



Avaliação da autenticidade de alheiras de caça por técnicas de biologia molecular

Cristina Maria Gomes dos Santos

Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar

Orientado por:

Doutora Isabel Maria Sousa Gomes Mafra

Prof^a Doutora Maria Leticia Estevinho

**Bragança
2011**

Trabalho realizado no Laboratório de Bromatologia e Hidrologia da
Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto,
sob orientação da Doutora Isabel Maria Sousa Gomes Mafra
e co-orientação da Prof.^a Doutora Maria Leticia Miranda Fernandes Estevinho

Aos meus Pais e Irmão.
Ao Vítor.

Agradecimentos

A realização deste trabalho não teria sentido sem a colaboração preciosa de determinadas pessoas, às quais estou muito grata. Desta forma quero apresentar os meus sinceros agradecimentos.

À minha orientadora, Doutora Isabel Mafra, pela transmissão de conhecimentos científicos, simpatia, ajuda constante, pela paciência e amizade. Pelas oportunidades que me foram proporcionadas, pelo acompanhamento e acolhimento, e sobretudo, pelo bom ambiente criado durante o tempo de execução desta dissertação.

À Professora Doutora Beatriz Oliveira, pelo acolhimento no serviço de Bromatologia da Universidade do Porto e pela simpatia demonstrada.

À minha co-orientadora, Professora Doutora Leticia Estevinho, pela simpatia, disponibilidade e ajuda.

À Doutora Joana Amaral, por toda a ajuda prestada ao longo do meu percurso académico, pelos conhecimentos científicos que me transmitiu, pela força e simpatia, amizade e, sobretudo, por me ter proporcionado a oportunidade da escolha deste tema e por me ter encaminhado para o Serviço de Bromatologia.

À Joana Costa, por toda a ajuda prestada durante e após a execução deste trabalho, disponibilidade, apoio e amizade.

À Graciete, ao Telmo, à Anabela Costa e Anabela Borges pela amizade, apoio e companheirismo durante a execução deste trabalho. Obrigada pela paciência e partilha de bons momentos!

A todos os meus amigos pela amizade e apoio que sempre me deram! Obrigada a todos por estarem sempre disponíveis, mesmo quando eu estava mais ausente! Porque todas as riquezas do mundo não valem um bom amigo!

Aos meus pais e irmão, por me terem proporcionado a oportunidade de chegar até aqui, porque sem vocês não seria possível! Por todo o apoio, incentivo e preocupação! Por todo o amor, segurança e força! Por estarem sempre presentes! Obrigada por tudo!

Ao homem da minha vida, Vítor, pelo amor, paciência e pela amizade! Obrigada por toda a ajuda quer a nível laboratorial, quer de escrita! Obrigada pelo conforto e pela calma que me transmites! Obrigada pela partilha de alegrias e tristezas! Porque sem ti não teria chegado até aqui! Obrigada por estares comigo! Obrigada por tudo! Obrigada pelo amor!

Resumo

O fabrico de enchidos à base de carne representa uma longa tradição na região transmontana, onde são produzidos, sendo muito apreciados pelas suas características organolépticas peculiares e elevado valor cultural.

A alheira é um dos produtos tradicionais mais típicos de Portugal. Actualmente, para além da alheira tradicional, produzida à base de carne de porco e/ou de aves (galinha e peru) são comercializadas as alheiras de caça, geralmente com preço mais elevado. Neste tipo de produtos processados, é difícil a diferenciação das carnes utilizadas, pelo que são propícios a adulterações. Para isso, o recurso a técnicas de biologia molecular, em especial a Reacção em Cadeia da Polimerase (PCR), tem-se mostrado como uma alternativa específica, rápida, sensível e adequada para a identificação de espécies em produtos alimentares.

A elaboração desta dissertação visou a avaliação da autenticidade de amostras comerciais de alheiras de caça. Para tal, foi necessária a optimização de técnicas de PCR qualitativa, recorrendo à preparação de amostras binárias contendo as espécies em estudo. Desta forma, foram utilizados *primers* específicos para a detecção dos genes mitocondriais *cytb* e rARN 12S. Dentro dos *primers* escolhidos, alguns foram propostos pela primeira vez neste trabalho, com especial destaque para a lebre. Os resultados demonstraram elevada especificidade e sensibilidade das reacções para as espécies em estudo, permitindo detectar a adição de faisão, perdiz, pato, coelho, vaca e lebre em carne de porco até ao limite de 0,01% e adição de veado em carne de porco até ao limite de 0,1%. No caso da detecção de galinha e peru, obteve-se um limite de detecção de 0,01% e 0,1%, respectivamente. No entanto, foi verificada alguma reactividade cruzada, pelo que estas duas técnicas deverão ser optimizadas com novos *primers*. As metodologias propostas foram aplicadas com sucesso a 18 amostras comerciais de alheiras de caça, tendo-se detectado várias inconsistências na rotulagem, nomeadamente a ausência de espécies de caça declaradas (faisão, perdiz, pato, veado, lebre e coelho) e a presença de carnes não rotuladas (vaca, galinha e peru). A lebre mereceu neste estudo um destaque importante por não terem sido encontrados estudos anteriores relativamente à identificação específica desta espécie. Pelo que, neste trabalho foram propostas duas técnicas de PCR para a detecção de lebre que permitiram atingir níveis da ordem de 0,01% de carne de lebre em carne de porco. Adicionalmente, por PCR em tempo real com a utilização do novo corante EvaGreen® atingiu-se o limite de detecção absoluto de 0,1 pg, tendo a nova metodologia proposta mostrado ser adequada para quantificação.

Palavras-chave: autenticidade, espécies, carne de caça, alheiras de caça, PCR.

Abstract

The manufacture of traditional meat products is a long-established tradition in Northeastern region of Portugal, in particular the case of “alheiras”, which are very popular for its unique organoleptic characteristics. Besides the traditional “alheiras” mainly produced with pork and poultry meat, others are currently available in the market, which are produced with different game meats, such as “alheiras de caça”. Since this kind of meat products are prepared using more expensive meats, they are prone to adulterations due to the economic profit that might result from the replacement or decrease of those high valued meats. Thus, the use of molecular biology techniques, especially Polymerase Chain Reaction (PCR), has become a reliable alternative, rapid in performance, sensitive and suitable for species identification in food.

The preparation of this thesis aimed to evaluate the authenticity of commercial samples of “alheiras de caça”. For this purpose, it was necessary to optimize qualitative PCR technique, using the binary mixtures containing the species under study. Specific primers were also used for the detection of mitochondrial genes *cytb* and 12S rRNA. From the chosen primers, some were available on the literature while others were proposed for the first time in this work, with special emphasis to hare. PCR results revealed high sensitivity and specificity of the primers, allowing detecting the addition of pheasant, partridge, duck, rabbit, cow and hare in pork mixtures down to 0.01% and the addition of deer in pork down to 0.1%. The detection of chicken and turkey using the new designed primers enable positive amplifications until 0.01% and 0.1%, respectively. However, for these reactions it was also observed some cross-reactivity, indicating that the technique should be optimized using different primers. The proposed methods were successfully applied to 18 commercial samples of “alheiras de caça”, being detected several discrepancies in the labeling, including the absence of game species declared (pheasant, partridge, duck, deer, hare and rabbit) and the presence of meat species not labeled (cow, chicken and turkey). In this study, hare meat earned a prominent role due to the lack of reported works regarding specific identification of hare. With the techniques applied to hare detection it was possible to achieve a relative limit of detection (LOD) of 0.01% using qualitative PCR. By the use of real-time PCR with the new EvaGreen dye, an absolute LOD of 0.1 pg was reached, having the novel proposed methodology demonstrated its adequacy for quantification.

Keywords: Authenticity, species, game meat, “alheiras de caça”, PCR.

Abreviaturas

CE – Electroforese capilar (*Capillary Electrophoresis*)

cytb – Citocromo b (*Cytochrome b*)

2-DE – Electroforese bidimensional (*Two-dimensional gel electrophoresis*)

ADN – Ácido desoxirribonucleico

ARN – Ácido ribonucleico

BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*

dNTP – Desoxirribonucleótido trifosfato

ELISA – Ensaio de imunoabsorção com enzimas fixadas (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*)

GC – Cromatografia Gasosa (*Gas Chromatography*)

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography*)

IEF – Focagem isoelectrica (*Isoelectric focusing*)

LC – Cromatografia Líquida (*Liquid Chromatography*)

pb – pares de bases

PCR – Reacção em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

RAPD – Amplificação aleatória de ADN polimórfico (*Random Amplification of Polymorphic DNA*)

RFLP – Polimorfismo no Comprimento dos Fragmentos de Restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

SDS-PAGE – Electroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

SSCP – Polimorfismos de conformação de cadeia simples (*Single Strand Conformational Polymorphisms*)

UV – Ultravioleta

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	iii
Abstract	v
Abreviaturas	vii
1. Objectivos e âmbito do trabalho	1
2. Abordagem teórica	3
2.1. História da alheira	3
2.2. A alheira	3
2.2.1. Importância económica	5
2.2.2. Qualidade microbiológica	6
2.3. Autenticidade de produtos cárneos	6
2.4. Metodologias de avaliação da autenticidade de produtos cárneos.....	8
2.4.1. Métodos baseados na análise de proteínas.....	9
2.4.2. Métodos baseados em ácidos nucleicos.....	10
2.4.2.1. Extracção de ADN.....	11
2.4.2.2. A técnica da PCR convencional	13
2.4.2.3. PCR em tempo real	16
2.4.2.4. Outros métodos baseados na técnica de PCR.....	19
2.4.2.5. Sequências alvo	22
2.5. Aplicação das técnicas de PCR na identificação de espécies em produtos cárneos	23
3. Material e Métodos	29
3.1. Descrição das amostras	29
3.2. Reagentes e soluções	31
3.2.1. Preparação das soluções	31
3.3. Extracção de ADN	32
3.3.1. Avaliação da qualidade do ADN extraído.....	33
3.4. Amplificação por PCR.....	34
3.4.1. Oligonucleótidos	34
3.4.2. PCR qualitativa	38
3.4.3. Electroforese em gel de agarose.....	38
3.4.4. PCR em tempo real	38
3.5. Cuidados especiais.....	39
4. Resultados e Discussão	41
4.1. Avaliação das amostras extraídas.....	41
4.2. Identificação de espécies animais por PCR	44
4.2.1. Identificação de <i>Gallus gallus</i> (Galinha).....	44

4.2.2.	Identificação de <i>Meleagris gallopavo</i> (Peru).....	47
4.2.3.	Identificação de <i>Sus scrofa</i> (Porco).....	50
4.2.4.	Identificação de <i>Phasianus colchicus</i> (Faisão).....	52
4.2.5.	Identificação de <i>Coturnix coturnix</i> (Codorniz).....	54
4.2.6.	Identificação de <i>Alectoris</i> spp. (Perdiz)	56
4.2.7.	Identificação de <i>Anas platyrhynchos</i> (Pato)	58
4.2.8.	Identificação de <i>Oryctolagus cuniculus</i> (Coelho).....	60
4.2.9.	Identificação de <i>Cervus elaphus</i> (Veado).....	62
4.2.10.	Identificação de <i>Bos taurus</i> (Vaca).....	64
4.2.11.	Identificação de <i>Lepus</i> spp. (Lebre)	67
4.3.	Avaliação global da autenticidade de alheiras de caça	73
5.	Conclusões finais	77
6.	Referências bibliográficas	79

Índice de Tabelas

Tabela 1: Diferentes métodos de extracção utilizados para o isolamento de ADN de produtos cárneos	12
Tabela 2: Resumo das aplicações de técnicas de PCR na avaliação de autenticidade de produtos cárneos	26
Tabela 3: Descrição da rotulagem das amostras de alheiras de caça	29
Tabela 4: Carnes utilizadas na produção de alheiras de caça	30
Tabela 5: Ingredientes utilizados na produção das alheiras (pão e especiarias)	31
Tabela 6: Misturas binárias de referência de cada espécie em estudo	31
Tabela 7: Oligonucleótidos utilizados na identificação das diferentes espécies por PCR	35
Tabela 8: Componentes das misturas de PCR convencional para a identificação de todas as espécies	36
Tabela 9: Condições de temperatura e tempo utilizadas na amplificação por PCR convencional para todas as espécies	37
Tabela 10: Componentes da mistura usada na PCR em tempo real	39
Tabela 11: Concentração e pureza dos extractos de ADN obtidos a partir das amostras de alheiras com tripa	41
Tabela 12: Concentração e pureza dos extractos de ADN obtidos a partir das amostras de alheiras sem tripa	42
Tabela 13: Concentração e pureza dos extractos de ADN obtidos a partir das amostras de carnes	42
Tabela 14: Concentração e pureza dos extractos obtidos a partir das amostras de especiarias e pão	43
Tabela 15: Concentração e pureza dos extractos de ADN obtidos a partir das misturas padrão de galinha/porco	44
Tabela 16: Concentração e pureza dos extractos de ADN obtidos a partir das misturas padrão de peru/porco	47
Tabela 17: Concentração e pureza dos extractos de ADN obtidos a partir das misturas padrão de faisão/porco	52
Tabela 18: Concentração e pureza dos extractos de ADN obtidos a partir das misturas padrão de codorniz/porco	54
Tabela 19: Concentração e pureza dos extractos de ADN obtidos a partir das misturas padrão de perdiz/porco	56
Tabela 20: Concentração e pureza dos extractos de ADN obtidos a partir das misturas padrão de pato/porco	58
Tabela 21: Concentração e pureza dos extractos de ADN obtidos a partir das misturas padrão de coelho/porco	61
Tabela 22: Concentração e pureza dos extractos de ADN obtidos a partir das misturas padrão de veado/porco	63
Tabela 23: Concentração e pureza dos extractos de ADN obtidos a partir das misturas padrão de vaca/porco	65
Tabela 24: Concentração e pureza dos extractos de ADN obtidos a partir das misturas padrão de lebre/porco	68
Tabela 25: Compilação dos resultados obtidos por PCR convencional para a detecção das diferentes espécies em amostras comerciais de alheiras de caça	75

Índice de Figuras

Figura 1: Esquema do modo de produção da alheira (Adaptado de Caderno de Especificações da Alheira de Mirandela).....	4
Figura 2: Produção de alheira de Mirandela em Portugal (Adaptado de Ministério da Agricultura).....	6
Figura 3: Questões de autenticidade relacionadas com carne e produtos à base de carne (Adaptado de Montowska & Pospiech, 2011)	8
Figura 4: Representação das três etapas de amplificação por PCR (Adaptado de Holzhauser et al., 2006).....	13
Figura 5: Esquema ilustrativo do funcionamento do corante EvaGreen®	17
Figura 6: Sinal fluorescente obtido pela amplificação do ADN alvo por PCR em tempo real (Adaptado de Levin, 2004)	18
Figura 7: Esquema ilustrativo da sequenciação de ADN pelo método de Sanger	20
Figura 8: Electroforese em gel de agarose de ADN genómico. Linhas 1 a 7 – Amostras de alheiras de caça; Linhas P1 a P9 – Misturas binárias padrão perdiz/porco; M – Marcador Molecular HyperLadder I (Bioline, Londres, Reino Unido).....	43
Figura 9: Electroforese em gel de agarose dos padrões de galinha em porco amplificados por PCR usando os <i>primers</i> Gal1-F/Gal1-R específicos para a galinha. M – Marcador de ADN 100 pb; Linhas 1 a 10 – 0%, 100%, 20%, 10%, 5%, 2,5%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,01% de galinha ([extractos]= 10 ng/μL); CN – Controlo negativo.	45
Figura 10: Electroforese em gel de agarose da reactividade dos <i>primers</i> Gal1-F/Gal1-R com todas as espécies. M – Marcador de ADN 100 pb; Linha 1 – Javali; Linha 2 – Pato; Linha 3 – Perdiz; Linha 4 – Lebre; Linha 5 – Codorniz; Linha 6 – Coelho; Linha 7 - Coelho selvagem; Linha 8 – Veado; Linha 9 – Faisão; Linha 10 – Vaca; Linha 11 – Galinha; Linha 12 – Peru; Linha 13 – Porco ([extractos]= 10 ng/μL); CN – Controlo negativo.	45
Figura 11: Electroforese em gel de agarose da especificidade dos <i>primers</i> Gal1-F/Gal1-R nas especiarias e pão. M – Marcador de ADN 100 pb; Linha 1 – Cebola; Linha 2 – Alho; Linha 3 – Salsa; Linha 4 – Pimenta branca; Linha 5 – Louro; Linha 6 – Pimentão-doce; Linha 7 – Piri-piri; Linha 8 – Soja; Linha 9 – Milho; Linha 10 – Pão de trigo; Linha 11 – Pão de centeio ([extractos]= 50 ng/μL); Linha 12 – 1% Galinha ([extractos]= 10 ng/μL); CN – Controlo negativo.	45
Figura 12: Electroforese em gel de agarose das especiarias amplificadas por PCR usando os <i>primers</i> 18SEU-F/18SEU-R específicos para eucariotas. M – Marcador de ADN 100 pb; Linha 1 – Cebola; Linha 2 – Alho; Linha 3 – Salsa; Linha 4 – Pimenta Branca; Linha 5 – Louro; Linha 6 – Pimentão-doce; Linha 7 – Piri-piri ([extractos]= 50 ng/μL); B – Branco de extracção; CN – Controlo negativo.	46
Figura 13: Electroforese em gel de agarose das amostras comerciais de alheiras de caça amplificadas por PCR usando os <i>primers</i> Gal1-F/Gal1-R específicos para a galinha. M – Marcador de ADN 100 pb; Linhas 1 a 18 – amostras AL1 a AL18 ([extractos]= 50 ng/μL); Cp ₁ – 1% galinha; Cp ₂ – 0,1% galinha ([extractos]= 10 ng/μL); CN – Controlo negativo.	47
Figura 14: Electroforese em gel de agarose dos padrões de peru em porco amplificados por PCR usando os <i>primers</i> Mel-F/Mel-R específicos para o peru. M – Marcador de ADN 100 pb; Linhas 1 a 9 – 0%, 20%, 10%, 5%, 2,5%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,01% de peru ([extractos]= 20 ng/μL); CN – Controlo negativo.	48
Figura 15: Electroforese em gel de agarose da reactividade dos <i>primers</i> Mel-F/Mel-R com todas as espécies. M – Marcador de ADN 100 pb; Linha 1 – Javali; Linha 2 – Pato; Linha 3 – Perdiz; Linha 4 – Lebre; Linha 5 – Codorniz; Linha 6 – Coelho; Linha 7 – Faisão; Linha 8 – Veado; Linha 9 – Coelho selvagem; Linha 10 – Vaca; Linha 11 – Galinha; Linha 12 – Peru; Linha 13 – Porco ([extractos]= 10 ng/μL); CN – Controlo negativo.	48
Figura 16: Electroforese em gel de agarose da especificidade dos <i>primers</i> Mel-F/Mel-R nas especiarias e pão. M – Marcador de ADN 100 pb; Linha 1 – Cebola; Linha 2 – Alho; Linha 3 – Salsa; Linha 4 – Pimenta Branca; Linha 5 – Louro; Linha 6 – Pimentão-doce; Linha 7 –	

Piripiri; Linha 8 – Soja; Linha 9 – Milho; Linha 10 – Pão de trigo; Linha 11 – Pão de centeio ([extractos]= 50 ng/μL); Linha 12 – 1% Peru ([extractos]= 20 ng/μL); CN – Controlo negativo.	49
Figura 17 Electroforese em gel de agarose das amostras comerciais de alheiras de caça amplificadas por PCR usando os <i>primers</i> Mel-F/Mel-R específicos para o peru. M – Marcador de ADN 100 pb; Linhas 1 a 18 – amostras AL1 a AL18 ([extractos]= 50 ng/μL); Cp ₁ – 1% peru; Cp ₂ – 0,1% peru ([extractos]= 20 ng/μL); CN – Controlo negativo.	50
Figura 18: Electroforese em gel de agarose da especificidade dos <i>primers</i> Pork-F/Pork-R nas especiarias e pão. M – Marcador de ADN 100 pb; Linha 1 – Cebola; Linha 2 – Alho; Linha 3 – Salsa; Linha 4 – Pimenta Branca; Linha 5 – Louro; Linha 6 – Pimentão-doce; Linha 7 – Piripiri; Linha 8 – Soja; Linha 9 – Milho; Linha 10 – Pão de trigo; Linha 11 – Pão de centeio ([extractos]= 50 ng/μL); Linha 12 – 100% Porco ([extracto]= 10 ng/μL); CN – Controlo negativo.....	51
Figura 19 Electroforese em gel de agarose das amostras comerciais de alheiras de caça com tripa amplificadas por PCR usando os <i>primers</i> Pork-F/Pork-R específicos para o porco. M – Marcador de ADN 100 pb; Linhas 1 a 18 – amostras AL1 a AL18 ([extractos]= 50 ng/μL); Cp – 100% porco ([extracto]= 10 ng/μL); CN – Controlo negativo.....	51
Figura 20: Electroforese em gel de agarose das amostras comerciais de alheiras de caça sem tripa amplificadas por PCR usando os <i>primers</i> Pork-F/Pork-R específicos para o porco. M – Marcador de ADN 100 pb; Linhas 1 a 18 – amostras AL1 a AL18 ([extractos]= 50 ng/μL); Cp – 100% porco ([extracto]= 10 ng/μL); CN – Controlo negativo.....	52
Figura 21: Electroforese em gel de agarose dos padrões de faisão em porco amplificadas por PCR usando os <i>primers</i> 12SPHA-F/12SPHA-R específicos para o faisão. M – Marcador de ADN 100 pb; Linhas 1 a 10 – 0%, 100%, 20%, 10%, 5%, 2,5%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,01% de faisão ([extractos]= 10 ng/μL); CN – Controlo negativo.	53
Figura 22: Electroforese em gel de agarose da especificidade dos <i>primers</i> 12SPHA-F/12SPHA-R nas especiarias e pão. M – Marcador de ADN 100 pb; Linha 1 – Cebola; Linha 2 – Alho; Linha 3 – Salsa; Linha 4 – Pimenta branca; Linha 5 – Louro; Linha 6 – Pimentão-doce; Linha 7 – Piripiri; Linha 8 – Soja; Linha 9 – Milho; Linha 10 – Pão de trigo; Linha 11 – Pão de centeio ([extractos]= 50 ng/μL); Linha 12 – 1% Faisão ([extracto]= 10 ng/μL); CN – Controlo negativo.....	53
Figura 23: Electroforese em gel de agarose das amostras comerciais de alheiras de caça amplificadas por PCR usando os <i>primers</i> 12SPHA-F/12SPHA-R específicos para o faisão. M – Marcador de ADN 100 pb; Linhas 1 a 18 – amostras AL1 a AL18 ([extractos]= 50 ng/μL); Cp ₁ – 1% faisão; Cp ₂ – 0,1% faisão ([extractos]= 10 ng/μL); CN – Controlo negativo.	54
Figura 24: Electroforese em gel de agarose dos padrões de codorniz em porco amplificadas por PCR usando os <i>primers</i> SCOT-F/SCOT-R específicos para a codorniz. M – Marcador de ADN 100 pb; Linhas 1 a 9 - 0%, 20%, 10%, 5%, 2,5%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,01% de codorniz ([extractos]= 10 ng/μL); CN – Controlo negativo.	55
Figura 25: Electroforese em gel de agarose das amostras comerciais de alheiras de caça amplificadas por PCR usando os <i>primers</i> SCOT-F/SCOT-R específicos para a codorniz. M – Marcador de ADN 100 pb; Linha 1 - Amostra AL6; Linha 2 - Amostra AL8; Linha 3 – Amostra AL9; Linha 4 – Amostra AL11; Linha 5 – Amostra AL12; Linha 6 - Amostra AL14 ([extractos]= 50 ng/μL); Cp – 1% Codorniz ([extracto]= 10 ng/μL); CN – Controlo negativo.	55
Figura 26: Electroforese em gel de agarose dos padrões de perdiz em porco amplificadas por PCR usando os <i>primers</i> 12SALEC-F/12SALEC-R específicos para a perdiz. M – Marcador de ADN 100 pb; Linhas 1 a 9 – 0%, 20%, 10%, 5%, 2,5%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,01% de perdiz ([extractos]= 10 ng/μL); CN – Controlo negativo.	56
Figura 27: Electroforese em gel de agarose da especificidade dos <i>primers</i> 12SALEC-F/12SALEC-R nas especiarias e pão. M – Marcador de ADN 100 pb; Linha 1 – Cebola; Linha 2 – Alho; Linha 3 – Salsa; Linha 4 – Pimenta Branca; Linha 5 – Louro; Linha 6 – Pimentão-doce; Linha 7 – Piripiri; Linha 8 – Soja; Linha 9 – Milho; Linha 10 – Pão de trigo; Linha 11 – Pão de centeio ([extractos]= 50 ng/μL); Linha 12 – 1% Perdiz ([extracto]= 10 ng/μL); CN – Controlo negativo.....	57

- Figura 28: Electroforese em gel de agarose das amostras comerciais de alheiras de caça amplificadas por PCR usando os *primers* 12SALEC-F/12SALEC-R específicos para a perdiz. M – Marcador de ADN 100 pb; Linhas 1 a 18 – amostras AL1 a AL18 ([extractos]= 50 ng/μL); Cp₁ – 1% perdiz; Cp₂ – 0,1% perdiz ([extractos]= 10 ng/μL); CN – Controlo negativo..... 57
- Figura 29: Electroforese em gel de agarose dos padrões de pato em porco amplificadas por PCR usando os *primers* Duk-F/Duk-R específicos para o pato. M – Marcador de ADN 100 pb; Linhas 1 a 9 – 0%, 20%, 10%, 5%, 2,5%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,01% de pato ([extractos]= 10 ng/μL); CN – Controlo negativo. 58
- Figura 30: Electroforese em gel de agarose da reactividade dos *primers* Duk-F/Duk-R com todas as espécies. M – Marcador de ADN 100 pb; Linha 1 – Javali; Linha 2 – Pato; Linha 3 – Perdiz; Linha 4 – Lebre; Linha 5 – Codorniz; Linha 6 – Coelho; Linha 7 – Faisão; Linha 8 – Veado; Linha 9 – Coelho selvagem; Linha 10 – Vaca; Linha 11 – Galinha; Linha 12 – Peru; Linha 13 – Porco ([extractos]= 10 ng/μL); CN – Controlo negativo. 59
- Figura 31: Electroforese em gel de agarose da especificidade dos *primers* Duk-F/Duk-R nas especiarias e pão. M – Marcador de ADN 100 pb; Linha 1 – Cebola; Linha 2 – Alho; Linha 3 – Salsa; Linha 4 – Pimenta Branca; Linha 5 – Louro; Linha 6 – Pimentão-doce; Linha 7 – Piri-piri; Linha 8 – Soja; Linha 9 – Milho; Linha 10 – Pão de trigo; Linha 11 – Pão de centeio ([extractos]= 50 ng/μL); Linha 12 – 1% Pato ([extractos]= 10 ng/μL); CN – Controlo negativo. 59
- Figura 32: Electroforese em gel de agarose das amostras comerciais de alheiras de caça amplificadas por PCR usando os *primers* Duk-F/Duk-R específicos para o pato. M – Marcador de ADN 100 pb; Linhas 1 a 18 – amostras AL1 a AL18 ([extractos]= 50 ng/μL); Cp₁ – 1% pato; Cp₂ – 0,1% pato ([extractos]= 10 ng/μL); CN – Controlo negativo. 60
- Figura 33: Electroforese em gel de agarose dos padrões de coelho em porco amplificadas por PCR usando os *primers* 12SpRab-F/12SpRab-R específicos para o coelho. M – Marcador de ADN 100 pb; Linhas 1 a 9 – 0%, 20%, 10%, 5%, 2,5%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,01% de coelho ([extractos]= 20 ng/μL); CN – Controlo negativo. 61
- Figura 34: Electroforese em gel de agarose da especificidade dos *primers* 12SpRab-F/12SpRab-R nas especiarias e pão. M – Marcador de ADN 100 pb; Linha 1 – Cebola; Linha 2 – Alho; Linha 3 – Salsa; Linha 4 – Pimenta branca; Linha 5 – Louro; Linha 6 – Pimentão-doce; Linha 7 – Piri-piri; Linha 8 – Soja; Linha 9 – Milho; Linha 10 – Pão de trigo; Linha 11 – Pão de centeio ([extractos]= 50 ng/μL); Linha 12 – 1% Coelho ([extractos]= 20 ng/μL); CN – Controlo negativo. 62
- Figura 35: Electroforese em gel de agarose das amostras comerciais de alheiras de caça amplificadas por PCR usando os *primers* 12SpRab-F/12SpRab-R específicos para o coelho. M – Marcador de ADN 100 pb; Linhas 1 a 18 – amostras AL1 a AL18 ([extractos]= 50 ng/μL); Cp₁ – 1% coelho; Cp₂ – 0,1% coelho ([extractos]= 20 ng/μL); CN – Controlo negativo. 62
- Figura 36: Electroforese em gel de agarose dos padrões de veado em porco amplificadas por PCR usando os *primers* 12SCEQ-F/12SCEQ-R específicos para o veado. M – Marcador de ADN 100 pb; Linhas 1 a 9 – 0%, 20%, 10%, 5%, 2,5%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,01% de veado ([extractos]= 20 ng/μL); CN – Controlo negativo. 63
- Figura 37: Electroforese em gel de agarose da especificidade dos *primers* 12SCEQ-F/12SCEQ-R nas especiarias e pão. M – Marcador de ADN 100 pb; Linha 1 – Cebola; Linha 2 – Alho; Linha 3 – Salsa; Linha 4 – Pimenta Branca; Linha 5 – Louro; Linha 6 – Pimentão-doce; Linha 7 – Piri-piri; Linha 8 – Soja; Linha 9 – Milho; Linha 10 – Pão de trigo; Linha 11 – Pão de centeio ([extractos]= 50 ng/μL); Linha 12 – 1% Veado ([extractos]= 20 ng/μL); CN – Controlo negativo. 64
- Figura 38: Electroforese em gel de agarose das amostras comerciais de alheiras de caça amplificadas por PCR usando os *primers* 12SCEQ-F/12SCEQ-R específicos para o veado. M – Marcador de ADN 100 pb; Linhas 1 a 18 – amostras AL1 a AL18 ([extractos]= 50 ng/μL); Cp₁ – 1% veado; Cp₂ – 0,1% veado ([extractos]= 20 ng/μL); CN – Controlo negativo..... 64
- Figura 39: Electroforese em gel de agarose dos padrões de vaca em porco amplificadas por PCR usando os *primers* Bos-F/Bos-R específicos para a vaca. M – Marcador de ADN 100 pb; Linhas 1 a 10 – 0%, 100%, 20%, 10%, 5%, 2,5%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,01% de vaca ([extractos]= 10 ng/μL); CN – Controlo negativo. 65

Figura 40: Electroforese em gel de agarose da reactividade dos <i>primers</i> Bos-F/Bos-R com todas as espécies. M – Marcador de ADN 100 pb; Linha 1 – Javali; Linha 2 – Pato; Linha 3 – Perdiz; Linha 4 – Lebre; Linha 5 – Codorniz; Linha 6 – Coelho; Linha 7 – Faisão; Linha 8 – Veado; Linha 9 – Coelho selvagem; Linha 10 – Vaca; Linha 11 – Galinha; Linha 12 – Peru; Linha 13 – Porco ([extractos]= 10 ng/μL); CN – Controlo negativo.....	66
Figura 41: Electroforese em gel de agarose da especificidade dos <i>primers</i> Bos-F/Bos-R nas especiarias e pão. M – Marcador de ADN 100 pb; Linha 1 – Cebola; Linha 2 – Alho; Linha 3 – Salsa; Linha 4 – Pimenta Branca; Linha 5 – Louro; Linha 6 – Pimentão-doce; Linha 7 – Piri-piri; Linha 8 – Soja; Linha 9 – Milho; Linha 10 – Pão de trigo; Linha 11 – Pão de centeio ([extractos]= 50 ng/μL); Linha 12 – 1% Vaca ([extractos]= 10 ng/μL); CN – Controlo negativo.	66
Figura 42: Electroforese em gel de agarose das amostras comerciais de alheiras de caça com tripa amplificadas por PCR usando os <i>primers</i> Bos-F/Bos-R específicos para a vaca. M – Marcador de ADN 100 pb; Linhas 1 a 18 – amostras AL1 a AL18 ([extractos]= 50 ng/μL); Cp ₁ – 1% vaca; Cp ₂ – 0,1% vaca ([extractos]= 10 ng/μL); CN – Controlo negativo.	67
Figura 43: Electroforese em gel de agarose das amostras comerciais de alheiras de caça sem tripa amplificadas por PCR usando os <i>primers</i> Bos-F/Bos-R específicos para a vaca. M – Marcador de ADN 100 pb; Linhas 1 a 18 – amostras AL1 a AL18 ([extractos]= 50 ng/μL); Cp ₁ – 1% vaca; Cp ₂ – 0,1% vaca ([extractos]= 10 ng/μL); CN – Controlo negativo.	67
Figura 44: Electroforese em gel de agarose dos padrões de lebre em porco amplificadas por PCR usando os <i>primers</i> Lep-F/Lep-R específicos para a lebre. M – Marcador de ADN 100 pb; Linhas 1 a 9 – 0%, 20%, 10%, 5%, 2,5%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,01% de lebre ([extractos]= 20 ng/μL); CN – Controlo negativo.	68
Figura 45: Electroforese em gel de agarose da reactividade dos <i>primers</i> Lep-F/Lep-R com todas as espécies. M – Marcador de ADN 100 pb; Linha 1 – Javali; Linha 2 – Pato; Linha 3 – Perdiz; Linha 4 – Lebre; Linha 5 – Codorniz; Linha 6 – Coelho; Linha 7 – Faisão; Linha 8 – Veado; Linha 9 – Coelho selvagem; Linha 10 – Vaca; Linha 11 – Galinha; Linha 12 – Peru; Linha 13 – Porco ([extractos]= 10 ng/μL); CN – Controlo negativo.....	69
Figura 46: Electroforese em gel de agarose da especificidade dos <i>primers</i> Lep-F/Lep-R nas especiarias e pão. M – Marcador de ADN 100 pb; Linha 1 – Cebola; Linha 2 – Alho; Linha 3 – Salsa; Linha 4 – Pimenta Branca; Linha 5 – Louro; Linha 6 – Pimentão-doce; Linha 7 – Piri-piri; Linha 8 – Soja; Linha 9 – Milho; Linha 10 – Pão de trigo; Linha 11 – Pão de centeio ([extractos]= 50 ng/μL); Linha 12 – 1% Lebre ([extractos]= 20 ng/μL); CN – Controlo negativo. ...	69
Figura 47: Alinhamento da sequência mitocondrial do gene <i>cytb</i> (AJ534882) com o fragmento obtido usando os <i>primers</i> Lep-R/Lep-F. Em itálico está representado o fragmento sequenciado. As letras a cinza representam as bases não alinhadas. A sublinhado estão representadas as regiões de hibridação dos <i>primers</i>	70
Figura 48: Electroforese em gel de agarose das amostras comerciais de alheiras de caça amplificadas por PCR usando os <i>primers</i> Lep-F/Lep-R específicos para a lebre. M – Marcador de ADN 100 pb; Linhas 1 a 18 – amostras AL1 a AL18 ([extractos]= 50 ng/μL); Cp ₁ – 1% lebre; Cp ₂ – 0,1% lebre ([extractos]= 20 ng/μL); CN – Controlo negativo.....	71
Figura 49: Curva de amplificação da diluição seriada do extracto de lebre amplificada por PCR em tempo real com EvaGreen [®] , usando os <i>primers</i> Lep-F/Lep-R específicos para a lebre.....	71
Figura 50: Electroforese em gel de agarose da diluição seriada do extracto de lebre amplificada por PCR usando os <i>primers</i> Lep-F/Lep-R específicos para a lebre. M – Marcador de ADN 100 pb; Linhas 1 a 5 – 10 ng, 1 ng, 0,1 ng, 10 pg, 1 pg, respectivamente; C – Controlo negativo.....	72
Figura 51: Curva de calibração da diluição seriada do extracto de lebre amplificada por PCR em tempo real com EvaGreen [®] , usando os <i>primers</i> Lep-F/Lep-R específicos para a lebre.....	72
Figura 52: Curva de <i>melting</i> da diluição seriada do extracto de lebre amplificada por PCR em tempo real com EvaGreen [®] , usando os <i>primers</i> Lep-F/Lep-R específicos para a lebre.....	73

1. Objectivos e âmbito do trabalho

A avaliação da autenticidade de produtos cárneos baseia-se na identificação da substituição de carnes com elevado valor económico por outras de menor valor, e da presença de espécies não declaradas no rótulo. A carne de caça, em particular, é comercializada a preços mais elevados, o que a torna num alvo apetecível para a ocorrência de fraudes. Actualmente, para além da Alheira tradicional, produzida à base de carne de porco e aves, encontram-se também disponíveis comercialmente as Alheiras de caça, as quais incluem uma diversidade de espécies de carne de caça.

Esta dissertação teve como objectivo o desenvolvimento de técnicas de biologia molecular que permitam a identificação de diferentes espécies de carne e, a aplicação das mesmas para a avaliação da autenticidade de amostras comerciais de alheiras de caça. A Reacção em Cadeia da Polimerase (PCR) tem-se mostrado uma alternativa específica, rápida, sensível e adequada para a identificação de espécies em produtos alimentares, sendo por isso escolhida para este trabalho.

Para tal, foram preparadas misturas padrão contendo quantidades conhecidas de cada espécie em estudo (secção 3.1): galinha, peru, faisão, codorniz, perdiz, pato, coelho, veado, vaca e lebre. Para a detecção específica de cada espécie foram seleccionadas sequências alvo de genes mitocondriais (*cytb* e rARN 12S) (secção 3.4.1). Com os genes escolhidos, pretendeu-se o desenvolvimento de novas metodologias de PCR para a detecção específica de carne de vaca, galinha, peru, pato e lebre, tendo a última recebido especial relevo dada a ausência de estudos publicados para esta espécie. Para as restantes espécies, pretendeu-se otimizar técnicas de PCR reportadas por outros grupos. Além da PCR convencional, foi também objectivo a detecção específica de lebre por PCR em tempo real (secção 4.2.11).

O âmbito desta dissertação baseou-se na avaliação da autenticidade de alheiras de caça, de forma a averiguar o rigor da rotulagem em relação ao conteúdo no produto. É importante garantir ao consumidor que as espécies de elevado valor comercial declaradas na rotulagem não sejam substituídas por outras de menor valor, como no caso particular das alheiras de caça, que são propensas a adulterações. Este trabalho não visou apenas a detecção de possíveis adulterações em alheiras de caça, pretendeu-se ainda valorizar os produtores que apresentem produtos em conformidade com a rotulagem e sensibilizar todos os produtores relativamente a boas práticas de fabrico e lealdade comercial.

2. Abordagem teórica

2.1. História da alheira

A origem da alheira remonta ao século XV, durante o reinado de D. Manuel I, em que a Inquisição perseguia os Judeus com intenções religiosas, políticas e de apreensão de bens. De forma a fugirem à Inquisição, as comunidades judias, mais fortes a nível económico, evadiram-se para o estrangeiro, enquanto as outras menos abastadas refugiaram-se no nordeste transmontano onde pensavam ser uma zona de difícil acesso para serem descobertos pelos agentes da Inquisição (Caderno de Especificações da Alheira de Mirandela; Martins & Fernandes, 1990).

Como a religião Hebraica proibia o consumo de carne de porco, esta foi substituída por aves de capoeira (galinha e peru), carne de vaca e carnes de caça (perdiz, veado, coelho, entre outras). Uma das estratégias utilizadas para enganarem a Inquisição foi criar um enchido que aparentava ser feito de carne de porco, mas que na verdade continha outras espécies. Este novo enchido também continha na sua constituição pão transmontano, alho, azeite e especiarias. A mistura era colocada em tripas de vaca e exposta ao fumo da lareira durante alguns dias (Caderno de Especificações da Alheira de Mirandela; Felício et al., 2011).

A alheira, assim designada pela comunidade judaica, tornou-se conhecida e apreciada pela população cristã que a adoptou, mas com incorporação da carne de porco, que passou a ser um ingrediente obrigatório neste produto (Caderno de Especificações da Alheira de Mirandela).

2.2. A alheira

O fabrico de produtos à base de carne representa uma das tradições mais vincadas na região transmontana, onde é produzida uma diversidade de enchidos tradicionais com características peculiares e elevado valor cultural. Dentro desta diversidade de produtos, a alheira é um dos enchidos mais apreciados e difundido por todo o país, devido às suas características únicas que advêm dos seus ingredientes (Caderno de Especificações da Alheira de Mirandela; Esteves et al., 2006; Patarata et al., 2008).

A alheira é um enchido curado pelo fumo, constituído por carne de vaca, porco, aves de capoeira ou carne de caça, pão de trigo e gordura de porco e condimentada com sal, alho e azeite. A utilização de cebola, salsa, pimenta e hortelã é facultativa (Caderno de Especificações da Alheira de Mirandela). O processo de fabrico da alheira encontra-se esquematizado na figura 1.

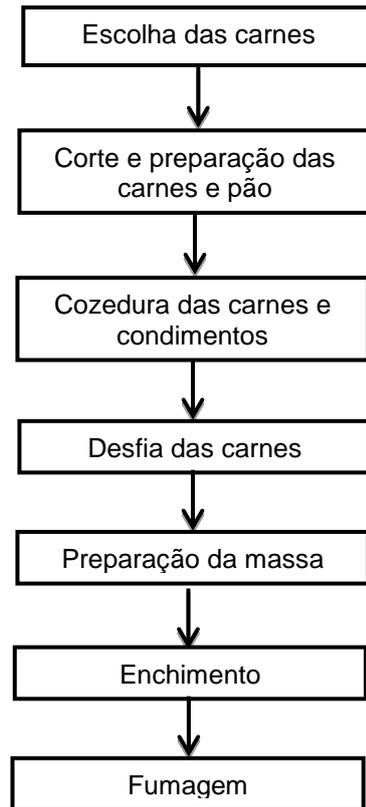


Figura 1: Esquema do modo de produção da alheira (Adaptado de Caderno de Especificações da Alheira de Mirandela)

A escolha das carnes para a produção da alheira varia de produtor para produtor, uma vez que cada um tem o seu modo de produção, transmitido ao longo das gerações, tendo sempre em conta as práticas tradicionais de fabrico e as características finais do produto. Numa panela específica, cozem-se as carnes cortadas em pedaços de dimensão média de forma a facilitar a eficácia da cozedura, juntamente com os restantes ingredientes. Após a cozedura desfiam-se as carnes (Caderno de Especificações da Alheira de Mirandela).

A preparação da massa inclui três fases: (1) o amolecimento do pão na calda de cozedura das carnes e (2) a mistura dos ingredientes. O pão regional de trigo utilizado deve ser produzido com pouco fermento, estar bem cozido e ligeiramente endurecido. O pão cortado em fatias finas é embebido na calda quente da cozedura das carnes, o que permite a absorção do aroma das diferentes carnes. Deixa-se amolecer o pão e homogeneiza-se a massa. Posteriormente, adicionam-se os restantes condimentos, a gordura aquecida, banha e/ou azeite e mistura-se. Por fim, adicionam-se as carnes já desfiadas, mistura-se de forma a obter uma massa homogénea e rectifica-se o tempero (Caderno de Especificações da Alheira de Mirandela).

A tripa, que pode ser de porco ou de vaca (fresca, salgada ou desidratada) deve ser previamente lavada em água com limão, louro e por vezes com aguardente. O enchimento

pode ser manual ou mecânico e deve ser cuidadoso de modo a não danificar a tripa. As extremidades da tripa são fechadas com um fio de algodão e o enchido adquire a forma de ferradura com cerca de 25 cm. Posteriormente lava-se a alheira com água quente, de forma a retirar possíveis resíduos de massa ou outras impurezas (Caderno de Especificações da Alheira de Mirandela).

As alheiras são finalmente suspensas numa vara que vai ao fumeiro em fogo brando numa sala ou câmara de fumo durante aproximadamente oito dias. A lenha utilizada pode ser de oliveira e/ou de quercíneas. No final, as alheiras são arrefecidas numa sala/câmara termostática (10°C, 90% humidade) e armazenadas noutra sala/câmara a 5°C (Caderno de Especificações da Alheira de Mirandela; Esteves et al., 2006).

No mercado nacional, para além das alheiras tradicionais está disponível uma grande variedade, nomeadamente alheiras de bacalhau, vegetarianas, presunto com ananás, noz com mel, avestruz e de caça.

2.2.1. Importância económica

Para o consumidor, a alheira constitui um produto atractivo, não só pelo custo reduzido, mas também por representar uma alternativa gastronómica de fácil e rápida confecção, sendo um produto disponível no mercado ao longo de todo o ano.

A produção de alheira desempenha um papel importante a nível económico por vários motivos. Em primeiro lugar, permite o aproveitamento e rendimento das culturas e a sustentabilidade dos meios rurais de modo a que não se perca a tradição do consumo deste enchido. Em segundo, porque, como se trata de um produto regional que detém um valor atractivo turístico, é um bom promotor da região associada ao seu fabrico. A nível industrial, permite o aproveitamento de carnes com menor valor (carcaças de suínos, carnes de aves e coelho) e de peças de difícil aproveitamento (carne da cabeça e entremeada) (Caderno de Especificações da Alheira de Mirandela; EcoGuia, 2011).

Em Portugal, a produção da alheira de Mirandela até ao ano de 2002 foi praticamente exponencial, atingindo o pico de 190 toneladas/ano. No entanto, entre os anos 2002 e 2004 verificou-se uma quebra na produção (100 toneladas) e até 2007 a produção tem-se mantido constante (figura 2) (Ministério da Agricultura). Deve-se realçar, contudo, que os dados apresentados são relativos à produção de alheiras, apenas de Mirandela, até ao ano de 2007. Segundo as Estatísticas Agrícolas de 2010, entre os anos 2008 e 2009 foram produzidas em Portugal cerca de 60 000 toneladas de enchidos.

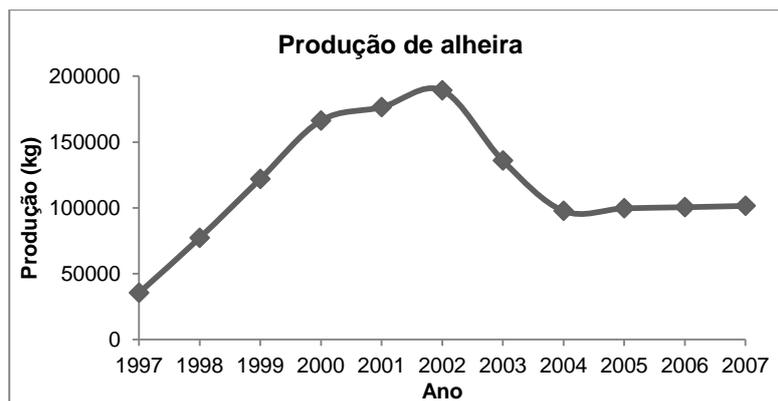


Figura 2: Produção de alheira de Mirandela em Portugal (Adaptado de Ministério da Agricultura)

2.2.2. Qualidade microbiológica

Um alimento pode tornar-se pouco seguro quando não são cumpridos os requisitos de higiene, limpeza e desinfecção durante todo o processo produtivo bem como a utilização de matérias-primas e/ou ingredientes contaminados. Se estes requisitos não forem verificados, o alimento pode constituir um veículo de transmissão de doenças (Segurança Alimentar, 2011).

Durante o processo de produção da alheira é importante garantir uma cozedura eficiente das carnes, já que esta etapa poderá reduzir a carga microbiana. Desta forma, devem também ser controlados outros factores como o pH e a actividade da água, de forma a controlar a contaminação microbiana durante a produção de alheiras (Segurança Alimentar, 2011).

A sensibilidade do consumidor em relação à qualidade microbiológica dos enchidos aumentou nos últimos anos. Vários estudos efectuados sobre produtos à base de carne têm demonstrado que a qualidade microbiológica da alheira é qualitativamente deficiente (Esteves, 2005; Esteves et al., 2006; Ferreira et al., 2006; Ferreira et al., 2007). Os autores citados concluíram que a presença de aeróbios mesófilos, coliformes e *Escherichia coli* pode ser indicativo da baixa qualidade higiénica da matéria-prima, manipulação incorrecta ou armazenamento em condições impróprias. Também detectaram a presença de *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* indicadores de uma higiene deficiente, contaminações cruzadas ou cozedura ineficaz.

2.3. Autenticidade de produtos cárneos

O consumidor está cada vez mais preocupado com questões de segurança alimentar e autenticidade dos produtos alimentares. De uma forma geral, o consumidor espera

encontrar no mercado um produto saudável, fresco, saboroso, suculência e propriedades de textura adequadas. O controlo alimentar é fundamental tanto para a protecção dos consumidores como para a indústria alimentar, que procura a confiança do consumidor (Aida et al., 2005; Anklam & Battaglia, 2001; Hoffman & Wiklund, 2006). O conceito de rastreabilidade, definido como a capacidade de seguir e acompanhar determinado produto alimentar em todo o processo de produção, transformação e distribuição, assume-se como um elemento importante na garantia da qualidade e segurança alimentar (Pascal & Mahé, 2001; Shackell, 2008). No entanto, o processo de fabrico nem sempre está de acordo com as boas práticas de fabrico e, muitas vezes, a rastreabilidade dos ingredientes é insuficiente (Köppel et al., 2009; Montowska & Pospiech, 2011).

A carne tem um papel importante na alimentação diária humana, uma vez que se trata de uma excelente fonte de proteínas. Como tal, a qualidade deste produto é alvo de preocupação por parte do consumidor. Neste contexto, a disponibilidade de informação acerca dos produtos alimentares, veiculada pelo rótulo, é muito importante (Lago et al., 2011; Rojas et al., 2009b).

Com efeito, a rotulagem é fundamental para garantir ao consumidor a identidade e a qualidade do produto alimentar. Deve portanto, ser verdadeira e precisa, sobretudo quando se trata de alimentos processados, em que não é possível distinguir os vários ingredientes, sendo extremamente difícil diferenciar as espécies que estão presentes no alimento (Martín et al., 2007; Martín et al., 2009; Woolfe & Primrose, 2004). A escolha de um produto alimentar por parte do consumidor pode reflectir aspectos do seu estilo de vida. Assim, por razões éticas (por exemplo, o vegetarianismo), religiosas (judeus e muçulmanos não podem consumir carne de porco) ou por problemas de saúde (intolerâncias ou alergias), os consumidores deverão ser alertados para o conteúdo do produto que adquirem (Ballin, 2010; Lago et al., 2011; Mafra et al., 2008b; Rastogi et al., 2007; Woolfe & Primrose, 2004).

Na maioria dos países desenvolvidos, a carne é considerada um produto de qualidade superior, quer ao nível da composição nutricional, quer ao nível das suas características organolépticas (Soares et al., 2010). Em particular, a carne de caça tem sido cada vez mais apreciada por parte do consumidor, pela sua textura e sabor exóticos, baixo teor em gordura e colesterol, bem como pela ausência de esteróides anabolizantes ou outras drogas (Bottero & Dalmaso, 2010; Fajardo et al., 2010; La Neve et al., 2008; Rojas et al., 2009a; Stamoulis et al., 2010). De facto, o consumo de carne de caça na União Europeia está a aumentar e, conseqüentemente, a adulteração de produtos à base de carne de caça está a tornar-se uma prática corrente, devido ao lucro proveniente da substituição destas carnes por outras mais rentáveis (Fajardo et al., 2007b; Fajardo et al., 2010; Mayer & Hochegger, 2011; Rojas et al., 2008). Além da diferença de preço das diferentes espécies, a sazonalidade constitui

um outro factor importante para a adulteração dos produtos cárneos, por parte dos produtores (Köppel et al., 2009; Montowska & Pospiech, 2011).

Segundo o Regulamento do Conselho Europeu (CE) nº 178/2002, de 28 de Janeiro de 2002, que determina os princípios e normas gerais da legislação alimentar, a adulteração de alimentos é ilegal e exige a identificação da fonte de todas as matérias-primas ao longo de todas as fases de produção, transformação e distribuição (Montowska & Pospiech, 2011; Murugaiah et al., 2009). Infelizmente, os regulamentos não são suficientes para evitar a fraude alimentar. É importante garantir, desta forma, que as espécies de elevado valor comercial declaradas não sejam substituídas, parcial ou totalmente, por outras espécies de menor valor (Ballin, 2010; Mafra et al., 2008b).



Figura 3: Questões de autenticidade relacionadas com carne e produtos à base de carne (Adaptado de Montowska & Pospiech, 2011)

Relativamente às questões da autenticidade de carne e produtos à base de carne devem ser consideradas várias categorias (Figura 3): (1) a substituição de ingredientes num alimento, normalmente por uma espécie de menor valor económico; (2) utilização de constituintes de origem animal não declarados no rótulo como por exemplo, vísceras ou plasma sanguíneo; (3) especificação e proporção de ingredientes incompatíveis com o rótulo do produto; (4) rotulagem inadequada relativamente à origem geográfica do produto, e, por fim, (5) substituição de carne de caça por carne de animais domésticos (Montowska & Pospiech, 2011; Woolfe & Primrose, 2004).

2.4. Metodologias de avaliação da autenticidade de produtos cárneos

A legislação da União Europeia tem vindo a impor a rotulagem e rastreabilidade, quer ao nível da alimentação humana, quer da alimentação animal (Directiva 2001/101/CE).

Desta forma, têm sido desenvolvidos vários trabalhos, por forma a permitir avaliar a autenticidade dos produtos alimentares (Aida et al., 2005; Fajardo et al., 2010). Para tal, têm sido propostas técnicas de análise fiáveis e sensíveis para a identificação de espécies animais presentes nos alimentos (Fajardo et al., 2007a; Kesmen et al., 2009; Martín et al., 2009). Os métodos analíticos propostos baseiam-se, essencialmente, na análise de proteínas e de ADN (Mafrá et al., 2008b).

2.4.1. Métodos baseados na análise de proteínas

Várias metodologias têm sido desenvolvidas para a identificação da origem dos tecidos animais utilizados em produtos cárneos, nomeadamente métodos electroforéticos, cromatográficos e enzimáticos, tendo como base a detecção de proteínas específicas (Asensio et al., 2008; Macedo-Silva et al., 2000; Montowska & Pospiech, 2007; Skarpeid et al., 1998).

No que diz respeito às **técnicas electroforéticas**, estas podem ser aplicadas na identificação de espécies de carne, uma vez que os tecidos são constituídos essencialmente por proteínas. Na electroforese ocorre a separação de moléculas através da migração de partículas sujeitas à aplicação de um campo eléctrico, tendo em conta que a carga destas depende do pH do meio. Assim, é possível obter separações de elevada resolução das misturas de proteínas. Algumas das técnicas utilizadas baseiam-se na focagem isoeléctrica (IEF), electroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) e electroforese bidimensional (2-DE) (Montowska & Pospiech, 2011; Skarpeid et al., 1998).

Relativamente às **técnicas cromatográficas**, foram desenvolvidas com o objectivo de separar moléculas com características químicas similares, de uma forma rápida e eficiente. Estas técnicas baseiam-se na separação das substâncias de uma mistura em componentes individuais, que dependem das propriedades de cada constituinte ou proteína. Posteriormente, procede-se à sua quantificação e, desta forma, é possível identificar quase todo o tipo de moléculas presentes num alimento. Consoante o tipo de eluente utilizado, pode considerar-se para este tipo de técnicas, a cromatografia gasosa (GC) e a cromatografia líquida (LC) (Montowska & Pospiech, 2011; Reid et al., 2006). No caso da cromatografia líquida, em particular HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência), é possível detectar proteínas e aminoácidos. Por outro lado, a análise por cromatografia gasosa é mais adequada para moléculas voláteis ou semi-voláteis (Reid et al., 2006).

Os **métodos enzimáticos** são largamente utilizados na identificação de produtos à base de carne, dependendo do teor em gordura, grau de processamento e nível de maturação. Trata-se de técnicas imunológicas que incluem uma enzima, de forma a detectar a presença de um anticorpo ou antigénio numa amostra. Os ensaios ELISA e tiras de fluxo

lateral são os mais utilizados em análises de alimentos. O método ELISA pode ser directo ou *sandwich* e o princípio desta técnica baseia-se na imobilização de um antigénio ou anticorpo numa superfície sólida (Asensio et al., 2008; Montowska & Pospiech, 2011). No que diz respeito às tiras de fluxo lateral, baseiam-se na utilização de dois anticorpos imobilizados, específicos para a proteína alvo, que são agrupados por um reagente corado numa tira de nitrocelulose (Mafra & Oliveira, 2005).

Os métodos baseados em proteínas podem ser qualitativos ou quantitativos, salientando-se o seu baixo custo, rapidez e fiabilidade dos resultados. De realçar que se trata de técnicas robustas, de elevada especificidade e sensibilidade (Asensio et al., 2008; Macedo-Silva et al., 2000; Montowska & Pospiech, 2011; Reid et al., 2006). Contudo, estes métodos implicam que as proteínas específicas sejam previamente identificadas para a espécie em questão e que a sua estrutura seja o mais próximo possível do estado natural. Desta forma, quando o produto é submetido a processamento térmico, as proteínas são irreversivelmente desnaturadas (alteração dos epítomos) e já não podem ser analisadas por técnicas optimizadas para o seu estado nativo (Nau et al., 2009; Soares et al., 2010).

Outras limitações prendem-se com a possibilidade de ocorrerem reacções cruzadas com proteínas de espécies estreitamente relacionadas e com o facto de, não ser possível detectar diferenças na composição dos aminoácidos entre proteínas. Além do mais, as proteínas não são homogéneas nos diferentes tipos de tecidos (Di Pinto et al., 2005; Pfeiffer et al., 2004; Rastogi et al., 2007).

Os métodos electroforéticos e cromatográficos não são convenientes para análises de rotina, pois são métodos relativamente dispendiosos, morosos e complexos de executar (Fajardo et al., 2007b). Por outro lado, os métodos imunológicos são apropriados para ensaios de campo, uma vez que são económicos, simples de executar e não requerem equipamento complexo (Mafra & Oliveira, 2005).

2.4.2. Métodos baseados em ácidos nucleicos

Actualmente, para além das metodologias baseadas em proteínas, as técnicas biomoleculares têm sido amplamente estudadas, devido ao seu elevado grau de especificidade. O conteúdo de informação presente no ADN é maior do que nas proteínas, devido à degeneração do código genético (vários codões codificam o mesmo aminoácido) (Broadmann et al., 2001; Dalmaso et al., 2004). Como o ADN é uma molécula relativamente estável face às proteínas, a análise de ácidos nucleicos é menos susceptível de ser perturbada pelo tratamento térmico a que os géneros alimentícios são sujeitos. Por outro lado, a molécula de ADN é ubíqua, podendo ser extraída em qualquer tipo de tecido (Aida et al., 2005; Lockley & Bardsley, 2000; Martín et al., 2007).

Os ácidos nucleicos presentes nos alimentos, apesar de não terem qualquer valor nutricional, são característicos de cada produto alimentar. A partir da análise específica dos ácidos nucleicos, é possível determinar a presença/ausência de um componente ou identificar as suas características específicas num alimento (The World of Food Science, 2011). A integridade do ADN deve ser mantida em todo o processo de produção e armazenamento, de forma a permitir a detecção de fragmentos específicos, característicos de cada espécie (Meyer & Candrian, 1996).

Desta forma, uma variedade de métodos baseados no ADN estão disponíveis para serem utilizados na autenticação de alimentos. O princípio destes métodos consiste na amplificação altamente específica de um ou mais fragmentos de ADN através da PCR, utilizando oligonucleótidos iniciadores (*primers*) específicos. Contudo, o sucesso destes métodos depende de um protocolo de extracção eficiente, que deverá fornecer ADN em elevada quantidade e qualidade (Lockley & Bardsley, 2000; Mafra et al., 2008a; Mafra et al., 2008b; Martín et al., 2009).

2.4.2.1. Extracção do ADN

O sucesso da PCR depende da concentração, pureza e da integridade das moléculas de ADN. Para isso, é necessário proceder à extracção do ADN das amostras, recorrendo a um método efectivo (Pascal & Mahé, 2001; Somma, 2006). Contudo, a integridade do ADN por ser afectada por diversos factores, quer durante o processamento do alimento, quer durante o isolamento do ADN. Tais factores podem ser temperaturas elevadas, variações de pH e a existência de nucleases que podem degradar o ADN. A natureza da matriz pode afectar a extracção dos ácidos nucleicos e o sucesso da PCR. A presença de polissacarídeos ou polifenóis, contaminantes provenientes da extracção, como SDS, etanol ou isopropanol nos extractos, podem inibir a acção da ADN polimerase (Mafra & Oliveira, 2005).

Para se extraírem os ácidos nucleicos de uma matriz alimentar é necessário provocar a lise das células, inactivar as nucleases celulares e separar os ácidos nucleicos de todas as outras células. O processo de lise celular pode ser provocado por ruptura mecânica, tratamento químico ou por digestão enzimática. Depois de efectuada a inactivação das nucleases através de sais, removem-se as restantes células por centrifugação ou precipitação (Somma, 2006).

Uma vez que existe uma diversidade de métodos de extracção e purificação de ADN, para a escolha da técnica mais apropriada deve-se ter em conta o ADN alvo, a matriz, quais os resultados desejados e qual a aplicação futura (Somma, 2006). Têm sido utilizados vários

métodos de extracção de ADN de produtos cárneos (tabela 1), destacando-se os *kits* comerciais e o método clássico baseado no reagente CTAB (brometo de cetiltrimetilamónio).

Tabela 1: Diferentes métodos de extracção utilizados para o isolamento de ADN de produtos cárneos

Método de extracção	Referências
<i>Wizard[®] DNA Clean-up System</i> (Promega)	Broadman et al. (2001); Fajardo et al. (2006); Martín et al. (2007); Rojas et al. (2008)
<i>Wizard[®] Plus Minipreps DNA Purification System</i> (Promega)	Köppel et al. (2009)
<i>Wizard[®] Magnetic DNA Purification for Food</i> (Promega)	Lanzilao et al. (2005)
<i>Tissue mini kit</i> (Qiagen)	Ghovvati et al. (2009); Di Pinto et al. (2005)
<i>DNeasy[®] Tissue kit</i> (Qiagen)	Aida et al. (2005); Dalmaso et al. (2004); La Neve et al. (2008); Murugaiah et al. (2009)
Método baseado no uso de CTAB (modificado)	Mayer & Hohegger (2011)
Método baseado no uso de colunas e resina do kit <i>Wizard[®] Plus Minipreps DNA Purification System</i> (Promega)	Soares et al. (2010)
<i>QIAamp DNA Micro Kit</i> (Qiagen)	Tobe & Linacre (2008)

A concentração e pureza dos ácidos nucleicos extraídos podem ser avaliadas por espectrofotometria UV, a diversos comprimentos de onda (230 nm, 260 nm, 280 nm e 320 nm). Desta forma, a concentração dos ácidos nucleicos pode ser determinada através do valor da absorvância lida a 260 nm, tendo como base a Lei de Lambert-Beer:

$$A = \varepsilon \times l \times C$$

em que, *A* corresponde à absorvância, ε à constante de absorvidade, *l* ao comprimento da cuvete e *C* à concentração. A utilização de cuvetes com 1 cm de percurso óptico e a absorvância lida a 260 nm igual a 1 pressupõe que a concentração de ADN de cadeia dupla seja de aproximadamente 50 µg/mL (Somma, 2006).

A interferência de contaminantes tais como proteínas, fenóis ou outras substâncias devem ser tidos em consideração. De facto como as proteínas absorvem preferencialmente a 280 nm, a partir do quociente A_{260}/A_{280} é possível calcular a pureza dos ácidos nucleicos. Para que uma amostra seja considerada pura, esta razão deve ser de aproximadamente 1,8 (Somma, 2006). A leitura a 230 nm e através do quociente A_{260}/A_{230} permite também avaliar a pureza dos extractos, tendo em conta contaminações com hidratos de carbono, péptidos ou compostos aromáticos, cuja razão deverá ser aproximadamente 2,0. A leitura da

absorvância a 320 nm pode indicar a presença de interferentes ou material estranho na solução ou na própria cuvete (Somma, 2006).

Por outro lado, é possível avaliar a qualidade do ADN extraído através de electroforese em gel de agarose de baixa concentração, através da observação do tamanho e forma das bandas obtidas (Somma, 2006).

2.4.2.2. A técnica da PCR convencional

A criação da reacção em cadeia da polimerase por Kary Mullis, em 1985, trouxe uma revolução para a biologia molecular. Com o desenvolvimento desta técnica verificou-se uma melhoria acentuada nos procedimentos de diagnóstico, pois é possível obter um elevado número de cópias de ADN, *in vitro* (Pereira et al., 2008; Somma & Querci, 2006b).

A base deste método consiste na amplificação exponencial de sequências de ADN. Durante o processo são usadas temperaturas elevadas, de forma a separar a cadeia dupla do ADN, em duas cadeias simples. Desta forma, a PCR consiste em três etapas funcionais (figura 4): (1) desnaturação do ADN, utilizando uma temperatura elevada; (2) hibridação dos *primers* nas cadeias simples de ADN e (3) extensão da cadeia de ADN, a partir dos *primers* e da utilização de uma ADN polimerase, na presença de iões magnésio (Mg^{2+}) (Mafra et al., 2008b; Pascal & Mahé, 2001; Somma & Querci, 2006b).

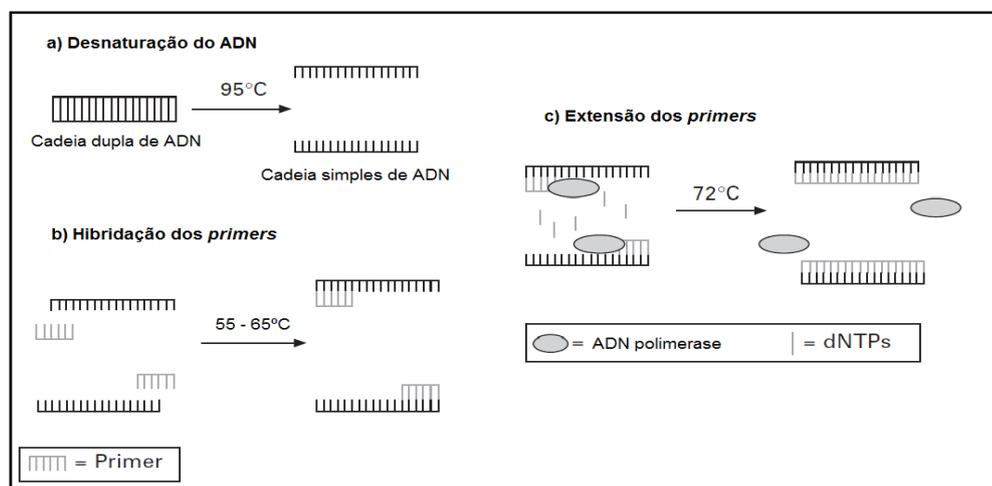


Figura 4: Representação das três etapas de amplificação por PCR (Adaptado de Holzhauser et al., 2006)

Na primeira etapa, **desnaturação do ADN**, ocorre a separação das cadeias duplas de ADN através do aumento de temperatura, que ronda os 95°C. Desta forma, quebram-se as ligações por pontes de hidrogénio, aumentando o número de bases desemparelhadas. A reacção termina quando todas as cadeias duplas se transformarem em cadeias simples.

Na segunda etapa, **hibridação dos primers**, diminui-se a temperatura da mistura reaccional, geralmente entre os 55 e 65°C, para que os *primers* se liguem às sequências dos pares de bases complementares, através de ligações por pontes de hidrogénio.

Na terceira e última etapa, **extensão dos primers**, estes são prolongados ao longo da cadeia molde por acção de uma ADN polimerase termoestável, juntamente com as bases nucleotídicas (dNTP), resultando, na síntese de uma nova molécula de ADN de cadeia dupla. A temperatura ideal para a actuação desta enzima é de aproximadamente 72°C e o tempo de actuação depende do tamanho do fragmento a amplificar (Somma & Querci, 2006b).

Este ciclo de três temperaturas é, geralmente, repetido 25 a 40 vezes, dependendo da quantidade de ADN inicial (Mafra & Oliveira, 2005).

Para que a amplificação tenha sucesso, é essencial cumprir as etapas de desnaturação, hibridação e extensão dos *primers* e utilizar componentes fundamentais para que a PCR ocorra. Como componentes fundamentais destacam-se:

- **ADN alvo:** tem que existir, pelo menos, uma cópia intacta da sequência alvo, sendo que quanto maior o número de cópias do gene alvo, maior a probabilidade de sucesso da amplificação. O extracto deve estar o mais puro possível, de forma a evitar inibições no processo de amplificação.

- **Primers (forward e reverse):** estes oligonucleótidos iniciadores são obtidos por síntese química e definem o local onde se inicia a replicação do ADN. Geralmente actuam em conjuntos de dois iniciadores diferentes mas que são complementares ao local de reconhecimento no segmento de ADN alvo a ser amplificado.

Convém salientar que para aumentar a hibridação da extremidade que se pretende estender, sempre que seja possível, a extremidade 3' do *primer* deve ter uma grande quantidade de bases Citosina (C) e Guanina (G).

O tamanho do *primer* também influencia a eficiência da hibridação. De facto, quanto maior for o oligonucleótido, menos eficaz é o emparelhamento. No entanto, este também não deve ser muito pequeno.

- **ADN polimerase:** enzima capaz de catalisar a reacção de replicação de ADN, originando uma molécula de ADN de cadeia dupla. A síntese de ADN ocorre sempre na direcção 5'-3', numa sequência de ADN de cadeia dupla. Esta enzima deve ser resistente a elevadas temperaturas, já que os ciclos de PCR decorrem a temperaturas entre os 60 e os 95°C. A enzima mais utilizada em PCR é a *Taq* polimerase. Esta enzima foi purificada a partir da bactéria termofílica, *Thermus aquaticus*, o seu pH óptimo é próximo de 8 e mantém-se activa a 95°C.

- **Tampão da reacção:** a PCR necessita de um tampão adequado, cuja composição depende do tipo e das características da enzima utilizada, daí ser geralmente

comercializado com a ADN polimerase. O tampão regula o pH da reacção, tendo como função cooperar com a enzima, para que esta tenha uma actividade óptima. O tampão de reacção mais utilizado contém 10 mM *Tris* a pH 8,3, 50 mM KCl e 1,5-2,5 mM MgCl₂.

- **Iões magnésio (Mg²⁺):** na PCR é indispensável a presença de catiões divalentes. Estes iões, para além de aumentarem a actividade da ADN polimerase, formam um complexo solúvel com os dNTP, fundamental para a sua incorporação na cadeia sintetizada. Usualmente, uma baixa concentração de iões magnésio conduz a uma baixa produção de fragmentos, porém concentrações elevadas conduzem à formação de produtos não específicos.

- **dNTP:** os desoxirribonucleótidos trifosfato livres são essenciais para que ocorra a síntese das novas cadeias de ADN. A concentração de cada dNTP deve ser equivalente, de forma a minimizar erros de incorporação.

- **Água:** deve ser ultra pura e, acima de tudo, isenta de nucleases de ADN e ARN, ou de outros componentes inibidores da PCR (Broll, 2010; Saiki et al., 1988; Somma & Querci, 2006b).

De forma a verificar os fragmentos de ADN (amplicões) produzidos por PCR recorre-se, geralmente, à visualização através de electroforese em gel de agarose (Broll, 2010). Trata-se de um método sensível, rápido e normalizado, o que permite separar e identificar os fragmentos de ADN por migração das moléculas, sob a acção de um campo eléctrico (Somma & Querci, 2006a). No caso do ADN, a direcção da migração ocorre do eléctrodo negativo para o eléctrodo positivo (Broll, 2010). No entanto, existe sempre o risco de aparecer uma banda com o mesmo tamanho do fragmento alvo, que poderá não corresponder ao fragmento pretendido, tornando-se necessário usar outros métodos para a confirmação dos resultados da PCR.

Alguns métodos utilizados para esta confirmação são a clivagem específica dos produtos de amplificação com endonucleases de restrição (RFLP), a transferência dos produtos de PCR para uma membrana de nitrocelulose ou nylon, seguida de uma hibridação com sondas de ADN específicas para a sequência alvo (*Southern blotting*) ou por sequenciação do fragmento amplificado, para confirmação da ordem dos pares de bases da sequência de ADN (Mafra & Oliveira, 2005).

É igualmente importante, para garantir a fiabilidade dos resultados, utilizar sempre controlos positivos e negativos na PCR. O controlo positivo serve para comprovar a eficácia da extracção e amplificação do ADN e, assim, demonstrar que o resultado contém a sequência alvo desejada. O controlo negativo permite verificar a ocorrência de contaminações, quer durante a extracção e purificação do ADN, quer na preparação da reacção de amplificação (Broll, 2010; Somma & Querci, 2006b).

Em suma, a PCR constitui uma ferramenta simples, rápida, sensível e específica, no que diz respeito à detecção de constituintes de origem animal em alimentos. No entanto, tem como desvantagem a necessidade de dados precisos sobre a espécie-alvo, para que sejam desenhados os *primers* específicos correspondentes (Fajardo et al., 2010).

Adicionalmente, quando se pretendem detectar quantidades baixas mas significativas de uma espécie proveniente de contaminação cruzada deve proceder-se à quantificação da espécie (Lenstra, 2009). Assim, uma grande desvantagem da PCR qualitativa relaciona-se com a falta de informação quantitativa, já que a eficiência de amplificação não se trata de um parâmetro constante. Se isto acontecesse, a cada ciclo, a concentração de ADN após a PCR seria directamente proporcional à concentração de ADN alvo. De forma a solucionar este tipo de problemas, surgiram métodos de PCR quantitativa, como a PCR quantitativa competitiva (QC-PCR), actualmente em desuso, e a PCR em tempo real, que visam estabelecer uma relação entre a concentração de ADN alvo e a quantidade de produto gerado pela PCR (Mafrá & Oliveira, 2005; Weighardt, 2006).

2.4.2.3. PCR em tempo real

A PCR em tempo real representa uma das técnicas de PCR mais precisas e utilizadas actualmente. Através desta técnica é possível obter dados na primeira fase exponencial de amplificação, permitindo a aquisição de resultados quantitativos. A aquisição de dados é obtida através da utilização de moléculas fluorescentes capazes de oferecer uma correlação forte, que permite avaliar pequenas quantidades de diferentes espécies animais (Ballin, 2010; Fajardo et al., 2008b; Weighardt, 2006).

Nesta metodologia, a PCR está associada à emissão de um sinal fluorescente proporcional à quantidade de produto produzido. Para tal, foram desenvolvidas várias substâncias para serem utilizadas como corantes, para se intercalarem na cadeia dupla do ADN, e sondas específicas para a sequência alvo. O uso de corantes que se ligam ao ADN oferecem uma alternativa adequada e menos dispendiosa para PCR em tempo real, uma vez que não há a necessidade de desenvolvimento de sondas e da sua optimização (Fajardo et al., 2008b).

O corante mais utilizado é o SYBR[®] Green I, sendo considerado o método mais simples e económico. Na extensão dos *primers*, o corante SYBR[®] Green I intercala-se na cadeia dupla de ADN que está a ser sintetizada, emitindo fluorescência. O uso deste corante permite calcular a temperatura de desnaturação ou de *melting* do fragmento alvo e a sua diferenciação de outros fragmentos de ADN de cadeia dupla (produtos não específicos e dímeros de *primers*). Recentemente, surgiram novos corantes fluorescentes, com elevada afinidade para o ADN de cadeia dupla, favorecendo assim o aumento da fluorescência quando comparados ao SYBR[®] Green I. Destaca-se, entre estes novos corantes, o

EvaGreen[®] (figura 5), que apresenta um baixo nível de inibição da PCR e pode ser usado em concentrações superiores ao SYBR[®] Green I, gerando um melhor sinal de fluorescência, levando a um aumento da sensibilidade e da estabilidade em PCR em tempo real (Bio-Rad, 2011; Chen et al., 2009; Weighardt, 2006).

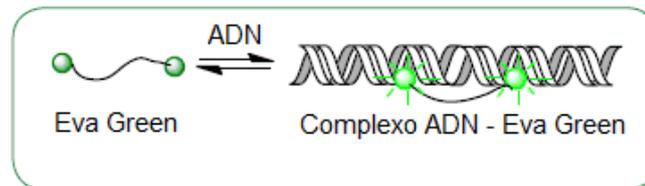


Figura 5: Esquema ilustrativo do funcionamento do corante EvaGreen[®]

Certas aplicações exigem maior especificidade da sequência alvo e, desta forma, o problema pode ser resolvido com a utilização de sondas específicas. Assim, podem ser utilizadas sondas de hidrólise do tipo TaqMan[™], sondas de hibridação FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) e sondas de interação específica, *Molecular Beacons[™]* e *Scorpions[™]*. Normalmente, a sonda é um oligonucleótido que contém um fluoróforo e um elemento neutralizador. O fluoróforo emite fluorescência quando excitado e o neutralizador (*quencher*) anula essa emissão quando está perto do fluoróforo. Como resultado da actividade exonuclease da Taq polimerase ou da interação entre a sonda e o amplicão, ocorre a separação física do fluoróforo e do neutralizador, resultando num aumento da fluorescência (Kesmen et al., 2009; Weighardt, 2006).

A amplificação do ADN alvo pode ser controlada e quantificada ao fim de cada ciclo de amplificação. O número de ciclos de PCR necessários para a produção de um sinal fluorescente, estatisticamente acima do nível de ruído, designa-se por C_t (*cycle threshold*) (figura 6). O valor de C_t é inversamente proporcional ao logaritmo da quantidade de ADN alvo no início da reacção, desde que a eficiência da PCR seja constante (Weighardt, 2006). Na PCR em tempo real é possível identificar três fases distintas: (1) fase inicial “lag”, (2) fase exponencial e (3) fase “plateau” (figura 6). Na primeira fase acumulam-se níveis de fluorescência de fundo, que muitas vezes correspondem ao ruído do aparelho. Esta fase encontra-se sempre abaixo da linha *threshold*. Na fase exponencial ocorre um aumento dos sinais de fluorescência, proporcional à quantidade de ADN que está a ser amplificado. Na fase “plateau” a acumulação dos produtos amplificados faz com que os valores de fluorescência se mantenham constantes, na qual o declive tende para zero.

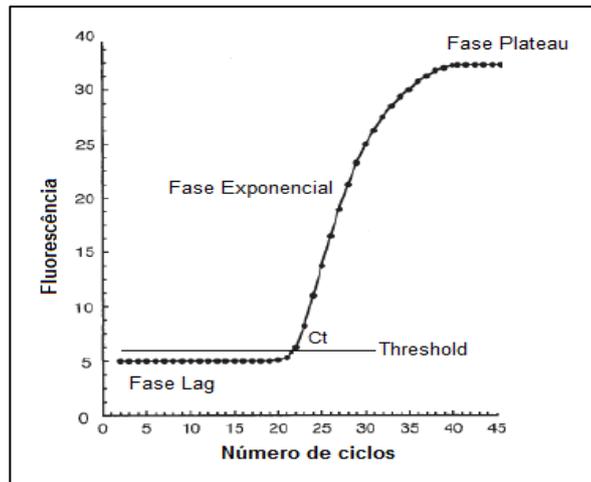


Figura 6: Sinal fluorescente obtido pela amplificação do ADN alvo por PCR em tempo real (Adaptado de Levin, 2004)

Através da obtenção de valores de C_t correspondentes a quantidades conhecidas, é possível obter uma curva padrão que permite a quantificação de determinadas amostras. Com o traçado da curva é possível determinar a eficiência da reacção, através do declive da curva padrão, recorrendo à seguinte expressão:

$$E = \left(10^{-1/x} - 1\right) \times 100$$

em que E corresponde à eficiência da reacção e x ao declive da curva de calibração. O coeficiente de correlação da curva padrão (R^2) deverá ser próximo de 1 e o declive, próximo de -3,3, para que a eficiência seja próxima de 100% (Broll, 2010; Weighardt, 2006).

A PCR em tempo real está relacionada com a redução do tempo de análise, comparativamente à PCR convencional. Quando anteriormente eram necessárias 2 a 3 horas, com PCR em tempo real é possível ter resultados em menos de 1 hora. Outra vantagem é que não necessita da visualização nem análise dos géis de agarose, o que diminui ainda mais o tempo de análise e evita todos os problemas associados aos géis de agarose. O facto de se usarem sondas específicas permite a identificação de pequenos fragmentos de ADN comparativamente à PCR convencional, o que facilita a cinética de reacção, tornando assim possível a análise de alimentos crus e processados, bem como de matrizes complexas. Porém, esta técnica tem como desvantagem, até ao momento, o custo elevado do equipamento necessário para a análise, bem como o custo elevado das sondas específicas.

2.4.2.4. Outros métodos baseados na técnica de PCR

A realização da técnica da PCR pode ser efectuada sem o conhecimento prévio da sequência de ADN que se pretende amplificar e pela utilização de *primers* específicos, em que é necessária a informação prévia da sequência alvo. Na primeira abordagem podem incluir-se o RAPD (amplificação aleatória de ADN polimórfico) e o PCR-SSCP (reação em cadeia da polimerase com polimorfismos de conformação de cadeia simples). Nas técnicas de PCR-sequenciação, PCR-RFLP (reação em cadeia da polimerase com polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição), PCR com *primers* específicos e PCR *multiplex* é necessário o conhecimento prévio das sequências a amplificar (Fajardo et al., 2006; Martinez & Yman, 1998; Meyer et al., 2011; Nau et al., 2009; Ripoli et al., 2006; Tobe & Linacre, 2008).

- **RAPD**

Nesta técnica é usado um *primer* de tamanho reduzido concebido aleatoriamente, com grande probabilidade de encontrar uma ou várias sequências complementares. Assim, ocorrerá a amplificação de várias regiões do genoma, onde cada sequência de ADN irá produzir diferentes fragmentos de PCR (várias bandas visualizadas no gel), dando origem ao perfil ou *fingerprint* de um indivíduo (Lenstra, 2009; Rastogi et al., 2007).

As análises de RAPD mostram, no entanto, falta de reprodutibilidade, sendo pouco adequadas para a detecção de uma dada espécie, em alimentos que possuem várias espécies como ingredientes, e para a análise de alimentos processados.

- **SSCP**

Esta técnica é usada na maioria das vezes para diferenciar espécies, baseando-se na relação da migração dos fragmentos de ADN de cadeia simples por PAGE ou electroforese capilar (CE). A sensibilidade desta técnica aumenta quando o comprimento dos fragmentos é pequeno. No caso particular das carnes cruas (500 a 1000 pb), torna-se necessário usar enzimas de restrição de forma a obter fragmentos menores (Rehbein, 2010).

A técnica SSCP apresenta-se como uma técnica rápida, com bons resultados para pequenos fragmentos de ADN, o que possibilita a análise de ADN degradado. Contudo, há uma grande dificuldade em otimizar o método, uma vez que a cadeia de ADN é influenciada pelas condições da electroforese (tipo de gel, tampão utilizado e temperatura).

- **Sequenciação**

A PCR seguida de sequenciação permite a obtenção e confirmação dos produtos amplificados, bem como de extractos de ADN, permitindo a determinação total ou parcial da sequência de ADN.

O método mais usual de sequenciação de ADN fundamenta-se nos princípios de Sanger, através de uma reacção enzimática com uma polimerase do ADN. A dupla cadeia de ADN é desnaturada com NaOH e, após estabilização do pH, os *primers* ligam-se ao fragmento de ADN que se pretende analisar (a sequência dos *primers* é complementar à sequência que se pretende sequenciar). A reacção é distribuída em quatro tubos, separadamente, para que ocorra a reacção de terminação. Cada um dos tubos reaccionais contém, além dos componentes habituais da PCR, um dos quatro didesoxiribonucleótidos trifosfato (ddNTP) marcados radioactivamente, que são desprovidos de um grupo químico essencial (grupo OH na posição 3' da desoxirribose). Desta forma, após adição do ddNTP a síntese de ADN é interrompida, uma vez que não ocorre a ligação fosfodiéster. Os diferentes fragmentos sintetizados nas quatro misturas reaccionais são separados de acordo com a sua dimensão por electroforese em gel de poliacrilamida e analisados por autorradiografia (figura 7).

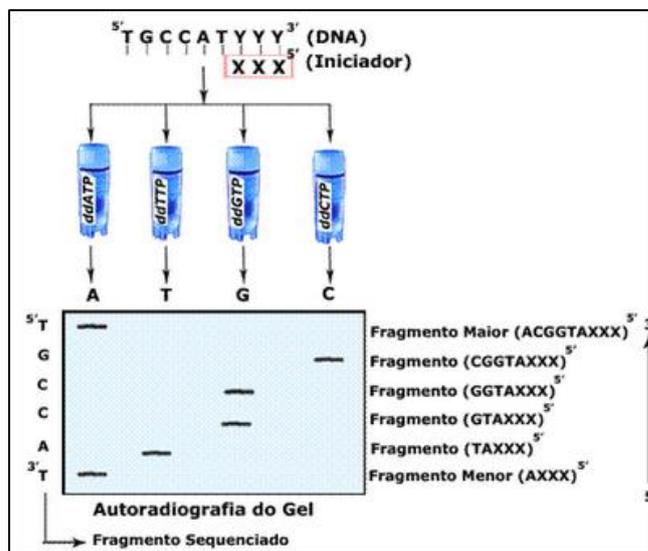


Figura 7: Esquema ilustrativo da sequenciação de ADN pelo método de Sanger

Hoje em dia, a sequenciação é feita com sistemas de detecção automática, e para isso, utilizam-se *primers* marcados com diferentes moléculas fluorescentes. Desta forma, é possível realizar a electroforese da mistura de todos os fragmentos sintetizados das quatro misturas reaccionais. Toda a informação obtida é compilada em sistemas informatizados, onde é possível encontrar inúmeras sequências nucleotídicas. Após introdução da

sequência, o programa irá identificar a espécie ou a espécie mais estreitamente relacionada com a sequência disponível na base de dados (Girish et al., 2004; Schubbert, 2010).

- **PCR-RFLP**

Com esta técnica é possível diferenciar as espécies, através da análise dos fragmentos de restrição resultantes da clivagem do ADN, após a PCR, revelando assim a variação genética entre as espécies. As enzimas de restrição são seleccionadas com base na informação da sequência dos fragmentos amplificados por PCR. Estas enzimas devem ser de fácil disponibilidade, baixo custo e a digestão dos fragmentos de ADN deve ser completa, de modo a permitir a máxima diferenciação entre as espécies. Deve-se também ter em conta, na selecção das enzimas de restrição, o tipo de gel utilizado na separação dos fragmentos (por exemplo agarose ou poliacrilamida). Os fragmentos menores a 80 pb obtidos por restrição enzimática são difíceis de ser analisados em gel de agarose. A aplicação deste método também depende do número de espécies incluídas no estudo. Assim, se o número de espécies for baixo e se as espécies forem desconhecidas, podem aparecer padrões de RFLP semelhantes e induzir em erro (Pietsch & Waiblinger, 2010; Wolf et al., 1999).

- **PCR com *primers* específicos de espécies**

Esta técnica de PCR envolve a utilização de *primers* específicos desenhados num fragmento de ADN com uma sequência característica da espécie, podendo ser aplicada no controlo da autenticidade de produtos alimentares. Este método está direccionado para pequenos fragmentos de ADN, oferecendo alta sensibilidade, especificidade e simplicidade. Com esta técnica, é possível identificar uma espécie-alvo numa matriz que contenha um conjunto de sequências de ADN heterogéneo, tratando-se assim, de uma técnica adequada para a análise de produtos processados. Esta técnica é indicada para análises de rotina, uma vez que é rápida, robusta e económica. No entanto, esta técnica requer o conhecimento preciso da sequência alvo, para que o desenho dos *primers* seja específico (Bottero & Dalmaso, 2010; Fajardo et al., 2010; Nau et al., 2009).

- **PCR *multiplex***

Trata-se de uma variante da reacção em cadeia da polimerase, na qual são usados vários *primers* para amplificação de mais do que uma sequência específica. Com esta técnica é possível rentabilizar reagentes, a quantidade de extractos de ADN utilizada e tempo de análise. Além do mais, os efeitos inibitórios são muitas vezes excluídos na quantificação relativa, obtendo-se assim resultados mais robustos.

Para o sucesso do ensaio em *multiplex* é importante ter em conta a concentração dos *primers* seleccionados para a reacção, a concentração do tampão de PCR, o ciclo de temperaturas utilizado na reacção e o balanço entre as concentrações de MgCl₂ e de dNTP. O facto de existir mais do que um par de *primers* na PCR pode provocar alguns problemas, como a formação de produtos de PCR inespecíficos. Além do mais, se o *primer* for longo (28-30 pb) permite que a reacção seja realizada a temperaturas de hibridação elevadas e, desta forma, leva a uma menor formação de produtos inespecíficos. Outro factor a ter em conta é o tamanho dos fragmentos amplificados que deve ser similar, uma vez que grandes diferenças nos tamanhos de ADN alvo favorecem a amplificação do ADN alvo menor, em relação ao maior, levando a rendimentos diferentes nos produtos amplificados (Köppel et al., 2009; Somma & Querci, 2006b).

Em suma, é possível economizar tempo e custos, sendo então possível a identificação simultânea de várias espécies (Broll, 2010; Fajardo et al., 2007a; Fajardo et al., 2010; Ghovvati et al., 2009).

2.4.2.5. Sequências alvo

A selecção adequada dos marcadores genéticos constitui um papel fundamental em qualquer método baseado na técnica da PCR. O genoma mitocondrial tem-se mostrado a melhor opção para diagnósticos moleculares, uma vez que oferece inúmeras vantagens em relação ao ADN nuclear. O facto de existirem múltiplas cópias de ADN mitocondrial numa célula faz com que aumente a probabilidade de ser detectada uma sequência específica, bem como a probabilidade de se amplificarem fragmentos muito pequenos resultantes do processamento térmico dos alimentos. Além do mais, os genes mitocondriais conseguem evoluir muito mais rápido que os nucleares e, assim, conter uma maior diversidade de sequências, facilitando a identificação de espécies filogeneticamente relacionadas (Bottero & Dalmaso, 2010; Fajardo et al., 2008a; Fajardo et al., 2010).

O ADN mitocondrial é haplóide, não-recombinante e é quase exclusivo de herança materna. O número de mitocôndrias por célula depende da sua actividade metabólica e, no caso de uma célula animal, podem ser encontradas até 1000 mitocôndrias (cada mitocôndria possui 2 a 6 moléculas de ADN) (Fajardo et al., 2008a; Girish et al., 2004).

O desenvolvimento de *primers* para identificação de espécies tem sido direccionado para genes mitocondriais, como o citocromo *b* (*cytb*) e a subunidade rARN 12S (Dooley et al., 2004; Fajardo et al., 2007a; Martín et al., 2009; Nau et al., 2009). Estes genes têm sido muito utilizados na identificação de espécies por PCR, visto que o ADN mitocondrial possui um número elevado de cópias genómicas, o que garante quantidades suficientes de ADN

para amplificação, mesmo em amostras muito processadas (Montiel-Sosa et al., 2000; Pascoal et al., 2005; Rojas et al., 2009b).

2.5. Aplicação das técnicas de PCR na identificação de espécies em produtos cárneos

Têm sido desenvolvidas numerosas técnicas baseadas na PCR aplicadas na identificação de espécies animais, por se tratar de uma ferramenta simples, rápida, sensível e específica para a detecção de constituintes de origem animal em produtos alimentares. Na tabela 2, apresenta-se um resumo das aplicações da técnica de PCR utilizadas na avaliação da autenticidade de produtos cárneos reportados na literatura.

Para a espécie *Gallus gallus* (galinha) foram desenvolvidas técnicas de PCR em tempo real (Dooley et al., 2004), PCR-RFLP (Stamoulis et al., 2010), PCR específica (Haunshi et al., 2009; Nau et al., 2009) e PCR multiplex (Matsunaga et al., 1999). Dooley et al. (2004) prepararam misturas de carne de galinha, vaca, peru, porco e cordeiro, baseando-se na amplificação do gene *cytb*. A utilização de uma sonda TaqMan™ na PCR em tempo real resultou em alguma reactividade cruzada com as outras espécies, mas concluíram que o nível de reactividade (0,01% e 0,1%) não levaria a erros de identificação das espécies. O limite de detecção obtido foi de 0,1%. Noutro estudo, Nau et al. (2009) misturaram ovos de galinha com ovos de peru, pato e galinha-de-angola. Para as espécies consideradas foram desenhados *primers* específicos, tendo em conta o gene *cytb*. Foi atingido um nível de detecção de 0,1%, não se podendo considerar como o mínimo detectável, uma vez que não foram testados níveis mais baixos.

Para o peru foram também desenvolvidos trabalhos por Dooley et al. (2004) e por Nau et al. (2009). Da mesma forma, prepararam misturas de carnes e mistura de ovos, conseguindo níveis de detecção de 0,02% e 0,1%, respectivamente. Estes autores, tiveram como base a amplificação do gene *cytb*.

No que diz respeito ao porco foram efectuados diversos trabalhos. Fajardo et al. (2008a) procederam à codificação do gene polimórfico nuclear para o receptor melanocortina 1 (*MC1R*), com 795 pb, de modo a poderem diferenciar javali de porco doméstico, através de PCR-RFLP. Em 2010, Soares et al. prepararam misturas padrão de carne de porco em carne de aves. O estudo baseou-se na amplificação do gene *cytb* (149 pb), tendo obtido um nível de detecção de 0,1% de porco em carne de aves, usando PCR *duplex*. Meyer et al. (1994) analisaram porco em várias amostras de espécies animais, misturas de carne processada de porco em vaca e algumas amostras comerciais. O gene da hormona do crescimento de porco foi usado como alvo em PCR. O nível de detecção alcançado foi de 0,5% de porco em carne de vaca.

Relativamente ao faisão, codorniz e perdiz, Rojas et al. (2009a) desenvolveram técnicas de PCR específicas de espécies e Stamoulis et al. (2010) e Rojas et al. (2008) desenvolveram a PCR-RFLP. Rojas et al. (2009a) amplificaram o gene rARN 12S para o faisão (113 pb), codorniz (129 pb) e perdiz (141 pb). Para tal, prepararam amostras padrão que continham cada espécie alvo em carne de galinha, de modo a avaliar o limite de detecção. Desta forma, obtiveram um nível de 0,1% para as três espécies, quer em misturas binárias, quer em amostras processadas. No trabalho desenvolvido por Stamoulis et al. (2010) foram utilizados para cada espécie, sequências do genoma mitocondrial rARN 12S (480 pb) e segmentos *cytb* (380 pb). Rojas et al. (2008) utilizaram carne processada das três espécies em questão e tiveram como base de amplificação o gene rARN 12S, com um amplicão de 720 pb. Foi assim possível, quer para Stamoulis et al. (2010), quer para Rojas et al. (2008), diferenciar faisão, codorniz e perdiz, através de PCR-RFLP.

No caso do coelho, Martín et al. (2007) prepararam amostras padrão de carne de coelho em aveia, com o objectivo de determinar a sensibilidade das técnicas. Desenvolveram uma técnica de PCR específica para o coelho tendo como base o gene rARN 12S, de modo a obter um amplicão de 110 pb com um limite de detecção de 0,1%. Walker et al. (2004) prepararam misturas de carnes e pela técnica da PCR quantitativa conseguiram atingir um limite de 1% de carne de coelho, usando *primers* que produziram fragmentos de 160 pb.

Fajardo et al. (2006, 2007a e 2008b) amplificaram o gene rARN 12S para identificação de veado. Em 2006, utilizaram a técnica PCR-RFLP, tendo obtido fragmentos com 712 pb. Verificaram que esta técnica não pode ser aplicada a amostras comerciais demasiado processadas, devido à degradação do ADN. Em 2007, analisaram carne processada através de PCR específica de espécies, amplificando um fragmento de 175 pb. Neste trabalho, evidenciaram a especificidade da técnica para o veado, relativamente a espécies como galinha, pato, coelho ou peru. Em 2008, foram preparadas misturas padrão de carne de veado em carne de porco (crua e processada), que foram analisadas por PCR em tempo real. Para a carne crua obtiveram um limite de detecção de 0,001% e para a carne processada, de 0,8%.

Relativamente à vaca, Dooley et al. (2000) prepararam misturas de carne de vaca, galinha, cordeiro, porco e peru, para o desenvolvimento de PCR em tempo real com utilização das sondas TaqMan™. O tamanho reduzido do amplicão utilizado neste estudo (116 pb) tornou-se vantajoso para a detecção de material processado. O limite de detecção alcançado foi de 0,012% de vaca. Em 2005, Pascoal et al. desenvolveram uma PCR específica para o gene *cytb*. A sensibilidade do método foi testada através de misturas padrão de carne de vaca com farinha de trigo, conseguindo-se obter um nível de 0,025%.

Martín et al. (2009), para o desenvolvimento de uma técnica de PCR específica para o coelho, verificaram que a semelhança das sequências de coelho e lebre foi de 91-92%. Mamuris et al. (2001) desenvolveram um estudo genético da lebre, através de PCR-RFLP para ADN mitocondrial. Relativamente à identificação específica de lebre por PCR qualitativa ou por PCR em tempo real em produtos cárneos, convém salientar que não foi encontrada na literatura qualquer referência.

Tabela 2: Resumo das aplicações de técnicas de PCR na avaliação de autenticidade de produtos cárneos

Espécie	Amostra	Técnica	Gene alvo	Amplicação (pb)	Ciclos de amplificação	Limite de detecção	Referência
Galinha	Mistura de carnes	PCR em tempo real	<i>cytb</i>	133	40	0,1%	Dooley et al. (2004)
	Carne crua (músculo)	PCR-RFLP	rARN 12S/ <i>cytb</i>	480/380	35	-	Stamoulis et al. (2010)
	Carne processada	PCR específica	<i>L-loop mit.</i>	256	25	-	Haunshi et al. (2009)
	Mistura de carnes processadas	PCR <i>multiplex</i>	<i>cytb</i>	227	35	0,25 ng	Matsunaga et al. (1999)
	Mistura de ovos	PCR específica	<i>cytb</i>	491	40	0,1%	Nau et al. (2009)
Peru	Mistura de carnes	PCR em tempo real	<i>cytb</i>	86	40	0,02%	Dooley et al. (2004)
	Mistura de ovos	PCR específica	<i>cytb</i>	165	40	0,1%	Nau et al. (2009)
	Carne crua (músculo)	PCR-RFLP	rARN 12S/ <i>cytb</i>	480/360	35	-	Stamoulis et al. (2010)
Porco	Mistura de carnes	PCR em tempo real	<i>cytb</i>	149	40	0,02%	Dooley et al. (2004)
	Carne crua (músculo)	PCR-RFLP	<i>MRC1</i>	795	32	-	Fajardo et al. (2008a)
	Mistura de carne de porco com aves	PCR <i>duplex</i>	<i>cytb</i>	149	35	0,1%	Soares et al. (2010)
	Mistura de carne de javali e porco	PCR em tempo real	<i>MRC1</i>	56	40	5%	Mayer & Hochegger (2001)
	Mistura de carne de porco e vaca	PCR <i>multiplex</i>	mt ADN	212	35	0,1%	Ilhak & Arslan (2006)
	Mistura de carne de porco e vaca	PCR específica	<i>PGH</i>	108	35	0,5%	Meyer et al. (1994)
	Mistura de carnes	PCR-RFLP	<i>cytb</i>	359	30	5%	Partis et al. (2000)

Tabela 2: (continuação)

Espécie	Amostra	Técnica	Gene alvo	Amplicação (pb)	Ciclos de amplificação	Limite de detecção	Referência
Faisão	Mistura de carnes cruas e processadas	PCR específica	rARN 12S	113	40	0,1%	Rojas et al. (2009a)
	Carne crua (músculo)	PCR-RFLP	rARN 12S/ <i>cytb</i>	480/380	35	-	Stamoulis et al. (2010)
	Carne processada	PCR-RFLP	rARN 12S	720	40	0,1%	Rojas et al. 2008
Codorniz	Mistura de carnes cruas e processadas	PCR específica	rARN 12S	129	40	0,02%	Rojas et al. (2009a)
	Carne crua (músculo)	PCR-RFLP	rARN 12S/ <i>cytb</i>	480/380	40	0,1%	Stamoulis et al. (2010)
	Carne processada	PCR-RFLP	rARN 12S	720	35	-	Rojas et al. 2008
Perdiz	Mistura de carnes cruas e processadas	PCR específica	rARN 12S	141	40	0,02%	Rojas et al. (2009a)
	Carne crua (músculo)	PCR-RFLP	rARN 12S/ <i>cytb</i>	480/380	32	-	Stamoulis et al. (2010)
	Carne processada	PCR-RFLP	rARN 12S	720	35	0,1%	Rojas et al. 2008
Pato	Carne processada	PCR específica	<i>L-loop</i> mit	292	25	-	Haunshi et al. (2009)
	Carne processada	PCR específica	rARN 12S	64	35	0,1%	Martín et al. (2007)
	Mistura de ovos	PCR específica	<i>cytb</i>	104	40	0,1%	Nau et al. (2009)
	Carne crua (músculo)	PCR-RFLP	rARN 12S/ <i>cytb</i>	480/380	35	-	Stamoulis et al. (2010)

Tabela 2: (continuação)

Espécie	Amostra	Técnica	Gene alvo	Amplicação (pb)	Ciclos de amplificação	Limite de detecção	Referência
Coelho	Mistura de carne de coelho com aveia	PCR específica	rARN 12S	110	35	0,1%	Martín et al. (2009)
	Carne crua	PCR-RFLP	<i>cytb</i>	359	30	-	Partis et al. (2000)
	Mistura de carnes	PCR quantitativa	beta-globin	160	40	1%	Walker et al. (2004)
Veado	Carne processada	PCR específica	rARN 12S	175	40	-	Fajardo et al. (2007a)
	Carne crua e processada	PCR-RFLP	rARN 12S	712	35	-	Fajardo et al. (2006)
	Mistura de carnes cruas e processadas	PCR em tempo real	rARN 12S	134	40	0,001%	Fajardo et al. (2008b)
Vaca	Mistura de carnes	PCR em tempo real	<i>cytb</i>	116	40	0,012%	Dooley et al. (2004)
	Mistura de carne de vaca com farinha de trigo	PCR específica	<i>cytb</i>	115	25	0,025%	Pascoal et al. (2005)
	Mistura de carnes	PCR em tempo real	-	98	40	0,002%	Walker et al. (2003)
		PCR específica			30	0,005%	

3. Material e Métodos

3.1. Descrição das amostras

No âmbito deste estudo, foram adquiridas 18 alheiras de caça em diferentes estabelecimentos comerciais, incluindo hipermercados e comércio tradicional (tabela 3).

Tabela 3: Descrição da rotulagem das amostras de alheiras de caça

Código	Ingredientes
AL1	40% Carne de caça (pato, perdiz, coelho), 30% pão de trigo, 20% carne de porco, 5% água, 2% alho, 2% azeite, 1% colorau
AL2	30% Carne de suíno, 20% veado, 3% faisão, 10% coelho, pão de trigo, água, azeite, sal, louro, salsa, piri-piri, pimentão-doce, tripa de porco
AL3	30% Carne de suíno, 20% veado, 3% faisão, 10% coelho, pão de trigo, água, azeite, sal, louro, salsa, piri-piri, pimentão-doce, tripa de porco
AL4	20% Carne de javali, 19% perdiz, pão de trigo, 9% coelho, 7% veado, 2% pato, 2% suíno, 2% galinha, 2% peru, azeite, sal, alho, especiarias
AL5	23% Pão, 20% coelho selvagem, 20% galinha, 12% pato selvagem, 7% perdiz, 5% água, 5% azeite, 4% suíno, 2% tripa, 2% condimentos
AL6	Pão de trigo, carne e gordura de suíno, 10% carne de caça, carne de bovino e aves, sal, antioxidantes (E301, E331), pimentão-doce, alho, conservantes (E259), aroma de fumo, salsa
AL7	15% Veado, 15% javali, 10% suíno, 30% pão de trigo, 15% água de cozedura, gordura de suíno, azeite, alho, sal, cebola, especiarias, conservantes e antioxidantes
AL8	Sem rotulagem
AL9	Sem rotulagem
AL10	Carne de Porco, carne de aves, coelho, pato e azeite
AL11	Sem rotulagem
AL12	Sem rotulagem
AL13	20% Pão de trigo, 20% carne de galinha, 10% pato, 10% veado, 10% javali, 10% coelho, 10% água, 5% gordura animal e vegetal, 4% tripa, 1% condimentos e especiarias
AL14	40% Carne de caça (javali, coelho, perdiz, pato, lebre, entre outras carnes), 25% pão de trigo, 17% água em forma de calda, 10% azeite extra virgem, 3% gordura de porco preto, 4% tripa, 1% condimentos e especiarias
AL15	40% Carne de caça (pato, perdiz, coelho), 30% carne de porco, 20% pão de trigo, 5% água, 2% alho, 2% azeite, 1% colorau
AL16	40% Carnes (veado, javali, suíno), pão de trigo (farinha de trigo tipo 65, água, sal, levedura), água de cozedura, gordura de suíno, azeite (5%), alho, sal, cebola, especiarias, conservantes, antioxidantes
AL17	Pão, javali, veado, porco, carneiro, aves, gordura animal, presunto, salpicão, sal, alho, ervas aromáticas e especiarias
AL18	30% Carne de aves, 27% carne de suíno, pão de trigo, 9% carne de pato, 9% carne de coelho, azeite, sal, alho, especiarias

Na tabela 3 estão reunidas todas as informações que constavam da rotulagem das alheiras adquiridas, tendo-se registado a ausência de qualquer rotulagem em quatro amostras, dado estas serem provenientes de produção artesanal.

Todas as amostras foram trituradas num moinho de lâmina dupla (Grindomix GM200, Retsch, Alemanha). Cada alheira foi previamente dividida em duas partes iguais sendo trituradas com e sem tripa. De forma a evitar contaminações, cada amostra foi tratada separadamente, usando material descontaminado quimicamente. Cada amostra foi imediatamente armazenada num recipiente esterilizado, rotulado e acondicionado a -20°C.

As amostras de carnes e outros ingredientes mencionadas nas tabelas 4 e 5 foram seleccionadas atendendo aos ingredientes declarados no rótulo de cada alheira de caça. Da mesma forma, estas amostras foram trituradas num moinho de lâmina dupla (Grindomix GM200, Retsch, Alemanha), usando recipientes diferentes e previamente descontaminados quimicamente. As amostras foram também armazenadas em recipientes esterilizados, devidamente rotulados e acondicionados a -20°C.

Tabela 4: Carnes utilizadas na produção de alheiras de caça

Código	Amostra	Origem	Embalagem
C1	Javali	Espanha	Embalado a vácuo numa embalagem plástica
C2	Pato	Portugal	Embalado a vácuo numa embalagem plástica
C3	Perdiz	Portugal	Embalado a vácuo numa embalagem plástica
C4	Lebre *	Portugal	-
C5	Codorniz	Espanha	Caixa de esferovite revestida de película
C6	Coelho *	Portugal	-
C7	Faisão	Escócia	Embalado a vácuo numa embalagem plástica
C8	Veado	Espanha	Embalado a vácuo numa embalagem plástica
C9	Coelho selvagem	Portugal	-
C10	Vaca *	Portugal	-
C11	Galinha *	Portugal	-
C12	Peru *	Portugal	-

* Amostras adquiridas no talho

Dada a inexistência de materiais de referência certificados para a validação das metodologias utilizadas, foram preparadas misturas binárias de cada uma das espécies em estudo com carne de porco. Cada espécie de carne foi individualmente triturada antes de se proceder às misturas. Todas as misturas de referência foram preparadas de acordo com o descrito na tabela 6.

Tabela 5: Ingredientes utilizados na produção das alheiras (pão e especiarias)

Código	Amostra	Origem	Embalagem
E1	Pão de trigo	Portugal	-
E2	Pão de centeio	Portugal	-
E3	Cebola	Portugal	-
E4	Alho (moído)	Portugal	Vidro
E5	Salsa	Portugal	-
E6	Pimenta Branca (moída)	Portugal	Embalagem de plástico com fecho hermético
E7	Louro	Portugal	-
E8	Pimentão-doce (moído)	Portugal	Vidro
E9	Piripiri (moído)	Portugal	Vidro

Tabela 6: Misturas binárias de referência de cada espécie em estudo

Padrões	% Espécie	Composição
P0	0%	100 g porco
P1	20%	20 g de espécie + 80 g de porco
P2	10%	50 g de P1 + 50 g de porco
P3	5%	50 g de P2 + 50 g de porco
P4	2,5%	50 g de P3 + 50 g de porco
P5	1%	40 g de P4 + 60 g de porco
P6	0,5%	50 g de P5 + 50 g de porco
P7	0,1%	10 g de P5 + 90 g de porco
P8	0,01%	10 g de P7 + 90 g de porco

3.2. Reagentes e soluções

3.2.1. Preparação das soluções

- Tampão de extracção TNE

Pesou-se 1 g de SDS e mediu-se 1 mL de Tris-HCl (1 M), 3 mL de NaCl (5 M) e 0,4 mL de EDTA (0,5 M). Dissolveu-se a mistura em água desionizada. Acertou-se o pH para 8, com NaOH ou HCl. Completou-se o volume até 100 mL com água desionizada e autoclavou-se a solução durante 15 minutos a 121°C.

- Hidrocloro de guanidina (Gu-HCl)

Dissolveram-se 4,78 g de Gu-HCl em água desionizada. Completou-se o volume até 10 mL e autoclavou-se durante 15 minutos a 121°C.

- Solução de Proteinase K (20 mg/mL)

Pesaram-se 20 mg de proteinase K e adicionaram-se 1000 µL de água ultra pura. Dividiu-se em alíquotas de 250 µL e armazenou-se a -20°C.

- Tampão TE 0,1x

A solução TE 1x foi preparada por diluição de 0,5 mL de solução de Tris 1 M e 0,1 mL de solução EDTA 0,5 M em 50 mL de água desionizada. A solução TE 0,1x foi preparada por diluição da solução TE 1x em água desionizada. Autoclavou-se a solução durante 15 minutos a 121°C.

- Tampão SGTB 1x

Efectuou-se a diluição da solução mãe de SGTB 20x (Grisp, Portugal) (100 mL) em 2000 mL de água desionizada.

- Solução de dNTP (10 mM)

Juntaram-se 50 µL de cada dNTP com 1800 µL de água ultra pura. Armazenou-se em alíquotas de 250 µL a -20°C.

- Tampão de carregamento 6x

Dissolveram-se 4 g de sacarose e 5 mg de azul de bromofenol em cerca de 5 mL de água desionizada. Adicionaram-se 2,4 mL de solução de EDTA (0,5 M) e completou-se o volume até 10 mL. Autoclavou-se e armazenou-se em alíquotas de 500 µL a -20°C.

3.3. Extracção de ADN

- **Método *Wizard***

O primeiro passo para o sucesso da amplificação por PCR consiste no isolamento e purificação do ADN, que deve ser efectivo o suficiente para ser possível aceder ao ADN nuclear ou mitocondrial. Desta forma, uma quantidade definida de amostra é submetida a um aquecimento na presença de dodecilsulfato de sódio (SDS) presente na solução tampão, juntamente com proteinase K (responsável pela digestão enzimática e eliminação das proteínas) e hidrocloro de guanidina (responsável pela desnaturação das proteínas).

A extracção do ADN de todas as amostras em estudo foi efectuada através do método *Wizard* de acordo com o descrito por Mafra et al. (2008a), com algumas modificações. A

base do método *Wizard* consiste na ligação dos ácidos nucleicos a uma resina de sílica do *kit Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System* (Promega, Madison, WI, USA). Após lavagem com solução de isopropanol, são eliminados os contaminantes, enquanto o ADN permanece ligado à sílica. Posteriormente, para recuperação do ADN, procede-se a uma eluição com uma solução tampão de baixa concentração de sal, previamente aquecida.

Desta forma, pesaram-se cerca de 100 mg de cada amostra (200 mg no caso das especiarias) para um tubo de reacção esterilizado de 2 mL, adicionando-se 860 µL de tampão de extracção TNE, 100 µL de Gu-HCl e 40 µL de solução de proteinase K. Após agitação vigorosa num vórtex, incubou-se cada mistura a 60°C durante 3h, com agitação ocasional. Posteriormente, procedeu-se a uma centrifugação durante 15 minutos (18 514 x g) a 4°C, recuperando-se cerca de 700 µL de sobrenadante para um novo tubo de reacção esterilizado de 1,5 mL. Procedeu-se a uma nova centrifugação durante 15 minutos (18 514 x g, 4°C), da qual se recuperaram cerca de 650 µL de sobrenadante para um novo tubo de 2 mL. Ao sobrenadante adicionou-se 1 mL de resina de purificação de ADN *Wizard®* e homogeneizou-se suavemente por inversão. A mistura foi eluída através das colunas do *kit Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System*, utilizando um êmbolo de uma seringa de 2 mL. Na coluna ficou retida a mistura ADN/resina. Esta mistura foi lavada com 2 mL de isopropanol 80% (v/v), procedendo-se de seguida a uma centrifugação de 2 minutos (10 000 x g), para completa eliminação do isopropanol. A coluna foi incubada à temperatura ambiente durante 5 minutos para secagem das colunas. Após incubação, as colunas foram colocadas num novo tubo esterilizado de 1,5 mL. Procedeu-se, de seguida, à eluição do ADN retido na coluna com 100 µL de tampão TE 0,1x, previamente aquecido a 70°C. Após eluição, as colunas foram incubadas à temperatura ambiente durante 1 minuto e procedeu-se à centrifugação (10 000 x g, 1 minuto), obtendo-se, assim, o extracto final de ADN. Todas as extracções incluíram um branco para efeitos de controlo dos reagentes de extracção e todos os extractos de ADN foram devidamente rotulados e armazenados a -20°C.

3.3.1. Avaliação da qualidade do ADN extraído

A pureza dos extractos foi avaliada por espectrofotometria UV, através do cálculo da razão das leituras das absorvâncias a 260 nm e 280 nm. Para se considerar um extracto puro, esta razão deve apresentar um valor próximo de 1,8. A estimativa da concentração de ADN é feita a partir do valor de absorvância lido a 260 nm através da expressão seguinte, tendo em conta o factor de diluição (1/20):

$$C_{ADN} \text{ (ng/}\mu\text{L)} = A_{260} / 0,02 \times \text{Factor Diluição}$$

Para avaliar a integridade do ADN extraído, todas as amostras foram submetidas a electroforese em gel de agarose a 1%. Cada electroforese foi realizada em tampão SGTB 1x (GRiSP Research Solutions, Porto, Portugal) com gel de agarose corado com Gel Red 1x (Biotium, Hayward, CA, EUA), durante 20 minutos a 200 V. No gel foram carregadas todas as amostras de ADN (5 µL) juntamente com 2 µL de corante de carregamento e 5 µL de marcador de massa molecular HyperLadder I (Bioline, Londres, Reino Unido).

A visualização do gel foi efectuada através de um transiluminador com luz UV e a imagem digital foi adquirida através de um sistema fotográfico Kodak Digital Science™ DC120 (Rochester, NY, USA) e analisada pelo *software* Kodak Digital Science™ 1D.

3.4. Amplificação por PCR

3.4.1. Oligonucleótidos

Os *primers* utilizados na amplificação por PCR qualitativa e PCR em tempo real encontram-se descritos na tabela 7. Estas sequências oligonucleotídicas são específicas para a amplificação de fragmentos das diferentes espécies, localizadas nos genes mitocondriais *cytb* e rARN 12S. Conforme apresentado na tabela 7, para as espécies porco, faisão, codorniz, perdiz, coelho e veado foram escolhidos *primers* descritos na literatura, que foram sujeitos anteriormente a avaliação para a reactividade contra outras espécies encontradas em alimentos. Para as restantes espécies foram desenhados novos *primers*, pelo facto de os que foram encontrados na literatura não produzirem fragmentos de tamanho desejado (100-150 pb) ou pelo facto de não existir qualquer método publicado para a espécie em estudo, como foi o caso da lebre.

As sequências mitocondriais escolhidas para o desenho dos *primers* foram retiradas da base de dados Genbank. Os *primers* específicos foram desenhados usando o *software* *Primer-BLAST designing tool* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). As sequências nucleotídicas foram submetidas a uma ferramenta de pesquisa e alinhamento contra outras sequências (BLAST) disponíveis na referida base de dados para identificação de possíveis homologias (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). A especificidade dos *primers* desenhados foi verificada, sendo 100% para as sequências escolhidas.

A síntese de todos os *primers* foi efectuada por Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Alemanha).

Tabela 7: Oligonucleótidos utilizados na identificação das diferentes espécies por PCR

Espécie	Primer	Sequência 5'-3'	Gene alvo	Amplicação (pb)	Referência
Galinha (<i>Gallus gallus</i>)	Gal1-F Gal1-R	CGG CGC CTC ATT CTT CTT CAT CT AAG GCG GTG GCT ATG AGT GTG A	<i>cytb</i>	129	Este trabalho ^a
Peru (<i>Maleagris gallopavo</i>)	Mel-F Mel-R	CTG AGG GGC TAC CGT CAT CA ACG AAG GGC AGG AGG AAG TG	<i>cytb</i>	144	Este trabalho ^b
Porco (<i>Sus scrofa</i>)	Pork-F Pork-R	ATG AAA CAT TGG AGT AGT CCT ACT ATT TAC C CTA CGA GGT CTG TTC CGA TAT AAG G	<i>cytb</i>	149	Dooley et al. (2004)
Faisão (<i>Phasianus colchicus</i>)	12SPHA-F 12SPHA-R	AGT GGT CAT ATG TTA TCC TCA CC GGG GTA AAA TTA GTC GTG GAG	rARN 12S	113	Rojas et al. (2009a)
Codorniz (<i>Coturnix coturnix</i>)	12SCOT-F 12SCOT-R	GAT TTA GCA GTA AAA TGG GAT CAC TTT TCG TCT TTG GCT TAA TGG TTG G	rARN 12S	129	Rojas et al. (2009a)
Perdiz (<i>Alectoris spp.</i>)	12SALEC-F 12SALEC-R	CGA CCT AAA AAC CAT CTT AGT TCC CA CGT AGT TCT CGG GCG GAT ATA TTG	rARN 12S	141	Rojas et al. (2009a)
Pato (<i>Anas platyrhynchos</i>)	Duk-F Duk-R	CTC CGT CCT AAT CCT ATT CCT GG GAG GAG GTT GGC CAC TAG TGT	<i>cytb</i>	111	Este trabalho ^c
Coelho (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	12SpRab-F 12SpRab-R	CAA AAG TAA GCT CAA TTA CCA CCG TA ATA AGG GCT TTC GTA TAT TCG GAA	rARN 12S	110	Martín et al. (2009)
Veado (<i>Cervus elaphus</i>)	12SCEQ-F 12SCEQ-R	CAA AAA CAT ATA ACG AAA GTA ACT TTC CGA CC AGT ACT CTG GCG AAT AGT TTT GTC TGC A	rARN 12S	134	Fajardo et al. (2008b)
Vaca (<i>Bos taurus</i>)	Bos-F Bos-R	CTG CCG AGA CGT GAA CTA CG AAG CCT CGT CCT ACG TGC ATA TA	<i>cytb</i>	90	Este trabalho ^d
Lebre (<i>Lepus spp.</i>)	Lep-F Lep-R	ATA CAT GTA GGC CGT GGA ATC TAC TTT GTC CTC ATG GGA GGA CGT A	<i>cytb</i>	127	Santos et al. (<i>in press</i>)
Eucariotas	18SEU-F 18SEU-R	TCT GCC CTA TCA ACT TTC GAT GG TAA TTT GCG CGC CTG CTG	rARN 18S nuclear	140	Fajardo et al. (2008b)

N.º acesso do GenBank: a) FM205716; b) L08381; c) NC009684; d) D34635.

Tabela 9: Condições de temperatura e tempo utilizadas na amplificação por PCR convencional para todas as espécies

Passos	Galinha		Peru		Porco		Faisão		Codorniz		Perdiz	
	Temp.	Tempo	Temp.	Tempo	Temp.	Tempo	Temp.	Tempo	Temp.	Tempo	Temp.	Tempo
Desnaturação	94°C	5 min	94°C	5 min	94°C	5 min	94°C	5 min	94°C	5 min	94°C	5 min
Amplificação	94°C	30 seg	94°C	30 seg	94°C	30 seg	94°C	30 seg	94°C	30 seg	94°C	30 seg
	65°C	30 seg	60°C	30 seg	60°C	30 seg	60°C	30 seg	60°C	30 seg	65°C	30 seg
	72°C	45 seg	72°C	45 seg	72°C	30 seg	72°C	30 seg	72°C	45 seg	72°C	45 seg
N.º ciclos	35		35		32		32		35		30	
Extensão final	72°C	5 min	72°C	5 min	72°C	5 min	72°C	5 min	72°C	5 min	72°C	5 min

Tabela 9: (continuação)

Passos	Pato		Coelho		Veado		Vaca		Lebre		Eucariotas	
	Temp.	Tempo	Temp.	Tempo	Temp.	Tempo	Temp.	Tempo	Temp.	Tempo	Temp.	Tempo
Desnaturação	94°C	5 min	94°C	5 min	94°C	5 min	94°C	5 min	94°C	5 min	94°C	5 min
Amplificação	94°C	30 seg	94°C	30 seg	94°C	30 seg	94°C	30 seg	94°C	30 seg	94°C	30 seg
	65°C	30 seg	60°C	30 seg	60°C	30 seg	65°C	30 seg	65°C	30 seg	60°C	30 seg
	72°C	45 seg	72°C	45 seg	72°C	45 seg	72°C	45 seg	72°C	45 seg	72°C	30 seg
N.º ciclos	30		32		38		32		35		35	
Extensão final	72°C	5 min	72°C	5 min	72°C	5 min	72°C	5 min	72°C	5 min	72°C	5 min

3.4.2. PCR qualitativa

A amplificação por PCR foi efectuada num volume total de 25 μL , que continha tampão (67 mM Tris-HCl, pH 8,8, 16 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,01% Tween 20), MgCl_2 , dNTP (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha), *primers* (tabela 7), enzima *SuperHot Taq Polymerase*[®] (Genaxxon Bioscience GmbH, Alemanha) e extracto de ADN, de acordo com as quantidades indicadas da tabela 8. As reacções foram efectuadas num termociclador MJ Mini[™] Gradient Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, USA) com as condições de temperatura e tempo descritas na tabela 9. Em todas as reacções foi incluído um controlo negativo (CN) para os reagentes da PCR, no qual se substituiu o extracto de ADN por água ultra pura.

3.4.3. Electroforese em gel de agarose

Os fragmentos de ADN obtidos por PCR foram analisados por electroforese em gel de agarose 1,5% em tampão SGTB 1x, corado com Gel Red 1x, durante 20 minutos a 200 V. Em cada electroforese aplicou-se 2,5 μL de marcador *DNA Ladder 100bp* (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha) juntamente com 4 μL de corante de carregamento. A 20 μL do produto da PCR adicionaram-se 4 μL de corante de carregamento, tendo as amostras sido carregadas no gel, assim como o marcador molecular. Depois de realizada a electroforese, o gel de agarose foi visualizado através de um transiluminador com luz UV. A imagem digital foi captada por um sistema fotográfico Kodak Digital Science[™] DC120 e analisada pelo *software* Kodak Digital Science[™] 1D.

3.4.4. PCR em tempo real

A amplificação por PCR em tempo real apenas foi efectuada para a espécie *Lepus spp.* (lebre), uma vez que foram desenvolvidos novos marcadores moleculares, assim como a optimização da técnica para a detecção desta espécie.

A técnica foi realizada com 20 μL de volume total de reacção contendo 2 μL de extracto de ADN, 1x SsoFast[™] Evagreen[®] Supermix (Bio-Rad Laboratories, USA) e 300 nM de cada *primer* (Lep-F/Lep-R), tal como o descrito na tabela 10. O ensaio foi realizado num termociclador CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, USA), utilizando as seguintes condições: 95°C durante 5 minutos, 45 ciclos a 95°C durante 10 segundos e 65°C durante 30 segundos, com a detecção de sinal fluorescente no final de cada ciclo. Os dados foram recolhidos e processados usando o *software* Bio-Rad CFX Manager 2.0 (Bio-Rad, Laboratories, USA).

Tabela 10: Componentes da mistura usada na PCR em tempo real

Componente	Volume (μL)
Água ultrapura	6,8
SsoFast™ Evagreen® Supermix	10
<i>Primers</i>	
<i>Forward</i>	0,6
<i>Reverse</i>	0,6
Extracto de ADN	2
Volume total da reacção	20

Foi também efectuada a análise da curva de *melting* ocorrendo a desnaturação a 95°C durante 1 minuto e hibridação a 65°C durante 5 minutos, de forma a proporcionar a correcta hibridação da cadeia dupla de ADN. Estas duas etapas foram seguidas pela curva de *melting* variando de 65 a 95°C, com incrementos de temperatura de 0,02°C por segundo. Os dados recolhidos foram processados usando o *software* Precision Melt Analysis 1.0 (Bio-Rad Laboratories, USA). Cada amostra padrão foi analisada em replicado (n=4).

3.5. Cuidados especiais

De forma a evitar a contaminação durante a extracção do ADN e preparação das soluções foram cumpridas várias medidas, tendo em conta que as bancadas, o equipamento ou até mesmo as pipetas podem ser fontes de contaminação. Para tal:

- As luvas foram mudadas frequentemente;
- A extracção do ADN das amostras e preparação das misturas da PCR foram realizadas em salas distintas;
- A sala de preparação das misturas da PCR estava equipada com equipamento e material próprios e luz UV, para esterilização do ambiente e material da sala;
- Os tubos utilizados na extracção de ADN e nas misturas da PCR eram isentos de ADNases e ARNases;
- Todos os reagentes foram autoclavados (à excepção dos dNTP, *primers* e *Taq* polimerase) a 121°C para eliminação de ADN e nucleases existentes;
- Todas as soluções foram preparadas com reagentes de grau de pureza apto para utilização em biologia molecular. Estas soluções eram usadas exclusivamente em PCR, estando armazenadas em pequenas alíquotas.

4. Resultados e Discussão

4.1. Avaliação das amostras extraídas

Os resultados da avaliação espectrofotométrica da extração de ADN para as amostras comerciais de alheiras de caça com e sem tripa encontram-se nas tabelas 11 e 12, respectivamente. Uma vez que a tripa pode ser de origem animal, procedeu-se à sua remoção para não interferir com a identificação de carnes adicionadas.

Pela análise dos resultados da tabela 11 respeitante às amostras de alheiras de caça com tripa, verifica-se que a pureza dos extractos de ADN variou entre 1,5 e 2,1, enquanto a concentração de ADN variou entre 104,3 e 483,7 ng/ μ L. No que diz respeito às alheiras de caça sem tripa (tabela 12) observou-se alguma variabilidade relativamente à pureza dos extractos de ADN, com valores entre 1,4 e 2,2. Porém, uma vez que a maioria das amostras apresentou valores superiores a 1,6, pode-se inferir que a pureza dos extractos foi, em geral, elevada. Atendendo aos valores obtidos para a concentração verifica-se que variaram entre 81,3 e 391,7 ng/ μ L. De acordo com os resultados obtidos da aplicação do método *Wizard* na extração de ADN de alheiras, pode-se inferir a sua adequação para este tipo de matrizes.

Tabela 11: Concentração e pureza dos extractos de ADN obtidos a partir das amostras de alheiras com tripa

Amostra	Concentração (ng/ μ L)	Pureza (A_{260}/A_{280})
AL1	127,3	2,1
AL2	134,7	1,6
AL3	159,0	1,7
AL4	175,0	1,7
AL5	197,3	1,7
AL6	104,3	1,6
AL7	292,3	1,8
AL8	151,0	1,8
AL9	149,7	1,7
AL10	228,0	1,9
AL11	157,3	1,7
AL12	187,0	1,8
AL13	188,0	1,5
AL14	235,3	1,7
AL15	124,0	1,6
AL16	483,7	1,6
AL17	159,3	1,6
AL18	151,0	2,1

Tabela 12: Concentração e pureza dos extractos de ADN obtidos a partir das amostras de alheiras sem tripa

Amostra	Concentração (ng/μL)	Pureza (A_{260}/A_{280})
AL1	81,3	1,9
AL2	136,3	2,0
AL3	170,0	1,5
AL4	248,7	1,7
AL5	134,0	1,5
AL6	136,3	2,1
AL7	342,3	1,8
AL8	134,0	1,4
AL9	123,0	2,2
AL10	219,7	1,9
AL11	164,3	2,0
AL12	174,0	1,9
AL13	167,7	2,0
AL14	212,0	1,5
AL15	88,3	2,0
AL16	391,7	1,6
AL17	223,3	1,7
AL18	168,0	2,1

Todas as espécies em estudo neste trabalho, assim como as misturas binárias de carnes de cada espécie em carne de porco foram, também sujeitas a extracção com o método *Wizard*. Os valores para a concentração e pureza dos extractos de ADN obtidos a partir das amostras das diferentes carnes encontram-se registados na tabela 13. Os rendimentos de ADN dos extractos das carnes foram bastante elevados com valores variando entre 282,7 e 981,3 ng/ μ L, com purezas adequadas (1,8-2,0).

Tabela 13: Concentração e pureza dos extractos de ADN obtidos a partir das amostras de carnes

Amostra	Concentração (ng/μL)	Pureza (A_{260}/A_{280})
C1	484,0	2,0
C2	498,3	1,8
C3	284,7	2,0
C4	299,7	1,9
C5	456,3	1,8
C6	472,7	1,8
C7	282,7	1,8
C8	548,3	2,0
C9	452,7	1,9
C10	305,0	1,9
C11	981,3	1,9
C12	394,3	1,8

Na tabela 14 estão registadas as purezas e concentrações do ADN extraído das especiarias e pão utilizados vulgarmente na preparação das alheiras de caça, com vista à avaliação da reactividade cruzada das metodologias de PCR desenvolvidas. As concentrações dos extractos de ADN destas matrizes oscilaram entre 135,7 e 954,0 ng/μL com purezas superiores a 1,6, à excepção da amostra de louro que registou o valor de 1,4 com rendimento de 61,7 ng/μL por ter havido dificuldades na sua trituração.

Tabela 14: Concentração e pureza dos extractos obtidos a partir das amostras de especiarias e pão

Amostra	Concentração (ng/μL)	Pureza (A_{260}/A_{280})
E1	229,3	1,7
E2	232,7	2,0
E3	212,3	1,7
E4	760,3	1,9
E5	427,7	1,9
E6	135,7	1,8
E7	61,7	1,4
E8	917,7	1,7
E9	954,0	1,6

Os valores de concentração e purezas apresentadas nas tabelas 13 e 14 evidenciaram mais uma vez a adequação do método de extracção *Wizard* para uma ampla gama de matrizes, incluindo tecidos de origem vegetal e animal.

Considerando ainda a avaliação da qualidade do ADN extraído, realizou-se uma electroforese em gel de agarose do ADN genómico dos extractos das alheiras de caça e das misturas binárias, que funcionaram como padrões na validação da técnica. A figura 8 constitui um exemplo da avaliação dos extractos de ADN obtidos dos padrões de perdiz/porco e de algumas alheiras. Verifica-se pela análise da figura 8 a presença de ADN degradado nas linhas 1 a 7 correspondentes às alheiras, o que justifica o facto de ser proveniente de amostras processadas. Por outro lado, verificam-se bandas de elevada massa molecular nas amostras padrão (P1 a P9) uma vez que se tratam de carnes cruas.

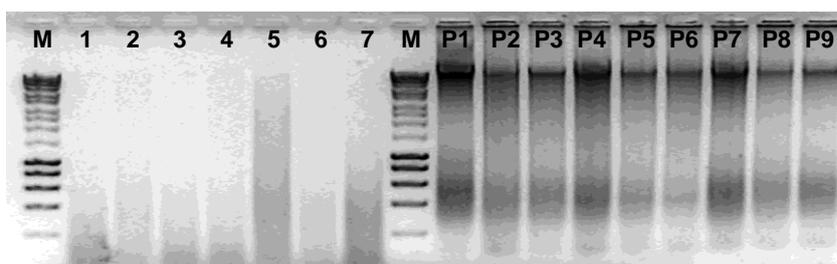


Figura 8: Electroforese em gel de agarose de ADN genómico. Linhas 1 a 7 – Amostras de alheiras de caça; Linhas P1 a P9 – Misturas binárias padrão perdiz/porco; M – Marcador Molecular HyperLadder I (Bioline, Londres, Reino Unido).

4.2. Identificação de espécies animais por PCR

Para a avaliação da autenticidade de alheiras de caça escolheram-se várias espécies animais tendo em conta a sua potencial utilização como ingrediente rotulado. Para tal, foi objectivo deste trabalho o desenvolvimento e/ou optimização de metodologias de PCR específicas para cada espécie em estudo, para posterior aplicação nas amostras de alheiras. Seguidamente apresentam-se os resultados relativos à identificação de cada uma das espécies.

4.2.1. Identificação de *Gallus gallus* (Galinha)

A detecção específica de carne de galinha foi efectuada por desenvolvimento de uma nova técnica de PCR convencional com misturas binárias padrão de carne de galinha em carne de porco. Como se pode verificar pela análise da tabela 15, a pureza dos extractos de ADN das misturas padrão galinha/porco foi em média de 1,8, o que indica um elevado grau de pureza das amostras. Atendendo aos valores obtidos para a concentração, estes variaram entre 340,7 e 435,7 ng/ μ L.

Tabela 15: Concentração e pureza dos extractos de ADN obtidos a partir das misturas padrão de galinha/porco

Amostra	Concentração (ng/ μ L)	Pureza (A_{260}/A_{280})
Ch0	356,0	1,7
Ch01	345,3	1,7
Ch02	432,7	1,9
Ch03	340,7	1,6
Ch04	370,3	1,8
Ch05	356,0	1,8
Ch06	360,7	1,8
Ch07	379,3	1,8
Ch08	435,7	1,8

Na detecção da espécie *Gallus gallus* desenharam-se novos *primers* para o gene mitocondrial *cytb* Gal1-F/Gal1-R (tabela 7), os quais originaram fragmentos de 129 pb. As condições para a amplificação de galinha foram previamente optimizadas de forma a permitir um nível de detecção de 0,01% de galinha, como se pode evidenciar através da figura 9. A sensibilidade atingida foi superior às obtidas por Nau et al. (2009) e Dooley et al. (2004), que detectaram 0,1% de galinha por PCR qualitativa e por PCR em tempo real, respectivamente.

A reactividade dos *primers* Gal1-F/Gal1-R foi testada com todas as espécies utilizadas neste estudo, a fim de verificar a especificidade *G. gallus*. Contudo, verificou-se também a amplificação de faisão e peru, para além de galinha (figura 10).

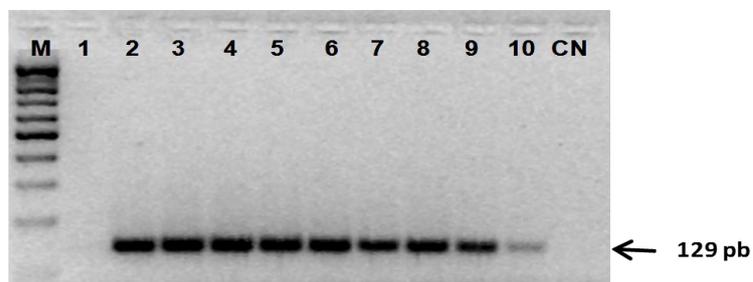


Figura 9: Electroforese em gel de agarose dos padrões de galinha em porco amplificados por PCR usando os *primers* Gal1-F/Gal1-R específicos para a galinha. M – Marcador de ADN 100 pb; Linhas 1 a 10 – 0%, 100%, 20%, 10%, 5%, 2,5%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,01% de galinha ([extractos]= 10 ng/ μ L); CN – Controlo negativo.

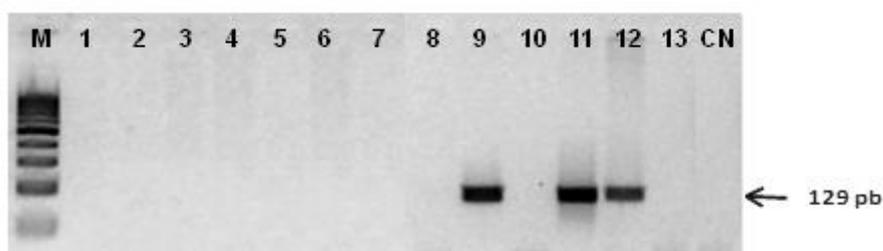


Figura 10: Electroforese em gel de agarose da reactividade dos *primers* Gal1-F/Gal1-R com todas as espécies. M – Marcador de ADN 100 pb; Linha 1 – Javali; Linha 2 – Pato; Linha 3 – Perdiz; Linha 4 – Lebre; Linha 5 – Codorniz; Linha 6 – Coelho; Linha 7 - Coelho selvagem; Linha 8 – Veadó; Linha 9 – Faisão; Linha 10 – Vaca; Linha 11 – Galinha; Linha 12 – Peru; Linha 13 – Porco ([extractos]= 10 ng/ μ L); CN – Controlo negativo.

A especificidade dos *primers* Gal1-F/Gal1-R foi também testada com as especiarias e pão, frequentemente utilizados no fabrico de alheiras. Os resultados permitiram atestar a ausência de reactividade para qualquer um dos possíveis ingredientes, enquanto a carne de galinha apresentou o fragmento esperado (figura 11).

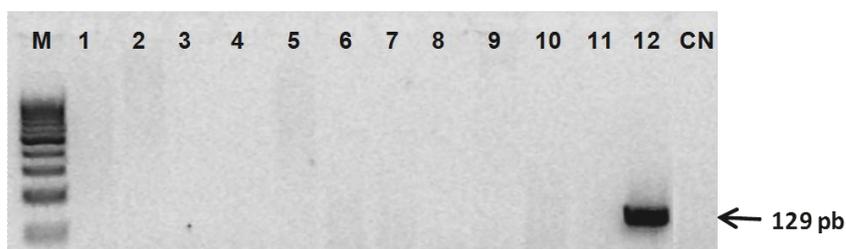


Figura 11: Electroforese em gel de agarose da especificidade dos *primers* Gal1-F/Gal1-R nas especiarias e pão. M – Marcador de ADN 100 pb; Linha 1 – Cebola; Linha 2 – Alho; Linha 3 – Salsa; Linha 4 – Pimenta branca; Linha 5 – Louro; Linha 6 – Pimentão-doce; Linha 7 – Piripiri; Linha 8 – Soja; Linha 9 – Milho; Linha 10 – Pão de trigo; Linha 11 – Pão de centeio ([extractos]= 50 ng/ μ L); Linha 12 – 1% Galinha ([extractos]= 10 ng/ μ L); CN – Controlo negativo.

Como forma de verificar a capacidade de amplificação dos extractos provenientes das especiarias e apesar do rendimento e pureza dos extractos serem aparentemente adequados para amplificação por PCR, procedeu-se à amplificação de um gene universal, como forma de garantir a ausência de falsos negativos nos testes de reactividade efectuados ao longo deste trabalho. Na figura 12 apresenta-se o resultado da amplificação do gene nuclear do rARN 18S de forma a amplificar um fragmento de 140 pb, o qual foi confirmado para todos os extractos.

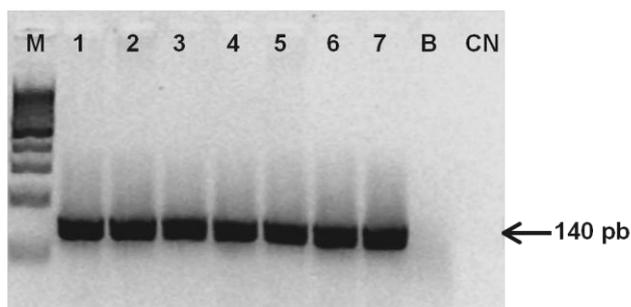


Figura 12: Electroforese em gel de agarose das especiarias amplificadas por PCR usando os *primers* 18SEU-F/18SEU-R específicos para eucariotas. M – Marcador de ADN 100 pb; Linha 1 – Cebola; Linha 2 – Alho; Linha 3 – Salsa; Linha 4 – Pimenta Branca; Linha 5 – Louro; Linha 6 – Pimentão-doce; Linha 7 – Piri-piri ([extractos]= 50 ng/ μ L); B – Branco de extracção; CN – Controlo negativo.

Tendo em conta o objectivo desta dissertação, aplicou-se a técnica proposta para a espécie *G. gallus* para avaliar a presença de carne de galinha em todas as amostras de alheiras de caça. Atendendo à figura 13 e tendo como base os rótulos das alheiras de caça (tabela 3), as amostras que rotulavam galinha (amostras AL4, AL5 e AL13 - linhas 4, 5 e 13) evidenciaram bandas intensas indicando, possivelmente, a presença de ADN de galinha. As amostras AL6, AL10, AL17 e AL18 (figura 13, linhas 6, 10, 17 e 18) indicam no rótulo a presença de carne de aves, não especificando as espécies. É clara a presença de carne de aves (galinha e/ou peru) nestas amostras, tendo em conta que apenas as amostras AL2 e AL3 rotulavam faisão. As restantes alheiras, com excepção das amostras AL2, AL8 e AL16 (figura 13, linhas 2, 8 e 16, respectivamente) também apresentaram bandas de amplificação de 129 pb, sem no entanto declarar a presença de galinha ou peru, à excepção da amostra AL4 que indica peru na sua composição. Tal facto pode apontar para uma possível substituição de alguma espécie de valor económico mais elevado por galinha e/ou peru, não estando assim de acordo com o indicado na rotulagem. De referir que as amostras AL8, AL9, AL11 e AL12 foram comercializadas como alheiras de caça mas não possuíam qualquer tipo de rótulo.

Pela análise dos resultados para a detecção de galinha pode-se concluir que algumas amostras comerciais de alheiras de caça não se encontram em conformidade com a rotulagem, já que apenas três amostras (AL4, AL5 e AL13, figura 13) indicam a presença de

galinha ou peru. Além das quatro amostras que rotulavam a presença de “carne de aves” (amostras AL6, AL10, AL17 e AL18, figura 13) apresentando bandas de 129 pb de elevada intensidade, cinco amostras que não declaravam a presença de galinha (amostras AL1, AL3, AL7, AL14 e AL15, figura 13) registaram amplificação positiva para o gene *cytb* da galinha com bandas de elevada intensidade. Estes resultados evidenciam possíveis não conformidades em algumas amostras, contudo para mais conclusões será necessário verificar também a presença de faisão e peru, uma vez que os *primers* para a galinha apresentaram reactividade para estas duas espécies.

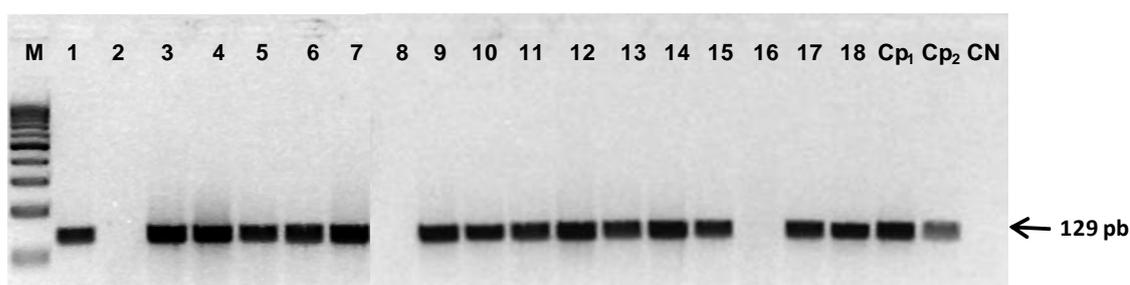


Figura 13: Electroforese em gel de agarose das amostras comerciais de alheiras de caça amplificadas por PCR usando os *primers* Gal1-F/Gal1-R específicos para a galinha. M – Marcador de ADN 100 pb; Linhas 1 a 18 – amostras AL1 a AL18 ([extractos]= 50 ng/μL); Cp₁ – 1% galinha; Cp₂ – 0,1% galinha ([extractos]= 10 ng/μL); CN – Controlo negativo.

4.2.2. Identificação de *Maleagris gallopavo* (Peru)

Na tabela 16 apresentam-se os resultados da avaliação dos extractos das misturas binárias de carne de peru em carne de porco para o desenvolvimento de uma metodologia de PCR com *primers* específicos de *Maleagris gallopavo*. Verifica-se que a pureza dos extractos de ADN das misturas padrão peru/porco foi elevada (em média 1,8) e que os rendimentos obtidos variaram entre 217,7 e 283,3 ng/μL. Pode assim concluir-se que o método de extracção permitiu obter ADN com elevada pureza e concentração.

Tabela 16: Concentração e pureza dos extractos de ADN obtidos a partir das misturas padrão de peru/porco

Amostra	Concentração (ng/μL)	Pureza (A_{260}/A_{280})
Tk0	236,0	1,6
Tk01	236,7	1,8
Tk02	246,7	1,9
Tk03	217,7	1,6
Tk04	236,0	1,8
Tk05	268,3	1,8
Tk06	283,3	1,8
Tk07	232,0	1,8
Tk08	246,7	1,8

Para a detecção de peru desenharam-se os *primers* Mel-F/Mel-R (tabela 7) com alvo no gene mitocondrial do *cytb* de forma a produzirem um fragmento específico de 144 pb. Os componentes da reacção e os respectivos programas de temperatura e tempo encontram-se descritos na tabela 8 e tabela 9, respectivamente. Estas condições foram optimizadas de forma a permitir um nível de detecção de 0,1% de peru (figura 14). O mesmo limite de detecção atingido foi obtido por Nau et al. (2009) por PCR específica de espécies, enquanto Dooley et al. (2004) conseguiram detectar 0,02% de peru por PCR em tempo real.

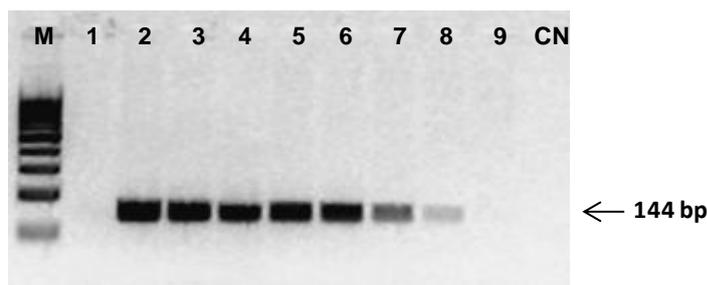


Figura 14: Electroforese em gel de agarose dos padrões de peru em porco amplificados por PCR usando os *primers* Mel-F/Mel-R específicos para o peru. M – Marcador de ADN 100 pb; Linhas 1 a 9 – 0%, 20%, 10%, 5%, 2,5%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,01% de peru ([extractos]= 20 ng/ μ L); CN – Controlo negativo.

Uma vez que os *primers* Mel-F/Mel-R foram propostos neste trabalho, a sua reactividade foi avaliada de forma a verificar a sua especificidade relativamente a outras espécies animais em estudo. No entanto, constatou-se que os *primers* escolhidos amplificaram perdiz (linha 3), codorniz (linha 5) e faisão (linha 7), para além de peru (linha 12), como se pode verificar na análise da figura 15. Apesar de não ser este o resultado de especificidade desejado, tendo em conta que as espécies reactivas foram também identificadas inequivocamente no presente trabalho, decidiu-se prosseguir com este resultado nesta primeira etapa do trabalho.

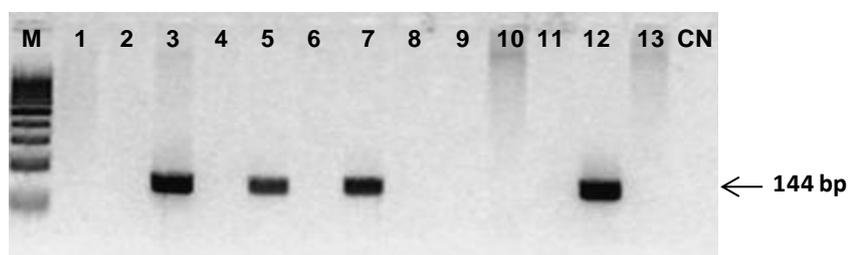


Figura 15: Electroforese em gel de agarose da reactividade dos *primers* Mel-F/Mel-R com todas as espécies. M – Marcador de ADN 100 pb; Linha 1 – Javali; Linha 2 – Pato; Linha 3 – Perdiz; Linha 4 – Lebre; Linha 5 – Codorniz; Linha 6 – Coelho; Linha 7 – Faisão; Linha 8 – Veado; Linha 9 – Coelho selvagem; Linha 10 – Vaca; Linha 11 – Galinha; Linha 12 – Peru; Linha 13 – Porco ([extractos]= 10 ng/ μ L); CN – Controlo negativo.

A especificidade dos *primers* Mel-F/Mel-R foi também avaliada com as especiarias e pão, vulgarmente utilizados na confecção das alheiras de caça. Por análise dos resultados da figura 16 verifica-se que apenas se obteve amplificação com o padrão contendo 1% de peru (linha 12), não se verificando qualquer reactividade em qualquer dos ingredientes das linhas 1 a 11.

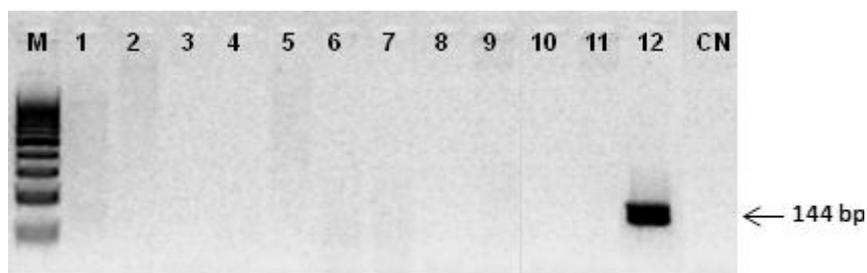


Figura 16: Electroforese em gel de agarose da especificidade dos *primers* Mel-F/Mel-R nas especiarias e pão. M – Marcador de ADN 100 pb; Linha 1 – Cebola; Linha 2 – Alho; Linha 3 – Salsa; Linha 4 – Pimenta Branca; Linha 5 – Louro; Linha 6 – Pimentão-doce; Linha 7 – Piri-piri; Linha 8 – Soja; Linha 9 – Milho; Linha 10 – Pão de trigo; Linha 11 – Pão de centeio ([extractos]= 50 ng/ μ L); Linha 12 – 1% Peru ([extractos]= 20 ng/ μ L); CN – Controlo negativo.

Procedeu-se, seguidamente, à aplicação da metodologia proposta para a detecção de peru nas amostras comerciais. Com base na figura 17 e atendendo à rotulagem de cada alheira de caça (tabela 3), a única amostra que rotula a presença de carne de peru (amostra AL4 – linha 4) apresentou uma banda intensa, indicando possivelmente, a presença de ADN de peru. As amostras AL6, AL10, AL17 e AL18 (linhas 6, 10, 17 e 18) indicam no rótulo a presença de carne de aves, não especificando, no entanto, as espécies de aves. Apenas a amostra AL10 (linha 10) apresentou uma banda de baixa intensidade, o que poderá ser vestígios de ADN de peru. Não ocorreu qualquer amplificação para as amostras AL1, AL2, AL3, AL7, AL8, AL11, AL15 e AL16 (linhas 1, 2, 3, 7, 8, 11, 15 e 16), sendo um resultado de esperar uma vez que nenhuma delas indicava peru ou carnes de aves. De notar que as amostras AL8, AL9, AL11 e AL12 foram comercializadas como alheiras de caça mas não possuíam qualquer tipo de rótulo. No entanto, as amostras AL9 (linha 9) e AL12 (linha 12) apresentaram bandas de amplificação de intensidade baixa, e a amostra AL14 (linha 14) apresentou banda de intensidade muito baixa, sem no entanto declarar a sua presença no rótulo, podendo-se supor que seja relativa a contaminação durante a produção.

Pela análise dos resultados para a detecção de peru pode-se concluir que algumas amostras de alheiras de caça não se apresentam em conformidade com a rotulagem. Apenas a amostra AL4 indica no rótulo a clara presença de peru, apresentando uma banda de elevada intensidade, comprovando a possível presença de ADN da espécie. Das amostras rotuladas com carne de aves (amostras AL6, AL10, AL17 e AL18) apenas a amostra AL10 apresentou uma banda de baixa intensidade, indicando possivelmente, a

presença de vestígios de ADN de peru. Uma vez que as amostras AL6, AL17 e AL18 apresentaram resultado negativo para o peru e positivo para galinha, pode-se inferir que as carnes de aves rotuladas dizem apenas respeito a galinha. Verifica-se que a amostra AL14 não indica no rótulo a presença de peru mas no entanto, pela análise da figura 17, apresenta banda de baixa intensidade indicando possivelmente a presença de vestígios de ADN de peru. Estes resultados evidenciam possíveis não conformidades em algumas amostras, contudo para mais conclusões será necessário verificar também a presença de perdiz, codorniz e faisão, uma vez que os *primers* para o peru apresentaram reactividade para estas três espécies.

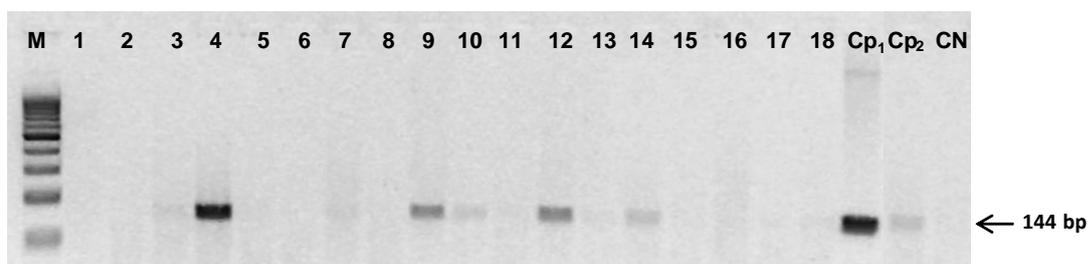


Figura 17 Electroforese em gel de agarose das amostras comerciais de alheiras de caça amplificadas por PCR usando os *primers* Mel-F/Mel-R específicos para o peru. M – Marcador de ADN 100 pb; Linhas 1 a 18 – amostras AL1 a AL18 ([extractos]= 50 ng/μL); Cp₁ – 1% peru; Cp₂ – 0,1% peru ([extractos]= 20 ng/μL); CN – Controlo negativo.

4.2.3. Identificação de *Sus scrofa* (Porco)

Sendo a carne e gordura de porco utilizados na preparação de todo o tipo de alheiras, a espécie *Sus scrofa* foi alvo de estudo no presente trabalho. Para a detecção de porco utilizaram-se os *primers* Pork-F/Pork-R (tabela 7) de forma a produzirem fragmentos de 149 pb. Os componentes da reacção e os respectivos programas de temperatura e tempo encontram-se descritos na tabela 8 e tabela 9, respectivamente, sendo de acordo com Soares et al. (2010).

Uma vez que os *primers* Pork-F/Pork-R foram anteriormente propostos, tendo sido testados para a reactividade para outras espécies animais, neste trabalho apenas se verificou a sua especificidade para as especiarias e o pão, vulgarmente utilizados na confecção das alheiras de caça. Pela análise da figura 18, apenas houve amplificação para o extracto de carne de porco (linha 12), não ocorrendo qualquer amplificação nos extractos restantes (linhas 1 a 11).

No que diz respeito à espécie *S. scrofa*, foram feitas duas análises distintas nas alheiras de caça, consistindo numa análise nas alheiras com a tripa e outra após a remoção da tripa, para verificar se a presença de porco seria resultante da adição de carne/gordura ou da tripa.

Atendendo à figura 19 (alheiras de caça com tripa) e à rotulagem de cada alheira de caça presente na tabela 3, verifica-se que nas amostras rotuladas como contendo porco (amostras AL1 a AL7, AL10, AL15 a AL18 – linhas 1 à 7, 10, 15 à 18) aparecem bandas de intensidade média e forte, indicando a presença de ADN de porco. De notar que as bandas das amostras AL5 e AL6 (linhas 5 e 6) são de intensidade muito baixa, podendo dizer-se que há vestígios de ADN de porco. As amostras AL13 e AL14 (linhas 13 e 14) indicam no rótulo que contêm gordura animal e vegetal e gordura de porco preto, respectivamente, não indicando a adição de carne de porco. Contudo verificam-se bandas intensas indicando, claramente, a presença de ADN de porco, podendo afirmar-se a possível adição de carne desta espécie. Nas amostras AL8, AL9, AL11 e AL12 (linhas 8, 9, 11 e 12) comercializadas como alheiras de caça, mas sem indicação das espécies, foi clara a presença de ADN de porco pela forte intensidade das bandas obtidas.

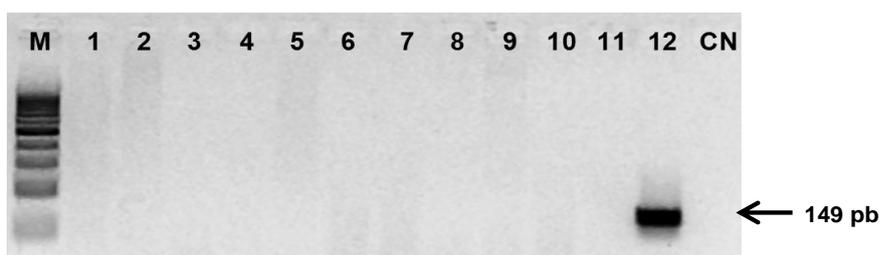


Figura 18: Electroforese em gel de agarose da especificidade dos *primers* Pork-F/Pork-R nas especiarias e pão. M – Marcador de ADN 100 pb; Linha 1 – Cebola; Linha 2 – Alho; Linha 3 – Salsa; Linha 4 – Pimenta Branca; Linha 5 – Louro; Linha 6 – Pimentão-doce; Linha 7 – Piri-piri; Linha 8 – Soja; Linha 9 – Milho; Linha 10 – Pão de trigo; Linha 11 – Pão de centeio ([extractos]= 50 ng/ μ L); Linha 12 – 100% Porco ([extracto]= 10 ng/ μ L); CN – Controlo negativo.

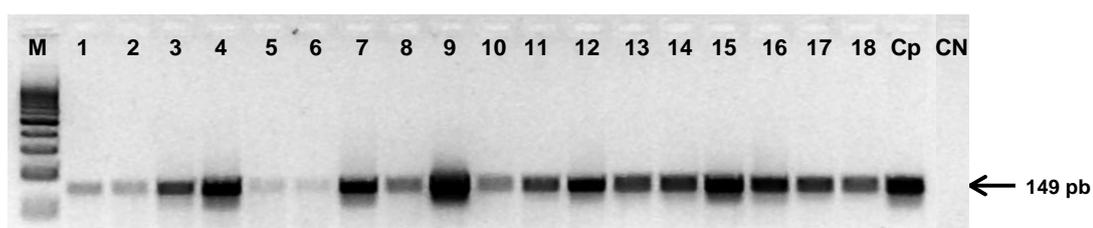


Figura 19 Electroforese em gel de agarose das amostras comerciais de alheiras de caça com tripa amplificadas por PCR usando os *primers* Pork-F/Pork-R específicos para o porco. M – Marcador de ADN 100 pb; Linhas 1 a 18 – amostras AL1 a AL18 ([extractos]= 50 ng/ μ L); Cp – 100% porco ([extracto]= 10 ng/ μ L); CN – Controlo negativo.

Relativamente à figura 20 (alheiras de caça sem tripa) verifica-se que todas as amostras que tinham amplificado anteriormente para alheiras de caça com tripa, amplificaram também para as amostras de alheira de caça sem tripa, alterando apenas a intensidade de algumas bandas. Deste modo, pode-se inferir que a presença de porco detectada é resultante de carne e/ou gordura de porco adicionados e não da tripa.

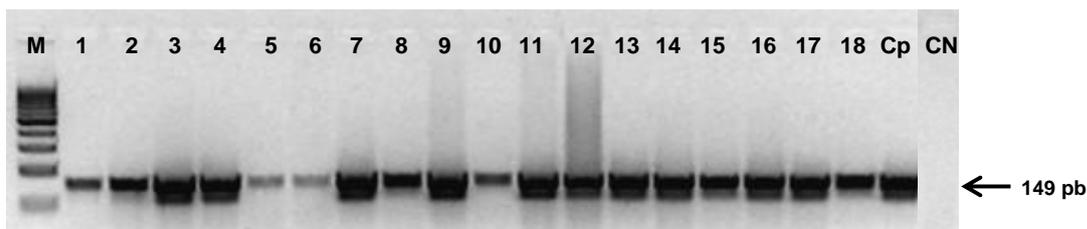


Figura 20: Electroforese em gel de agarose das amostras comerciais de alheiras de caça sem tripa amplificadas por PCR usando os *primers* Pork-F/Pork-R específicos para o porco. M – Marcador de ADN 100 pb; Linhas 1 a 18 – amostras AL1 a AL18 ([extractos]= 50 ng/ μ L); Cp – 100% porco ([extracto]= 10 ng/ μ L); CN – Controlo negativo.

Pela análise dos resultados para a detecção de porco pode-se concluir que a sua presença foi detectada em todas as amostras, como seria de prever, pois todas as amostras que rotulavam os ingredientes indicavam a presença de algum derivado de porco. Mesmo nas amostras AL13 e AL14 que indicavam apenas a adição de gordura de porco obtiveram-se bandas de elevada intensidade.

4.2.4. Identificação de *Phasianus colchicus* (Faisão)

Sendo o faisão considerado uma espécie de caça e sendo a sua carne utilizada na produção de alheira de caça, foi alvo de estudo no presente trabalho.

Na tabela 17 apresentam-se os resultados da avaliação dos extractos preparados a partir das misturas binárias de carne de faisão em carne de porco.

Tabela 17: Concentração e pureza dos extractos de ADN obtidos a partir das misturas padrão de faisão/porco

Amostra	Concentração (ng/ μ L)	Pureza (A_{260}/A_{280})
Ph0	150,7	1,8
Ph01	127,3	1,7
Ph02	144,0	1,7
Ph03	96,7	1,7
Ph04	157,3	1,6
Ph05	149,7	1,7
Ph06	129,3	1,6
Ph07	105,0	1,7
Ph08	135,0	1,7

A pureza dos extractos das misturas padrão faisão/porco foi em média de 1,7, o que indica um elevado grau de pureza do ADN. Atendendo aos valores obtidos para a concentração, estes variaram entre 96,7 e 157,3 ng/ μ L. O método *Wizard* permitiu a

obtenção de extractos com elevado rendimento e pureza, embora mais baixos do que os obtidos anteriormente.

Na detecção de faisão utilizaram-se os *primers* 12SPHA-F/12SPHA-R propostos por Rojas et al. (2009a) (tabela 7), os quais originaram fragmentos de 113 pb. Os componentes utilizados na PCR e as condições de temperatura e tempo encontram-se descritos nas tabelas 8 e 9, respectivamente. O resultado da aplicação da técnica de PCR otimizada para a detecção de 0,01% de faisão apresenta-se na figura 21. O limite de detecção atingido foi superior ao obtido por Rojas et al. (2009a), que detectou 0,1% de faisão por PCR específica.

A especificidade dos *primers* 12SPHA-F/12SPHA-R foi avaliada para as especiarias e para o pão, habitualmente incluídos nas alheiras de caça (figura 22). Verifica-se uma banda de intensidade forte na linha 12, correspondente a 1% de faisão, não ocorrendo qualquer amplificação para os restantes ingredientes das linhas 1 a 11.

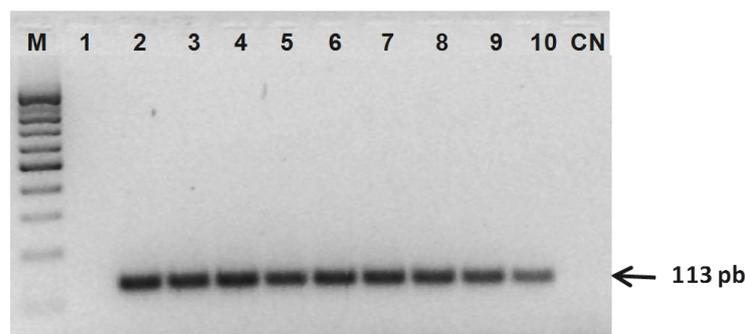


Figura 21: Electroforese em gel de agarose dos padrões de faisão em porco amplificados por PCR usando os *primers* 12SPHA-F/12SPHA-R específicos para o faisão. M – Marcador de ADN 100 pb; Linhas 1 a 10 – 0%, 100%, 20%, 10%, 5%, 2,5%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,01% de faisão ([extractos]= 10 ng/ μ L); CN – Controlo negativo.

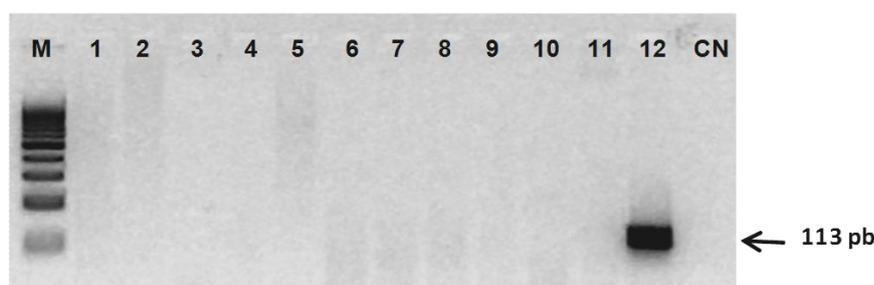


Figura 22: Electroforese em gel de agarose da especificidade dos *primers* 12SPHA-F/12SPHA-R nas especiarias e pão. M – Marcador de ADN 100 pb; Linha 1 – Cebola; Linha 2 – Alho; Linha 3 – Salsa; Linha 4 – Pimenta branca; Linha 5 – Louro; Linha 6 – Pimentão-doce; Linha 7 – Piripiri; Linha 8 – Soja; Linha 9 – Milho; Linha 10 – Pão de trigo; Linha 11 – Pão de centeio ([extractos]= 50 ng/ μ L); Linha 12 – 1% Faisão ([extracto]= 10 ng/ μ L); CN – Controlo negativo.

Na figura 23 apresenta-se a aplicação da técnica de PCR específica para o faisão nas alheiras comerciais. Os resultados mostram claramente a ausência de amplificação em todas as amostras, mesmo nas AL2 e AL3 (linhas 2 e 3) que rotulavam faisão. De notar que

as amostras AL8, AL9, AL11 e AL12 foram comercializadas como alheiras de caça mas não possuíam qualquer tipo de rótulo.

Pela análise dos resultados para a detecção de faisão pode-se concluir que houve duas potenciais não conformidades nas duas amostras (AL2 e AL3) que rotulavam faisão como ingrediente. Tal facto pode apontar para uma possível substituição desta espécie, de valor económico mais elevado por uma espécie de menor valor.



Figura 23: Electroforese em gel de agarose das amostras comerciais de alheiras de caça amplificadas por PCR usando os *primers* 12SPHA-F/12SPHA-R específicos para o faisão. M – Marcador de ADN 100 pb; Linhas 1 a 18 – amostras AL1 a AL18 ([extractos]= 50 ng/μL); Cp₁ – 1% faisão; Cp₂ – 0,1% faisão ([extractos]= 10 ng/μL); CN – Controlo negativo.

4.2.5. Identificação de *Coturnix coturnix* (Codorniz)

Considerando a codorniz uma espécie de caça potencialmente utilizada na preparação de alheiras de caça, esta foi também alvo de estudo no presente trabalho.

Na tabela 18 apresentam-se os resultados da avaliação dos extractos preparados a partir das misturas binárias de carne de codorniz em carne de porco.

Tabela 18: Concentração e pureza dos extractos de ADN obtidos a partir das misturas padrão de codorniz/porco

Amostra	Concentração (ng/μL)	Pureza (A_{260}/A_{280})
QL0	237,3	1,8
QL01	203,0	1,4
QL02	243,0	1,6
QL03	260,7	1,5
QL04	226,0	1,7
QL05	217,3	1,6
QL06	252,3	1,7
QL07	245,7	1,7
QL08	208,7	1,7

Analisando a tabela 18, verifica-se que a pureza dos extractos das misturas padrão codorniz/porco foi adequada (em média 1,6) e que os rendimentos de ADN obtidos variaram

entre 203,0 e 260,7 ng/ μ L. Pode assim concluir-se que o método de extracção permitiu obter ADN com pureza adequada e concentração elevada.

Na detecção de codorniz utilizaram-se os *primers* SCOT-F/SCOT-R (tabela 7) propostos por Rojas et al. (2009a), os quais originaram fragmentos de 129 pb. Os componentes utilizados na PCR e as condições de temperatura e tempo utilizados encontram-se descritos nas tabelas 8 e 9, respectivamente. É de realçar que estas condições foram optimizadas de forma a permitir um nível de detecção de 0,01% de codorniz, como se pode evidenciar através da figura 24. O limite de detecção atingido foi superior ao obtido por Rojas et al. (2009a) que detectou 0,1% de codorniz por PCR específica.

Embora nenhuma das amostras indicasse a presença de codorniz no rótulo, tendo em conta que quatro delas não continham rótulo (amostras AL8, AL9, AL11 e AL12) e duas indicavam conter outras espécies de caça, para além das rotuladas (amostras AL6 e AL14), decidiu-se pesquisar codorniz apenas nestas seis alheiras. No entanto, pode-se concluir que não foi possível detectar codorniz em nenhuma das alheiras analisadas para esta espécie, como se pode verificar na figura 25.

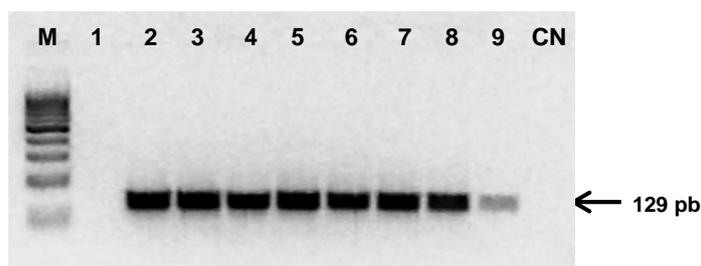


Figura 24: Electroforese em gel de agarose dos padrões de codorniz em porco amplificados por PCR usando os *primers* SCOT-F/SCOT-R específicos para a codorniz. M – Marcador de ADN 100 pb; Linhas 1 a 9 - 0%, 20%, 10%, 5%, 2,5%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,01% de codorniz ([extractos]= 10 ng/ μ L); CN – Controlo negativo.

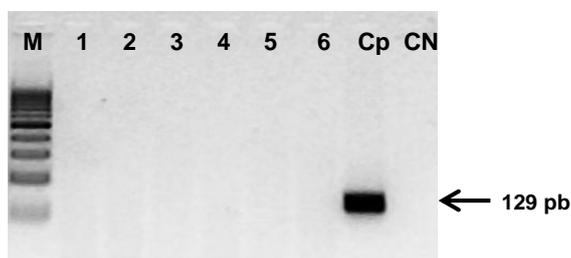


Figura 25: Electroforese em gel de agarose das amostras comerciais de alheiras de caça amplificadas por PCR usando os *primers* SCOT-F/SCOT-R específicos para a codorniz. M – Marcador de ADN 100 pb; Linha 1 - Amostra AL6; Linha 2 - Amostra AL8; Linha 3 – Amostra AL9; Linha 4 – Amostra AL11; Linha 5 – Amostra AL12; Linha 6 - Amostra AL14 ([extractos]= 50 ng/ μ L); Cp – 1% Codorniz ([extracto]= 10 ng/ μ L); CN – Controlo negativo.

4.2.6. Identificação de *Alectoris spp.* (Perdiz)

A perdiz, considerada como ave de caça, e rotulada em algumas das amostras de alheiras de caça foi alvo de estudo no presente trabalho.

Analisando a tabela 19, verifica-se que a pureza dos extractos de ADN das misturas padrão perdiz/porco foi elevada (em média 1,8) e que os rendimentos obtidos variaram entre 222,3 e 451,3 ng/ μ L. Pode assim concluir-se que o método de extracção permitiu a obtenção de ADN com elevada pureza e concentração.

Tabela 19: Concentração e pureza dos extractos de ADN obtidos a partir das misturas padrão de perdiz/porco

Amostra	Concentração (ng/ μ L)	Pureza (A_{260}/A_{280})
Pz0	451,3	1,8
Pz01	280,7	1,8
Pz02	347,7	1,8
Pz03	282,7	1,8
Pz04	264,0	1,8
Pz05	222,3	1,7
Pz06	360,7	1,7
Pz07	322,3	1,8
Pz08	352,0	1,8

Na detecção de perdiz utilizaram-se os *primers* 12SALEC-F/12SALEC-R (tabela 7) propostos por Rojas et al. (2009a), os quais permitiram amplificação de fragmentos de 141 pb. Os componentes utilizados na mistura da PCR e as condições de temperatura e tempo utilizados encontram-se descritos nas tabelas 8 e 9, respectivamente. As condições da técnica de PCR foram optimizadas com as misturas binárias de perdiz/porco de forma a permitir um nível de detecção de 0,01% de perdiz, como se pode verificar na figura 26. O limite de detecção atingido foi superior ao obtido por Rojas et al. (2009a) que detectou 0,1% de perdiz por PCR específica.

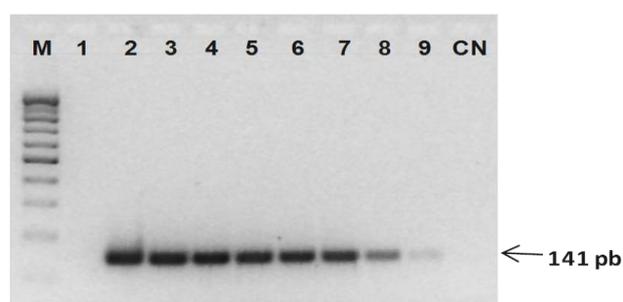


Figura 26: Electroforese em gel de agarose dos padrões de perdiz em porco amplificados por PCR usando os *primers* 12SALEC-F/12SALEC-R específicos para a perdiz. M – Marcador de ADN 100 pb; Linhas 1 a 9 – 0%, 20%, 10%, 5%, 2,5%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,01% de perdiz ([extractos]= 10 ng/ μ L); CN – Controlo negativo.

A especificidade dos *primers* 12SALEC-F/12SALEC-R foi avaliada com as especiarias e pão, vulgarmente utilizados no fabrico de alheiras de caça (figura 27). Verifica-se apenas uma banda de intensidade forte na linha 12, correspondente a 1% de perdiz, não ocorrendo qualquer amplificação nos restantes ingredientes (linhas 1 a 11).

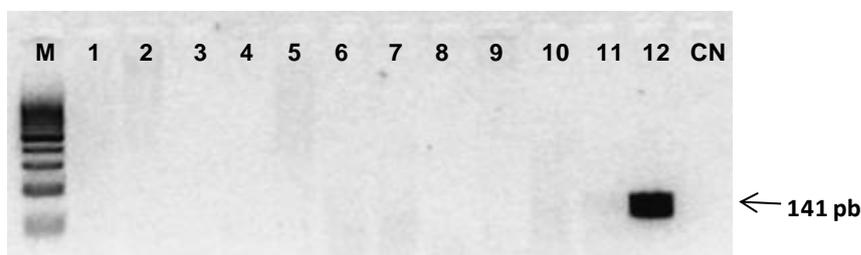


Figura 27: Electroforese em gel de agarose da especificidade dos *primers* 12SALEC-F/12SALEC-R nas especiarias e pão. M – Marcador de ADN 100 pb; Linha 1 – Cebola; Linha 2 – Alho; Linha 3 – Salsa; Linha 4 – Pimenta Branca; Linha 5 – Louro; Linha 6 – Pimentão-doce; Linha 7 – Piri-piri; Linha 8 – Soja; Linha 9 – Milho; Linha 10 – Pão de trigo; Linha 11 – Pão de centeio ([extractos]= 50 ng/ μ L); Linha 12 – 1% Perdiz ([extracto]= 10 ng/ μ L); CN – Controlo negativo.

Na figura 28 apresenta-se a aplicação da técnica de PCR específica para a perdiz nas alheiras comerciais. Com base nos resultados de amplificação e atendendo à rotulagem de cada alheira de caça presente na tabela 3, das amostras que rotulavam perdiz (amostras AL1, AL4, AL5, AL14 e AL15 – linhas 1, 4, 5, 14 e 15) apenas foi obtida uma banda de intensidade moderada para a amostra AL4, não ocorrendo qualquer amplificação para as restantes amostras.

Pela análise dos resultados para a detecção de perdiz pode-se concluir que quatro amostras comerciais de alheiras de caça não se encontravam em conformidade com a rotulagem, já que apenas uma das cinco amostras que indicavam a presença de perdiz mostrou resultado positivo. Tal facto pode apontar para uma possível substituição desta espécie, de valor económico mais elevado, por uma espécie de menor valor.

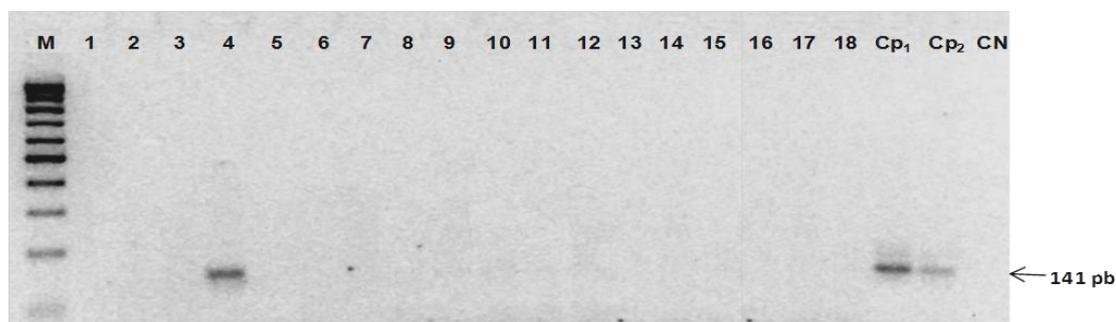


Figura 28: Electroforese em gel de agarose das amostras comerciais de alheiras de caça amplificadas por PCR usando os *primers* 12SALEC-F/12SALEC-R específicos para a perdiz. M – Marcador de ADN 100 pb; Linhas 1 a 18 – amostras AL1 a AL18 ([extractos]= 50 ng/ μ L); Cp1 – 1% perdiz; Cp2 – 0,1% perdiz ([extractos]= 10 ng/ μ L); CN – Controlo negativo.

4.2.7. Identificação de *Anas platyrhynchos* (Pato)

O pato foi outra espécie analisada neste trabalho por ser utilizada na preparação de alheiras de caça, podendo ser considerado como uma espécie de caça.

Analisando os valores da tabela 20, verifica-se que a pureza dos extractos de ADN das misturas padrão pato/porco foi elevada (em média 1,8) e que os rendimentos obtidos variaram entre 216,3 e 343,0 ng/μL. Pode assim concluir-se que o método de extracção permitiu obter ADN com pureza e concentração elevadas.

Tabela 20: Concentração e pureza dos extractos de ADN obtidos a partir das misturas padrão de pato/porco

Amostra	Concentração (ng/μL)	Pureza (A_{260}/A_{280})
DK0	216,3	1,7
DK01	312,7	1,9
DK02	343,0	1,8
DK03	275,0	1,7
DK04	258,3	1,8
DK05	223,3	1,9
DK06	249,0	1,6
DK07	267,3	1,7
DK08	241,7	1,7

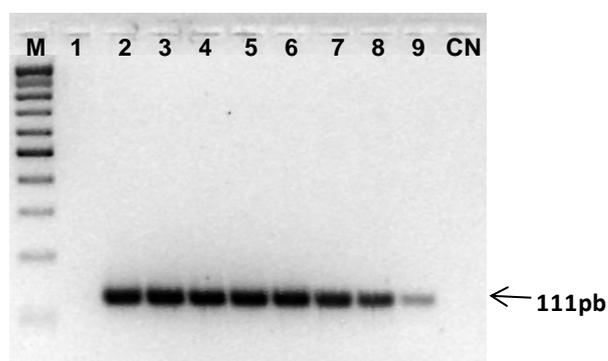


Figura 29: Electroforese em gel de agarose dos padrões de pato em porco amplificados por PCR usando os *primers* Duk-F/Duk-R específicos para o pato. M – Marcador de ADN 100 pb; Linhas 1 a 9 – 0%, 20%, 10%, 5%, 2,5%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,01% de pato ([extractos]= 10 ng/μL); CN – Controlo negativo.

Na detecção de pato utilizaram-se os *primers* Duk-F/Duk-R (tabela 7) desenhados no presente trabalho com alvo no gene mitocondrial do *cytb* para originar fragmentos de 111 pb. Os componentes utilizados na PCR e as condições de temperatura e tempo utilizados encontram-se descritos nas tabelas 8 e 9, respectivamente. Os resultados da optimização da nova técnica de PCR proposta para a detecção de pato permitiram um nível de detecção de 0,01% de pato, como se pode evidenciar através da figura 29. O limite de detecção atingido foi superior ao obtido por Nau et al. (2009) que detectou 0,1% de pato por PCR

específica e por Martín et al. (2007), que detectou igualmente 0,1% de pato por PCR em tempo real.

Sendo os *primers* Duk-F/Duk-R propostos pela primeira vez neste trabalho, procedeu-se à avaliação da sua reactividade com todas as espécies animais em estudo, de forma a verificar a sua especificidade (figura 30). Verifica-se apenas uma banda forte na linha 2, correspondente a 100% pato, não ocorrendo qualquer amplificação nas outras espécies.



Figura 30: Electroforese em gel de agarose da reactividade dos *primers* Duk-F/Duk-R com todas as espécies. M – Marcador de ADN 100 pb; Linha 1 – Javali; Linha 2 – Pato; Linha 3 – Perdiz; Linha 4 – Lebre; Linha 5 – Codorniz; Linha 6 – Coelho; Linha 7 – Faisão; Linha 8 – Veado; Linha 9 – Coelho selvagem; Linha 10 – Vaca; Linha 11 – Galinha; Linha 12 – Peru; Linha 13 – Porco ([extractos]= 10 ng/ μ L); CN – Controlo negativo.

A especificidade dos *primers* Duk-F/Duk-R foi também avaliada com as especiarias e pão, vulgarmente incluídos nas alheiras de caça (figura 31). Verifica-se uma banda de intensidade média na linha 12, correspondente a 1% de pato, não ocorrendo qualquer amplificação para os restantes ingredientes (linhas 1 a 11). Pode assim, concluir-se que os *primers* propostos são específicos para pato sem reactividade para qualquer outro ingrediente utilizado na preparação das alheiras de caça.

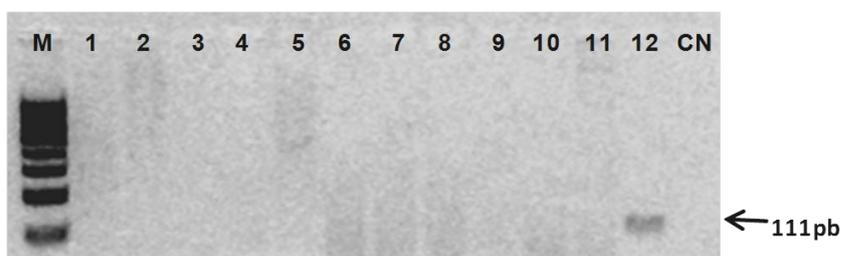


Figura 31: Electroforese em gel de agarose da especificidade dos *primers* Duk-F/Duk-R nas especiarias e pão. M – Marcador de ADN 100 pb; Linha 1 – Cebola; Linha 2 – Alho; Linha 3 – Salsa; Linha 4 – Pimenta Branca; Linha 5 – Louro; Linha 6 – Pimentão-doce; Linha 7 – Piri-piri; Linha 8 – Soja; Linha 9 – Milho; Linha 10 – Pão de trigo; Linha 11 – Pão de centeio ([extractos]= 50 ng/ μ L); Linha 12 – 1% Pato ([extractos]= 10 ng/ μ L); CN – Controlo negativo.

Na figura 32 apresentam-se os resultados da aplicação na nova técnica de PCR para a detecção de pato em alheiras comerciais. Os resultados mostram que as cinco amostras AL1, AL4, AL5, AL10 e AL18 amplificaram positivamente para o pato, conforme seria de

esperar de acordo com a rotulagem. Porém, as amostras AL13, AL14 e AL15, que também declaravam pato na rotulagem não produziram o fragmento esperado. As restantes amostras que não rotulavam pato ou que não discriminavam as espécies (AL8, AL9, AL11 e AL12) foram também negativas para a presença de pato.

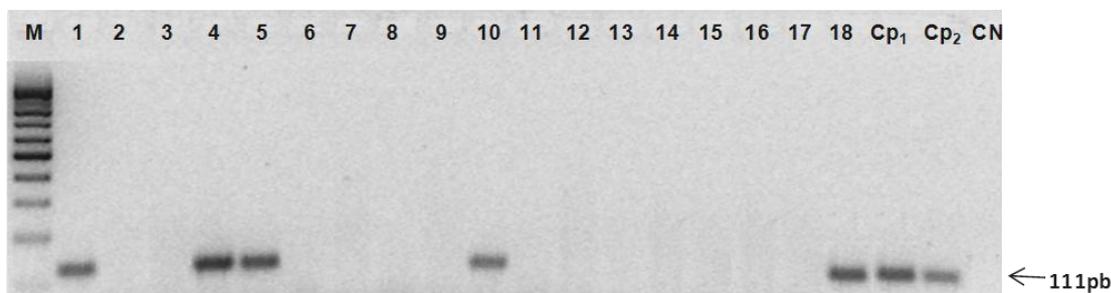


Figura 32: Electroforese em gel de agarose das amostras comerciais de alheiras de caça amplificadas por PCR usando os *primers* Duk-F/Duk-R específicos para o pato. M – Marcador de ADN 100 pb; Linhas 1 a 18 – amostras AL1 a AL18 ([extractos]= 50 ng/ μ L); Cp₁ – 1% pato; Cp₂ – 0,1% pato ([extractos]= 10 ng/ μ L); CN – Controlo negativo.

Pela análise dos resultados para a detecção de pato pode-se inferir que três amostras (AL13, AL14 e AL15) de alheiras de caça não se encontram em conformidade com a rotulagem, já que não foi detectada a presença de pato declarada na rotulagem. Tal facto pode apontar para uma possível substituição desta espécie, de valor económico mais elevado, por uma espécie de menor valor.

4.2.8. Identificação de *Oryctolagus cuniculus* (Coelho)

Sendo a carne de coelho utilizada na preparação de alheiras de caça, podendo ser considerada espécie de caça, foi objecto de estudo no presente trabalho.

Como se pode verificar pela análise da tabela 21, a pureza dos extractos de ADN das misturas padrão coelho/porco foi em média de 1,6, o que indica que o grau de pureza das amostras é adequado para PCR. Atendendo aos valores obtidos para a concentração, estes variaram entre 215,7 e 313,0 ng/ μ L, mostrando que o método *Wizard* permitiu a obtenção de extractos com elevado rendimento e pureza adequada.

Na detecção de coelho utilizaram-se os *primers* 12SpRab-F/12SpRab-R (tabela 7) propostos por Martín et al. (2009), os quais originaram fragmentos de 110 pb. Os componentes utilizados para a amplificação por PCR e as condições de temperatura e tempo encontram-se descritos nas tabelas 8 e 9, respectivamente. O resultado da optimização da técnica de PCR para a detecção de coelho permitiu um nível de detecção de 0,01% de coelho, como se pode evidenciar através da figura 33. O limite de detecção

atingido foi superior aos obtidos por Martín et al. (2009) e Walker et al. (2004), que detectaram 0,1% e 1% de coelho por PCR específica e PCR quantitativa, respectivamente.

Tabela 21: Concentração e pureza dos extractos de ADN obtidos a partir das misturas padrão de coelho/porco

Amostra	Concentração (ng/ μ L)	Pureza (A_{260}/A_{280})
Rab0	229,0	1,5
Rab01	234,0	1,5
Rab02	268,3	1,6
Rab03	313,0	1,8
Rab04	215,7	1,6
Rab05	242,3	1,6
Rab06	237,0	1,6
Rab07	243,0	1,7
Rab08	249,7	1,7

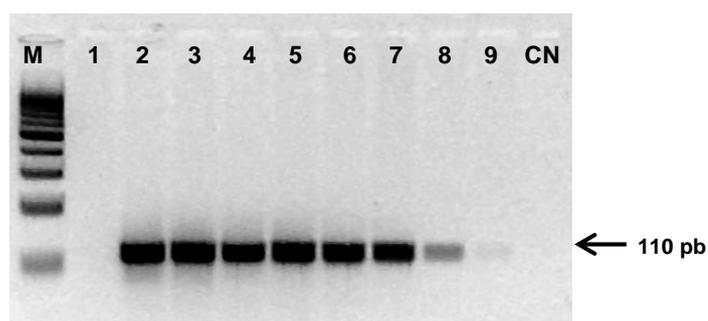


Figura 33: Electroforese em gel de agarose dos padrões de coelho em porco amplificados por PCR usando os *primers* 12SpRab-F/12SpRab-R específicos para o coelho. M – Marcador de ADN 100 pb; Linhas 1 a 9 – 0%, 20%, 10%, 5%, 2,5%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,01% de coelho ([extractos]= 20 ng/ μ L); CN – Controlo negativo.

A especificidade dos *primers* 12SpRab-F/12SpRab-R foi avaliada com as especiarias e pão, vulgarmente incluídos nas alheiras de caça (figura 34). Verifica-se uma banda de intensidade média na linha 12, correspondente a 1% de coelho, não ocorrendo qualquer amplificação para os restantes ingredientes (linhas 1 a 11).

A técnica de PCR otimizada para a detecção específica de coelho foi aplicada nas alheiras comerciais. Atendendo aos resultados da figura 35, apenas as amostras AL4, AL5, AL10 e AL18 amplificaram positivamente para a presença de coelho. Tendo como base a informação rotulada nas alheiras de caça (tabela 3), as amostras AL1, AL2, AL3, AL13, AL14 e AL15, (linhas 1, 2, 3, 13, 14 e 15) indicavam coelho como ingrediente mas não apresentaram qualquer amplificação por PCR. As restantes amostras que não rotulavam coelho ou não discriminavam a espécie foram também negativas para a presença de coelho.

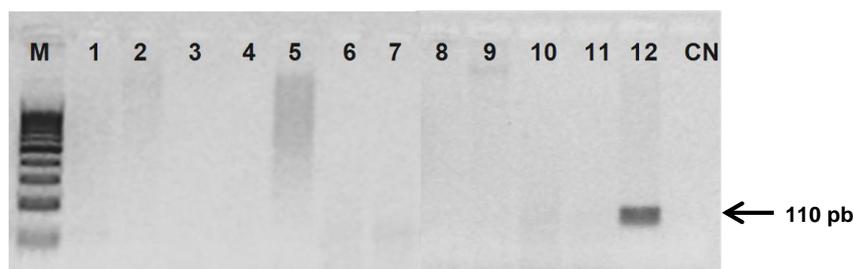


Figura 34: Electroforese em gel de agarose da especificidade dos *primers* 12SpRab-F/12SpRab-R nas especiarias e pão. M – Marcador de ADN 100 pb; Linha 1 – Cebola; Linha 2 – Alho; Linha 3 – Salsa; Linha 4 – Pimenta branca; Linha 5 – Louro; Linha 6 – Pimentão-doce; Linha 7 – Piri-piri; Linha 8 – Soja; Linha 9 – Milho; Linha 10 – Pão de trigo; Linha 11 – Pão de centeio ([extractos]= 50 ng/ μ L); Linha 12 – 1% Coelho ([extractos]= 20 ng/ μ L); CN – Controlo negativo.

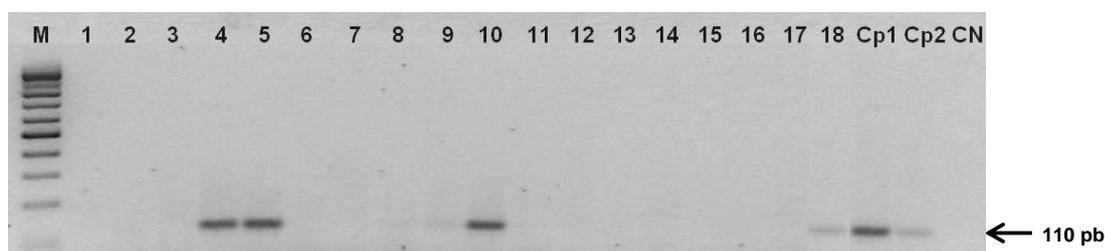


Figura 35: Electroforese em gel de agarose das amostras comerciais de alheiras de caça amplificadas por PCR usando os *primers* 12SpRab-F/12SpRab-R específicos para o coelho. M – Marcador de ADN 100 pb; Linhas 1 a 18 – amostras AL1 a AL18 ([extractos]= 50 ng/ μ L); Cp₁ – 1% coelho; Cp₂ – 0,1% coelho ([extractos]= 20 ng/ μ L); CN – Controlo negativo.

Pela análise dos resultados para a detecção de coelho, pode-se deduzir que seis das amostras que indicavam coelho não se apresentam em conformidade com a rotulagem. Tal facto pode apontar para uma possível substituição desta espécie, de valor económico mais elevado, por uma espécie de menor valor.

4.2.9. Identificação de *Cervus elaphus* (Veado)

O veado, considerado um animal de caça e rotulado em algumas amostras de alheiras de caça foi alvo de estudo no presente trabalho.

Como se pode verificar pela análise da tabela 22, a pureza dos extractos de ADN das misturas padrão veado/porco foi em média de 1,7, o que indica que o grau de pureza do ADN foi elevado. Atendendo aos valores obtidos para a concentração, estes variaram entre 279,3 e 364,0 ng/ μ L, considerando-se que o método *Wizard* permitiu a obtenção de extractos com elevado rendimento e pureza.

Na detecção de veado utilizaram-se os *primers* 12SCEQ-F/12SCEQ-R (tabela 7) propostos por Fajardo et al. (2008b), os quais originaram fragmentos de 134 pb. Os componentes utilizados na PCR e as condições de temperatura e tempo encontram-se descritos nas tabelas 8 e 9, respectivamente. A optimização da técnica de PCR para a detecção específica de veado permitiu um nível de detecção de 0,1% de veado, como se

pode evidenciar através da figura 36. O limite de detecção atingido foi inferior ao obtido por Fajardo et al. (2008b) que detectou 0,001% de veado por PCR em tempo real.

Tabela 22: Concentração e pureza dos extractos de ADN obtidos a partir das misturas padrão de veado/porco

Amostra	Concentração (ng/μL)	Pureza (A ₂₆₀ /A ₂₈₀)
RD0	285,0	1,7
RD01	302,7	1,5
RD02	331,0	1,7
RD03	333,7	1,7
RD04	323,0	1,7
RD05	306,0	1,7
RD06	364,0	1,7
RD07	290,3	1,7
RD08	279,3	1,7

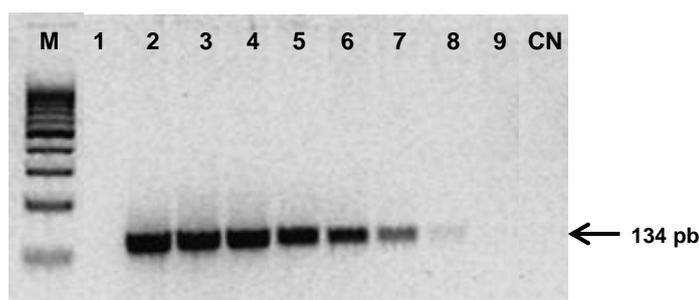


Figura 36: Electroforese em gel de agarose dos padrões de veado em porco amplificados por PCR usando os *primers* 12SCEQ-F/12SCEQ-R específicos para o veado. M – Marcador de ADN 100 pb; Linhas 1 a 9 – 0%, 20%, 10%, 5%, 2,5%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,01% de veado ([extractos]= 20 ng/μL); CN – Controlo negativo.

A especificidade dos *primers* 12SCEQ-F/12SCEQ-R foi avaliada com as especiarias e pão, habitualmente incluídos nas alheiras de caça (figura 37). Verifica-se uma banda de elevada intensidade na linha 12, correspondente a 1% de veado, não ocorrendo qualquer amplificação para os outros ingredientes (linhas 1 a 11).

A técnica de PCR otimizada para a detecção específica de veado foi aplicada nas alheiras comerciais. Atendendo aos resultados da figura 38, verifica-se que as amostras AL3, AL4, AL7 e AL16 (linhas 3, 4, 7 e 16) amplificaram positivamente para a presença de veado conforme descrito na rotulagem. Contudo, nas amostras AL2, AL13 e AL17 que também indicavam veado no rótulo, não foi detectada a presença desta espécie.

Relativamente às amostras AL4 e AL7 que apresentaram bandas de intensidade mais baixa, tal poderá indicar vestígios de ADN de veado. De notar que das amostras de alheiras de caça AL8, AL9, AL11 e AL12 que não possuíam qualquer tipo de rótulo, a amostra AL12

amplificou para a espécie em questão, apresentando uma banda de elevada intensidade. A amostra AL14 possui uma banda de intensidade média indicando a presença de ADN de veado (é indicado no rótulo “entre outras carnes de caça”).

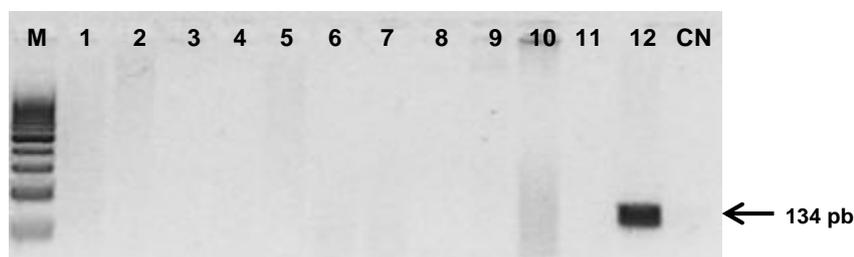


Figura 37: Electroforese em gel de agarose da especificidade dos *primers* 12SCEQ-F/12SCEQ-R nas especiarias e pão. M – Marcador de ADN 100 pb; Linha 1 – Cebola; Linha 2 – Alho; Linha 3 – Salsa; Linha 4 – Pimenta Branca; Linha 5 – Louro; Linha 6 – Pimentão-doce; Linha 7 – Piripiri; Linha 8 – Soja; Linha 9 – Milho; Linha 10 – Pão de trigo; Linha 11 – Pão de centeio ([extractos]= 50 ng/μL); Linha 12 – 1% Veado ([extractos]= 20 ng/μL); CN – Controlo negativo.

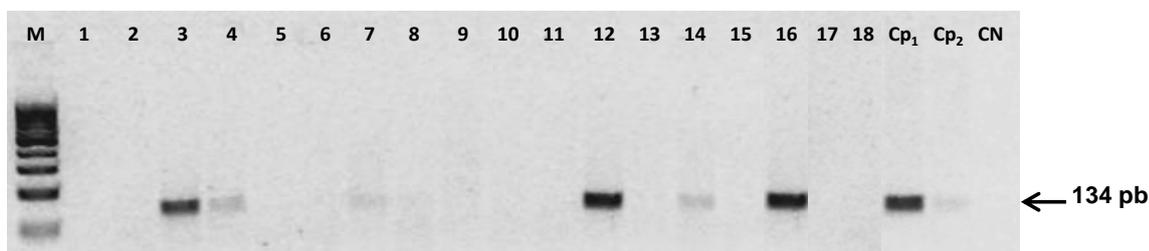


Figura 38: Electroforese em gel de agarose das amostras comerciais de alheiras de caça amplificadas por PCR usando os *primers* 12SCEQ-F/12SCEQ-R específicos para o veado. M – Marcador de ADN 100 pb; Linhas 1 a 18 – amostras AL1 a AL18 ([extractos]= 50 ng/μL); Cp₁ – 1% veado; Cp₂ – 0,1% veado ([extractos]= 20 ng/μL); CN – Controlo negativo.

Pela análise dos resultados para a detecção de veado pode-se concluir que três das amostras (AL2, AL13, e AL17) que rotulavam veado não se encontravam em conformidade com a rotulagem. Tal facto pode apontar para uma possível substituição desta espécie, de valor económico mais elevado, por uma espécie de menor valor. No entanto, a amostra AL12 e AL14, sem indicarem a presença da espécie, obtiveram um resultado positivo, que não deixa de estar concordante com a designação de alheira de caça.

4.2.10. Identificação de *Bos taurus* (Vaca)

Sendo a carne de vaca um dos ingredientes utilizados na produção de alheiras, apesar de não ser uma espécie de caça foi também objecto de estudo neste trabalho.

Os resultados da avaliação dos extractos da tabela 23 mostram que a pureza do ADN proveniente das misturas padrão vaca/porco foi elevada (em média 1,8) e que os rendimentos de ADN obtidos variaram entre 179,0 e 283,7 ng/μL. Pode assim concluir-se que o método de extracção *Wizard* permitiu obter extractos com elevada pureza e concentração.

Tabela 23: Concentração e pureza dos extractos de ADN obtidos a partir das misturas padrão de vaca/porco

Amostra	Concentração (ng/ μ L)	Pureza (A_{260}/A_{280})
Cw0	283,7	1,6
Cw01	212,7	1,8
Cw02	179,0	1,8
Cw03	233,7	1,7
Cw04	205,3	1,7
Cw05	245,7	1,8
Cw06	275,7	2,1
Cw07	238,7	1,8
Cw08	226,7	1,8

Para a detecção de vaca desenharam-se novos *primers* Bos-F/Bos-R (tabela 7) com alvo no gene mitocondrial do *cytb* de forma a produzirem um fragmento específico de 90 pb. Os componentes da reacção e os respectivos programas de temperatura e tempo utilizados encontram-se descritos nas tabelas 8 e 9, respectivamente. O resultado da optimização da nova técnica de PCR permitiu um nível de detecção de 0,01% de vaca (figura 39). Comparando com outros resultados da literatura, verifica-se que o limite de detecção atingido foi semelhante ao obtido por Dooley et al. (2004) que detectou 0,012% de vaca por PCR em tempo real, e inferior ao obtido por Walker et al. (2003) que conseguiram detectar 0,002% e 0,005% por PCR em tempo real e PCR convencional, respectivamente.

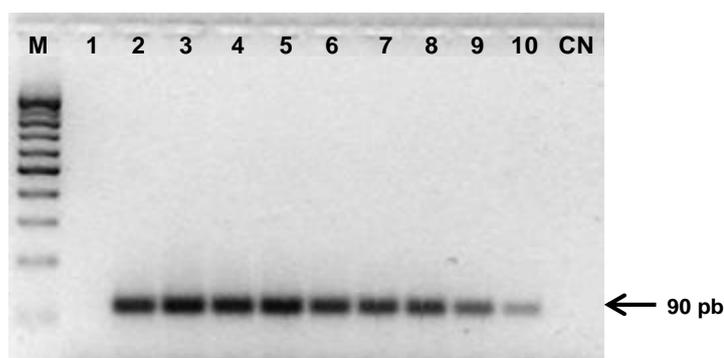


Figura 39: Electroforese em gel de agarose dos padrões de vaca em porco amplificados por PCR usando os *primers* Bos-F/Bos-R específicos para a vaca. M – Marcador de ADN 100 pb; Linhas 1 a 10 – 0%, 100%, 20%, 10%, 5%, 2,5%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,01% de vaca ([extractos]= 10 ng/ μ L); CN – Controlo negativo.

Sendo os *primers* Bos-F/Bos-R propostos pela primeira vez neste trabalho, procedeu-se à avaliação da sua reactividade com todas as espécies animais em estudo, de forma a verificar a sua especificidade (figura 40). Verifica-se apenas uma banda forte na linha 10, correspondente a 100% vaca, não ocorrendo qualquer amplificação nas outras espécies.

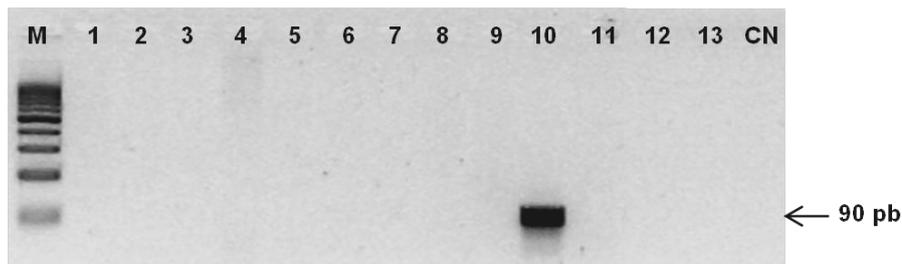


Figura 40: Electroforese em gel de agarose da reactividade dos *primers* Bos-F/Bos-R com todas as espécies. M – Marcador de ADN 100 pb; Linha 1 – Javali; Linha 2 – Pato; Linha 3 – Perdiz; Linha 4 – Lebre; Linha 5 – Codorniz; Linha 6 – Coelho; Linha 7 – Faisão; Linha 8 – Veado; Linha 9 – Coelho selvagem; Linha 10 – Vaca; Linha 11 – Galinha; Linha 12 – Peru; Linha 13 – Porco ([extractos]= 10 ng/ μ L); CN – Controlo negativo.

A especificidade dos *primers* Bos-F/Bos-R foi também avaliada com as especiarias e pão, vulgarmente incluídos nas alheiras de caça (figura 41). Verifica-se uma banda de elevada intensidade na linha 12, correspondente a 1% de vaca, não ocorrendo qualquer amplificação para os outros ingredientes testados (linhas 1 a 11).



Figura 41: Electroforese em gel de agarose da especificidade dos *primers* Bos-F/Bos-R nas especiarias e pão. M – Marcador de ADN 100 pb; Linha 1 – Cebola; Linha 2 – Alho; Linha 3 – Salsa; Linha 4 – Pimenta Branca; Linha 5 – Louro; Linha 6 – Pimentão-doce; Linha 7 – Piri-piri; Linha 8 – Soja; Linha 9 – Milho; Linha 10 – Pão de trigo; Linha 11 – Pão de centeio ([extractos]= 50 ng/ μ L); Linha 12 – 1% Vaca ([extractos]= 10 ng/ μ L); CN – Controlo negativo.

No que diz respeito à identificação de vaca, tal como no porco, foram feitas duas análises distintas, uma nas alheiras com tripa e outra após remoção da tripa, para verificar se a presença de vaca seria resultante da adição de carne ou da tripa.

Atendendo aos resultados da detecção de vaca nas alheiras de caça com tripa (figura 42), é notória a amplificação positiva da presença de vaca na grande maioria das amostras, apesar de apenas uma rotular a sua presença (amostra AL6 – linha 6). Das amostras AL8, AL9, AL11 e AL12 (linhas 8, 9, 11 e 12), comercializadas como alheiras de caça, mas sem indicação das espécies constituintes, verifica-se a presença de vaca nas amostras AL9, AL11 e AL12. A amostra AL11 apresenta uma banda de intensidade fraca o que poderá indicar vestígios de ADN de vaca. Das restantes amostras, verifica-se ainda que AL1, AL2, AL3, AL5, AL7, AL10, AL14, AL15, AL16 e AL17 não estão de acordo com a rotulagem, uma vez que amplificaram o fragmento esperado para a vaca, apresentando bandas de intensidade forte (com excepção da amostra AL3 que poderá indicar vestígios de ADN de vaca ou contaminação com ADN de vaca).

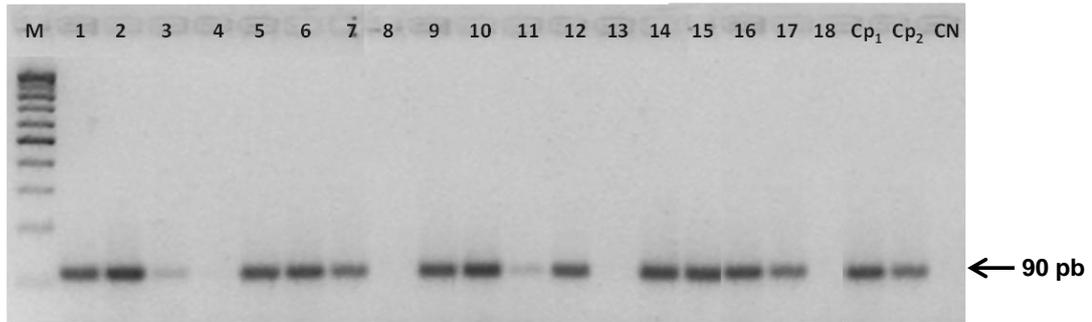


Figura 42: Electroforese em gel de agarose das amostras comerciais de alheiras de caça com tripa amplificadas por PCR usando os *primers* Bos-F/Bos-R específicos para a vaca. M – Marcador de ADN 100 pb; Linhas 1 a 18 – amostras AL1 a AL18 ([extractos]= 50 ng/μL); Cp₁ – 1% vaca; Cp₂ – 0,1% vaca ([extractos]= 10 ng/μL); CN – Controlo negativo.

Relativamente aos resultados das alheiras de caça sem tripa (figura 43), verifica-se que todas as amostras que tinham amplificado anteriormente para alheiras de caça com tripa, também apresentaram resultado positivo (alterando apenas a intensidade de algumas bandas), excepto a amostra AL3. Pode concluir-se que neste caso a tripa era de vaca e que não houve adição de carne de vaca nesta alheira.

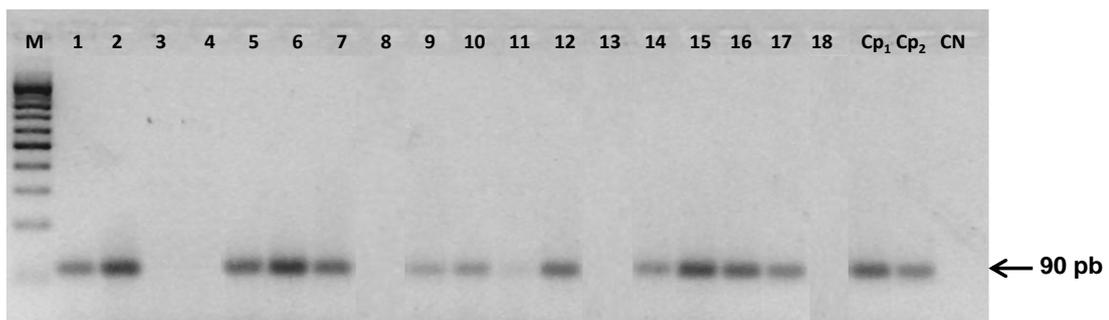


Figura 43: Electroforese em gel de agarose das amostras comerciais de alheiras de caça sem tripa amplificadas por PCR usando os *primers* Bos-F/Bos-R específicos para a vaca. M – Marcador de ADN 100 pb; Linhas 1 a 18 – amostras AL1 a AL18 ([extractos]= 50 ng/μL); Cp₁ – 1% vaca; Cp₂ – 0,1% vaca ([extractos]= 10 ng/μL); CN – Controlo negativo.

Pela análise dos resultados para a detecção de vaca pode-se concluir que a maioria das amostras de alheiras de caça não se encontram em conformidade com a rotulagem, uma vez que apenas a amostra AL6 indica a presença da espécie.

4.2.11. Identificação de *Lepus spp.* (Lebre)

A lebre foi outra espécie de caça analisada neste trabalho por ser utilizada na preparação de alheiras de caça.

Na tabela 24 apresentam-se os resultados da avaliação dos extractos preparados a partir das misturas binárias de carne de lebre em carne de porco.

Tabela 24: Concentração e pureza dos extractos de ADN obtidos a partir das misturas padrão de lebre/porco

Amostra	Concentração (ng/ μ L)	Pureza (A_{260}/A_{280})
LP0	299,7	1,8
LP01	351,0	1,7
LP02	236,0	1,8
LP03	267,0	1,4
LP04	227,0	1,7
LP05	230,3	1,6
LP06	282,7	1,7
LP07	285,7	1,5
LP08	214,3	1,6

Analisando os valores da tabela 24, verifica-se que a pureza dos extractos de ADN das misturas padrão lebre/porco foi adequada para PCR (em média 1,6), bem como os respectivos rendimentos de ADN que variaram entre 214,3 e 351,0 ng/ μ L. Pode assim concluir-se que o método de extracção *Wizard* permitiu obter extractos com pureza adequada e concentração elevada de ADN.

Para a detecção de lebre desenharam-se novos *primers* Lep-F/Lep-R (tabela 7) com alvo no gene mitocondrial *cytb*, de forma a produzirem um fragmento específico de 127 pb. Os componentes fundamentais da PCR e os respectivos programas de temperatura e tempo utilizados encontram-se descritos nas tabelas 8 e 9, respectivamente. A técnica de PCR otimizada para a detecção específica de lebre permitiu um nível de detecção de 0,01% de lebre (figura 44).

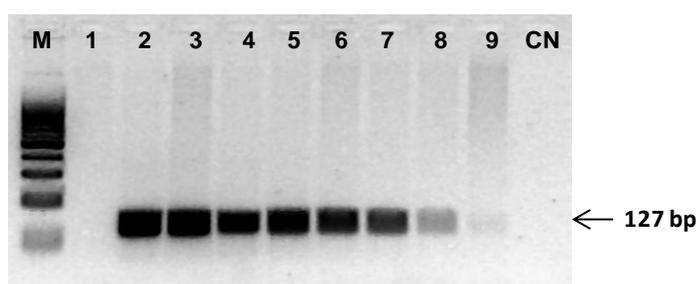


Figura 44: Electroforese em gel de agarose dos padrões de lebre em porco amplificados por PCR usando os *primers* Lep-F/Lep-R específicos para a lebre. M – Marcador de ADN 100 pb; Linhas 1 a 9 – 0%, 20%, 10%, 5%, 2,5%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,01% de lebre ([extractos]= 20 ng/ μ L); CN – Controlo negativo.

Sendo os *primers* Lep-F/Lep-R propostos pela primeira vez neste trabalho foi necessário proceder à avaliação da reactividade com todas as espécies em estudo, de forma a verificar a sua especificidade para a lebre. Nos resultados da figura 45, verifica-se uma banda forte na linha 4, correspondente a 100% lebre, não ocorrendo qualquer

amplificação nas outras linhas. Pode assim concluir-se que os *primers* são específicos para a espécie *Lepus spp.*

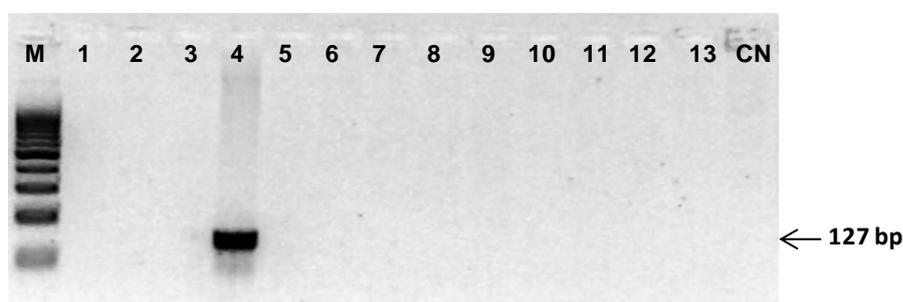


Figura 45: Electroforese em gel de agarose da reactividade dos *primers* Lep-F/Lep-R com todas as espécies. M – Marcador de ADN 100 pb; Linha 1 – Javali; Linha 2 – Pato; Linha 3 – Perdiz; Linha 4 – Lebre; Linha 5 – Codorniz; Linha 6 – Coelho; Linha 7 – Faisão; Linha 8 – Veado; Linha 9 – Coelho selvagem; Linha 10 – Vaca; Linha 11 – Galinha; Linha 12 – Peru; Linha 13 – Porco ([extractos]= 10 ng/ μ L); CN – Controlo negativo.

A especificidade dos *primers* Lep-F/Lep-R foi também avaliada com as especiarias e pão, habitualmente incluídos nas alheiras de caça (figura 46). Verifica-se que apenas ocorreu a amplificação na mistura contendo 1% de lebre, não ocorrendo qualquer amplificação nos restantes extractos (linhas 1 a 11). Pode assim, concluir-se que os *primers* propostos para a lebre não apresentaram reactividade para qualquer dos ingredientes utilizados na preparação de alheira de caça.

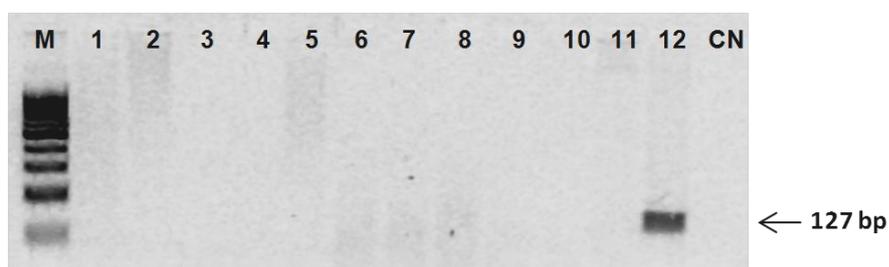


Figura 46: Electroforese em gel de agarose da especificidade dos *primers* Lep-F/Lep-R nas especiarias e pão. M – Marcador de ADN 100 pb; Linha 1 – Cebola; Linha 2 – Alho; Linha 3 – Salsa; Linha 4 – Pimenta Branca; Linha 5 – Louro; Linha 6 – Pimentão-doce; Linha 7 – Piri-piri; Linha 8 – Soja; Linha 9 – Milho; Linha 10 – Pão de trigo; Linha 11 – Pão de centeio ([extractos]= 50 ng/ μ L); Linha 12 – 1% Lebre ([extractos]= 20 ng/ μ L); CN – Controlo negativo.

Como referido anteriormente, de acordo com a literatura consultada até ao momento, a detecção de lebre foi proposta pela primeira vez neste trabalho. Os resultados de pesquisa de alinhamento com várias espécies (BLAST) confirmaram que o fragmento esperado de 127 pb foi 100% específico para *Lepus europaeus*, enquanto para outras espécies *Lepus* (*L. capensis*, *L. townsendii*, *L. yarkandensis*, *L. oiostolus*, *L. granatensis*, *L. brachyurus* e *L. hainurus*) mostraram uma identidade máxima de 94 a 96%. Como tal, de forma a proceder-se à identificação inequívoca do fragmento obtido para *Lepus europaeus*, recorreu-se à sequenciação. Os produtos de PCR foram purificados com colunas Cut&DNA (GRiSP

Solutions Research) para remover componentes de interferência, sendo depois enviados para uma instalação de investigação especializada para sequenciação (STABVIDA, Lisboa, Portugal).

Para confirmar a homologia do fragmento de *Lepus* obtido, o ADN sequenciado foi alinhado com a sequência esperada do gene do *cytb* (figura 47). Os resultados revelaram a ocorrência de sete não alinhamentos, dando uma identidade máxima de 95% em relação ao fragmento esperado de *L. europaeus*. Efectuado um novo BLAST para a sequência obtida, os resultados mostraram uma homologia de 100% para *L. granatensis*, que é uma espécie também encontrada em várias regiões de Portugal e Espanha (Alves et al., 2003). Com a utilização da ferramenta Primer-BLAST para os *primers* propostos, os resultados confirmaram o alinhamento completo para vários acessos de *cytb* de *L. granatensis*, *L. europaeus* e *L. capensis*. Muitas outras espécies de *Lepus* são também prováveis de detectar com os *primers* propostos, uma vez que várias outras sequências encontradas apresentam apenas o não alinhamento numa única base.

```

1 atgaccaaca ttcgtaaaac acacccccta ctaaaaattg ttaaccactc tctaatcgac
61 cttcccgccc cctcaaacat ctctgcctga tgaaccttcg gctctctatt gggattatgc
121 ctaataatcc agatcctaac tggcttattt ctagccatac actacacatc agacacagct
181 acagcattct cctcagttac acatatttgc cgagatgtaa actacggctg actcattcgt
241 tacttacacg ctaatggagc atcaatattc tttatttgct tatatataca tgtaggccgt
                                     ataca tgtaggccgt
301 ggaatctact acggctcata tacttaccta gaaacctgaa acattggcat tattctacta
   ggaatctact acggctcata tacttaccta gaaacctgaa atattggcat tattctacta
361 ttcgcagtaa tggctacagc attcataggc tacgtcctcc catgaggaca aatatcattc
   tttgcagtaa tagccacagc attcataggc tacgtcctcc catgaggaca aa
421 tgaggg

```

Figura 47: Alinhamento da sequência mitocondrial do gene *cytb* (AJ534882) com o fragmento obtido usando os *primers* Lep-R/Lep-F. Em itálico está representado o fragmento sequenciado. As letras a cinza representam as bases não alinhadas. A sublinhado estão representadas as regiões de hibridação dos *primers*.

Os resultados da aplicação da técnica de PCR proposta para a detecção de lebre nas amostras comerciais de alheiras de caça apresentam-se na figura 48. Verifica-se que nenhuma das amostras amplificou para o fragmento esperado, apesar da amostra AL14 (linha 14) indicar lebre no rótulo.

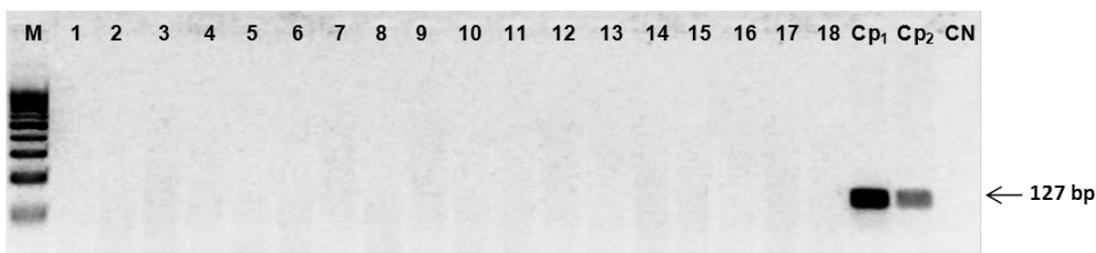


Figura 48: Electroforese em gel de agarose das amostras comerciais de alheiras de caça amplificadas por PCR usando os *primers* Lep-F/Lep-R específicos para a lebre. M – Marcador de ADN 100 pb; Linhas 1 a 18 – amostras AL1 a AL18 ([extractos]= 50 ng/ μ L); Cp₁ – 1% lebre; Cp₂ – 0,1% lebre ([extractos]= 20 ng/ μ L); CN – Controlo negativo.

Pela análise dos resultados para a detecção de lebre pode-se concluir que a amostra de alheira de caça que rotulava esta espécie não se encontra em conformidade com a rotulagem, já que não se observou qualquer amplificação por PCR. Tal facto pode apontar para uma possível substituição desta espécie, de valor económico mais elevado, por uma espécie de menor valor.

Adicionalmente à técnica proposta de PCR convencional para a detecção de lebre, desenvolveu-se uma outra metodologia para a detecção de lebre baseada em PCR em tempo real, com utilização do corante EvaGreen[®] e os *primers* Lep-F/Lep-R. A sensibilidade da PCR em tempo real foi determinada pela amplificação de um extracto de ADN de lebre de concentração 50 ng/ μ L diluído seriadamente (10x) (figura 49). As curvas de amplificação dos padrões mostraram que foi possível detectar lebre até um nível de 0,1 pg. O resultado obtido mostrou-se mais sensível relativamente ao obtido por PCR convencional (10 pg) (figura 50), mostrando a adequação dos *primers* propostos para PCR em tempo real.

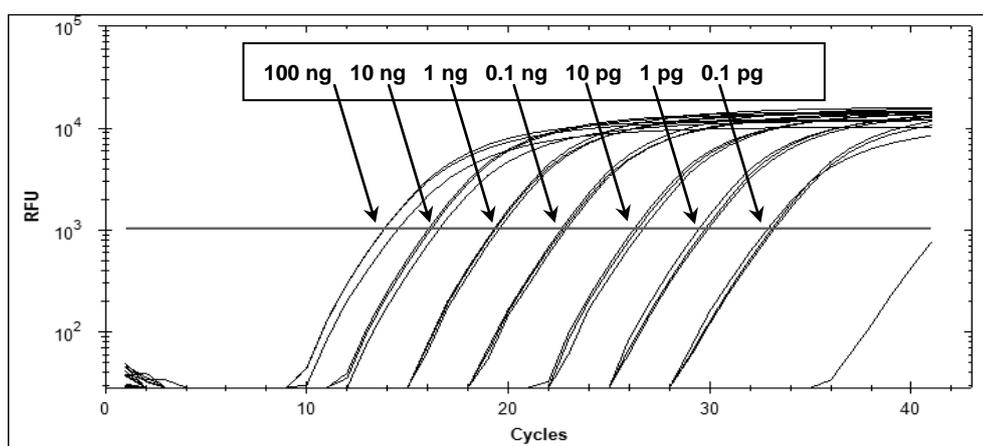


Figura 49: Curva de amplificação da diluição seriada do extracto de lebre amplificada por PCR em tempo real com EvaGreen[®], usando os *primers* Lep-F/Lep-R específicos para a lebre.

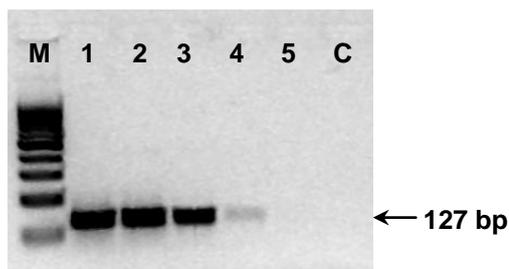


Figura 50: Electroforese em gel de agarose da diluição seriada do extracto de lebre amplificada por PCR usando os *primers* Lep-F/Lep-R específicos para a lebre. M – Marcador de ADN 100 pb; Linhas 1 a 5 – 10 ng, 1 ng, 0,1 ng, 10 pg, 1 pg, respectivamente; C – Controlo negativo.

A curva de calibração obtida a partir da amplificação dos extractos de lebre diluídos seriadamente mostrou que a eficiência da PCR foi muito próxima do valor ideal de 100%, correspondente a um declive de -3,247 e todos os dados foram altamente correlacionados ($R^2=0,996$). Os parâmetros obtidos mostraram a adequação da técnica de PCR em tempo real para medições quantitativas (figura 51).

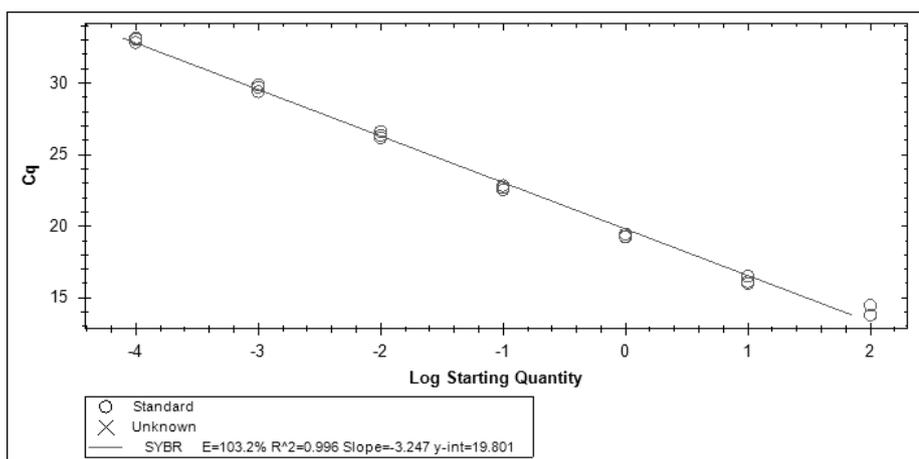


Figura 51: Curva de calibração da diluição seriada do extracto de lebre amplificada por PCR em tempo real com EvaGreen[®], usando os *primers* Lep-F/Lep-R específicos para a lebre.

De forma a verificar a especificidade dos produtos amplificados foi efectuada uma análise da curva de *melting*, após as curvas de amplificação em PCR em tempo real. Pela análise da figura 52, verifica-se que todos os produtos têm a mesma temperatura de *melting* de 78,2°C, sem mostrar qualquer evidência de dímeros de *primers* ou outros fragmentos diferentes.

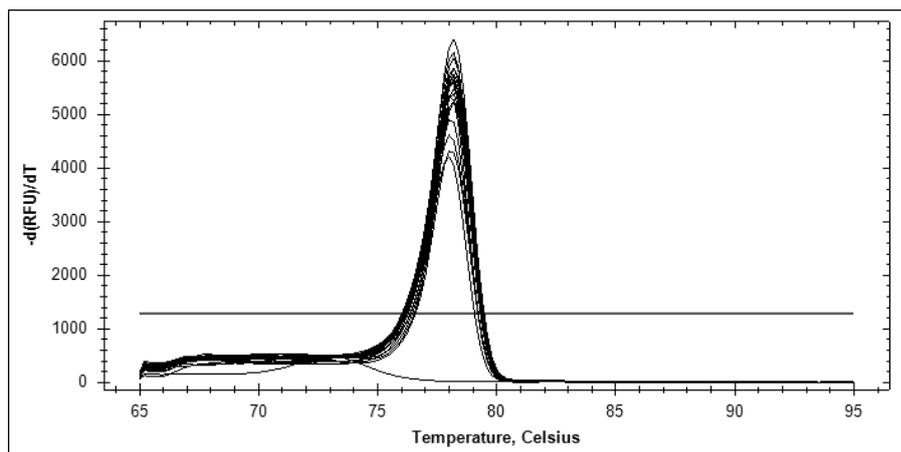


Figura 52: Curva de *melting* da diluição seriada do extracto de lebre amplificada por PCR em tempo real com EvaGreen®, usando os *primers* Lep-F/Lep-R específicos para a lebre.

4.3. Avaliação global da autenticidade de alheiras de caça

Na tabela 25 apresenta-se um resumo dos resultados obtidos para a detecção específica de cada espécie em amostras comerciais de alheiras de caça, por PCR convencional, de acordo com a rotulagem específica de cada alheira (tabela 3). Deste modo, verifica-se que existem várias inconsistências na rotulagem, nomeadamente a ausência de espécies de caça declaradas (faisão, perdiz, pato, coelho, veado e lebre) e a presença de carnes não rotuladas (vaca, galinha e peru).

Para a galinha, tendo em conta a rotulagem “carne de aves” e que quatro amostras foram comercializadas sem rotulagem, verifica-se que cinco amostras não estão de acordo com a rotulagem, indicando a presença da espécie galinha. Pode inferir-se a possível adição de galinha nas alheiras AL1, AL3, AL7, AL14 e AL15. No entanto, será necessário o desenvolvimento de uma nova metodologia de modo a aumentar a especificidade da técnica para a galinha.

No que diz respeito à detecção de peru, apenas uma amostra indica a presença de peru estando em concordância com a rotulagem. Além disso, verifica-se que duas amostras (AL9 e AL12) que não contêm rotulagem amplificaram positivamente para o peru e que uma amostra (AL14) não está de acordo com a rotulagem, indicando possivelmente a presença de peru. Pode deduzir-se que as amostras que rotulavam “carne de aves” apenas continham galinha. Porém, como no caso da galinha, será necessário desenvolver uma nova metodologia para a detecção de peru, de forma a aumentar a especificidade da técnica.

Relativamente à detecção de porco, verifica-se que está presente em todas as amostras, com excepção das amostras AL5 e AL6, que contém vestígios de ADN de porco (possível contaminação com ADN de porco). Tendo em conta que quatro amostras não possuem rótulo, pode concluir-se que é clara a presença de ADN de porco nestas amostras.

Por outro lado, as amostras AL13 e AL14 indicam no rótulo, a presença de gordura animal e gordura de porco, respectivamente, verificando-se bandas intensas, indicando claramente a presença de ADN de porco, não estando de acordo com a rotulagem.

Para o faisão verifica-se que as amostras comerciais de alheiras de caça não se encontram em conformidade com a rotulagem, já que as duas amostras (amostra AL2 e AL3) que rotulam faisão não continham esta espécie.

Pela análise dos resultados para a detecção de perdiz pode-se concluir que as amostras comerciais de alheiras de caça não se encontram em conformidade com a rotulagem, já que apenas uma (AL4) das cinco amostras que indicavam a presença de perdiz é que mostrou resultado positivo.

No que diz respeito à detecção de pato, das oito amostras que rotulavam esta espécie, três não se mostraram concordantes com a rotulagem.

Na detecção de coelho pode-se concluir que das dez amostras que rotulavam esta espécie, seis não estavam de acordo com a rotulagem, uma vez não continham ADN de coelho.

Relativamente à detecção de veado, pode-se concluir que as amostras comerciais de alheiras de caça não se encontram em conformidade com a rotulagem, já que três amostras (amostras AL2, AL13, e AL17) que rotulavam a presença de veado, de facto, não continham esta espécie. No entanto, a amostra AL12 e AL14, sem indicarem a presença desta espécie, obtiveram um resultado positivo, o que não deixa de estar concordante com a designação de alheira de caça.

Para a detecção de vaca, apenas uma alheira (AL6) indica a presença desta espécie, contudo foi detectada em mais onze alheiras. Pode-se concluir que houve adição desta espécie, sem no entanto o indicarem na rotulagem.

Pela análise dos resultados para a detecção de lebre pode-se concluir que a amostra de alheira de caça que rotulava esta espécie (AL14) não se encontrava em conformidade com a rotulagem, já que não se observou qualquer amplificação por PCR.

Pode-se concluir que a ausência de faisão, perdiz, pato, coelho, veado e lebre pode apontar para uma possível substituição destas espécies, de valor económico mais elevado, por uma espécie de menor valor.

Tabela 25: Compilação dos resultados obtidos por PCR convencional para a detecção das diferentes espécies em amostras comerciais de alheiras de caça

Alheiras de caça	Galinha		Peru		Porco		Faisão		Perdiz		Pato		Coelho		Veado		Vaca		Lebre	
	R	D	R	D	R	D	R	D	R	D	R	D	R	D	R	D	R	D	R	D
AL1		+++		-	X	++		-	X	-	X	++	X	-		-		+++		-
AL2		-		-	X	++	X	-		-		-	X	-	X	-		+++		-
AL3		+++		-	X	+++	X	-		-		-	X	-	X	+++		-		-
AL4	X	+++	X	+++	X	+++		-	X	++	X	+++	X	+++	X	++		-		-
AL5	X	+++		-	X	+		-	X	-	X	+++	X	+++		-		+++		-
AL6	X*	+++	X*	-	X	+		-		-		-		-		-	X	+++		-
AL7		+++		-	X	+++		-		-		-		-	X	+		+++		-
AL8 ^a		-		-		+++		-		-		-		-		-		-		-
AL9 ^a		+++		++		+++		-		-		-		-		-		++		-
AL10	X*	+++	X*	+	X	+++		-		-	X	++	X	+++		-		++		-
AL11 ^a		+++		-		+++		-		-		-		-		-		+		-
AL12 ^a		+++		++		+++		-		-		-		-		+++		+++		-
AL13 ^b	X	+++		-		+++		-		-	X	-	X	-	X	-		-		-
AL14		+++		++	X [#]	+++		-	X	-	X	-	X	-		++		++	X	-
AL15		+++		-	X	+++		-	X	-	X	-	X	-		-		+++		-
AL16		-		-	X	+++		-		-		-		-	X	+++		+++		-
AL17	X*	+++	X*	-	X	+++		-		-		-		-	X	-		+++		-
AL18	X*	+++	X*	-	X	+++		-		-	X	+++	X	++		-		-		-

5. Conclusões finais

A elaboração desta dissertação visou a avaliação da autenticidade de amostras comerciais de alheiras de caça. Foi possível verificar a conformidade da rotulagem das amostras utilizadas neste estudo por métodos de biologia molecular. Os extractos obtidos pelo método *Wizard* apresentaram, de um modo geral, elevada concentração e pureza. A metodologia por PCR qualitativa foi otimizada visando a identificação específica de cada espécie de carne (vaca, galinha, peru, pato, lebre, veado, perdiz, codorniz, porco, coelho e faisão) normalmente utilizadas no fabrico das típicas alheiras de caça. No caso da identificação das carnes de galinha, peru, vaca, lebre e pato foi necessário o desenho de novos *primers* com base nas sequências disponíveis no GenBank. Estas técnicas foram alvo de estudo mais pormenorizado com forma a avaliar as especificidades dos *primers* desenhados. De um modo global, todas as reacções foram específicas para a respectiva espécie, à excepção do peru e da galinha, que apresentaram reactividade cruzada com outras espécies.

As técnicas de PCR convencional mostraram-se adequadas para a detecção de baixas concentrações de carne cada uma das espécies. No caso das espécies veado e peru o limite de detecção obtido foi de 0,1%, valor este considerado suficientemente baixo para a avaliação da autenticidade. Para as restantes espécies o limite de detecção foi de 0,01% sendo, em alguns casos (galinha, faisão, codorniz, perdiz, pato e coelho), um limite inferior aos reportados pela literatura. Dada a ausência de informação relativamente à lebre, esta foi alvo de estudo mais detalhado, tendo sido possível estabelecer além do limite de detecção relativo de 0,01%, um limite de detecção absoluto de 10 pg por PCR convencional e 0,1 pg por PCR em tempo real.

A aplicação das técnicas de PCR convencional às amostras comerciais revelou-se efectiva na detecção de cada uma das espécies testadas. Das 18 alheiras de caça, 6 amostras rotuladas como contendo carnes de caça, não apresentaram resultados positivos para qualquer uma das espécies de caça verificadas, incluindo na sua composição apenas vaca, porco, galinha e peru. Das restantes 8 alheiras rotuladas, todas apresentam pelo menos uma das espécies de caça testadas (pato, perdiz, coelho, veado, faisão, codorniz ou lebre). É ainda importante referir que das 4 amostras sem rótulo, apenas 1 (AL12) amplificou positivamente para o veado, como única espécie de caça. Em resumo apenas 2 das amostras testadas (AL4 e AL18) estão em conformidade com a respectiva rotulagem. A amostra AL10 está de acordo com as indicações do rótulo quanto à presença de pato, coelho, porco e aves, no entanto esta amostra também foi positiva para a vaca, a qual não se encontra mencionada na alheira.

Em relação à especificidade da técnica proposta para a detecção de galinha, esta também permitiu a amplificação positiva do peru e do faisão, facto este que não era

esperado. O mesmo foi verificado pela técnica proposta para a detecção de peru, a qual também permitiu amplificar as carnes de perdiz e faisão. Apesar das duas técnicas evidenciarem alguma reactividade cruzada, estes resultados não invalidam a identificação da perdiz e do faisão, uma vez que a especificidade das técnicas propostas para estas espécies já tinha sido validada em estudos anteriores.

Quanto à detecção específica do peru e da galinha, deverão ser desenhados novos *primers* considerando sequências mais específicas para cada espécie, de forma a evitar potenciais reactividades cruzadas.

As técnicas desenvolvidas neste trabalho podem ter uma possível aplicação a nível industrial para a monitorização de diversos ingredientes em alimentos processados, dado serem técnicas de rápida execução e com uma relação custo/tempo relativamente aceitável. No entanto, é importante referir a relevância do desenvolvimento de metodologias simples e rápidas para atestar a autenticidade dos alimentos, de forma a preservar a qualidade e identidade dos produtos tradicionais.

Com este trabalho não se pretendeu apenas a detecção de possíveis adulterações em alheiras de caça, pretendeu-se também valorizar os produtores que apresentam produtos em conformidade com a rotulagem e sensibilizar todos os produtores, relativamente a boas práticas de fabrico e lealdade comercial.

6. Referências bibliográficas

- Aida, A.A.; Che Man, Y.B.; Wong, C.M.V.L.; Raha, A.R.; Son, R. (2005). Analysis of raw meat and fats of pigs using polymerase chain reaction for Halal authentication. *Meat Science* 69: 47-52.
- Alves, P.C.; Ferrand, N.; Suchentrunk, F.; Harris, D.J. (2003). Ancient introgression of *Lepus timidus* mtDNA into *L. granatensis* and *L. europaeus* in the Iberian Peninsula. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 27: 70-80.
- Anklam, E.; Battaglia, R. (2001). Food analysis and consumer protection. *Food Science and Technology* 12: 197-202.
- Arslan, A.; Ilhak, O.I.; Calicioglu, M. (2006). Effect of method of cooking on identification of heat processed beef using polymerase chain reaction (PCR) technique. *Meat Science* 72: 326-330.
- Asensio, L.; González, I.; García, T.; Martín, R. (2008). Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Food Control* 19: 1-8.
- Ballin, N.Z. (2010). Authentication of meat and meat products. *Meat Science* 86: 577-587.
- Bio-Rad, 2011. <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10014647A.pdf> (último acesso a 24-09-11).
- Bottero, M.T.; Dalmaso, A. (2010). Animal species identification in food products: Evolution of biomolecular methods. *The Veterinary Journal* 190: 34-38.
- Brodmann, P.D.; Niclolas, G.; Schaltenbrand, P.; Ilg, E.C. (2001). Identifying unknown game species: experience with nucleotide sequencing of the mitochondrial cytochrome b gene and a subsequent basic local alignment search tool search. *European Food Research and Technology* 212: 491-496.
- Broll, H. (2010). Polymerase Chain Reaction (Chapter 2). In Popping, B.; Diaz-Amigo, C.; Hoenicke, K. (Eds) *Molecular Biological and Immunological Techniques and Applications for Food Chemists*. John Wiley & Sons, Inc, New Jersey.
- Caderno de especificações da alheira de Mirandela. Versão submetida à consulta pública nacional – Julho 2010. Agrupamento gestor: Associação comercial e Industrial de Mirandela.
- Chen, Y.; Wu, Y.; Wang, J.; Xu, B.; Zhong, Z.; Xia, J. (2009). Identification of cervidae DNA in feedstuff using a real-time polymerase chain reaction method with the new fluorescence intercalating dye EvaGreen. *Journal of AOAC International* 92: 175-180.
- Dalmaso, A.; Fontanella, E.; Piatti, P.; Civera, T.; Rosati, S.; Bottero, M.T. (2004). A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs. *Molecular and Cellular Probes* 18: 81-87.
- Di Pinto, A.; Forte, V.T.; Conversano, M.C.; Tantillo, G.M. (2005). Duplex polymerase chain reaction for detection of pork meat in horse meat fresh sausages from Italian retail sources. *Food Control* 16: 391-394.
- Directiva 2001/101/CE da Comissão, de 26 de Novembro de 2001, que altera a Directiva 2000/13/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, relativa à aproximação das legislações dos Estados Membros respeitantes à rotulagem, apresentação e publicidade dos géneros alimentícios. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, 28-11-2001, L310, 19-21.

- Dooley, J.J.; Paine, K.E.; Garrett, S.D.; Brown, H.M. (2004). Detection of meat species using TaqMan real-time PCR assays. *Meat Science* 68: 431-438.
- Ecoguia – Município de Mirandela – Ambiente e Salubridade, 2011. <http://ecoguia.cm-mirandela.pt/index.php?oid=91> (último acesso a 03-08-11).
- Estatísticas Agrícolas de 2010, Instituto Nacional de Estatística, I.P., Edição 2011. http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_publicacoes&PUBLICACOESTipo=ea&PUBLICACOEScolecacao=107660&selTab=tab0&xlang=pt (último acesso a 03-08-11).
- Esteves, A.; Aymerich, T.; Garriga, M.; Patarata, L.; Fontes, M.C.; Martins, C. (2006). Tracing *Salmonella* in Alheira processing plants. *Journal of Applied Microbiology* 103: 1-10.
- Esteves, A.S.M.F. (2005). Perigos microbiológicos em alheira. Principais vias de contaminação por *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* e *Salmonella spp.* Tese de Doutoramento. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Vila Real.
- Fajardo, V.; González, I.; López-Calleja, I.; Martín, I.; Hernández, P.E.; García, T.; Martín, R. (2006). PCR-RFLP Authentication of meats from Red Deer (*Cervus elaphus*), Fallow Deer (*Dama dama*), Roe Deer (*Capreolus capreolus*), Cattle (*Bos taurus*), Sheep (*Ovis aries*), and Goat (*Capra hircus*). *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 54: 1144-1150.
- Fajardo, V.; González, I.; López-Calleja, I.; Martín, I.; Rojas, M.; García, T.; Hernández, P.E.; Martín, R. (2007b). PCR identification of meats from chamois (*Rupicapra rupicapra*), pyrenean ibex (*Capra pyrenaica*), and mouflon (*Ovis ammon*) targeting specific sequences from the mitochondrial D-loop region. *Meat Science* 76: 644-652.
- Fajardo, V.; González, I.; López-Calleja, I.; Martín, I.; Rojas, M.; Hernández, P.E.; García, T.; Martín, R. (2007a). Identification of meats from red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), and roe deer (*Capreolus capreolus*) using polymerase chain targeting specific sequences from the mitochondrial 12S rRNA gene. *Meat Science* 76: 234-240.
- Fajardo, V.; González, I.; Martín, I.; Rojas, M.; Hernández, P.E.; García, T.; Martín, R. (2008a). Differentiation of European wild boar (*Sus scrofa scrofa*) and domestic swine (*Sus scrofa domestica*) meats by PCR analysis targeting the mitochondrial D-loop and the nuclear melanocortin receptor 1 (MC1R) genes. *Meat Science* 78: 314-322.
- Fajardo, V.; González, I.; Martín, I.; Rojas, M.; Hernández, P.E.; García, T.; Martín, R. (2008b). Real-Time PCR for detection and quantification of red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), and roe deer (*Capreolus capreolus*) in meat mixtures. *Meat Science* 79: 289-298.
- Fajardo, V.; González, I.; Rojas, M.; García, T.; Martín, R. (2010). A review of current PCR-based methodologies for the authentication of meats from game animal species. *Food Science and Technology* 21: 408-421.
- Felício, M.T.S.; Ramalheira, R.; Ferreira, V.; Brandão, T.; Silva, J.; Hogg, T.; Teixeira, P. (2011). Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* from alheiras, traditional Portuguese sausage during cooking. *Food Control* 22: 1960-1964.
- Ferreira, V.; Barbosa, J.; Silva, J.; Felício, M.T.; Mena, C.; Hogg, T.; Gibbs, P.; Teixeira, P. (2007). Characterization of alheiras, traditional sausages produced in the North of Portugal, with respect to their microbiological safety. *Food Control* 18: 436-440.

- Ferreira, V.; Barbosa, J.; Vendeiro, S.; Mota, A.; Silva, F.; Monteiro, M.J.; Hogg, T.; Gibbs, P.; Teixeira, P. (2006). Chemical and microbiological characterization of alheira: a typical Portuguese fermented sausage with particular reference to factors relating to food safety. *Meat Science* 73: 570-575.
- Ghovvati, S.; Nassiri, M.R.; Mirhoseini, S.Z.; Moussavi, A.H.; Javadmanesh, A. (2009). Fraud identification in industrial meat products by multiplex PCR assay. *Food Control* 20: 696-699.
- Girish, P.S.; Anjaneyulu, A.S.R.; Viswas, K.N.; Anand, M.; Rajkumar, N.; Shivakumar, B.M.; Bhaskar, S. (2004). Sequence analysis of mitochondrial 12S rRNA gene can identify meat species. *Meat Science* 66: 551-556.
- Haunshi, S.; Basumatary, R.; Girish, P.S.; Doley, S.; Bardoloi, R.K.; Kumar, A. (2009). Identification of chicken, duck, pigeon and pig meat by species-specific markers of mitochondrial origin. *Meat Science* 83: 454-459.
- Hoffman, L.C.; Wiklund, E. (2006). Game and venison – meat for the modern consumer. *Meat Science* 74: 197-208.
- Holzhauser, T.; Stephan, O.; Vieths, S. (2006). Polymerase Chain Reaction (PCR) methods for the detection of allergenic foods (Chapter 7). In Koppelman, S.J., Hefle S.L. (Eds) *Detecting allergens in food*. Woodhead Publishing Limited, England.
- Ilhak, O.I.; Arslan, A. (2007). Identification of Meat Species by Polymerase Chain Reaction (PCR) Technique. *Journal of Veterinary and Animal Sciences* 31: 159-163.
- Kesmen, Z.; Gulluce, A.; Sahin, F.; Yetim, H. (2009). Identification of meat species by TaqMan-based real-time PCR assay. *Meat Science* 82: 444-449.
- Kocher, T.D.; Thomas, W.K.; Meyer, A.; Edwards, S.V.; Pääbo, S.; Villablanca, F.X.; Wilson, A.C. (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86: 6196-6200.
- Köppel, R.; Zimmerli, F.; Breitenmoser, A. (2009). Heptaplex real-time PCR for the identification and quantification of DNA from beef, pork, chicken, turkey, horse meat, sheep (mutton) and goat. *European Food Research and Technology* 230: 125-133.
- La Neve, F.; Civera, T.; Mucci, N.; Bottero, M.T. (2008). Authentication of meat from game and domestic species by SNaPshot minisequencing analysis. *Meat Science* 80: 216-224.
- Lago, F.C.; Herrero, B.; Madriñán, M.; Vieites, J.M.; Espiñeira, M. (2011). Authentication of species in meat products by genetic techniques. *European Food Research and Technology* 232: 509-515.
- Lanzilao, I.; Burgalassi, F.; Fancelli, S.; Settimelli, M.; Fani, R. (2005). Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Mitochondrial *cytb* Gene from Species of Dairy Interest. *Journal of AOAC International* 88: 128-135.
- Laube, I. (2010). Meat (Chapter 7). In Popping, B.; Diaz-Amigo, C.; Hoenicke, K. (Eds) *Molecular Biological and Immunological Techniques and Applications for Food Chemists*. John Wiley & Sons, Inc, New Jersey.
- Lenstra, J.A. (2009). Detection of Adulteration: Identification of Animal Species (Chapter 27). *Taylor & Francis Group, LLC*, 601-617.

- Levin, R.E. (2004). The Application of Real-Time PCR to Food and Agricultural Systems. A review. *Food Biotechnology* 18: 97-133.
- Lockley, A.K.; Bardsley, R.G. (2000). DNA-based methods for food authentication. *Food Science & Technology* 11: 67-77.
- Macedo-Silva, A.; Barbosa, S.F.C.; Alkmin, M.G.A.; Vaz, A.J.; Shimokomaki, M.; Tenuta-Filho, A. (2000). Hamburger meat identification by dot-ELISA. *Meat Science* 56: 189-192.
- Mafra, I.; Ferreira, I.M.P.L.V.O.; Oliveira, M.B.P.P. (2008b). Food authentication by PCR-based methods. *European Food Research and Technology* 227: 649-665.
- Mafra, I.; Oliveira, M.B.P.P. (2005) Organismos geneticamente modificados e alimentos derivados: II. Métodos de detecção e quantificação. *Alimentação Humana* 11: 71-89.
- Mafra, I.; Silva, S.A.; Moreira, E.J.M.O.; Silva, C.S.F.; Oliveira, M.B.P.P. (2008a). Comparative study of DNA extraction methods for soybean derived food products. *Food Control* 19: 1183-1190.
- Mamuris, Z.; Sfougaris, A.L.; Stamatis, C. (2001). Genetic structure of Greek Brown hare (*Lepus europaeus*) populations as revealed by mtDNA RFLP-PCR analysis: implications for conserving genetic diversity. *Biological Conservation* 101: 187-196.
- Martín, I.; García, T.; Fajardo, V.; López-Calleja, I.; Rojas, M.; Hernández, P.E.; González, I.; Martín, R. (2007). Mitochondrial markers for the detection of four duck species and the specific identification of Muscovy duck in meat mixtures using the polymerase chain reaction. *Meat Science* 76: 721-729.
- Martín, I.; García, T.; Fajardo, V.; Rojas, M.; Pegels, N.; Hernández, P.E.; González, I.; Martín, R. (2009). Polymerase chain reaction detection of rabbit DNA in food and animal feed. *World Rabbit Science* 17: 27-34.
- Martinez, I.; Yman, I.M. (1998). Species identification in meat products by RAPD analysis. *Food Research International* 31: 459-466.
- Martins, C.; Fernandes, L.M. (1990). Chemical characteristics of "Alheira" – A traditional portuguese sausage. 36th International Congress of meat science and technology. Proceedings Vol III. Havana. Cuba.
- Matsunaga, T.; Chikuni, K.; Tanabe, R.; Muroya, S.; Shibata, K.; Yamada, J.; Shinmura, Y. (1999). A quick and simple method for identification of meat species and meat products by PCR assay. *Meat Science* 51: 143-148.
- Mayer, W.; Hochegger, R. (2011). Discrimination of two alleles of the melanocortin receptor 1 gene to discern European wild boar (*Sus scrofa scrofa*) and domestic pig (*Sus scrofa domestica*) in meat products by real-time PCR. *European Food Research and Technology* 232: 687-692.
- Meyer, R.; Candrian, U. (1996). PCR-based DNA Analysis for the Identification and Characterization of Food Components. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 29: 1-9.
- Meyer, R.; Candrian, U.; Lüthy, J. (1994). Detection of Pork in Heated Meat Products by Polymerase Chain Reaction. *Journal of AOAC International*, 77: 617-622.

- Ministério da Agricultura, Mar, Ambiente e Ordenamento do Território. Gabinete de Planeamento e Políticas. Produtos DOP, IGP e ETG. http://www.gpp.pt/valor/DOP_IGP_ETG.html (último acesso a 20-10-11).
- Montiel-Sosa, F.F.F.; Ruiz-Pesini, E.; Montoya, J.; Roncalé, P.; López-Pérez, M.; Pérez-Martos, A. (2000). Direct and Highly Species-Specific Detection of Pork Meat and Fat in Meat Products by PCR Amplification of Mitochondrial DNA. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 48: 2829-2832.
- Montowska, M.; Pospiech, E. (2007). Species identification of meat by electroforetic methods. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria* 6 (1): 5-16.
- Montowska, M.; Pospiech, E. (2011). Authenticity determination of meat and meat products on the protein and DNA basis. *Food Reviews International* 27: 84-100.
- Murugaiah, C.; Noor, Z.M.; Mastakim, M.; Bilung, L.M.; Selamat, J.J.; Radu, S. (2009). Meat species identification and Halal authentication analysis using mitochondrial DNA. *Meat Science* 83: 57-61.
- Nau, F.; Désert, C.; Cochet, M.F.; Pasco, M.; Jan, S.; Baron, F.; Lagarrigue, S.; Guérin-Dubiard, C. (2009). Detection of Turkey, Duck, and Guinea Fowl egg in hen egg products by species-specific PCR. *Food Analytical Methods* 2: 231-238.
- Partis, L.; Croan, D.; Guo, Z.; Clark, R.; Coldham, T.; Murby, J. (2000). Evaluation of DNA fingerprinting method for determining the species origin of meats. *Meat Science* 54: 369-376.
- Pascal, G.; Mahé, S. (2001). Identity, traceability, acceptability and substantial equivalence of food. *Cellular and Molecular Biology* 47 (8): 1329-1342.
- Pascoal, A.; Prado, M.; Calo, P.; Cepeda, A.; Velazquez, J.B. (2005). Detection of bovine DNA in raw and heat-processed foodstuffs, commercial foods and specific risk materials by a novel specific polymerase chain reaction method. *European Food Research and Technology* 220: 444-450.
- Patarata, L.; Judas, I.; Silva, J.A.; Esteves, A.; Martins, C. (2008). A comparison of the physicochemical and sensory characteristics of alheira samples from different-sized producers. *Meat Science* 79: 131-138.
- Pereira, F.; Carneiro, J.; Amorim, A. (2008). Identification of Species with DNA-based Technology: Current Progress and Challenges. *Recent Patents on DNA & Gene Sequences* 2: 187-200.
- Pfeiffer, I.; Burger, J.; Brenig, B. (2004). Diagnostic polymorphisms in the mitochondrial cytochrome b gene allow discrimination between cattle, sheep, goat, roe buck and deer by PCR-RFLP. *BMC Genetics* 5: 30.
- Pierpaoli, M.; Riga, F.; Trocchi, V.; Randi, E. (2003). Hare population in Europe: intra and interspecific analysis of mtDNA variation. *Comptes Rendus Biologies* 326: S80-S84.
- Pietsh, K.; Waiblinger, H. (2010). Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis (Chapter 4). In Popping, B.; Diaz-Amigo, C.; Hoenicke, K. (Eds) *Molecular Biological and Immunological Techniques and Applications for Food Chemists*. John Wiley & Sons, Inc, New Jersey.
- Rastogi, G.; Dhane, M.S.; Walujkar, S.; Kumar, A.; Patole, M.S.; Shouche, Y.S. (2007). Species identification and authentication of tissues of animal origin using mitochondrial and nuclear markers. *Meat Science* 76: 666-674.

- Regulamento (CE) n.º 178/2002 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 28 de Janeiro de 2002, que determina os princípios e normas gerais da legislação alimentar, cria a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos e estabelece procedimentos em matéria de segurança dos géneros alimentícios. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, 1-02-2002, L 30, 1-24.
- Rehbein, H. (2010). Single-Stranded Conformation Polymorphism Analysis (Chapter 5). In Popping, B.; Diaz-Amigo, C.; Hoenicke, K. (Eds) *Molecular Biological and Immunological Techniques and Applications for Food Chemists*. John Wiley & Sons, Inc, New Jersey.
- Reid, L.M.; O'Donnell, C.P.; Downey, G. (2006). Recent technological advances for the determination of food authenticity. *Food Science and Technology* 17: 344-353.
- Ripoli, M.V.; Corva, P.; Giovambattista, G. (2006). Analysis of a polymorphism in the DGAT1 gene in 14 cattle breeds through PCR-SSCP methods. *Veterinary Science* 80: 287-290.
- Rojas, M.; González, I.; Fajardo, V.; Martín, I.; Hernández, P.E.; García, T.; Martín, R. (2009b). Identification of raw and heat processed meats from game bird species by polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism of the mitochondrial D-loop region. *Poultry Science* 88: 669-679.
- Rojas, M.; González, I.; Fajardo, V.; Martín, I.; Hernández, P.E.; García, T.; Martín, R. (2008). Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism authentication of raw meats from game birds. *Journal of AOAC International* 91 No.6.
- Rojas, M.; González, I.; Fajardo, V.; Martín, I.; Hernández, P.E.; García, T.; Martín, R. (2009a). Authentication of meats from quail (*Coturnix coturnix*), pheasant (*Phasianus colchicus*), partridge (*Alectoris spp.*), and guinea fowl (*Numida meleagris*) using polymerase chain reaction targeting specific sequences from the mitochondrial 12S rRNA gene. *Food Control* 20: 896-902.
- Saiki, R.K.; Gelfand, D.H.; Stoffel, S.; Scharf, S.J.; Higuchi, R.; Horn, G.T.; Mullis, K.B.; Erlich, H.A. (1988). Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science* 239: 487-491.
- Santos, C.G.; Melo, V.S.; Amaral, J.S.; Estevinho, L.; Oliveira, M.B.P.P.; Mafra, I. Identification of hare meat by a species-specific marker of mitochondrial origin. *Meat Science* (doi:10.1016/j.meatsci.2011.10.018, in press).
- Schubbert, R. (2010). Sequencing (Chapter 6) In Popping, B.; Diaz-Amigo, C.; Hoenicke, K. (Eds) *Molecular Biological and Immunological Techniques and Applications for Food Chemists*. John Wiley & Sons, Inc, New Jersey.
- Segurança Alimentar, Produção de Alheiras, 2011.
www.esac.pt/noronha/manuais/seguranca_alimentar_alheiras.pdf (último acesso a 03-08-11).
- Shackell, G.H. (2008). Traceability in the meat industry – the farm to plate continuum. *International Journal of Food Science and Technology* 43: 2134-2142.
- Skarpeid, H.J.; Kvaal, K.; Hildrum, K.I. (1998). Identification of animal species in ground meat mixtures by multivariate analysis of isoelectric focusing protein profiles. *Electrophoresis* 19: 3103-3109.
- Soares, S.; Amaral, J.S.; Mafra, I.; Oliveira, M.B.P.P. (2010). Quantitative detection of poultry meat adulteration with pork by a duplex PCR assay. *Meat Science* 85: 531-536.

- Somma, M. (2006). Extraction and Purification of DNA (Session 4). *The Analysis of Food Samples for the Presence of Genetically Modified Organisms*. European Commission, Joint Research Center, Institute for Health and Consumer Protection.
- Somma, M.; Querci, M. (2006a). Agarose Gel Electrophoresis (Session 5). *The Analysis of Food Samples for the Presence of Genetically Modified Organisms*. European Commission, Joint Research Center, Institute for Health and Consumer Protection.
- Somma, M.; Querci, M. (2006b). The Polymerase Chain Reaction (PCR) (Session 6). *The Analysis of Food Samples for the Presence of Genetically Modified Organisms*. European Commission, Joint Research Center, Institute for Health and Consumer Protection.
- Stamoulis, P.; Stamatis, C.; Sarafidou, T.; Mamuris, Z. (2010) Development and application of molecular markers for poultry meat identification in food chain. *Food Control* 21: 1061-1065.
- The World of Food Science – Modern Molecular Methods (PCR) in food control: GMO, Pathogens, Species identification, Allergens. <http://www.worldfoodscience.org/cms/?pid=1003869> (último acesso a 02-10-11).
- Tobe, S.S.; Linacre, A.M.T. (2008). A multiplex assay to identify 18 European mammal species from mixtures using the mitochondrial cytochrome b gene. *Electrophoresis* 29: 340-347.
- Walker, J.A.; Hughes, D.A.; Anders, B.A.; Shewale, J.; Sinha, S.K.; Batzer, M.A. (2003) Quantitative intra-short interspersed element PCR for species-specific DNA identification. *Analytical Biochemistry* 316: 259-269.
- Walker, J.A.; Hughes, D.A.; Hedges, D.J.; Anders, B.A.; Laborde, M.E.; Shewale, J.; Sinha, S.K.; Batzer, M.A. (2004). Quantitative PCR for DNA identification based on genome-specific interspersed repetitive elements. *Genomics* 83: 518-527.
- Weighardt, F. (2006). Quantitative PCR for the Detection of GMOs (Session 10). *The Analysis of Food Samples for the Presence of Genetically Modified Organisms*. European Commission, Joint Research Center, Institute for Health and Consumer Protection.
- Wolf, C.; Rentsch, J.; Hübner, P. (1999). PCR-RFLP Analysis of Mitochondrial DNA: A Reliable Method for Species Identification. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 47: 1350-1355.
- Woolfe, M.; Primrose, S. (2004). Food forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud. *Biotechnology* 22: 222-226.