponíveis no mercado, atendendo a um número cada vez maior de consumidores que procuram alimentos industrializados pela sua praticidade. O processo de industrialização causa intensa modificação

nas características naturais das carnes dificultando sua identificação por inspeção visual e sensorial. Devido a esse crescimento em produção e qualidade e ao menor custo, a carne de frango tem sido comumente utilizada na formulação e também na adulteração de diversos produtos processados (Hsieh et al., 1995; Djurdjevic et al., 2005).

O uso de carne de espécie não declarada, e/ou de proteína não cárnea em quantidade diferente da descrita no rótulo de produtos processados tem sido observado por diversos pesquisadores em vários países seja devido à contaminação ou a fraude propriamente dita. Essa conduta envolve questões de ordem econômica (pelo uso de carne de menor valor), religiosa (algumas religiões não permitem o consumo de carne de certas espécies), e de saúde pública (pela veiculação de micro-organismos que não deveriam estar presentes naquele tipo de produto, e abate de animais que foram tratados com medicamentos não permitidos àqueles que são destinados ao consumo humano) (Flores-Munguia et al., 2000; Cawthorn et al., 2013).

O poder de escolha do consumidor deve ser preservado, tornando-se ainda mais importante a garantia de autenticidade dos alimentos, e a correta rotulagem dos mesmos. Este direito é assegurado pelo Código de Defesa do Consumidor que estabelece como impróprios ao consumo alimentos adulterados, falsificados ou fraudados. Os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade (RTIQ) de alimentos estabelecem a composição e os padrões que alguns produtos cárneos devem possuir, e a não observância desses padrões e a consequente perda da autenticidade dos produtos é caracterizado como fraude (BRASIL, 1990).

Em 2013 foi divulgada na Europa a fraude de hambúrgueres e lasanhas pela substituição de carne bovina por equina, que em muitos produtos chegava a 100%. Além da violação legal, em razão da rotulagem incorreta, há o risco sanitário, uma vez que a carne utilizada para a fabricação dos produtos pode ser proveniente de animais não destinados ao consumo humano (Hsieh et al., 2014)

O conceito de segurança alimentar está relacionado à inocuidade e também à quantidade e a qualidade do alimento disponível. Visando garantir a segurança dos alimentos, vários parâmetros são exigidos pela legislação vigente. Porém, para verificar, a conformidade ou não dos produtos de acordo com esses parâmetros, são necessários métodos analíticos confiáveis e precisos. Várias metodologias podem ser usadas para diferenciação das espécies de carne em produtos crus ou submetidos a algum processamento térmico. Os métodos mais utilizados atualmente são as técnicas moleculares/genéticas e os ensaios imunológicos.

Ensaios imunoenzimáticos são testes utilizados para detectar e quantificar moléculas antigênicas específicas. Desta maneira, todos os imunoensaios são baseados em medições da ligação de um antígeno com seu anticorpo correspondente, e suas variações promovem menor ou maior sensibilidade de acordo com o arranjo utilizado. O método de ensaio por enzimas imuno-adsorvidas (ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay) tornou-se o principal imunoensaio entre muitos utilizados atualmente. Essencialmente, este método depende da imobilização de抗ígenos ou anticorpos em uma superfície sólida. As maiores vantagens do ELISA sobre os métodos instrumentais tradicionais são sua sensibilidade e especificidade, preparação simples das amostras, alto rendimento e baixo custo por amostra (Bonwick e Smith, 2004).

Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi desenvolver uma metodologia para produzir anticorpos capazes de detectar e identificar, através de ensaios imunológicos, a presença de carne de frango de corte em alimentos.

## **REVISÃO DE LITERATURA**

### **Legislação**

Segundo o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) entende-se por carne de açaougue as massas musculares maturadas e demais tecidos que as acompanham, incluindo ou não a base óssea correspondente, procedentes de animais abatidos sob inspeção veterinária. As carnes de bovinos, búfalos, ovinos, caprinos, equídeos, suínos e coelhos são consideradas carne vermelha; e as carnes de aves (galináceos, perus) e peixes são classificadas como carne branca (BRASIL, 1997).

De acordo com o RIISPOA para a aprovação e registro do rótulo de um produto a indústria deve enviar ao Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) o memorial descritivo de fabricação do produto detalhando sua composição e respectivas porcentagens. Ainda de acordo com este regulamento pode ser considerado impróprio ao consumo o produto de origem animal adulterado, fraudado ou falsificado. São considerados fraudados os produtos que tenham sido adicionados de substâncias de qualidade, espécie ou tipo diferentes das de sua composição natural sem prévia autorização do MAPA (BRASIL, 1997).

O Regulamento Técnico para Rotulagem de Produtos de Origem Animal, publicado através da Instrução Normativa nº22 do MAPA, reafirma, de maneira clara, como informação obrigatória a

lista de ingredientes e sua composição no rótulo do produto. Assim, qualquer supressão na rotulagem, de ingredientes que fazem parte da composição do produto pode ser caracterizado como fraude ou adulteração (BRASIL, 2005).

O código de defesa do consumidor (Lei nº 8078 de 11 de setembro de 1990) dispõe sobre a proteção e defesa do consumidor certificando o direito do mesmo à informação. Segundo o artigo sexto desta Lei, a informação sobre os diferentes produtos deve ser adequada e clara, com especificação correta de quantidade, características, composição, qualidade, tributos incidentes e preço, bem como sobre os riscos que apresentem. Ainda, segundo este mesmo artigo a materialização do direito à informação ocorre através da rotulagem correta, clara e completa dos produtos uma vez que os rótulos são o meio de comunicação entre indústria e o consumidor (BRASIL, 1990).

As sanções e penalidades a quem rotula de maneira inadequada ou fraudula, falsifica e adultera estes produtos estão previstas em Lei. Segundo a Lei nº 6437, de 20 de agosto de 1977, é passível de advertência, apreensão e inutilização do produto, suspensão de venda ou fabricação, cancelamento do registro e interdição parcial ou total do estabelecimento ou multa a quem fraudar, falsificar ou adulterar alimentos e quaisquer outros produtos que interessem à saúde pública (BRASIL, 1977).

O Código Penal Brasileiro aborda diretamente a preservação da segurança alimentar e, a hipótese de fraude alimentar está prevista no capítulo III do art. 272. De acordo com este artigo, o fabricante ou comerciante que corromper, adulterar, falsificar ou alterar algum produto alimentício destinado ao consumo, tornando-o nocivo à saúde ou reduzindo-lhe o valor nutritivo está sujeito a pena de reclusão, de quatro a oito anos, e multa (BRASIL, 1998).

### **Métodos de identificação de espécies de carnes em alimentos**

## **Microscopia clássica**

A Microscopia óptica clássica, descrita pela diretiva da Comissão Europeia (2003/126/EC), é a metodologia oficial utilizada pela União Europeia (EU) para a detecção de proteínas animais processadas (PAP's) em alimentos destinados a ruminantes. O banimento do uso de PAP's na alimentação de ruminantes tem como finalidade conter a transmissão de encefalopatia espongiforme bovina (BSE: Bovine Spongiform Encephalopathy). Porém, as técnicas de microscopia possuem limitações importantes, pois dependem da experiência do observador, e da presença de algumas partículas, como fibras musculares, ossos, pêlos ou penas para permitir a identificação. Outra limitação inerente ao método de microscopia é a não identificação espécie-específica, o que torna o método falho para classificar a proteína animal segundo sua espécie (Gizzi et al., 2003; Von Holst et al., 2006; Kreuz et al., 2012).

## **Eletroforese**

As técnicas eletroforéticas e de focalização isoelétrica apresentam bons resultados para a identificação de espécies únicas de carnes não processadas e cruas. Na metodologia de eletroforese, as proteínas cárneas são separadas de acordo com a sua carga elétrica e peso molecular. Para a separação é utilizado um gel de poliacrilamida submetido à passagem de corrente elétrica e as proteínas se movem de acordo com a sua carga nativa em direção ao ânodo ou ao catodo. Assim, é possível correlacionar à distância percorrida pelas proteínas durante a corrida com seu peso molecular, usando como referência um padrão com pesos moleculares conhecidos. Porém, as técnicas eletroforéticas são menos efetivas em misturas de carnes onde mais de uma espécie está presente, e também em amostras que passaram por processamentos térmicos (Patterson e Jones, 1990; Monstowska e Pospiech, 2007).

Na focalização isoelétrica, o gel possui um gradiente de pH e as proteínas depois de submetidas a um agente desnaturante, migram pelo gel até atingir o pH de seu ponto isoelétrico. A diferenciação da espécie baseia-se em proteínas específicas presentes nos diferentes tipos de carnes (Hitchcock e Crimes, 1985; Barai et al., 1992).

## **Métodos Físico-químicos**

### **Espectroscopia no infravermelho**

A técnica de Espectroscopia de Infravermelho (Espectroscopia IV) baseia-se no espectro de absorbância eletromagnética que ocorre na região perto do infravermelho, definida como os comprimentos de onda entre 780 e 2526 nanômetros (nm). Cada substância possui um padrão de emissão pouco variável devido às ligações atômicas das quais são formadas, que vibram obedecendo basicamente a sua massa atômica e as ligações químicas presentes. A partir da análise do espectro de emissão, da amostra avaliada é possível se obter detalhes das moléculas presentes. É uma técnica rápida e não destrutiva utilizada para diversos fins, podendo ser utilizada para autenticação de comidas como sucos e purês de frutas, mel, leite em pó, peixes e carnes (Leite e Prado, 2012).

A metodologia da espectroscopia IV 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 referência, a partir do qual se faz a correlação com a amostra que está sendo analisada. A distinção de carnes de diferentes animais (bovinos, suínos, ovinos e aves) pode ser feita pela análise dos principais componentes com nível de classificação correta em torno de 80%. É uma técnica que requer um profissional experiente para o processamento e análise dos resultados (Cozzolino e Murray, 2004; Ceccantini, 2008; Leite e Prado, 2012).

### **Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**

A cromatografia é um método físico-químico de separação. Ela está fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações entre duas fases: a fase móvel e a fase estacionária. Vários métodos utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram descritos para a identificação de espécies de carnes em produtos derivados. A proporção de dipeptídeos que contém histidina: anserina, balenina e carnosina é característica para cada espécie animal e sua relação pode ser usada para diferenciação de espécies cárneas. Segundo Carnegie et al. (1984) a carne suína possui maior quantidade do dipeptídeo balenina no seu tecido muscular, e a avaliação da relação balenina e anserina (b/a) em proporções iguais ou maiores que 0,05 evidencia altas quantidades dessa carne em uma mistura. Porém,

segundo esses autores, a proporção destes dipeptídeos pode ser diferente nos vários tecidos musculares dos animais e pode mudar de acordo com a idade do animal.

Sawaya et al. (1990), com o objetivo de verificar a eficiência da utilização da relação b/a para diferenciação de espécies de carnes em misturas, adicionaram experimentalmente 0, 1, 3, 5, 10, 30 e 50% de carne suína em carne bovina e verificaram que o método de CLAE foi efetivo na detecção de contaminação a partir de 1%.

### **Métodos moleculares/genéticos**

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – Polymerase Chain Reaction) é uma técnica molecular que consiste na amplificação de parte do ácido desoxirribonucléico (DNA) extraído da amostra a ser analisada para a identificação de um determinado organismo. Atualmente é um dos métodos mais usados para detecção de fraudes, pois possui alta sensibilidade e especificidade. Dentre as limitações da técnica estão a necessidade de obter amostras com o material genético íntegro, isto é, em condições de ser amplificado e a presença na amostra de substâncias inibidoras do processo de extração do DNA, o processamento da carne sob altas temperaturas pode ocasionar a fragmentação do DNA aumentando as chances de detecção não específica, substâncias como glicogênio, polissacarídeos, colágeno e produtos da reação de Maillard dificultam a extração. O material genético também não é tecido-específico, não permitindo assegurar que se trata de uma proteína do músculo, do leite ou de miúdos. Outra limitação é a complexidade das amostras, que podem trazer efeitos de matriz que afetam negativamente a precisão e robustez do teste, tornando necessário o desenvolvimento de protocolos para extração de DNA para cada situação particular garantindo extração efetiva. (Gizzi et al., 2003; Woolfe et al, 2004; Liu et al., 2006; Ballin et al., 2009; Ghovvati et al., 2009; Bottero e Dalmasso, 2011).

A técnica de PCR em tempo real tem sido utilizada para a quantificação de adulterações em produtos cárneos. Neste método o número de cópias de fragmento de DNA do “adulterante” é comparado ao número de cópias de fragmento de DNA da espécie que se esperava encontrar num determinado número de ciclos. Porém, não é possível afirmar que a quantidade de fragmento de DNA amplificado reflete a quantidade de carne presente na amostra, pois além do processamento que degrada o DNA, outros ingredientes presentes no alimento interferem no processo de extração do mesmo. Sawyer et al. (2003) utilizaram a metodologia de PCR em tempo real para quantificação de amostras experimentalmente fraudadas, nas seguintes proporções de carne bovina em carne ovina: 0,1; 1; 2; 5; 10; 25; 50 e 100%. Os pesquisadores utilizaram iniciadores

universais (direcionados a regiões conservadas presentes em ambas espécies) e iniciadores espécie-específicos direcionados ao DNA bovino. O resultado obtido não demonstrou a acurácia necessária para determinação da porcentagem de fraude.

## **Métodos Imunológicos**

Os métodos imunológicos surgiram da necessidade em detectar e quantificar moléculas biológicas complexas, quando análises químicas e/ou físicas eram inadequadas ou não estavam disponíveis. Esses métodos baseiam-se nas complexas e específicas interações antígeno-anticorpo, podendo ser usados para detectar determinados抗ígenos em misturas como fluidos biológicos ou extratos de alimentos sem prévia separação. Esta habilidade é uma característica proveitosa para analistas de alimentos interessados em realizar análises em matrizes mais complexas (Patterson e Jones, 1990; Gosling, 2000).

### **- Anticorpos**

Anticorpos também conhecidos como imunoglobulinas (Ig), são glicoproteínas produzidas por animais vertebrados em resposta à introdução de um agente externo (antígeno), possuindo a habilidade de reconhecê-lo de forma específica e ligar-se a parte definida da estrutura molecular do antígeno (Figura 1) (Bonwick e Smith, 2004).

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 reação cruzada (Billett et al., 1996; Sheu e Hsieh, 1998).

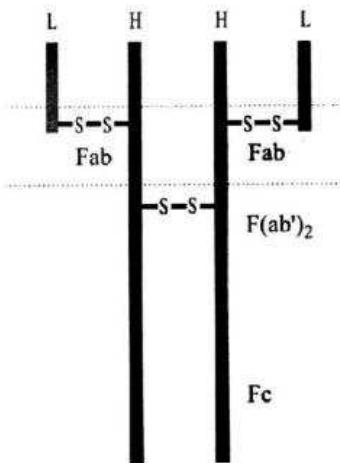


Figura 1. Estrutura geral de um anticorpo. Quatro cadeias de polipeptídeos, duas pesadas (H) e duas leves (L), são estabilizadas e ligadas por pontes dissulfeto (-s-s-) dando à molécula o formato de um Y. A porção inferior da molécula (fração Fc) é própria para ligações. A parte superior [fração F(ab')<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 epitopo de um antígeno (Bonwick e Smith, 2004).

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 anticorpos monoclonais possuem uma atividade biológica definida, especificidade constante, e produção ilimitada, porém, sua produção é mais difícil, requer técnicas de cultivo celular e devem ser mantidos em ambiente altamente asséptico e em temperatura e atmosfera controladas para manutenção da sua viabilidade (Sheu e Hsieh, 1998; Nagashima et al., 2013).

### - Antígenos

Antígenos são definidos como moléculas estranhas que quando introduzidas no organismo são capazes de estimular a resposta imune, ou seja, são substâncias capazes, sob condições apropriadas, de induzirem a formação de anticorpos e de serem reconhecidas especificamente pelos mesmos. No entanto, estudos mostraram que os抗ígenos podem apresentar restrições para demonstrar estas duas propriedades, o tamanho de um antígeno, por exemplo, pode ser uma restrição quanto à sua capacidade de induzir a formação de anticorpos. Estas restrições levaram a redefinição do termo antígeno para imunógeno, que é uma estrutura molecular capaz de induzir a produção de um ou mais anticorpos. Um mesmo imunógeno pode induzir a formação de diferentes

anticorpos por possuir diferentes epitopos, ou determinantes antigênicos (Bonwick e Smith, 2004).

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

Tratamentos térmicos são frequentemente usados na elaboração de produtos cárneos, podendo levar a alterações químicas e físicas nas proteínas musculares, como desnaturação e coagulação. Os anticorpos são dirigidos principalmente contra a estrutura conformacional (tridimensional) do antígeno em vez de sítios sequenciais de sua estrutura primária. Marín et al. (1992) avaliaram a associação entre a antigenicidade e a temperatura de tratamento, encontrando uma relação linear entre o aumento da temperatura de tratamento e a diminuição da antigenicidade. Houve perda de 14% de antigenicidade quando o produto foi submetido a temperatura de 40°C por 30 minutos, e de até 70% quando esse binômio passou a 100°C/30 minutos.

### **Imunodifusão em gel de Agarose (IDGA)**

Numa placa com uma fina camada de ágar são feitos poços em que são depositados os antígenos e o anticorpo, que se difundem pelo gel, se o anticorpo for específico para o antígeno, há formação de uma linha opaca de precipitação. Esta técnica já foi utilizada para a identificação de diversas espécies de carnes, porém, apesar de ser uma técnica específica, possui baixa sensibilidade, e não distingue equinos de muares, e ovinos de caprinos. Existem testes comerciais que se baseiam nessa técnica para triagens rotineiras de adulterações (Patterson e Jones, 1990).

### **Contra imunoelétroforese**

A metodologia da contra imunoelétroforese é uma combinação das técnicas de imunodifusão em gel de agarose e eletroforese, e proporciona um resultado mais rápido e mais sensível. Na eletroforese convencional o gel de poliacrilamida tem pH neutro e as proteínas movem-se em direção ao anodo devido a sua carga negativa. Na contra imunoelétroforese o gel é alcalino, fazendo com que as proteínas fracamente negativas, como as imunoglobulinas fiquem carregadas positivamente movendo-se então em direção ao catodo. Dessa maneira as proteínas do extrato de

carne e as imunoglobulinas presentes no antissoro se movem uma em direção à outra formando uma linha opaca de precipitação (Patterson e Jones, 1990).

## ELISA

A técnica do ensaio imunoenzimático (ELISA) tornou-se a principal entre muitos ensaios utilizados atualmente. Essa metodologia baseia-se nas reações antígeno-anticorpo detectáveis através de reações enzimáticas. A enzima é covalentemente ligada ao anticorpo específico que reconhece o antígeno alvo. Se o antígeno estiver presente, o anticorpo marcado enzimaticamente irá ligar-se a ele, e a enzima catalisará a reação de um substrato. Essa reação resultará em uma mudança de cor detectável ou na liberação de íons, mudando visivelmente a cor do substrato (Patterson e Jones, 1990; Bonwick e Smith, 2004; Ansensio et al., 2008).

Existem vários tipos de arranjos possíveis para a metodologia de ELISA. No método direto (Figura 2) o antígeno, alvo da mensuração, é immobilizado na placa e um anticorpo marcado enzimaticamente é adicionado à mistura. Se houver ligação antígeno/anticorpo, a enzima catalisa a reação e a extensão da ligação é mensurada pela mudança de cor do substrato. A intensidade da cor resultante pode ser medida em espectrofotômetro pois, quanto mais intensa a cor, maior a quantidade de antígeno ligado a placa (Bonwick e Smith, 2004).



Figura 2. ELISA direto: immobilização do antígeno na placa e adição de anticorpo marcado enzimaticamente (After et al., 2000).

No método indireto (Figura 3) há immobilização do antígeno na placa, seguido da adição de um anticorpo primário que é o alvo da mensuração, posteriormente um anticorpo secundário marcado com a enzima é adicionado.

Essa enzima é responsável pela catalisação da reação do substrato, gerando cor, quanto mais intensa a cor, maior a quantidade de anticorpo primário ligado ao antígeno (Bonwick e Smith, 2004).

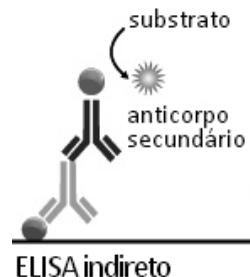


Figura 3. ELISA indireto: imobilização do antígeno na placa com adição de anticorpo primário e anticorpo secundário marcado enzimaticamente (After et al., 2000).

No ELISA sanduíche ou ELISA de captura (figura 4) um anticorpo em quantidade conhecida é imobilizado na placa. Em seguida é adicionado o antígeno, que se deseja mensurar, e posteriormente o anticorpo secundário, marcado enzimaticamente, que catalisará a reação do substrato. Quanto mais intensa a cor, maior a quantidade de antígeno ligado ao anticorpo imobilizado na placa (Bonwick e Smith, 2004).

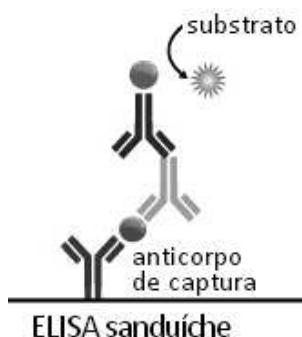


Figura 4. ELISA sanduíche: O anticorpo é imobilizado na placa seguido da adição do antígeno e posteriormente do anticorpo marcado enzimaticamente (After et al., 2000).

### **Aplicações da metodologia de ELISA para identificação de espécies de carnes em alimentos**

Jones e Patterson (1985) utilizaram anticorpos policlonais produzidos em coelhos e ovelhas, para o desenvolvimento de uma metodologia de ELISA sanduíche. Os anticorpos policlonais foram purificados em colunas imunoadsorventes, para aumentar sua especificidade. O objetivo do estudo foi detectar baixas concentrações de espécies de carne em misturas. Amostras de carne

bovina foram fraudadas experimentalmente com carne suína nas proporções de 0; 0,2; 0,5; 1; 2,5; 5 e 10%. Os autores concluíram que foi possível discriminar até 0,5% de inclusão de carne suína em mistura com a carne bovina.

A metodologia de ELISA sanduíche empregando anticorpos monoclonais e policlonais purificados em coluna de imunoafinidade, foi utilizada por Martín et al. (1991) para estabelecer uma curva padrão de detecção de carne de ave misturada a carne bovina ou suína. Foram utilizadas as proporções de 0; 1; 2,5; 5; 10; 25; 50; 100% de carne de frango para preparar as amostras fraudadas. O teste foi capaz de correlacionar linearmente à quantidade de carne de ave na mistura e a absorbância.

Com o objetivo de desenvolver uma metodologia de ELISA capaz de reconhecer especificamente carne mecanicamente separada (CMS) de frango em alimentos de origem animal, Pickering et al.(1995) utilizaram como抗ígenos para a produção de anticorpos, uma fração de proteínas de baixo peso molecular (< 30 kDa) da medula óssea dessa espécie animal. A escolha do uso de proteínas presentes na medula óssea baseia-se no processo de elaboração da CMS, durante o qual os ossos são submetidos a altas pressões, havendo liberação de fluidos de sua estrutura, como células precursoras sanguíneas e outras proteínas. O resultado demonstrou que foi possível quantificar a presença de CMS de frango misturada a carne de peito de frango. Entretanto quando outras partes da carcaça eram utilizadas na mistura em proporções definidas (0, 5, 10, 25, 50 e 100%) havia um incremento da mensuração de absorbância, gerando estimativas de porcentagem de CMS diferentes da concentração real (50, 30, 17, >50, >50, >50%; respectivamente para as proporções citadas anteriormente). De acordo com os autores provavelmente a maior quantidade de sangue residual nessas outras partes, quando comparadas ao peito, tenham desencadeado esse resultado. Foi testada também a interferência de ingredientes não cárneos como trigo e soja, comumente utilizados na fabricação de produtos de origem animal. Observou-se que a adição de trigo não interferiu na mensuração da quantidade de CMS, entretanto a utilização de soja subestimou a quantidade de CMS. Esse resultado pode ser explicado pela ligação das proteínas de soja a placa de ELISA durante a etapa de sensibilização, diminuindo, portanto, a quantidade de CMS imobilizada e mensurada.

A quantificação de carne de frango de corte e peru em carne bovina e suína, respectivamente, foi realizada por Djurdjevic et al., (2005) utilizando anticorpos monoclonais, num teste de ELISA indireto. Os抗ígenos utilizados para imunização foram previamente cozidos (100ºC/ 15 min),

resultando em anticorpos específicos para proteínas solúveis termoestáveis. Ao testar esses anticorpos contra proteínas do soro de aves, cruas não houve reação cruzada. Com proporções de 0, 1, 2, 5, 10, 20, 50 e 100% de carne de frango em carne bovina, esses autores, construíram uma curva padrão capaz de distinguir com exatidão amostras positivas das negativas. Contaminações a partir de 1% foram detectadas. O teste foi capaz de identificar 77 de 80 amostras positivas e 19 de 20 amostras negativas para carne de frango, totalizando 96% de êxito.

Utilizando um par de anticorpos monoclonais dirigidos a proteína termoestável Troponina I, Liu et al.(2006), desenvolveram um ensaio imunoenzimático em formato sanduíche com sensibilidade em detectar até 0,05% de carne suína crua, misturada a carne de frango, em amostras adulteradas em laboratório. Para comparar a efetividade do ensaio para amostras termicamente tratadas, porções de carne suína foram submetidas aos seguintes processamentos térmicos: 100°C/30min (1), 121°C /30min (2), 128°C /30min (3), 132°C /30min (4), 132°C /60min (5), 132°C /90min (6), 132°C /120min (7); e as absorbâncias encontradas comparadas a da carne suína crua. Foi observado que os tratamentos 1,2, 3, 4 e 5 apresentaram uma absorbância maior que a exibida pelo extrato de carne crua, esse aumento foi atribuído ao efeito de concentração dos抗ígenos termoestáveis, uma vez que a maior parte das proteínas extraídas da carne crua são termolábeis e os anticorpos utilizados no ensaio eram dirigidos a uma proteína termoestável.

Marcondes (2011) utilizou anticorpos policlonais dirigidos a proteínas do soro de bovinos, canídeos, coelhos, equídeos e suínos para desenvolvimento de um método de ELISA indireto qualitativo. Para verificar a eficiência do método desenvolvido, o autor utilizou nos ensaios amostras de hambúrgueres obtidos no comércio varejista, com objetivo de aferir a correta rotulagem dos mesmos. As amostras foram separadas em 5 grupos de acordo com a composição e marca, grupo 1: carne bovina e de ave, grupo 2: carne bovina de ave e gordura suína, grupo 3: carne bovina, de aves e suína, grupo 4: carne de ave, grupo 5: carne de ave. Os resultados mostraram que o teste foi eficaz em detectar as diferentes espécies cárneas nas amostras. Foi observado que uma das amostras do grupo 1 não demonstrou reatividade frente ao antissoro bovino, e as amostras do grupo 3 não reagiram com o antissoro de suíno, o autor sugere que esses resultados podem ser reflexo da não utilização da carne de algumas espécies na composição dos hambúrgueres apesar de descritas no rótulo, sendo utilizada alguma outra espécie descrita em substituição.

A síntese de porções espécie-específicas de proteínas animais tem sido utilizada para desenvolvimento de ensaios imunoenzimáticos do tipo sanduíche. Kotoura et al. (2012) utilizaram mioglobina bovina e dois peptídeos (A e B) de dez aminoácidos, sintetizados a partir da sequência N terminal dessa proteína, para a produção de anticorpos monoclonais. A escolha da mioglobina como proteína alvo baseia-se na sua tolerância a tratamentos térmicos e proteinases, comumente utilizados no processo de fabricação de produtos cárneos. A triagem dos anticorpos monoclonais foi feita através de ensaios de ELISA competitivo e utilizados para elaboração de uma curva padrão de concentração de carne bovina, para avaliar se o teste era adequado para a quantificação desta espécie em misturas. A carne suína ou de frango, foi adicionada carne bovina nas proporções de: 10; 1; 0,1 e 0%, e as amostras submetidas a diferentes temperaturas de processamento: temperatura ambiente (TA), 80°C e 120°C por 30 minutos. Utilizando a curva padrão e as absorbâncias observadas os resultados virtuais de contaminação foram: carne suína/10% carne bovina/TA: 9,2%; carne suína/10%carne bovina/80°C: 5,7%; carne suína/10% carne bovina/120°C: 10,3%; carne suína/1% carne bovina/TA: 1%; carne suína/1% carne bovina/80°C: 0,4%; carne suína/1% carne bovina/120°C: 0,7%; carne suína/0,1% carne bovina/TA: 0,2%; carne suína/0,1% carne bovina/80°C: 0,1%; carne suína/0,1% carne bovina/120°C: 0,1%. Carne de frango/10% carne bovina/TA: 13,5%; carne de frango/10% carne bovina/80°C: 4,8%; carne de frango/10% carne bovina/120°C: 6%; carne de frango/1% carne bovina/TA: 0,8%; carne de frango/1% carne bovina/80°C: 0,6%; carne de frango/1% carne bovina/120°C:0,4%; carne de frango/0,1% carne bovina/TA: 0,1%; carne de frango/0,1% carne bovina/80°C: 0,1%; carne de frango/0,1% carne bovina/120°C: 0,1%. Para amostras puras de carne suína ou frango, não houve detecção pelo teste. O coeficiente de variação entre a quantidade real e a aferida pelo teste foi inferior a 5%, os autores consideraram o teste satisfatório para a avaliação da correta rotulagem e quantificação de carne bovina em produtos cárneos.

Após casos de BSE na Europa o uso de proteínas animais para a alimentação de ruminantes foi proibida, diversos testes com o objetivo de detectá-las têm sido desenvolvidos, o único teste aceito pela União Europeia é a microscopia clássica, método que não permite a distinção de espécies, nem quantificação de contaminação. Kreuz et al (2012) com o objetivo de detectar proteínas animais processadas (PAP'S) em ração destinada a alimentação de ruminantes, desenvolveram um teste de ELISA sanduíche. O anticorpo de captura, dirigido contra a proteína osteocalcina, foi obtido comercialmente. A osteocalcina é uma proteína da matriz óssea extracelular secretada pelos osteoblastos. O anticorpo secundário foi feito a partir da imunização de camundongos com

peptídeos sintéticos da porção N terminal da osteocalcina. Afim de obter melhor desempenho dos anticorpos policlonais, estes foram purificados por cromatografia de afinidade, em seguida conjugados a estreptavidina. Segundo os autores a osteocalcina é uma proteína alvo promissora para pesquisa de carne e farinha de carne em ração destinada a ruminantes. Foi possível detectar até 1 ng de osteocalcina desta proteína pelo teste desenvolvido.

A substituição de espécies de carne em alimentos de origem animal é prática cada vez mais comum mundialmente e, com objetivo de verificar a correta rotulagem desses produtos, Cawthorn et al. (2013) analisaram 139 amostras de diferentes produtos obtidos no comércio varejista da África do Sul. Utilizando testes comerciais de análise molecular e imunoenzimáticas, esses autores encontraram carnes de espécies não declaradas em 68% das amostras examinadas, a carne suína (37%) e carne de ave (23%) foram as mais comumente encontradas como substitutas.

Com o propósito de detectar carne equina em produtos cárneos in natura, cozidos e autoclavados Hsieh et al. (2014) utilizaram proteínas termoestáveis extraídas da carne equina, após submetê-la a autoclavagem (121°C/ 1 hora) para a confecção de anticorpos monoclonais. Dentre os hibridomas, foram escolhidos dois clones que secretavam anticorpos reagentes com carne equina crua e autoclavada e não demonstraram reatividade contra carne bovina, suína e de aves. Amostras de carne bovina ou suína foram contaminadas com 0,1; 0,3; 0,5; 1 e 3% de carne equina e utilizadas no teste de ELISA competitivo. De acordo com os autores foi possível estabelecer correlação linear em ampla faixa de concentração 0,1 a 100% de carne equina em carne bovina ou suína, estabelecendo uma curva padrão de inibição, gerada a partir de concentração conhecida do antígeno contra seu percentual de inibição no teste, possibilitando seu uso em amostras desconhecidas.

Para a mistura de carne equina em carne bovina os limites de detecção foram de 0,1; 0,3 e 0,1% para carne crua, cozida e autoclavada respectivamente, para carne suína contaminada com carne equina os limites de detecção foram de 0,5% para carne crua e cozida e de 0,1 para carne autoclavada.

## MATERIAL E MÉTODOS

No presente trabalho foi elaborada metodologia específica para a identificação de carne de frango de corte em produtos de origem animal. Para o desenvolvimento dos testes foi necessário

a utilização de amostras de soro e músculo de outras espécies animais para realização de ensaios de reatividade cruzada. Os tampões e soluções utilizados nos testes estão descritos no Anexo 1.

### **Obtenção de amostras**

Amostras de soros das diferentes espécies animais utilizados para os ensaios (frango de corte, bovinos, equinos, coelhos e suínos) foram cedidas pela Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV-UFMG). Todas as amostras eram de animais saudáveis e em idade adulta. Estas amostras foram utilizadas como fonte de抗ígenos para os ensaios realizados durante a fase experimental do trabalho. As amostras foram separadas em alíquotas de 1 ml cada e submetidas a congelamento em freezer a -20°C e descongeladas apenas no momento do uso.

As amostras de músculos das diferentes espécies animais (frango de corte, bovino, coelho, equino e suíno) foram obtidas no comércio varejista de Belo Horizonte. As amostras de carnes foram utilizadas para obtenção de proteínas cárneas solúveis para os ensaios.

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 até a obtenção de um composto homogêneo. Em seguida, a mistura resultante foi disposta em placas de vidro e aquecidas em estufa a 60°C, overnight para sua secagem. Após a secagem, as amostras foram novamente trituradas e misturadas em solução PBS 0,1 M e filtradas com filtro de papel qualitativo Whatman nº4 obtendo-se um filtrado homogêneo e cristalino. Após estes procedimentos foram realizados ensaios de dosagem de proteínas em espectrofotômetro a 260 e 280 nm, em seguida os filtrados foram aliquotados em tubos com volumes de 1 ml cada e armazenados em freezer a -20°C até o momento do uso.

### **Tratamento das amostras**

#### **Imunização**

Para realização da imunização foram utilizados dois carneiros em idade adulta: um para imunização com soro de frango de corte e o outro para imunização com o extrato muscular de frango de corte. Os animais foram concedidos pela Fazenda São Judas Tadeu, (Fazenda experimental da Fundação Ezequiel Dias, localizada em Betim, MG, Brasil), e antes de cada

inoculação foram coletados sangue dos animais com o objetivo de acompanhar a evolução da imunização, a coleta foi realizada diretamente da veia jugular dos animais (Figura 5).

Para a primeira imunização, o soro e filtrado 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 completo é composto por uma emulsão oleosa em água contendo a bactéria *Mycobacterium tuberculosis* inativada pela ação do calor ou componentes de sua parede celular e é efetivo em potencializar resposta imune humoral e celular contra imunógenos coadministrados. Nas imunizações subsequentes foi utilizado o adjuvante de Freund incompleto, conservando a mesma proporção, o adjuvante incompleto não possui as micobactérias (Mota et al., 2006).

Os抗ígenos e adjuvante foram homogeneizados e inoculados nos carneiros com o auxílio de seringas de vidro, em doses de 2 ml (Figura 6). As inoculações do soro e filtrado de músculo foram realizados em intervalos de 15 dias, totalizando quatro inoculações. Antes de cada inoculação era retirado cerca de 10 mL de sangue de cada carneiro para acompanhamento da evolução da resposta imune, 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 para a retirada do soro e posterior armazenamento em freezer a -20°C.

### **Confecção das colunas de imunoafinidade**

Os procedimentos descritos para a confecção das colunas de imunoafinidade foram adaptados de Avarameas e Ternynck (1969). As colunas de imunoafinidade (colunas contendo抗ígenos, para posterior ligação com anticorpos) foram confeccionadas com o objetivo de purificar os soros (antimúsculo e antissoro) coletados dos carneiros imunizados.

Para isso, os géis de especificidade foram preparados misturando os抗ígenos, soro ou extrato de músculo de bovinos, coelhos, equinos e suínos, com albumina 1 mg/mL e glutaraldeído 25%, sendo este diluído para a proporção final de 2,5% até a formação de gel, em temperatura ambiente.



Figura 5. Retirada do sangue diretamente da veia jugular dos carneiros.

Preparado o gel, este então foi triturado com uma espátula limpa em PBS 0,1 M até a formação de partículas minúsculas. Em seguida o gel triturado foi centrifugado para separação de líquidos remanescentes. Após a centrifugação, foi adicionado ao gel solução de HCl-Glicina 0,2 M e deixado em repouso por cerca de 10 minutos. Outra centrifugação foi realizada e o pH foi ajustado para 7 com solução de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>1M.

Em seguida lavado três vezes com água destilada, os sítios reativos foram bloqueados com solução de etanolamina 1M em incubação overnight.

Posteriormente o gel foi 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 proliferação de micro-organismos. Antes do uso as colunas foram lavadas com PBS 0,1 M para retirada do tampão de azida sódica.

### **Obtenção de antissoros específicos**

Para a produção dos soros específicos (antimúsculo e antissoro), os soros coletados dos carneiros foram adsorvidos nas colunas de imunoafinidade. Os soros (antimúsculo e antissoro) foram diluídos na proporção 1:3 com tampão PBS 0,1 M e passados pelas colunas heterólogas que continham todos os抗ígenos descritos anteriormente, ou seja, soro ou extrato de músculo de

bovinos, coelhos, equinos e suínos, retendo assim todos os componentes presentes no soro (antimúsculo e antissoro) que possuem afinidade com esses抗ígenos.

Deste modo somente os anticorpos específicos para frango de corte foram coletados, após as coletas os soros adsorvidos foram armazenados em tubos cônicos de 15 mL. Para confirmação da eficiência da coleta, foram realizados periodicamente dosagem das proteínas por leitura em espectrofotômetro em 260 e 280 nm.



Figura 6. Imunização com proteínas do músculo e soro de frango de corte.

#### **Teste de especificidade de anticorpos anti-frango de corte**

Os testes de especificidades foram realizados através do método de ELISA indireto, foram utilizadas microplacas de 96 poços. Todos os ensaios de ELISA foram realizados em duplicata.

Para os ensaios de ELISA indireto, cada uma das amostras de antígeno foi aliquotada em tampão de sensibilização e na concentração de 0,01mg/mL. A cada poço foram acrescentados 100 µL desta solução e sensibilizados overnight sob refrigeração a 4°C. No dia seguinte, as microplacas foram lavadas com solução de lavagem e foi acrescentado em cada poço 100 µL de solução de bloqueio. Após estes procedimentos, as microplacas foram incubadas por uma hora a 37°C e lavadas em seguida.

Para a verificação dos títulos de anticorpos tanto os soros puros (antes da adsorção), quanto adsorvidos, foram preparados em solução tampão de incubação e diluídos em série a partir da proporção 1:100 a 1:6400 em cada microplaca. Após a adição do soro (puro ou adsorvido) as microplacas foram incubadas novamente durante uma hora a temperatura de 37°C.

Após a incubação, as microplacas foram lavadas e os poços foram preenchidos com conjugado anti carneiro 1:10000 Sigma®, diluído em solução de bloqueio e levadas a estufa a 37°C por uma hora. Em seguida, as microplacas foram lavadas e preenchidas com 100 µL em cada poço com solução de substrato. As microplacas foram novamente incubadas a 37°C durante 30 minutos, para o desenvolvimento da cor. A reação foi interrompida adicionando-se H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 30% v/v e a intensidade da cor foi medida em Leitor de ELISA a 492 nm.

### **Preparo das amostras experimentalmente contaminadas**

Amostras de carnes foram experimentalmente fraudadas em laboratório com diferentes proporções de carne de frango de corte em carne bovina ou suína (Figura 7).

#### **Amostras experimentalmente contaminadas cruas**

Foram preparadas quatro amostras com diferentes percentuais de carne de frango de corte em carne bovina e quatro amostras com diferentes percentuais de carne de ave em carne suína, totalizando oito amostras. As proporções utilizadas foram as seguintes:

- 95% de carne de boi ou porco + 5% de carne de ave;
- 90% de carne de boi ou porco + 10% de carne de ave;
- 65% de carne de boi ou porco + 35% de carne de ave;
- 50% de carne de boi ou porco + 50% de carne de ave.

Foram utilizadas triplicatas de cada uma das oito amostras contaminadas experimentalmente.

A extração das proteínas solúveis de carne crua foi realizada segundo procedimentos descritos por Rafael et al., (2008). Aproximadamente 10 gramas de cada amostra experimentalmente contaminada foi pesada adicionada de 40 mL de água destilada a 4°C e homogeneizadas em agitador eixo-hélice, em seguida o pH foi ajustado a 11,5 com solução de NaOH 1 N a 5°C. Após esse procedimento as amostras foram centrifugadas a 5000 G por 30 minutos sob temperatura de 4°C, separando em três fases: proteínas insolúveis no fundo do tubo, proteínas solúveis na fase intermediária e gordura na superfície (Figura 8). A fase intermediária foi retirada, filtrada, aliquotada e mantida a -20°C, até o uso.

### **Amostras experimentalmente contaminadas tratadas termicamente**

Foram preparadas quatro amostras com diferentes percentuais de carne de frango de corte em carne bovina e quatro amostras com diferentes percentuais de carne de ave em carne suína, totalizando oito amostras.

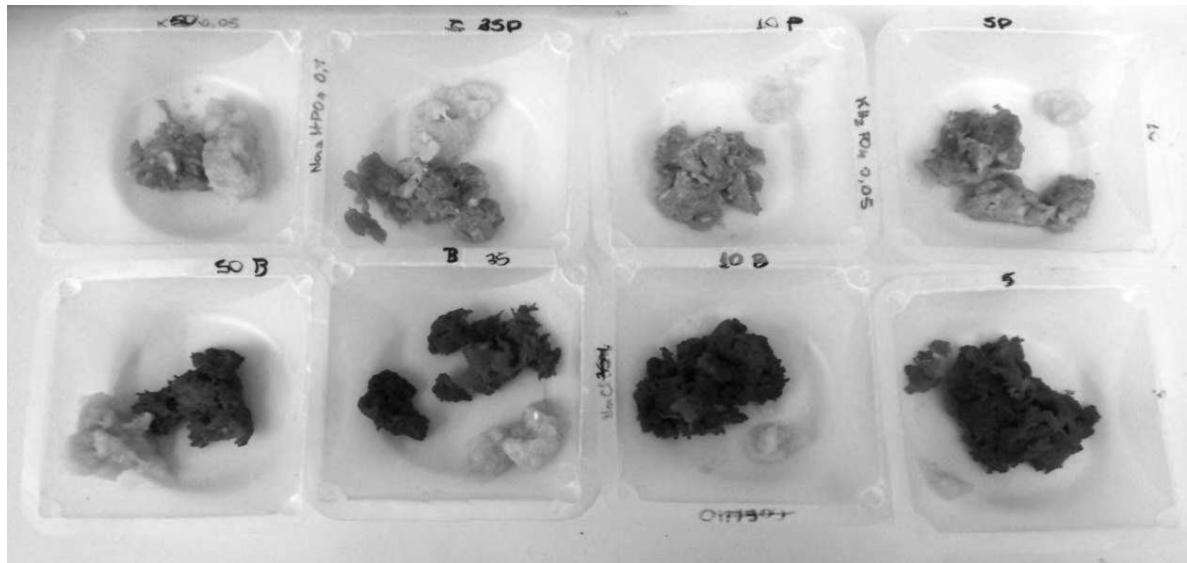


Figura 7. Pesagem das amostras experimentalmente contaminadas em diferentes proporções de carne de frango em carne bovina ou suína.

As proporções utilizadas foram as seguintes: - 95% de carne de boi ou porco + 5% de carne de ave;

- 90% de carne de boi ou porco + 10% de carne de ave;
- 65% de carne de boi ou porco + 35% de carne de ave;
- 50% de carne de boi ou porco + 50% de carne de ave.

Foram utilizadas triplicata de cada uma das oito amostras experimentalmente contaminadas.

Para extração de proteínas solúveis de carne tratada termicamente foram utilizados procedimentos descritos por Djurdjevic et al., (2005). Cerca de 10 gramas das amostras experimentalmente contaminadas foram pesadas e adicionadas de 20 mL de PBS 0,1 M em seguida colocados em banho maria a 100°C por 15 minutos para desnaturação das proteínas. Após a retirada do banho maria as amostras foram homogeneizadas por 1 minuto em agitador eixo-hélice. Em seguida foram deixadas decantar por 2 horas sob temperatura de 4°C. Posteriormente as amostras foram

centrifugadas por 30 minutos a 15000 G, mantendo a temperatura de 4°C. Para os ensaios, o sobrenadante foi retirado e filtrado em papel filtro, aliquotado e mantido a- 20°C, até o uso.

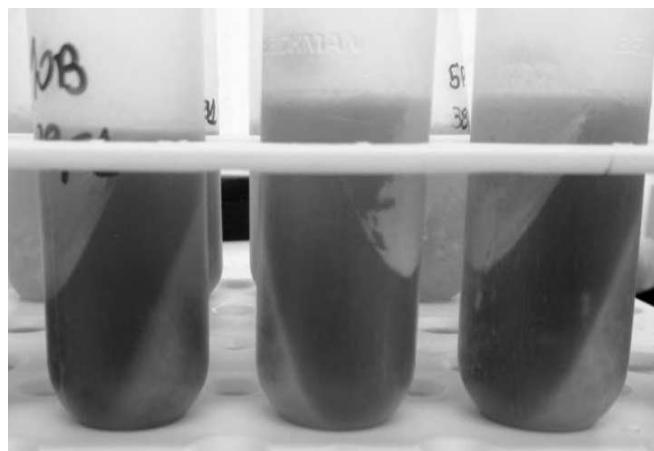


Figura 8. Separação das proteínas solúveis em amostras experimentalmente fraudadas de carne crua.

#### **ELISA indireto para amostras experimentalmente contaminadas**

Para os ensaios de ELISA indireto, cada uma das amostras de antígeno foi aliquotada em tampão de sensibilização na concentração de 0,01mg/mL. A cada poço foram acrescentados 100 µL desta solução e sensibilizados overnight, sob refrigeração a 4°C. No dia seguinte, as microplacas foram lavadas com solução de lavagem e foi acrescentado em cada poço 100 µL de solução de bloqueio. Após estes procedimentos, as microplacas foram incubadas por uma hora a 37°C e lavadas em seguida.

Posteriormente os anticorpos adsorvidos, foram preparados em solução tampão de incubação na proporção de 1: 1500. Após a adição do soro adsorvido, as microplacas foram incubadas novamente durante uma hora a uma temperatura de 37°C.

Após a incubação, as microplacas foram lavadas e os poços foram preenchidos com conjugado anti carneiro 1:10000 Sigma®, diluído em solução de bloqueio e levadas a estufa a 37°C por mais uma hora. Em seguida, as microplacas foram lavadas e preenchidas com 100 µL em cada poço com solução de substrato. Após 30 minutos a reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 30% v/v, e lidas em leitor de microplacas de ELISA a 492 nm.

### **Testes em alimentos processados (Hambúrgueres)**

Para a realização dos testes em alimentos processados, amostras de hambúrgueres de diferentes marcas e composição, foram adquiridas no comércio varejista da região metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. As amostras foram separadas em dois grupos: grupo um: carne bovina, gordura suína e carne de aves e grupo dois: carne de frango totalizando doze amostras de duas diferentes marcas. Para o preparo da amostra, cerca de 5 gramas de cada hambúrguer foi pesado e adicionado de tampão PBS 0,1 M e trituradas até a obtenção de uma mistura homogênea, e deixadas em repouso por uma hora, para decantação das partículas sólidas. Em seguida centrifugadas a 5000 G e filtradas em papel filtro Whatman nº 4 até a obtenção de um filtrado cristalino. Posteriormente as amostras foram submetidas a dosagem de proteínas em espectrofotômetro a 260 e 280 nm. Em seguida, as amostras foram aliquotadas e preservadas a temperatura de – 20º C.

### **Delineamento experimental**

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, em arranjo fatorial 2 x 2 x 4, sendo dois tipos de espécies de carne (bovina e suína), dois tipos de processamentos (carne crua e tratada termicamente) e quatro níveis de adição de carne de frango (cinco, 10, 35 e 50%) totalizando 16 tratamentos para avaliação da metodologia desenvolvida. Para avaliação dos níveis de adição de carne de frango nas amostras cruas e processadas termicamente foram utilizados modelos de regressão linear.

Para avaliação da detecção de carne de frango em amostras de hambúrgueres foram utilizados dois tratamentos (duas marcas diferentes de hambúrgueres) com seis repetições cada.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Título de anticorpos**

Os títulos de anticorpos antimúsculo e antissoro alcançados com o ciclo de imunizações com soro e músculo de frangos de corte estão representados na figura 9. Alcançar altos títulos de anticorpos é fator primordial para assegurar que as imunizações estão sendo efetivas. As absorbâncias (unidade de medida usada para determinar concentrações) encontradas alcançaram valores superiores a 3,5 em diluição de 1:100 em ambos os anticorpos (antimúsculo e antissoro)

diminuindo a valores próximo de 1 em diluição de 1:6400. Esses valores mostraram-se bem maiores que aqueles observados para o soro pré-imune, que alcançou absorbância de 0,136 na diluição de 1:100 atingindo valor bem próximo a zero à medida que a diluição foi aumentando.

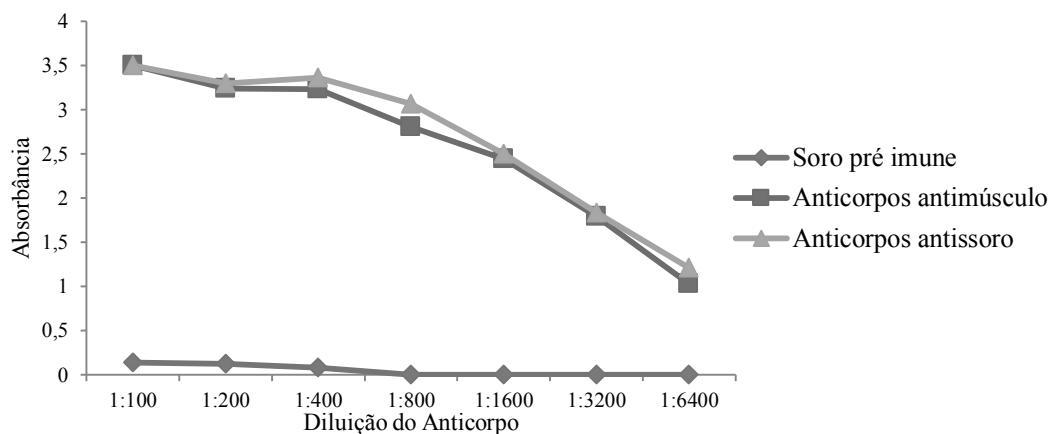


Figura 9: ELISA indireto. Título de anticorpos do soro coletado antes do início das imunizações (soro pré-imune) e após o ciclo de imunizações submetido a diluições sucessivas (1:100 a 1:6400)

#### **Adsorção dos anticorpos em coluna heteróloga de imunoafinidade**

A adsorção em coluna heteróloga tem por objetivo a retirada de componentes que reagem inespecificamente, com o antígeno utilizado nas imunizações. Na figura 10 é demonstrado a reatividade do soro antimúsculo frente ao extrato de proteínas musculares de frango de corte, bovinos, coelhos, equinos e suínos. O soro antimúsculo demonstrou alta reatividade contra o extrato de músculo de frango de corte, alcançando absorbância de até 0,756 em diluição de 1:100. Frente aos extratos de músculo de outras espécies a maior absorbância foi observada contra suíno com valor de 0,173 na menor diluição (1:100).

Jones e Patterson (1985) utilizaram colunas imunoadsorventes para purificação de anticorpos policlonais produzidos em coelhos e ovelhas dirigidos contra carne suína, o teste desenvolvido foi efetivo na detecção de 0,5% de carne suína em carne bovina. Martín et al., (1991) e Kotoura et al., (2012) utilizaram colunas de imunoafinidade para purificação de soros policlonais, para aumento da especificidade em ensaios de ELISA sanduíche. Resultados semelhantes foram encontrados por Marcondes (2011), ao utilizar colunas de imunoafinidade para verificar a

reatividade dos soros utilizados, também atestou um aumento da especificidade dos anticorpos utilizados para comprovação da composição de produtos cárneos.

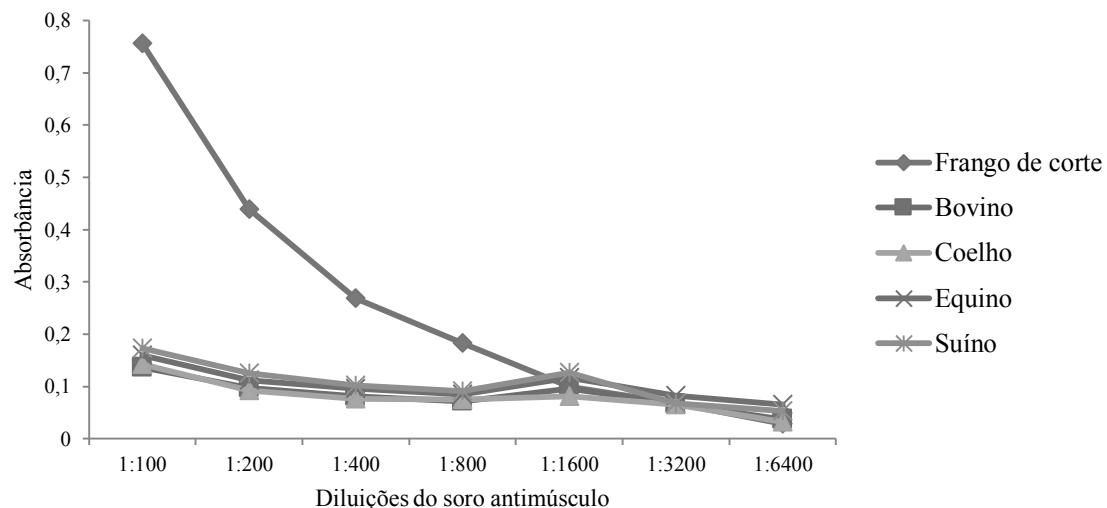


Figura 10. ELISA indireto. Reatividade do soro antimúsculo adsorvido em coluna de imunoafinidade heteróloga frente extrato de músculo de frango de corte, bovinos, coelhos, equinos e suínos.

O resultado da adsorção em coluna de imunoafinidade do antissoro está apresentado na figura 11. O antissoro demonstrou alta reatividade com o soro de ave com absorbância de até 2 na menor diluição (1:100), entretanto houve também uma alta reação cruzada com o soro de suíno com valores de 0,723 na diluição de 1:100, impossibilitando o uso nos ensaios posteriores. A interferência em imunoensaios de substâncias presentes nas amostras foi discutida por Schietecatte et al., (2012), a presença de lipídios, triglicerídeos ou colesterol no soro interfere na ligação antígeno-anticorpo, podendo superestimá-la, esses autores recomendam a coleta sanguínea pós jejum reduzindo a lipemia.

### **Amostras experimentalmente contaminadas cruas**

Foi observado que o aumento da porcentagem de contaminação correlaciona-se significativamente com aumento da absorbância. As equações de regressão da porcentagem de carne de frango adicionada à carne bovina e suína em função da absorbância e sua representação gráfica estão apresentadas nas figuras 12 e 13. Essa relação pode ser usada para quantificação de fraudes entre 5 e 50%, no entanto ligeiras variações nas curvas padrão podem ocorrer, é prudente padronizar os ensaios utilizando amostras conhecidas antes de avaliar amostras desconhecidas.

Para a quantificação de proteína de uma dada espécie em amostras contendo várias espécies cárneas, é aconselhável construir uma curva padrão em que todas estejam presentes, minimizando o efeito matriz. Esses resultados assemelham aos encontrados por Martín et al. (1991), esses autores propuseram a quantificação da carne de ave em carne bovina ou suína, utilizando metodologia de ELISA sanduíche, obtendo correlação linear e resultados satisfatórios para previsões de fraude entre 1 e 100%.

Djurdjevic et al., (2005) observaram correlação positiva entre o aumento da contaminação de carne bovina com carne de frango de 0 a 100%, e o aumento da absorbância utilizando teste de ELISA indireto, utilizando anticorpos monoclonais.

#### **Amostras experimentalmente contaminadas tratadas termicamente**

A avaliação dos anticorpos antimúsculo em detectar proteínas de frango de corte em amostras experimentalmente contaminadas tratadas termicamente é demonstrada na tabela 1. Foi observado que os antissoros foram efetivos na identificação das proteínas musculares de frango, apesar de haver diferença entre as repetições das amostras com a mesma porcentagem de contaminação, não foi possível estabelecer correlação entre as porcentagens de fraude e a absorbância mensurada.

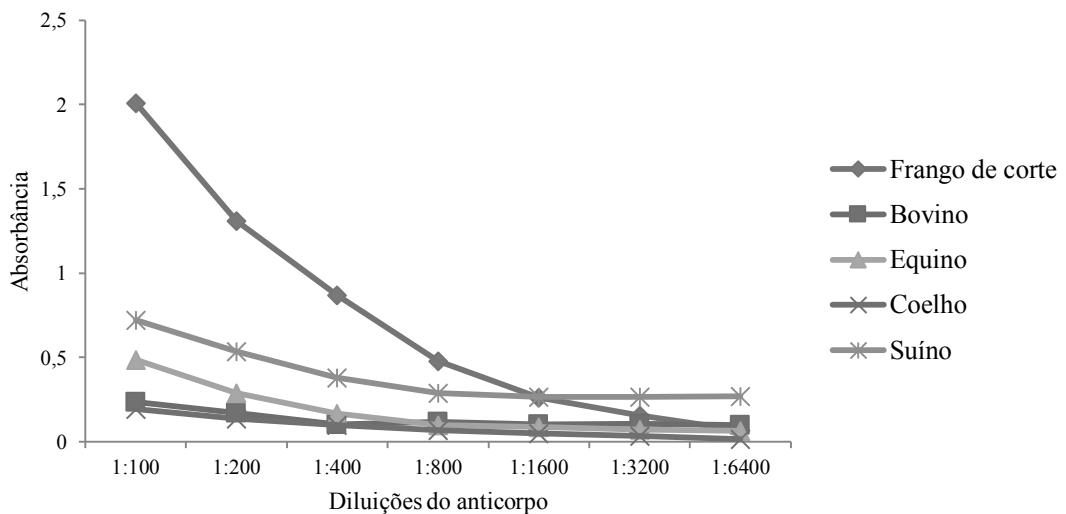


Figura 11. ELISA indireto. Reatividade do soro antissoro adsorvido em coluna de imunoafinidade heteróloga frente soro de frango de corte, bovinos, coelhos, equinos e suíños.

A perda de antigenicidade pode ser explicada pela perda dos epitopos conformacionais ocasionado pelo cozimento que desnaturou as proteínas fazendo com que as mesmas perdessem sua estrutura terciária, pois quando se perde a complementariedade entre antígeno e anticorpo não há reconhecimento, nem ligação.

Constatação semelhante ao do presente trabalho foi encontrada por Liu et al., (2006) utilizando proteína Troponina I para o desenvolvimento de anticorpos monoclonais. Esses autores observaram variação da antigenicidade com aumento da intensidade do tratamento térmico aplicado às amostras de carne suína. Concluindo que não foi possível correlacionar a perda da antigenicidade e o tratamento térmico utilizado.

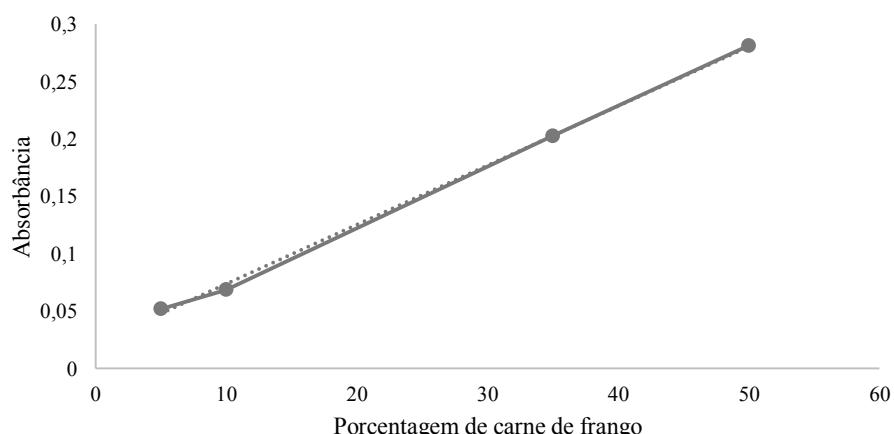


Figura 12- Equação de regressão linear obtida com concentrações de 5 a 50% de carne de frango em carne bovina. A equação é expressa estatisticamente por  $y= 0,0052x + 0,0217$ ,  $r^2 = 0,9988$ , onde o y é a absorbância e o x é a concentração de carne de frango.

Utilizando anticorpos policlonais e monoclonais dirigidos contra a proteína termoestável osteocalcina Kreuz et al., (2012) desenvolveram um teste de ELISA sanduíche, efetivo na detecção qualitativa de farinha de ossos bovino em ração autoclavada destinada a alimentação de ruminantes.

Empregando carne bovina para analisar o efeito de tratamentos térmicos na desnaturação de proteínas animais, Marín et al., (1992) verificaram correlação linear entre a perda de antigenicidade das proteínas musculares e a intensidade dos tratamentos térmicos.

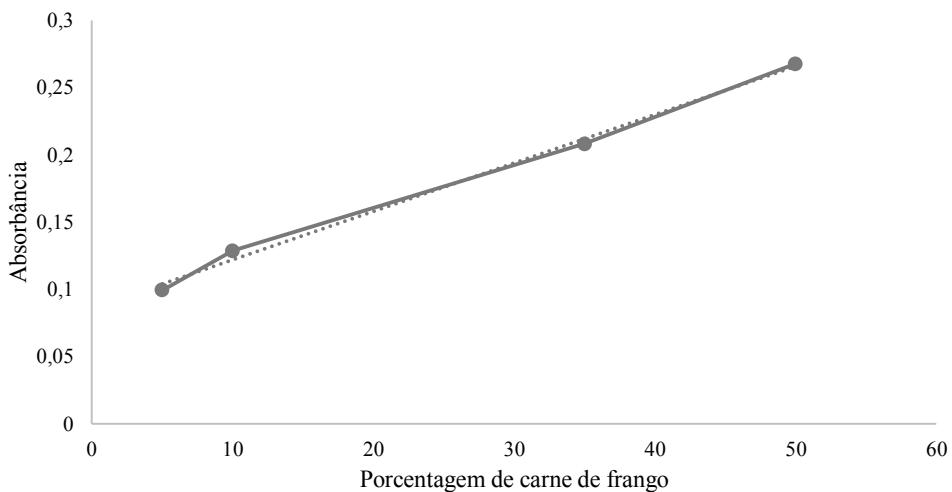


Figura 13. Equação de regressão linear foi obtida com concentrações de 5 a 50% de carne de frango em carne suína. A equação é expressa estatisticamente por  $y = 0,0036x + 0,086$ ,  $r^2 = 0,9953$ , onde o y é a absorbância e o x é a concentração de carne de frango.

Objetivando quantificar contaminação de carne bovina em carne suína ou de aves, Kotoura et al., (2012) desenvolveram um teste capaz de predizer a concentração do contaminante independente do tratamento térmico a que as amostras foram submetidas. Com coeficiente de variação entre a quantidade real e a quantidade mensurada a partir do teste, inferior a 5%.

O uso de antígenos previamente tratados termicamente para a obtenção dos anticorpos pode trazer resultados satisfatórios na pesquisa de fraude em alimentos submetidos a tratamentos térmicos. Hsieh et al., (2014) pesquisaram a presença de carne equina em alimentos crus, cozidos e autoclavados, utilizando anticorpos monoclonais. Esses anticorpos foram desenvolvidos a partir de proteínas solúveis de carne equina autoclavada. Para amostras cruas houve alta reação cruzada dos anticorpos utilizados com carnes de ganso, pato e frango, porém, quando as amostras eram cozidas ou autoclavadas esses resultados não foram observados. Os autores sugerem que as proteínas antigênicas reconhecidas na carne crua foram inativadas pelo tratamento térmico realizado. Segundo os autores foi possível estabelecer uma curva padrão de concentração de proteína solúvel equina e absorbância, para fraudes em carne bovina ou suína, observando pequena variação na curva padrão dependendo da matriz utilizada.

Tabela 1. Porcentagem de carne de frango em amostras experimentalmente contaminadas e absorbâncias observadas em ELISA indireto.

Frango %	Absorbância - Carne Bovina			Absorbância - Carne Suína			Controles		
	Repetição		Repetição	Repetição	Repetição		Frango	Bovino	Suíno
	I	II	III	I	II	III			
5	0,13	0,044	0,178	0,193	0,1597	0,202	1,089	0,007	0,006
10	0,098	0,029	0,19	0,179	0,1945	0,231			
35	0,1545	0,067	0,252	0,1645	0,178	0,2267			
50	0,221	0,098	0,461	0,194	0,1397	0,243			

### Testes em amostras de hambúrgueres

Segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) para hambúrgueres, o mesmo deve ser denominado hambúguer seguido do nome espécie animal do qual é feito, permitindo-se adição máxima de proteínas não cárneas de quatro por cento. A tabela 2 demonstra os resultados obtidos nos testes realizados com as amostras de hambúrgueres. As amostras foram separadas segundo sua marca e composição, as amostras do grupo um, são descritas no rótulo como compostas por carne bovina, gordura suína e carne de ave, enquanto as amostras do grupo dois, são rotuladas como contendo apenas carne de frango. O teste demonstrou eficiência na detecção de carne de frango em amostras industrializadas, entretanto não foi possível quantificar as proteínas cárneas de frango, devido a interferência da matriz. Observou-se que os títulos obtidos no grupo um foram mais baixos que aqueles do grupo dois o que pode ser explicado pela diferença entre a composição dos mesmos. A variação de título observada dentro dos grupos pode ser interpretada por diferentes quantidades de gordura e ou adição de proteínas não cárneas ou ainda de outras espécies animais.

Segundo Pickering et al., (1995) a presença de proteínas de soja pode interferir na mensuração da absorbância, subestimando-a, devido a diminuição da imobilização de proteínas animais em razão da ligação da proteína vegetal a placa de ELISA.

Tabela 2: Absorbâncias das amostras de hambúrgueres. Compostas por: grupo um: carne bovina, gordura suína e carne de aves; grupo 2: carne de aves.

Grupos	Número da amostra	Absorbância
Grupo 1	6214	0,022
	7474	0,032
	7484	0,031
	7489	0,020
	7490	0,054
	7501	0,032
Grupo 2	7483	0,222
	7494	0,139
	7495	0,150
	7496	0,156
	7497	0,222
	7498	0,266

## CONCLUSÕES

A purificação de anticorpos monoclonais em colunas de imunoafinidade foi eficiente na retirada de componentes inespecíficos, que reagiam com outras espécies animais, resultando em um pool de anticorpos específicos para proteínas de frango de corte, possibilitando o desenvolvimento de um teste de ELISA indireto eficiente na detecção de proteínas de carne de frango de corte. Para as amostras experimentalmente contaminadas cruas houve ajuste dos dados ao modelo de regressão linear apresentando coeficiente de determinação acima de 0,99 mostrando-se adequado para quantificação de carne de frango em carne bovina ou suína em porcentagens de 5 a 50% de contaminação. Em amostras termicamente tratadas foi possível classificá-las, de modo qualitativo, quanto a presença ou ausência de carne de frango. Ao testar amostras de hambúrgueres comerciais o ensaio foi seletivo na detecção de proteínas cárneas de frango de corte, na presença de proteínas cárneas de outras espécies animais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFTER R. A.; GOLDSBY, T. J.; KINDT, B. A. **Kuby Immunology**, 4th ed. (W. H. Freeman and Company), p. 162. 2000.

ASENSIO, L.; GONZÁLEZ, I.; GARCÍA, T; MARTÍN, R. Determination of Food Authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **FoodControl**, v.19, p.1-8. 2008.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEINA ANIMAL. Relatório Anual da Associação Brasileira de Avicultura. 106p. 2014.

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.

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

BARAI, B. K.; NAYAK, R. R.; SINGHAL, R. S.; KULKARNI, P. R. Approaches to the detection of meat adulteration. **Trends in Food Science & Technology**, v. 31, p.69-72. 1992.

BILLETT, E. E, BEVAN, R.; SCANLON, B.; PICKERING, K.; GIBBONS, B. The use of a poultry-specific murine monoclonal antibody directed to the insoluble muscle protein desmin I meat speciation. **Journal of Science Food Agriculture**, n.70, p.396-404. 1996.

BONWICK, G.A; SMITH, C. J. Immunoassays: their history, development and current place in food science and technology. **International Journal of Food Science and Technology**, n.39, p.817-827. 2004.

BOTTERO, M. T.; DALMASSO, A. Animal Species Identification in Food Products: Evolution of biomolecular methods. **The Veterinary Journal**, v.190, p. 34-38. 2011.

BRASIL. Lei nº 6437 de 20 de agosto de 1977. **Configura infrações à legislação sanitária federal, estabelece as sanções respectivas e dá outras providências**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 1977.

BRASIL. Lei nº 8078 de 11 de setembro de 1990. **Dispõe sobre a proteção do consumidor e dá outras providências**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 11 de Setembro de 1990.

BRASIL. Decreto nº 6385 fev. 2008. Dá nova redação aos arts. 854 e 918 do **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal**, aprovado pelo Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 28 fev. 1997, 2008.

BRASIL. Decreto Lei nº2848 de 7 de Dezembro de 1940. **Código Penal Brasileiro**. Redação dada pela Lei 9677 de 2 de Julho de 1998. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 7 de Julho de 1998, 1940.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução **normativa nº 22, de 24 de Novembro de 2005. Aprova o Regulamento Técnico para Rotulagem de Produtos de Origem Animal Embalado**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, p.15, 25 de novembro de 2005. Seção 1. 2005.

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. 1984.

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

CECCANTINI, M. L. Novas técnicas e tecnologias na análise de alimentos aplicados à formulação (NIRs). In: **Seminário de Nutrição Animal**. Curitiba, 2008.

CNA. Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil. Disponível em: <<http://www.cna.gov.br/>>. Acesso em 5 de dezembro de 2013

REGULAMENTO EC/2003/126. Commission Directive establishing guidelines for microscopic identification and estimation of constituents of animal origin for the official control of feeding stuffs. Official Journal of the European Communities. 27 de Novembro de 2003. L.318, p.45 – 50. 2003.

COZZOLINO, D.; MURRAY, I. Identification of animal meat muscle by visible and near infrared reflectance spectroscopy. **Lebensm. – Wiss. u. - Technol.** n.37, p. 447-452. 2004.

DJURDJEVIC, N.; SHEU, S-C; HSIEH Y-H. P. Quantitative Detection of Poultry in Cooked Meat Products. **Journal of Food Science**.v.70, nº 9, p.586-593.2005.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em :<<http://www.fao.org/>> Acesso em 15 de Dezembro de 2013.

FLORES-MUNGUIA, M. E.; BERMUDEZ-ALMADA, M. C.; VÁSQUEZ-MORENO, L. A research note: Detection of Adulteration in Processed Traditional Meat Products. **Journal of Muscle Foods**, v.11, p. 319-325. 2000.

GHOVVATI, S.; NASSIRI, M. R.; MIRHOSSEINI, S. Z.; MOUSSAVI, A. H.; JAVADMANESH, A. Fraud Identification in Industrial Meat Products by multiplex PCR assay. **Food Control**, v.20, p.696-699. 2009.

GIZZI, G.; VON HOLST, C.; BAETEN, V.; et al. Intercomparisson study for the determination of processed animal proteins including meat and bone meal in animal feed. **Relatório final de contrato administrativo nº B5-1000/02/000483. JCR-IRMM**, 100p. 2003.

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

HITCHCOCK, C. H. S.; CRIMES, A. A. Methodology for meats species identification: a review. **Meat Science**, n.15, p.215-224. 1985.

HSIEH, Y. P.; WOODWARD, B. B.; HO, S.H. Detection of species substitution in raw and cooked meats using immunoassay. **Journal of Food Protection**, v.58, p. 555-559. 1995.

HSIEH, Y. P.; OFORI, J. A. Detection of horse meat contamination in raw and heat-processed meat products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 62, p. 12536-12544. 2014.

JONES, S. J.; PATTERSON, R. L. S. Double-Antibody ELISA for Detection of Trace Amounts of Pig Meat in Raw Meat Mixtures. **Meat Science**. n.15, p. 1-13. 1985.

KOTOURA, S.; MURAKAMI-YAMAGUCHI, Y.; KIZU, K.; NAKAMURA, M.; FUCHU, H.; MIAKE, K.; SUGIYAMA, M.; NARITA, H. Establishment of a sandwich ELISA for the determination of beef content in processed foods by using monoclonal antibodies to myoglobin. **Food and Agricultural Immunology**. v. 23, p. 289-301. 2012.

KREUZ, G.; ZAGON, J.; BROLL, H.; BERNHARDT, C.; LINKE, B.; LAMPEN, A. Immunological detection of osteocalcin in meat and bone meal: a novel heat stable marker for the investigation of illegal feed adulteration. **Food Additives and Contaminants**. v. 29, p. 716-726. 2012.

LEITE, D. O.; PRADO R. J. Espectroscopia no Infravermelho: Uma apresentação para o Ensino Médio. **Revista Brasileira Do Ensino De Física**, v.34, n.2, 2504. 2012.

LIU, L.; CHEN, F.; DORSEY, J. L.; HSIEH, Y. H. P. Sensitive monoclonal antibody-based sandwich ELISA for the detection of porcine skeletal muscle in meat and feed products. **Food Microbiology and Safety**, v. 71, p.1-6. 2006.

MARCONDES, G. A. Produção de antissoros específicos para detecção e identificação específica de carnes em alimentos. 55f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2011.

MARÍN, M. L.; CASAS, C.; CAMBERO, M. I.; SANZ, B. Study of the effect of heat (treatments) on meat protein denaturation as determined by ELISA. **Food Chemistry**, n.43, p. 147-150. 1992.

MARTÍN, R.; WARDALE, R. J; JONES, S. J.; HERNÁNDEZ, P. E.; PATTERSON, R. L. S. Monoclonal antibody sandwich ELISA for the potential detection of meat in mixtures of raw beef and pork. **Meat Science**, n. 30. p. 23-31. 1991.

MOTA, E. F.; LIMA, M. G. S.; MELO D. F. Adjuvantes imunológicos: avanços e perspectivas. **Ciência Animal**, n.16, p. 79-88. 2006.

MONTOWSKA, M.; & POSPIECH, E. Species identification of meat by electrophoretic methods. **ACTA Scientiarum Polonorum- Technologia Alimentaria**, v.6. p. 5-16. 2007.

NAGASHIMA, H.; WATARI, A.; SHINODA, Y.; OKAMOTO, H.; TAKUMA, S. Application of a quality by design approach to the cell culture process of a monoclonal antibody production, resulting in the establishment of a new design space. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.102, p.4274-4283.2013.

PATTERSON, R.L.S.; JONES, S.J. Review of current techniques for the verification of the species origin of meat. **Analyst**, v.115, p.501-506, 1990.

PICKERING, K. G.; GRIFFING, M.; SMETHURST, P.; HARGIN, K.D.; STEWART, C. A. Investigations of Methods to Detect Mechanically Recovered Meat in Meat Products – IV: Immunology. **Meat Science**. n.40. p.327-336. 1995.

RAFAEL, R.; MORAES, K.; HERNANDEZ, C. P.; FLORES, J.; SIMÕES, L. Extração de proteínas de frango por solubilização alcalina. **X Encontro de pós Graduação da Universidade Federal de Pelotas**. 2008.

SAWAYA, W. N.; SAEED, M. M.; MAMEESH, M.; EL-RAYES, E.; HUSAIN, A.; ALI, S.; ABDUL RAHMAN. Detection of pork in processed meat: experimental comparison of methodology. **Food Chemistry**. v. 37. p. 201-219. 1990.

SAWYER, J.; WOOD, C.; SHANAHAN, D.; GOUT, S.; McDOWELL, D. Real-time PCR for quantitative meat species testing. **Food Control**. n. 14. p. 579-583. 2003.

SCHIETTECATTE, J.; ANCKAERT, E.; SMITZ, J. Interferences in Immunoassays. **Advances in Immunoassay Technology**, Dr. Norman H. L. Chiu (Ed) InTech. Disponível em:  
<http://www.intechopen.com/books/advances-in-immunoassay-technology/interference-in-immunoassays> Bélgica, 2012

SHEU, S-C.; HSIEH, Y-H. P. Production and Partial Characterization of Monoclonal Antibodies Specific to Cooked Poultry Meat. **Meat Science**, v.50, nº 3, p.315-326. 1998.

TIJSSEN, P. The Nature of immunogens, antigens and haptens. In: **Practice and Theory of Enzyme Immunoassay**. p. 39-41. Amsterdam. 1985.

VON HOLST, C.; BOIX, A.; BAETEN, V.; VANCUTSEM, J.; BERBEN, G. Determination of processed animal proteins in feed: The performance characteristics of classical microscopy and immunoassay methods, **Food Additives and Contaminants**. n.23, p. 252-264. 2006.

WOOLFE, M.; PRIMROSE, S. Food forensics: Using DNA technology to combat misdescription and fraud. **Trends in Biotechnology**, nº. 22, p.222-226. 2004.

**ANEXO I**  
**TAMPÕES E SOLUÇÕES**

**PBS 1 M pH 7,4**

NaCl	80,0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O	28,0 g
KCl	2,0 g

Completar para um litro em água destilada .

**COATING BUFFER – TAMPÃO CARBONATO/BICARBONATO – 0,05M pH 9,6 (Tampão de Sensibilização)**

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1,59 g (0,015M)
NaHCO <sub>3</sub>	2,93 g (0,035M)

Completar para um litro em água destilada. Ajustar o pH com a adição de solução salina monobásica ou dibásica.

**SOLUÇÃO DE LAVAGEM (PRONTA PARA USO)**

NaCl	9,0 g
Tween – 20	0,5 ml
H <sub>2</sub> O (destilada)	1,0 L

Obs.: adicionar o Tween-20 após dissolver o NaCl.

**SOLUÇÃO DE BLOQUEIO – CASEÍNA**

Caseína 2,0 g

Dissolver a caseína em 100 ml de PBS 0,05M pH 7,4.

Aquecer para facilitar a dissolução.

#### **TAMPÃO DE INCUBAÇÃO – PBS 0,1M + TWEEN-20 0,1 %**

PBS 0,1M 1,0 L

Tween-20 1,0 ml

#### **TAMPÃO CITRATO 0,15M pH 5,0**

Ácido Cítrico 7,3 g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 11,86 g

Dissolver em um litro de água destilada, ajustar o pH para 5 com a adição de ácido ou salina dibásica.

#### **SOLUÇÃO SUBSTRATO (OPD)**

OPD 5mg

Tampão Citrato 12,5 mL

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Peróxido de Hidrogênio) 30% v/v 5 µL

Dissolver OPD no tampão citrato e em seguida adicionar a solução de peróxido de hidrogênio, utilizar 100 µL em cada poço da microplaca.

#### **SOLUÇÃO SALINA**

NaCl	8,5 g
H <sub>2</sub> O (destilada)	1,0 L

**ETANOLAMINA 1,0 m pH 8,0**

Etanolamina	3,0 ml
H <sub>2</sub> O (destilada)	20 ml
Ajustar o pH com HCl e completar o volume para 50 ml.	

**SOLUÇÃO DE NaOH 1M**

NaOH	4 g
Dissolver em 100 mL de água destilada.	