

## Análise genética de hambúrgueres bovinos vendidos no mercado brasileiro Genetic analysis of bovine hamburgers sold in the brazilian market

Carlos Benigno Vieira de Carvalho<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Perito criminal federal, Setor de Perícias de Genética Forense, Instituto Nacional de Criminalística, e-mail: benigno.cbvc@pf.gov.br

### RESUMO

A rotulagem incorreta de produtos alimentícios pode ser resultante de práticas de produção inadequadas ou representar tentativas de fraude. Além de perdas econômicas, os produtos com rótulos incorretos podem levar ao consumo inadvertido de itens potencialmente alergênicos ou inadequados a algumas dietas por uma série de outros motivos. Em 2013, um grande caso de adulteração de produtos de carne bovina na Europa levou a questionamentos sobre a qualidade e segurança do consumo desse tipo de alimento também no Brasil. Componentes de produtos industrializados de carne, como hambúrgueres, por exemplo, normalmente não podem ser identificados visualmente e, sendo assim, a análise genética surge como uma opção adequada para esse fim. O DNA Barcoding é um sistema de identificação animal baseado em sequências do gene mitocondrial do citocromo c oxidase I (COI) que variam entre espécies. O sistema conta com uma plataforma informatizada chamada Barcode of Life Data System (BOLD), que inclui um banco de dados de referência com sequências autenticadas e um mecanismo de busca utilizado para a identificação das espécies. Com uso ainda bastante restrito no Brasil, nos últimos anos, o DNA Barcoding tem sido amplamente utilizado em diversos outros países na investigação de produtos alimentícios rotulados incorretamente, incluindo frutos do mar e carnes de caça. O objetivo deste estudo foi analisar hambúrgueres bovinos vendidos em supermercados brasileiros e verificar se eles continham outros tipos de carne, além do conteúdo bovino declarado em seus rótulos. A análise foi realizada no Laboratório de DNA da Polícia Federal do Brasil, em 2019 e 2020, e compreendeu 54 amostras de hambúrgueres de cinco marcas e lotes diferentes, cada um deles declarando possuir 100% de carne bovina em seus rótulos. A metodologia utilizada para extrair, amplificar e detectar o DNA amplificado foi bem-sucedida e todas as amostras analisadas produziram sequências COI de boa qualidade que apresentaram 100% de similaridade com o boi-doméstico *Bos taurus*, quando pesquisadas no banco de dados de espécies do BOLD. Além disso, quando comparadas a sequências de outras espécies que poderiam, hipoteticamente, ser utilizadas para adulteração dos hambúrgueres ou representar potencial fonte de contaminação, as sequências aqui obtidas apresentaram divergência superior a 18%. Os resultados mostraram que, pelo menos no que diz respeito ao tipo de carne, os rótulos dos hambúrgueres estavam corretos, embora análises posteriores, com foco nos demais componentes dos produtos, devam ser feitas para excluir qualquer outro tipo de problema. O estudo reafirma a importância do DNA Barcoding na investigação da composição de produtos alimentícios e reforça a necessidade dessa técnica ser amplamente difundida no Brasil.

**Palavras-chave:** DNA Barcoding, *Bos taurus*, identificação genética, alimentos, Brasil.

## ABSTRACT

Mislabeled food products can sometimes be the result of improper production practices or attempts of market fraud. In addition to economic losses, mislabeled products lead customers to the inadvertent consumption of items that can potentially cause allergies or are inadequate to their diets due to any other reasons. In 2013, a major case involving beef product adulteration came to surface in Europe, which also resulted in questions about the quality and safety of consumption of this type of food in Brazil. As the meat components in processed beef products, like burgers, cannot be visually identified, genetic analysis is a suitable option for this purpose. DNA barcoding is an animal identification system based on cytochrome c oxidase I mitochondrial gene (COI) sequences that vary between species. The system has a computerized platform called Barcode of Life Data System (BOLD), which includes a reference database with authenticated sequences and a search engine used for species identification. In the last few years, DNA barcoding has become a very important tool in the investigation of mislabeled food products, including seafood and game meat, although its use in Brazil is still restricted. The objective of this study was to analyze beef burgers sold in Brazilian supermarkets and to check if they contained other kinds of meat besides the bovine content declared on their labels. The analysis was conducted at the Brazilian Federal Police DNA Laboratory in 2019 and 2020 and comprised 54 samples of burgers from five different brands and lots, each one declaring 100% bovine meat on their labels. The methodology used to extract, amplify and detect the amplified DNA was successful and all the analyzed samples produced good quality COI sequences that presented 100% similarity with the domestic cattle *Bos taurus* when searched in BOLD species level database. Additionally, when compared to sequences from other species that could hypothetically be used for adulteration of beef burgers or represent a potential source of contamination, the sequences obtained here presented more than 18% divergence. The results showed that, at least regarding the meat content, the labels of the burgers were correct, although posterior analysis with a focus on its other components should be done to exclude any possibility of mislabeling. The study reaffirms the importance of DNA barcoding in food product investigations and reinforce the need for this technique to be widespread in Brazil.

**Keywords:** DNA Barcoding, *Bos taurus*, genetic identification, food, Brazil.

## INTRODUÇÃO

A rotulagem incorreta de alimentos pode ser resultado de práticas de produção inadequadas ou tentativas de fraudes de mercado. Além das perdas econômicas, os produtos com rótulos errados podem levar ao consumo inadvertido de itens potencialmente alergênicos ou inadequados a algumas dietas por uma série de outros motivos (Galimberti et al., 2013; Kane & Helberg, 2016). Em 2013, o chamado “Escândalo da carne de cavalo” chocou a Europa, quando alimentos rotulados como compostos de carne bovina continham

carne equina indevidamente ou não declarada em sua composição, incluindo cavalos de esporte, que são tratados com drogas proibidas em animais utilizados para alimentação humana. Alguns produtos também continham carne de outros animais, como o porco, alimento proibido para judeus e muçulmanos por questões religiosas e culturais (BBC News, 2013). Já em 2015, um estudo nos Estados Unidos com carne moída e produtos de aves encontrou espécies não declaradas nos rótulos de 20% das amostras analisadas (Helberg et al., 2017), indicando que a rotulagem incorreta não está restrita a uma única região do globo. No Brasil,

ainda que não haja suspeita fundamentada desse tipo de problema envolvendo a indústria de produtos cárneos, tem havido nos últimos anos, possivelmente em resposta à ocorrência de casos internacionais, um aumento da preocupação da sociedade com a qualidade e segurança dos alimentos processados consumidos.

Considerando que em produtos processados de carne bovina, como hambúrgueres, por exemplo, os componentes da carne não podem ser identificados visualmente, a análise genética pode ser uma opção adequada para tal fim. O DNA Barcoding é um sistema de identificação de animais, baseado em sequências do gene mitocondrial do citocromo c oxidase I (COI) que variam entre espécies (Herbert et al., 2003a). O sistema possui uma plataforma informatizada denominada Barcode of Life Data System (BOLD), que inclui um banco de dados de referência com sequências autenticadas e um mecanismo de busca utilizado para identificação das espécies. Em termos sucintos, para fornecer uma identificação ao nível taxonômico de espécie, o BOLD determina que a similaridade entre uma sequência questionada e uma determinada sequência no banco de dados deva ser superior a 99% (Ratnasingham & Hebert 2007). Estudos anteriores demonstraram que as sequências COI são eficazes para discriminar muitas espécies de vertebrados, incluindo Bovidae (Herbert et al., 2003b; Cai et al., 2011). Com o suporte de seu robusto banco de dados, que possui atualmente cerca de 40.000 espécies de Chordata representadas (<http://www.boldsystems.org/>), o DNA barcoding parece ser adequado para identificar as espécies desse grupo.

Nos últimos anos, em diversos países, o DNA Barcoding tem sido utilizado para investigar produtos alimentícios rotulados incorretamente, incluindo frutos do mar, carnes de caça e inúmeras outras carnes processadas (D'Amato et al. 2013; Quinto et al. 2016; Hellberg et al. 2017; Staffen et al. 2017). Embora existam alguns exemplos de aplicação da técnica no Brasil, seu uso em investigações ou para avaliar a conformidade da

indústria de alimentos ainda é muito restrito. O objetivo deste estudo foi utilizar o DNA Barcoding para verificar se hambúrgueres bovinos produzidos por grandes indústrias e vendidos em supermercados brasileiros continham outros tipos de carne em sua composição além do conteúdo bovino declarado em seus rótulos. Os resultados aqui obtidos podem reforçar a necessidade de que as autoridades brasileiras, incluindo as sanitárias e de segurança alimentar, usem o DNA Barcoding como ferramenta de rotina em suas análises.

### MATERIAL E MÉTODOS

Nove caixas de hambúrgueres rotulados como 100% carne bovina, provenientes de cinco produtores e lotes diferentes, foram adquiridos em supermercados de Brasília, Distrito Federal, em 2019. Dois hambúrgueres de cada caixa foram selecionados para análises e três amostras foram obtidas de cada hambúrguer. As amostras consistiram em um pequeno fragmento de carne bovina de fonte única (cerca de 2-3 mm), isolado com auxílio de um estereomicroscópio (Figura 1). Cada uma das 54 amostras foi lavada três vezes em água ultrapura antes de ser analisada, procedimento que visava à remoção de eventuais contaminantes externos.



Figura 1. Exemplo de hambúrgueres antes (esquerda) e durante a amostragem em um estereomicroscópio (direita). As amostras consistiram em fragmentos individuais com cerca de 2-3 mm.

O DNA foi extraído com o kit PrepFiler Express™ Forensic DNA Extraction em um AutoMate Express™ DNA Extraction System (Applied Biosystems). Fragmentos de 650 pb da região 5' do gene COI foram amplificados usando iniciadores FishF1/FishR1 (Ward et al., 2005). As condições de PCR são descritas em Carvalho (2014) e os procedimentos de sequenciamento em Carvalho et al. (2019). As sequências foram montadas e tiveram sua qualidade avaliada com o Software SeqScape® 3 (Applied Biosystems). As sequências consensuais foram pesquisadas no banco de dados BOLD (Species Level Barcode Records), usando o mecanismo de busca próprio do sistema (Identification Engine).

A identificação das amostras foi baseada no BOLD. A identificação até o nível taxonômico de espécie se deu quando uma sequência questionada apresentou mais de 99% de similaridade com sequência(s) de uma única espécie no banco de dados. Ademais, além de sequências do boi-doméstico *Bos taurus*, as sequências obtidas das amostras foram comparadas com a sequências COI de frango *Gallus gallus*, porco *Sus scrofa*, cavalo *Equus caballus*, rato *Mus musculus* e do homem *Homo sapiens*.

A escolha dessas espécies, para comparação, se deu pelo fato de que poderiam, hipoteticamente, ser usadas para adulteração de hambúrgueres de carne bovina ou por representarem uma fonte potencial de contaminação. As sequências foram obtidas no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) e o software MEGA 6 (Tamura et al. 2013) foi usado para calcular a proporção da distância-p pareada entre elas. (proporção de posições divergentes entre duas sequências, obtida pela divisão das diferenças pelo total de nucleotídeos comparados).

## RESULTADOS

Sequências consensuais de boa qualidade com aproximadamente 650 bp foram obtidas de todas as 54 amostras. Cinco haplótipos diferentes (H1 a H5) foram identificados, sendo que a diferença entre eles não ultrapassou duas bases. A grande maioria das sequências

(45) era idêntica. Todas as sequências apresentaram 100% de similaridade com as sequências de *Bos taurus* quando pesquisadas no BOLD e, dessa forma, puderam ser associadas a essa espécie. Como esperado, as distâncias-p pareadas entre as sequências dos cinco haplótipos e de *Bos taurus* foram muito baixas ou inexistentes. Já a comparação entre as sequências dos haplótipos e as das espécies com potencial para adulteração ou contaminação resultou em distâncias maiores que 0,18 (18%) em todos os casos (Tabela 1).

Tabela 1. Distância-p entre os cinco haplótipos observados neste estudo, *Bos taurus*, e as espécies com potencial para adulteração ou contaminação.

Espécie (*)	Haplótipo (nº de amostras)				
	H1 (45)	H2 (5)	H3 (2)	H4 (1)	H5 (1)
Boi <i>Bos taurus</i> (MG837552)**	0,000	0,0015	0,0015	0,0031	0,0015
Galo <i>Gallus gallus</i> (KC189866)	0,1914	0,1901	0,1927	0,1944	0,197
Porco <i>Sus scrofa</i> (JN714162)	0,1887	0,1855	0,1902	0,1898	0,1902
Cavalo <i>Equus caballus</i> (AB859014)	0,1991	0,1963	0,1972	0,2006	0,2003
Rato <i>Mus musculus</i> (JF459217)	0,2052	0,2040	0,2049	0,2083	0,2064
Homem <i>Homo sapiens</i> (HM771214)	0,1899	0,1870	0,1896	0,1852	0,1881

\*Número de acesso no GenBank.

\*\*Sequência com maior similaridade (100%), de acordo com os resultados do BOLD.

## DISCUSSÃO

Todas as sequências obtidas neste estudo foram associadas a *Bos taurus* com o uso do banco de dados BOLD. Comparações diretas com sequências de outras espécies com potencial para adulteração ou contaminação resultaram em grande divergência genética, permitindo descartá-las com segurança como a fonte das amostras analisadas. Esses resultados mostram que a metodologia de identificação utilizada, neste estudo, em que se trabalhou com fragmentos de carne de fonte única, foi adequada e permitiu chegar ao nível taxonômico de espécie em todos os casos. Ressalta-se, no entanto, que os métodos tradicionais de sequenciamento não funcionam bem com misturas de espécies, o que pode representar um problema na análise de produtos homogêneos, tais como salsichas, queijos e carnes enlatadas. Nesses casos, o uso de coquetéis de primers, combinado a protocolos de sequenciamento de nova geração, parece ser mais

apropriado (Xing et al. 2019; Palumbo et al. 2020; Yanyi et al. 2020).

A associação de todas as amostras à *Bos taurus* demonstrou que, pelo menos em relação ao tipo de carne, os produtos analisados estavam em conformidade com seus rótulos, indicando que seu consumo é confiável. Porém, para descartar qualquer possibilidade de fraude ou falhas no processo de produção, devem ser feitas análises posteriores com foco nos demais componentes dos produtos. Evidências de quantidades maiores do que o esperado de sódio, água e outros componentes foram encontradas em hambúrgueres de frango vendidos no Kuwait, por exemplo (Al-Bahouh et al. 2012). Além disso, também é importante mencionar que, para este estudo, foram selecionados produtos de grandes indústrias e distribuidores nacionais, que estão mais sujeitos a cumprir as leis e regulamentações brasileiras. Selecionar hambúrgueres de pequenos produtores locais pode levar a resultados completamente diferentes.

O uso do DNA Barcoding como ferramenta de investigação, regulatória e de fiscalização está se tornando cada vez mais comum. Inclusive, algumas agências de vigilância sanitária e controle alimentar em todo o mundo, incluindo a Administração de Alimentos e Drogas do Estados Unidos (Food and Drug Administration - FDA) e a Agência Canadense de Inspeção de Alimentos (Canadian Food Inspection Agency - CFIA), já o adotaram de alguma forma pelo menos na identificação de frutos do mar (Shehata et al. 2018). Embora não haja notícia do uso amplo do DNA Barcoding como ferramenta de identificação de produtos bovinos por qualquer órgão governamental, nacional ou internacional, seu uso rotineiro para esse fim parece ser uma questão de tempo.

Além da elucidação de fraudes, como potência agrícola e grande produtor de carne, o Brasil poderia obter outros benefícios a partir do uso em larga escala do DNA Barcoding, um método sensível, rápido, relativamente barato e confiável de identificação de espécies. A utilização

de técnicas que atestem a confiabilidade dos alimentos pode servir como poderosa ferramenta de marketing e agregar valor a produtos, em especial àqueles direcionados ao mercado consumidor externo.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Al-Bahouh, M., Al-Zenki, S., Alomirah, H., Al-Failee, B., Al-Mutairi, T., Khan, A. 2012. Conformity of Labeling into Real Composition of Local and Imported Chicken Burgers Sold in the State of Kuwait. *International Journal of Poultry Science* 11: 529-535.

BBC News. 2013. Q&A: Horsemeat scandal. Accessible at <https://www.bbc.com/news/uk-21335872>. Accessed 15/01/2020.

Cai, Y., Zhang, L., Shen, F., Zhang, W., Hou, R. Yue, B., Li, J. & Zhang, Z. 2011. DNA barcoding of 18 species of Bovidae. *Chinese Science Bulletin*. 56. 164-168.

Carvalho, C. B. V., Fassio, L. H., Paranaíba, R. T. F. 2019. Investigação de colisões entre aves e aeronaves no Brasil com o uso do DNA barcoding. *Revista de Estudos Ambientais*. 21(2): 71-79.

Carvalho, C. B. V. 2014. DNA Barcoding in Forensic Vertebrate Species Identification. *Brazilian Journal of Forensic Sciences, Medical Law and Bioethics* 4(1): 12-23.

D'Amato, M. E., Alechine, E., Cloete, K. W., Davison, S. & Corach, D. 2013. Where is the game? Wild meat products authentication in South Africa: a case study. *Investigative Genetics* 4:6.

Galimberti, A., De Mattia, F., Losa, A., Bruni, I., Federici, S., Casiraghi, M., Martellos, S. & Labra, M. 2013. DNA barcoding as a new tool for food traceability. *Food Research International* 50(1): 55-63.

Hellberg, R., Hernandez, B. & Hernandez, E. 2017. Identification of Meat and Poultry Species in Food Products Using DNA Barcoding. *Food Control* 80: 23-28.

Herbert, P. D. N., Ratnasingham, S. & de Waard, J. R. 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B (Suppl.)* 270: 96-99.

Herbert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L. & de Waard, J. R. 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B* 270: 313-321.

Kane, D. E. & Hellberg, R. S. 2016. Identification of species in ground meat products sold on the U.S. commercial market using DNA-based methods. *Food Control* 59: 158-163.

Palumbo, F., Scariolo, F., Vannozi, A. & Barcaccia, G. 2020. NGS-based barcoding with mini-COI gene target is useful for pet food market surveys aimed at mislabelling detection. *Scientific Reports* 10(1):17767.

Quinto, C. A., Tinoco, R. & Hellberg, R. S. 2016. DNA barcoding reveals mislabeling of game meat species on the U.S. commercial market. *Food Control* 59: 386-392.

Ratnasingham, S. & Hebert, P. D. N. 2007. BOLD: The Barcode of Life Data System ([www.barcodinglife.org](http://www.barcodinglife.org)). *Molecular Ecology Notes* 7: 355-364.

Shehata, H., Naaum, A., Garduño, R. & Hanner, Robert.

2018. DNA barcoding as a regulatory tool for seafood authentication in Canada. *Food Control* 92: 147-153.

Staffen, C. F., Staffen, M. D., Becker, M. L., Löfgren, S. E., Muniz, Y. C. N, de Freitas, R. H. A. & Marrero, A. R. 2017. DNA barcoding reveals the mislabeling of fish in a popular tourist destination in Brazil. *PeerJ*. 2017 Nov 29;5: e4006.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipiński, A., Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.

Ward, R. D., Zemlak, T. S., Innes, B. H., Last, P. R., Herbert, P. D. N. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 360: 1847-1857.

Xing, R., Nan-Wang, Hu, R. & Zhang, J., Han, J. & Chen, Y. 2019. Application of next generation sequencing for species identification in meat and poultry products: A DNA metabarcoding approach. *Food Control* 101:173-179.

Yanyi, P., De-yi, Q., Jian, C., & Yue, Q. 2020. Combining a COI Mini-Barcode with Next-Generation Sequencing for Animal Origin Ingredients Identification in Processed Meat Product. *Journal of Food Quality* 2020: 1-9.

### COMO CITAR ESTE ARTIGO:

CARVALHO, C. B. V. DE. Genetic analysis of bovine hamburgers sold in the Brazilian market. *Perícia Federal*, v. 1, n. 47, p. 63-68, 2021. <https://doi.org/10.29327/266815.1.47-2>

**Quer ter o seu artigo publicado no encarte Fronteiras em Ciências Forenses?**

**Em breve serão divulgados os normativos e diretrizes para publicação neste espaço da revista Perícia Federal. Acompanhe as publicações da APCF!**