



**Juliana Pires
Abrantes**

**Despiste de Fraude Alimentar em Processados de
Carne por Métodos Biomoleculares**

DECLARAÇÃO

Declaro que este relatório é integralmente da minha autoria, estando devidamente referenciadas as fontes e obras consultadas, bem como identificadas de modo claro as citações dessas obras. Não contém, por isso, qualquer tipo de plágio quer de textos publicados, qualquer que seja o meio dessa publicação, incluindo meios eletrônicos, quer de trabalhos acadêmicos.



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
2017

**Juliana Pires
Abrantes**

Despiste de Fraude Alimentar em Processados de Carne por Métodos Biomoleculares

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica do Doutor Luís Manuel Souto de Miranda, Professor Auxiliar Convidado do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

o júri

Presidente

Prof. Doutora Maria de Lourdes Gomes Pereira
Professora Associada com Agregação da Universidade de Aveiro

Doutora Elsa Maria Carvalheiro Dias
Técnica Especialista Centro Hospitalar do Baixo Vouga, Epe.

Prof. Doutor Luís Manuel Souto de Miranda
Professor Auxiliar Convidado da Universidade de Aveiro

Agradecimentos

Ao Professor Luís Souto, pelo incansável apoio e pela oportunidade de integrar a sua equipa de investigação do Laboratório de Genética Aplicada do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

À Filipa e à Helena pelos sábios conselhos transmitidos, pela paciência e constante disponibilidade que sempre demonstraram, pela transmissão de conhecimentos e pelo companheirismo, boa disposição e alegria constante.

À Rafaela pelos poucos mas bons momentos partilhados e por toda a ajuda e conselhos dados.

À Sílvia, pelo companheirismo, paciência, força e apoio.

À Rita, uma amiga inesperada mas que tornou tudo muito mais fácil. Obrigada pela companhia, pela força e motivação constante, e pela boa disposição e alegria mesmo quando tudo parecia ser impossível. Vou ter saudades.

A todos os meus colegas de laboratório que sempre me deram força para continuar.

A todos os meus amigos que nunca desistiram de mim e sempre me deram força ao longo deste duro caminho.

A toda a minha família, e em especial aos meus pais, à minha irmã e ao André, pelo otimismo, incansável paciência, apoio incondicional e por estarem sempre presentes ao longo destes anos.

Palavras-chave

Produtos cárneos, Fraude Alimentar, Autenticidade, Rotulagem, Rastreabilidade, ADN, PCR.

Resumo

A identificação de espécies, em alimentos para consumo humano é cada vez mais importante para avaliar a sua autenticidade. Uma rotulagem correta, verdadeira e precisa é essencial para manter o consumidor informado sobre a identidade e qualidade dos produtos alimentares que pretende adquirir, especialmente nos produtos processados, onde a diferenciação das espécies utilizadas é extremamente difícil, tornando-os alvos fáceis de adulterações.

A crescente demanda por transparência na indústria alimentar e a aplicação de uma correta rotulagem, proporcionaram uma força motriz para o desenvolvimento de metodologias analíticas adequadas à identificação de espécies de carne. Assim, o recurso a técnicas de biologia molecular, em especial a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), tem-se mostrado como uma alternativa específica, rápida, sensível e adequada para a identificação de espécies em produtos alimentares.

Neste estudo, inicialmente procedeu-se à extração de ADN de diferentes espécies de carne fresca (amostras de referência) adquiridas no talho, *Bos taurus* (vaca), *Sus scrofa* (porco), *Equus caballus* (cavalo) e *Ovis aries* (ovelha). De seguida, as espécies em estudo foram identificadas com recurso a um protocolo de amplificação *multiplex* em tempo real. Posteriormente avaliou-se a autenticidade de 38 amostras comerciais de produtos cárneos, que apenas continham carne de vaca na sua rotulagem, de forma a averiguar a veracidade e rigor da rotulagem em relação ao conteúdo do produto. De todas as amostras comerciais analisadas, nenhuma revelou a presença de qualquer outra das espécies em estudo, para além da mencionada no rótulo de cada uma, pelo que não foi necessário proceder-se à posterior quantificação da mesma. Assim, através da utilização de metodologias de biologia molecular, podemos concluir que a rotulagem está em conformidade com o conteúdo do produto alimentar.

Keywords

Meat Products, Food Fraud, Authenticity, Labeling, Traceability, DNA, PCR

Abstract

In food the identification of species for human consumption is increasingly important to evaluate its authenticity. A correct, truthful and accurate labeling is essential to keep the consumer informed about the identity and quality of the food products that he intends to acquire, especially in processed products, where species differentiation is extremely difficult, making them easy targets for adulteration.

A growing demand for transparency in the food industry and the application of correct labeling, have provided a driving force for the development of analytical methodologies suitable for the identification of meat species. Thus, the use of molecular biology techniques, in particular Polymerase Chain Reaction (PCR), is a specific, fast, sensitive and adequate alternative for the identification of species in food products.

In this study, DNA from different fresh meat species (reference samples) acquired in the butcher's shop, *Bos taurus* (cow), *Sus scrofa* (pig), *Equus caballus* (horse) and *Ovis aries* (sheep) were initially extracted. Next, the species under study were identified using a real-time multiplex amplification protocol. Subsequently, the authenticity of 38 commercial samples of meat products containing only beef in their labeling was assessed to ascertain the veracity and accuracy of the labeling in relation to the product content. Of all the commercial samples analyzed, none revealed the presence of any of the other species under study, in addition to the one mentioned in the label of each one, reason why it was not necessary to be quantified later. Thus, through the use of molecular biology methodologies, we can conclude that the labeling is in conformity with the content of the food product.

Abreviaturas

μL – Microlitro

°C – Graus Celsius

A – Adenina

A – Amperes

ADN – Ácido desoxirribonucleico

ARN – Ácido ribonucleico

ASAE – Autoridade de Segurança Alimentar e Económica

ATPase 8 – Adeniltrifosfatase 8

BSE – (*bovine spongiform encephalopathy*) Encefalopatia Espongiforme Bovina

C – Citosina

COI – Subunidade I da Oxidase do Citocromo

COII – Subunidade II da Oxidase do Citocromo

Ct – (*threshold cycle*) Ciclo de Threshold

CTAB – (*cetyl trimethylammonium bromide*) Brometo de Cetil Trimetil Amónio

cyt b – Citocromo b

DOP – Denominação de Origem Protegida

dNTP – Desoxinucleótidos Tri-Fosfato

dsADN – ADN de cadeia dupla

EFSA – Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos

ELISA – Ensaio Imunoenzimático

ESI – (electrospray ionization) Ionização por Eletrospray

FSA – (*food standards agency*) Agência de Normas Alimentares

FTS – (*food traceability system*) Sistema de Rastreabilidade Alimentar

G – Guanina

gADN – ADN Genómico

GC – (*gas chromatography*) Cromatografia gasosa

GFSI – *Global Food Safety Initiative*

GH – Hormona de crescimento

HRM – do inglês *High-resolution melting*

IEF – Focagem isoeletrica

ISO – (*International Standards Organization*) Organização Internacional de Normalização

Kg - kilograma

LC – (*liquid chromatography*) Cromatografia Líquida

LINE – (*long interspersed nuclear elements*) Elementos Nucleares Longos Dispersos

LOD - Limite de Detecção

MALDI - (*matrix-assisted laser desorption ionization*) Ionização e dessorção a laser assistida por matriz

MC1R – Recetor da Melanocortina 1

mg – Miligramas

mL – Mililitros

mtADN – ADN mitocondrial

MS – (*mass spectrometry*) Espectrometria de Massa

NaCl – Cloreto de Sódio

NaOH – Hidróxido de Sódio

ng – Nanogramas

nm - Nanometro

PAGE – (*polyacrylamide gel electrophoresis*) Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

pb - Pares de Base

PBS – (*Phosphate Buffered Saline*) Tampão Fosfato Salino

PCR - (*polymerase chain reaction*) Reação em Cadeia da Polimerase

Pg – Picograma

pH – Potencial de Hidrogénio

RAPD – (*random amplified polymorphic DNA*) Amplificação Aleatória de ADN Polimórfico

RFLP – (*restriction fragment length polymorphism*) Polimorfismo no Comprimento do Fragmento de Restrição

RFU – Unidade Relativa de Fluorescência

RNase – Ribonuclease

RNase A – Ribonuclease A

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida e dodecilsulfato de sódio

SINE – (*short interspersed nuclear elements*) Elementos Nucleares Curtos Dispersos

SNP – Polimorfismo de Nucleótido único

ssADN – (*single strand DNA*) ADN de cadeia única

SSCP – (*single-strand conformation polymorphism*) Polimorfismos Conformacionais de Cadeia Única

SSP – (*species specific PCR*) PCR específico de espécie

T – Temperatura

T – Timina

Tm – Temperatura de *melting*

TRU – (*traceable resource unit*) Unidade de Recurso Rastreável

UE – União Europeia

UV - Ultravioleta

V - Voltagem

Índice

1.	Introdução	1
1.1.	A Segurança Alimentar e a Autenticidade de Produtos Cárneos	1
1.2.	Produtos Cárneos.....	8
1.3.	Rastreabilidade	10
1.4.	Métodos utilizados para a identificação de espécies em produtos cárneos	13
1.4.1.	Métodos baseados na análise de proteínas	14
1.4.2.	Métodos baseados na análise de ADN	19
1.4.2.1.	ADN alvo a amplificar	19
1.4.2.2.	Sequências alvo	21
1.4.2.3.	Extração e isolamento de ADN	22
1.4.2.4.	Técnica de PCR Convencional.....	24
1.4.2.5.	PCR em Tempo Real.....	27
1.4.2.5.1.	Análise HRM (High-Resolution Melting Analysis).....	29
1.4.2.5.2.	Quantificação	30
1.4.2.5.3.	Métodos de Detecção na PCR em Tempo Real	32
1.4.2.6.	Outros métodos baseados na técnica de PCR.....	35
1.5.	Aplicação de técnicas de PCR na identificação de espécies em produtos cárneos	40
2.	Objetivos	42
3.	Material e Métodos.....	43
3.1.	Amostras	43
3.2.	Homogeneização de Tecidos e Extração de ADN	44
3.2.1.	Preparação de Soluções.....	44
3.2.2.	Homogeneização do Tecido Animal	45
3.2.3.	Extração de ADN	45
3.3.	Quantificação e Análise da Pureza do ADN extraído	46
3.3.1.	Quantificação do ADN por Fluorimetria (Qubit™).....	46
3.3.2.	Quantificação e Avaliação da Pureza do DNA (Nanodrop™ 1000).....	47
3.4.	Amplificação de ADN.....	47

3.4.1.	Amplificação de ADN com o kit de amplificação AllHorse (Microsynth).....	48
3.5.	Eletroforese em gel de agarose (2%).....	49
3.6.	Cuidados especiais	50
4.	Resultados e Discussão	51
4.1.	Avaliação do ADN extraído de amostras de carne fresca (amostras de referência).....	51
4.1.1.	Avaliação da concentração e pureza do ADN extraído das amostras de carne fresca (amostras de referência)	51
4.1.2.	Avaliação da integridade do ADN extraído das amostras de carne fresca (amostras de referência).....	52
4.2.	Determinação da especificidade dos sistemas de amplificação integrantes do <i>kit Tetraplex AllHorse</i> e avaliação da performance da PCR em Tempo Real para amplificação do ADN.....	52
4.3.	Avaliação do ADN extraído de amostras comerciais (processados de carne de bovino). 55	
4.3.1.	Avaliação da concentração e pureza do ADN extraído de amostras comerciais (processados de carne de bovino).....	55
4.3.2.	Análise por PCR em Tempo Real das amostras comerciais (processados de carne de bovino) com o <i>kit Tetraplex AllHorse</i>	59
5.	Discussão e Conclusão	75
6.	Referências Bibliográficas	78
	Anexos.....	89
	Anexo I – Etiquetas de identificação das amostras de talho analisadas.	89
	Anexo II - Inquérito online dirigido à comunidade académica da Universidade de Aveiro.	91
	Anexo III - Respostas obtidas no inquérito online dirigido à comunidade académica da universidade de Aveiro.....	93
	Anexo IV – Descrição detalhada do rótulo das amostras comerciais analisadas.	96
	Anexo V - Proposta de artigo.....	99

Índice de Figuras

Figura 1 - Inter-relação entre “ <i>Food Safety</i> ” e “ <i>Food Security</i> ”. Adaptado de Amaral, Mafra, & Oliveira (2015).	2
Figura 2 - Representação conceptual da rastreabilidade aplicada à cadeia de abastecimento alimentar. Adaptado de Bosona et al. (2013).	11
Figura 3 - Componentes da <i>The TraceFood Framework</i> . Adaptado de Storoy et al. 2013.	13
Figura 4 - Representação esquemática da técnica tiras de fluxo lateral. Adaptado de Mark et al. (2010).	16
Figura 5 - Método ELISA, Direto e <i>Sandwich</i> . O antigénio de interesse é imobilizado por adsorção direta à placa de ensaio ou pela ligação a um anticorpo de captura à superfície da placa. A deteção do antigénio ocorre utilizando um anticorpo primário/secundário conjugado. Adaptado de Overview of ELISA (Thermo Fisher Scientific).	17
Figura 6 - Representação esquemática da técnica Western blot. Adaptado de Hegyi et al. (2013). ..	18
Figura 7 - Representação esquemáticas das etapas da PCR. Adaptado de Popping et al., (2010). ..	25
Figura 8 - Gráfico de amplificação da PCR em Tempo Real, Adaptado de Levin, (2004).	30
Figura 9 - Curva standard obtida por sucessiva análise de amostras com concentrações conhecidas de ADN. Adaptado de Butler, 2005.	31
Figura 10 - Esquema ilustrativo do mecanismo de ação do corante intercalar <i>SYBR Green</i> ®. Adaptado de BIO-RAD (2006).	34
Figura 11 - Esquema ilustrativo do mecanismo de ação da sonda <i>TaqMan</i> ®. Adaptado de BIO-RAD (2006).	35
Figura 12 - Estado de fragmentação do ADN extraído: M (marcador molecular 100pb); V ₁ e V ₂ (amostras <i>Bos taurus</i>); P ₁ e P ₂ (amostras <i>Sus scrofa</i>); C ₁ e C ₂ (amostras <i>Equus caballus</i>); O ₁ e O ₂ (amostras <i>Ovis aries</i>).	52
Figura 13 - Amplificação do ADN extraído da amostra <i>Bos taurus</i> (vaca), com o <i>kit</i> de amplificação <i>Tetraplex AllHorse</i>	53
Figura 14 - Amplificação do ADN extraído da amostra <i>Sus scrofa</i> (porco), com o <i>kit</i> de amplificação <i>Tetraplex AllHorse</i>	53
Figura 15 - Amplificação do ADN extraído da amostra <i>Equus caballus</i> (cavalo), com o <i>kit</i> de amplificação <i>Tetraplex AllHorse</i>	54
Figura 16 - Amplificação do ADN extraído da amostra <i>Ovis aries</i> (ovelha), com o <i>kit</i> de amplificação <i>Tetraplex AllHorse</i>	54

Figura 17 - Gráfico representativo das curvas de amplificação dos controlos positivos para cada espécie. laranja – <i>Bos taurus</i> ; verde – <i>Sus scrofa</i> ; roxo – <i>Eqqus caballus</i> ; azul – <i>Ovies aries</i> .	60
Figura 18 - Gráfico representativo das curvas de amplificação das amostras comerciais (processados de carne de bovino) do lote 1.....	61
Figura 19 - Gráfico representativo das curvas de amplificação das amostras comerciais (processados de carne de bovino) do lote 1.....	62
Figura 20 - Gráfico representativo das curvas de amplificação das amostras comerciais (processados de carne de bovino) do lote 1.....	63
Figura 21 - Gráfico representativo das curvas de amplificação das amostras comerciais (processados de carne de bovino) do lote 1.....	64
Figura 22 - Gráfico representativo das curvas de amplificação das amostras comerciais (processados de carne de bovino) do lote 2.....	65
Figura 23 - Gráfico representativo das curvas de amplificação das amostras comerciais (processados de carne de bovino) do lote 2.....	66
Figura 24 - Gráfico representativo das curvas de amplificação das amostras comerciais (processados de carne de bovino) do lote 2.....	67
Figura 25 - Gráfico representativo das curvas de amplificação das amostras comerciais (processados de carne de bovino) do lote 2.....	68
Figura 26 - Gráfico representativo das curvas de amplificação das amostras comerciais (processados de carne de bovino) do lote 1.....	69
Figura 27 - Gráfico representativo das curvas de amplificação das amostras comerciais (processados de carne de bovino) do lote 1.....	70
Figura 28 - Gráfico representativo das curvas de amplificação das amostras comerciais (processados de carne de bovino) do lote 1.....	71
Figura 29 - Gráfico representativo das curvas de amplificação das amostras comerciais (processados de carne de bovino) do lote 2.....	72
Figura 30 - Gráfico representativo das curvas de amplificação das amostras comerciais (processados de carne de bovino) do lote 2.....	73
Figura 31 - Gráfico representativo das curvas de amplificação das amostras comerciais (processados de carne de bovino) do lote 2.....	74

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Definições de termos importantes no que respeita à Fraude Alimentar. Adaptado de Ellis et al. (2015).	3
Tabela 2– Diferentes métodos de extração empregues em produtos cárneos.	23
Tabela 3 - Resumo de alguns trabalhos reportados na literatura, baseados na análise de ADN.	41
Tabela 4 - Identificação das amostras de referência das espécies utilizadas.	43
Tabela 5 - Descrição das amostras comerciais analisadas.	44
Tabela 6 - Descrição dos <i>primers</i> e sondas constituintes do <i>Kit Tetraplex AllHorse</i> . Adaptado de Koppel et al. (2011).	49
Tabela 7 - Dados da quantificação do ADN extraído das amostras de carne fresca (amostras de referência).	51
Tabela 8 - Dados da quantificação do ADN extraído das amostras comerciais de processados de bovino do lote 1, espectrofotometria (<i>NanoDrop™ 1000</i>) e fluorimetria (<i>Qubit™ Fluorometer</i>). H1, H2, H3, H4, H5 – amostras comerciais (processados de carne de bovino); A1, A2, B1, B2 – réplicas; L1 – lote 1.	56
Tabela 9 - Dados da quantificação do ADN extraído das amostras comerciais de processados de bovino do lote 2, espectrofotometria (<i>NanoDrop™ 1000</i>) e fluorimetria (<i>Qubit™ Fluorometer</i>). H1, H2, H3, H4, H5 – amostras comerciais (processados de carne de bovino); A1, A2, B1, B2 – réplicas; L2 – lote 2.	57
Tabela 10 - Dados da quantificação do ADN extraído das amostras comerciais de processados de bovino do lote 1, espectrofotometria (<i>NanoDrop™ 1000</i>) e fluorimetria (<i>Qubit™ Fluorometer</i>). A1, A2, A3, C1, E1, E2, L1, L2, L3 – amostras comerciais (processados de carne de bovino); A1, A2 – réplicas; L1 – lote 1.	58
Tabela 11 - Dados da quantificação do ADN extraído das amostras comerciais de processados de bovino do lote 2, espectrofotometria (<i>NanoDrop™ 1000</i>) e fluorimetria (<i>Qubit™ Fluorometer</i>). A1, A2, A3, C1, E1, E2, L1, L2, L3 – amostras comerciais (processados de carne de bovino); A1, A2 – réplicas; L2 – lote 2.	59
Tabela 12 - Tabela dos dados correspondentes às curvas de amplificação dos controlos positivos.	60
Tabela 13 - Tabela dos dados correspondentes às curvas de amplificação das amostras comerciais (processados de carne de bovino) do lote 1.	61

Tabela 14 - Tabela dos dados correspondentes às curvas de amplificação das amostras comerciais (processados de carne de bovino) do lote 1.....	62
Tabela 15 - Tabela dos dados correspondentes às curvas de amplificação das amostras comerciais (processados de carne de bovino) do lote 1.....	63
Tabela 16 - Tabela dos dados correspondentes às curvas de amplificação das amostras comerciais (processados de carne de bovino) do lote 1.....	64
Tabela 17 - Tabela dos dados correspondentes às curvas de amplificação das amostras comerciais (processados de carne de bovino) do lote 2.....	65
Tabela 18 - Tabela dos dados correspondentes às curvas de amplificação das amostras comerciais (processados de carne de bovino) do lote 2.....	66
Tabela 19 - Tabela dos dados correspondentes às curvas de amplificação das amostras comerciais (processados de carne de bovino) do lote 2.....	67
Tabela 20 - Tabela dos dados correspondentes às curvas de amplificação das amostras comerciais (processados de carne de bovino) do lote 2.....	68
Tabela 21 - Tabela dos dados correspondentes às curvas de amplificação das amostras comerciais (processados de carne de bovino) do lote 1.....	69
Tabela 22 - Tabela dos dados correspondentes às curvas de amplificação das amostras comerciais (processados de carne de bovino) do lote 1.....	70
Tabela 23 - Tabela dos dados correspondentes às curvas de amplificação das amostras comerciais (processados de carne de bovino) do lote 1.....	71
Tabela 24 - Tabela dos dados correspondentes às curvas de amplificação das amostras comerciais (processados de carne de bovino) do lote 2.....	72
Tabela 25 - Tabela dos dados correspondentes às curvas de amplificação das amostras comerciais (processados de carne de bovino) do lote 2.....	73
Tabela 26 - Tabela dos dados correspondentes às curvas de amplificação das amostras comerciais (processados de carne de bovino) do lote 2.....	74

1. Introdução

1.1. A Segurança Alimentar e a Autenticidade de Produtos Cárneos

A segurança alimentar constitui, nos dias de hoje, uma exigência prioritária por parte dos consumidores finais, que desejam alimentos saudáveis e seguros para a saúde. Este tema tem-se tornado cada vez mais pertinente, sendo uma fonte de preocupação e interesse por parte dos consumidores e das empresas do setor alimentar. A globalização e a industrialização das técnicas empregues no processamento dos alimentos, expõem os consumidores a um elevado número de perigos (Caporale et al., 2001). Para além disto, a atenção por parte do consumidor para com a segurança e a qualidade dos produtos que adquire tem crescido nos últimos anos (Cunha & Moura, 2008). Assim, as autoridades responsáveis pela segurança sanitária têm o dever de adotar medidas que assegurem a proteção do estado de saúde do consumidor (FAO/OMS, 2002).

O conceito de segurança alimentar tem evoluído bastante nos últimos anos, acompanhando a modernização das técnicas empregues na indústria alimentar e o crescente desenvolvimento da sociedade. De modo a garantir a segurança dos produtos alimentares, é fundamental considerar todos os aspetos envolvidos na cadeia de produção dos mesmos, desde a produção primária, incluindo aspetos como a saúde do animal e a produção de alimentos para o animal, até à distribuição dos produtos alimentares ao consumidor final (FAO/OMS, 2002). O setor alimentar, de uma forma geral, encontra-se assente em dois pilares basilares, *Food Security* e *Food Safety*, conceitos originais de segurança alimentar e segurança sanitária (Figura 1). Segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), é possível distingui-los. O primeiro tende a dar-se como adquirido nos países desenvolvidos e existe quando qualquer pessoa tem acesso físico, económico e social a alimentos suficientes, seguros e nutritivos, permitindo assim satisfazer, a qualquer momento, as suas preferências alimentares e necessidades nutricionais, de modo a manter um estilo de vida saudável e ativo. Por outro lado, a segurança sanitária dos alimentos visa garantir que um determinado alimento não causará qualquer dano no consumidor, quando preparado e consumido de acordo com as instruções do fabricante (CAC - Codex Alimentarius Commission, 2003). Apesar de serem conceitos diferentes, um depende diretamente do outro, embora em Portugal apenas se utilize o conceito de segurança alimentar (Robertson et al., 2004; Sagueiro, 2009).

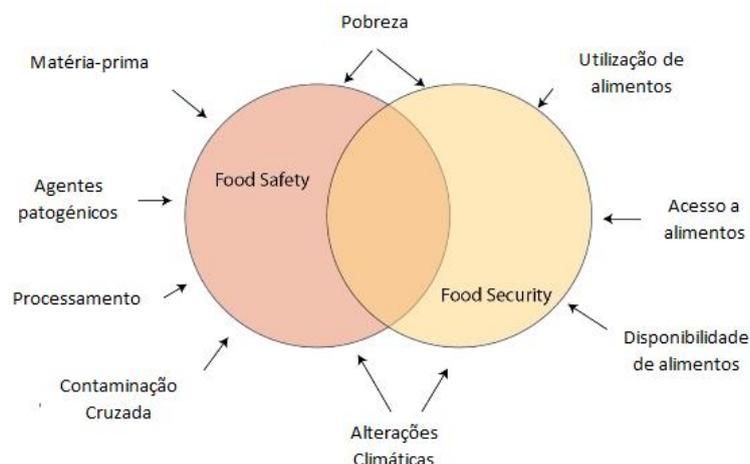


Figura 1 - Inter-relação entre “Food Safety” e “Food Security”. Adaptado de Amaral et al., (2015).

A evolução da sociedade atual resultou num aumento da atenção dirigida à proteção e segurança dos consumidores relativamente a todos os ramos da produção alimentar. O consumidor não aceita a possibilidade, por muito remota que seja, de adquirir um produto que não corresponda às suas expectativas ou de contrair uma doença de origem alimentar (Shaw, 2012).

Segundo a legislação da Comissão Europeia (178/2002) sobre a segurança alimentar, todos os intervenientes de uma cadeia alimentar devem ter a possibilidade de rastrear as matérias-primas utilizadas no fabrico dos produtos alimentares (Ali et al., 2012; Lotta & Bogue, 2015). O tema da segurança alimentar tornou-se numa prioridade política fundamental, devido às recentes fraudes ocorridas em produtos alimentares, às práticas abusivas realizadas por parte de alguns produtores alimentares e por todas as razões mencionadas anteriormente, o que tem contribuído para o crescente aumento do interesse público pela composição dos alimentos.

As questões da autenticidade dos produtos alimentares encontram-se cada vez mais patentes nas preocupações dos consumidores, sendo atualmente abrangidas pelo conceito de segurança alimentar.

Apesar de, ao longo do século passado, se ter assistido ao desenvolvimento significativo das Boas Práticas de Higiene e Segurança Alimentar, a fraude alimentar continua a persistir, abalando a confiança dos consumidores e produzindo um impacto negativo no setor agroalimentar. Embora na legislação europeia não exista ainda uma definição para “Fraude Alimentar”, a Global Food Safety Initiative (GFSI) definiu a fraude alimentar como “Um termo abrangente que inclui a substituição deliberada e intencional, adição, adulteração ou deturpação de alimentos, ingredientes alimentares ou embalagens de alimentos, rotulagem, informações de produtos ou declarações falsas

ou enganosas realizadas sobre um produto, com fins lucrativos que possam afetar a saúde do consumidor” (Vieira, 2017). Os autores Ellis et al. (2015) apresentaram também alguns conceitos relacionados com esta temática (Tabela 1).

Tabela 1 - Definições de termos importantes no que respeita à Fraude Alimentar. Adaptado de Ellis et al. (2015).

Termo	Definição
Fraude alimentar	O alimento é deliberadamente colocado no mercado, para ganhos financeiros, com a intenção de enganar o consumidor. Inclui o comércio de alimentos impróprios para consumo ou prejudiciais para a saúde e rotulagem errónea.
Contaminação	Envolve contaminação física, química ou biológica indesejada, geralmente não intencional, como por exemplo, contaminação com produtos químicos utilizados na limpeza de equipamentos. No caso de a contaminação ser intencional, é considerado crime alimentar e, dependendo da intenção e extensão, pode ser considerado bioterrorismo.
Deterioração	Qualquer alteração das características organolépticas (descoloração, odor, sabor) que tornam o alimento impróprio para consumo.
Crime alimentar	Quando a fraude alimentar deixa de ser um ato aleatório e se torna uma atividade organizada, com o intuito de enganar ou ferir o consumidor.
Segurança	Assegura o acesso a uma quantidade segura e suficiente de alimentos, de modo a manter uma vida saudável e ativa.
Autenticidade	Correta rotulagem de um produto alimentar.
Integridade	Garantir que os produtos alimentares vendidos apresentam a qualidade e natureza esperada pelo consumidor.

A informação disponibilizada relativamente aos produtos alimentares, veiculada pelo rótulo, é deste modo fundamental, para garantir ao consumidor a identidade e qualidade do produto alimentar (Rojas et al. 2009b).

As informações declaradas nos rótulos dos produtos alimentares devem ser completas, verdadeiras, esclarecedoras e legíveis, pois é através destas que o consumidor fica a conhecer o produto quanto à sua composição, apresentação, forma de conservação, quantidade, modo de utilização e consumo, entre outros parâmetros (Estiri et al. 2010). A lista de ingredientes presentes na rotulagem e a declaração nutricional são ferramentas de extrema relevância, permitindo ao consumidor escolher um produto baseado nas suas características em detrimento de outro, o que é

muito importante tendo em conta a vasta gama de produtos idênticos que muitas das vezes existem no mercado. A informação veiculada pelos rótulos torna-se ainda mais relevante quando se trata de alimentos processados, em que não é possível distinguir os vários ingredientes, sendo muito difícil diferenciar as espécies presentes no alimento (Martín et al., 2007; Martín et al., 2010; Primrose et al., 2010).

A avaliação da autenticidade de produtos cárneos engloba diversas questões:

- Substituição de espécies de maior valor comercial, por espécies de valor inferior (Amaral et al. 2014; Ballin et al. 2009; Montowska & Pospiech, 2011; Primrose et al., 2010; Soares et al. 2013; Soares et al. 2014);
- Presença de espécies não declaradas no rótulo (Amaral et al., 2014; Ballin et al., 2009; Montowska & Pospiech, 2011; Primrose et al., 2010);
- Substituição de carne por proteínas de origem vegetal (Amaral et al. 2014; Ballin et al. 2009);
- Indicações fraudulentas relativas à origem geográfica das espécies ou de produção (ex: produtos locais ou alimentos com designação de DOP) (Montowska & Pospiech, 2011; Primrose et al., 2010);
- Substituição de espécies de caça por espécies domésticas (Montowska & Pospiech, 2011);
- Rotulagem errónea (quer fraudulenta quer involuntária) (Amaral et al., 2014; Ballin et al., 2009; Kane et al., 2015; Montowska & Pospiech, 2011; Primrose et al., 2010; Soares et al., 2013; Soares et al. 2014).

Ballin (2010) categoriza as áreas onde a fraude alimentar tem maior probabilidade de ocorrer da seguinte forma: origem da carne, substituição de uma espécie por outra, tratamento e processamento dos produtos cárneos e, por último, adição de produtos não cárneos. No que respeita às fraudes associadas à origem das espécies, estas podem estar relacionadas com a própria origem da mesma, ou então ao sexo ou idade de abate do animal. A prática constante de congelação e descongelação dos produtos alimentares pode ser uma das fraudes cometidas relacionadas com o processamento.

Várias são as razões apontadas que evidenciam a ilegitimidade destas práticas:

- Económicas, praticadas com o intuito de fazer face à competição (Ali et al., 2012; Amaral et al., 2014; Lin et al., 2014; Primrose et al., 2010; Yang et al., 2014);
- Legais (Amaral et al. 2014);
- Religiosas, sendo o consumo de algumas espécies desaprovado por certas religiões (Ali et al., 2012; Amaral et al., 2014; Ballin et al., 2009; Dooley et al., 2004; Kane et al, 2015; Primrose et al., 2010; Soares et al., 2013);

- Éticas, quando consideramos estilos de vida como o vegetarianismo (Ballin et al., 2009; Dooley et al., 2004; Primrose et al., 2010; Soares et al., 2013)
- Saúde pública (Ali et al., 2012; Amaral et al., 2014; Dooley et al., 2004; Kane et al., 2015; Lin et al., 2014; Primrose et al., 2010; Soares et al., 2013);
- Surtos de epidemias em populações de gado (Ex: encefalopatia espongiforme bovina, gripe das aves, brucelose) (Bottero et al., 2011; Fajardo et al., 2010; Rogberg-Muñoz et al., 2014);
- Proteção de espécies, principalmente as que se encontram em vias de extinção (Ali et al., 2012; Bottero et al., 2011; Fajardo et al., 2010);
- Contaminações químicas de produtos alimentares - crise da dioxina (Bottero et al., 2011; Rogberg-Muñoz et al., 2014).

Apesar da crescente preocupação por parte de entidades e consumidores, a rotulagem errada, fraudulenta ou não, surge numa vasta gama de produtos colocados à venda no mercado, resultando numa diminuição da qualidade dos mesmos, bem como numa perda de confiança por parte dos consumidores face à indústria alimentar. Uma incorreta rotulagem dos produtos alimentares representa não só uma fraude comercial, como também um potencial problema de saúde, no caso dos consumidores que apresentam, por exemplo, sensibilidade aos alérgenos não mencionados no rótulo (Fajardo et al., 2008).

A recente ocorrência de várias crises alimentares enfatizou a segurança alimentar e a proteção da saúde do consumidor como os principais objetivos da legislação da rotulagem dos alimentos. Ao considerar todas as preocupações em volta deste tema, a necessidade de verificar as declarações mencionadas nos rótulos torna-se num aspeto crucial para os consumidores, a indústria alimentar e as entidades responsáveis por manter a segurança alimentar (Mafra et al., 2008).

Na União Europeia, a informação que deve constar nos rótulos dos produtos alimentares encontra-se estabelecida por lei na Diretiva 2002/86/CE, que refere que os produtos cárneos devem conter nos rótulos a indicação e quantidade de cada espécie utilizada (Primrose et al., 2010). Algumas agências nasceram com o objetivo de verificar o cumprimento das normas alimentares e da legislação, expondo assim casos de fraude alimentar, como é o exemplo da instituição governamental *Food Standards Agency* (FSA), no Reino Unido (Primrose et al., 2010). Organizações de ação global, como a *International Organization for Standardization* (ISO) e GFSI também definiram, recentemente, regras para o restabelecimento da segurança nas redes alimentares desde a raiz, de forma a tranquilizar os consumidores (Lotta & Bogue, 2015).

Em 2002, após uma série de alertas relacionados com os alimentos que tiveram impacto na saúde humana e abalaram a confiança pública, a União Europeia aprovou a legislação alimentar

geral [Regulamento (CE) n.º 178/2002], que proporciona um quadro global para o sistema regulamentar da União Europeia relativo aos alimentos, baseado em dados científicos. Elementos-chave neste contexto foram a separação funcional entre gestão dos riscos e avaliação dos riscos e a criação da Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA). A principal atividade da EFSA consiste na avaliação científica dos riscos e comunicação dos seus pareceres aos principais parceiros, às partes interessadas e ao público em geral. A Lei Geral sobre a Alimentação criou um sistema europeu de segurança alimentar em que a responsabilidade pela avaliação dos riscos (ciência) e pela gestão de riscos (política) é mantida separada. Assim, a EFSA é responsável pela área da avaliação dos riscos, enquanto os gestores de riscos (Comissão Europeia, Parlamento Europeu e Estados-Membro da União Europeia) devem manter o controlo relativo à tomada de decisões regulamentares, políticas e às medidas de prevenção e controlo (EFSA, 2012).

A entidade responsável pela segurança alimentar, em Portugal, é a Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE). A missão da ASAE encontra-se definida na sua lei orgânica (Dec.-Lei 194/2012) como “fiscalização e prevenção do cumprimento da legislação reguladora do exercício das atividades económicas nos setores alimentar e não alimentar bem como a avaliação e comunicação dos riscos, na cadeia alimentar sendo o organismo nacional de ligação com as suas entidades congéneres, a nível europeu e internacional”. Fazem parte da missão da ASAE a avaliação de riscos e a verificação do cumprimento da legislação nacional e europeia, de modo a garantir ao consumidor, a segurança dos géneros alimentícios, mais especificamente da carne e dos produtos cárneos. Nos últimos anos, a cooperação entre a ASAE e a EFSA tem vindo a ser reforçada pelo crescente número de especialistas do seu Conselho Científico e dos Painéis Temáticos, que estão integrados nas redes científicas da EFSA. Em 2014, a ASAE assinou um protocolo com a empresa Biopremier, no âmbito da avaliação da autenticidade alimentar, tendo sido estabelecida ordem para a deteção e quantificação de espécies animais como cavalo, ovelha, peru, porco, e vaca (Sol et al., 2015).

O conhecimento sobre a composição dos produtos alimentares, a verificação da conformidade da rotulagem com a legislação e a subsequente deteção de fraudes (Ali et al., 2012; Primrose et al., 2010; Soares et al., 2014) abrangem questões como substituições indesejadas e ilegais (Ali et al., 2012; Kashani, 2014; Rojas et al., 2010; Safdar et al., 2014), proteção do valor de produtos locais (Rogberg-Muñoz et al., 2014), proteção dos animais (Bottero et al., 2011) e minimização de perdas económicas (Kashani, 2014).

Os produtos lácteos, a carne, os frutos do mar, o vinho, bebidas espirituosas, óleos alimentares, mel, sumos de frutas, café e chá, produtos orgânicos e processados e, ainda, os produtos *Halal*, encontram-se entre os alvos mais comuns no que respeita à fraude alimentar (Ellis et al., 2015).

Os produtos alimentares com designação *Halal* têm suscitado cada vez mais inquietações por parte dos consumidores (Amaral et al., 2015). Aqueles consistem em todos os produtos cujo consumo é permitido pela população muçulmana, devido às suas crenças religiosas, e que devem respeitar uma série de regras tais como a ausência de sangue animal, carne de porco, e carne de animais que não tenham sido sacrificados em nome de *Allah* (Mukhtar et al., 2012). As rigorosas normas de produção a que estes produtos se encontram sujeitos, refletem-se em preços de mercado mais elevados, especialmente em países onde a população muçulmana é uma minoria, tornando-se, por estes motivos, alvos fáceis de fraude alimentar (Amaral et al., 2015; Rahman et al., 2014).

Num estudo realizado por Amaral et al. (2015), 26 produtos cárneos com designação não-*Halal* mas rotulados como sendo produtos que apenas contém carne de aves, e 15 produtos com designação *Halal*, foram analisados quanto à possível presença de ADN suíno. Em 6 dos 15 produtos *Halal* e 16 dos produtos cárneos não-*Halal* à base de aves, verificou-se a presença de ADN suíno. Apenas foi possível efetuar a quantificação de ADN em 8 amostras, pois eram as únicas que apresentavam quantidades de ADN suíno acima do limite de deteção (0.01pg). Embora as quantidades de ADN detetado nas amostras de produtos cárneos à base de aves (0,03% - 0,24%) fossem superiores às dos produtos *Halal* (0,01%), todas as amostras analisadas sugerem que esta presença de ADN suíno foi fruto de possíveis contaminações aquando da sua produção, em vez de uma substituição fraudulenta por adição de carne de suíno (Amaral et al., 2015).

A título exemplificativo, referem-se os seguintes casos de fraude alimentar descobertos pela ASAE: em 2013, esta entidade apreendeu cerca de 12 mil embalagens de lasanha, que apenas continha carne bovina nos seus rótulos, produzidas no Luxemburgo e comercializadas em Portugal, pelo facto de conterem vestígios de carne de cavalo (Sol et al., 2015). Nos primeiros dois meses de 2013, foram detetados pela ASAE mais dois casos de não conformidades de rotulagem de produtos alimentares, para além do mencionado anteriormente, o que levou à apreensão de 1500kg de hambúrgueres de frango e 7471kg de ovos (ASAE, 2013a, 2013b).

Num estudo realizado por Kitpipit et al. (2014), foram analisadas primeiramente seis espécies de carne fresca normalmente consumida em todo o mundo (*Sus scrofa*, *Ovis aries*, *Gallus gallus*, *Struthio camelus*, *Equus ferus caballus* e *Bos indicus*). Foram também adquiridos 115 produtos alimentares em lojas e mercados locais de cinco províncias do sul da Tailândia, incluindo carnes congeladas cruas, alimentos congelados instantaneamente, alimentos de rua e alimentos com certificação *Halal*. Através da deteção direta com *multiplex*, os autores verificaram que apenas 3 das 115 amostras analisadas não amplificaram, e que em aproximadamente 25% de todas as amostras (29 de 115) foram detetadas espécies de carne que não constavam nos rótulos dos produtos alimentares.

O consumo de carne de caça tem vindo a aumentar nos últimos anos, devido ao seu sabor

intenso, composição saudável (menores teores de gordura), ou pela simples atração de experimentar alimentos novos e exóticos (Fajardo et al., 2010). Por estas razões, a carne de caça acarreta, normalmente, um custo mais elevado comparativamente a outras carnes, o que a torna um alvo suscetível de fraude. Em Portugal, a produção de Alheiras de Caça, com carne de animais de caça como coelho selvagem, lebre, e veado, tem vindo a aumentar (Amaral et al., 2014). Num estudo de Amaral et al. (2014), foram adquiridas 18 amostras comerciais de alheiras de caça, em mercados locais ou diretamente do fornecedor. Dentro destas, 13 não declaravam especificamente as espécies presentes nas mesmas, e 11 não respeitavam a rotulagem, por adição, substituição ou ausência de uma ou várias espécies indicadas nos rótulos.

Num estudo realizado por Meira et al. (2015), 67 amostras comerciais contendo carne de vaca na rotulagem foram analisadas para a presença de ADN equino, por se considerarem ser as mais propícias de serem adulteradas com adição de carne de equino. Das amostras analisadas, 33 foram adquiridas em 2012, previamente ao escândalo da carne de cavalo, e as restantes 34 amostras comerciais foram adquiridas entre 2013 e 2014, ou seja, posteriormente ao escândalo. Após a aplicação do método de PCR em tempo real para a deteção e quantificação de carne de equino, apenas duas amostras comerciais revelaram a presença de ADN equino (um hambúrguer e uma salsicha). Através da quantificação das amostras positivas, foi possível os autores concluir que as quantidades detetadas foram consideradas contaminações, uma vez que os valores detetados de ADN de equino nas duas amostras eram inferiores ao limite de deteção absoluto (0,1pg), obtido no estudo.

1.2. Produtos Cárneos

Nos últimos anos, a procura de alimentos de origem conhecida e elevada qualidade tem aumentado consideravelmente, uma vez que os consumidores se encontram cada vez mais preocupados com o meio ambiente, com a autenticidade dos produtos alimentares, bem como com as doenças que deles podem advir.

A carne como alimento, segundo o *Codex Alimentarius*, é definida como “todas as partes de um animal que se destinam a ser, ou ter sido ponderadas como seguras e adequadas para o consumo humano” (CAC/RCP 58, 2005). Esta possui um elevado valor nutricional, pois é uma fonte primária de proteínas com elevado valor biológico e aminoácidos essenciais, minerais, vitaminas de elevada biodisponibilidade, gorduras e ácidos gordos, o que contribui para que tenha um importante papel na alimentação diária humana. A carne é ainda muito versátil para a produção de diversos produtos cárneos, constituindo a matéria-prima principal da maioria dos produtos cárneos transformados (Mariano et al., 2015). Devido a todas estas características adjacentes, a carne

é considerada uma fonte proteica primordial, sendo consumida em grande parte dos países desenvolvidos ocidentais (Soares et al., 2014).

Os teores de proteínas podem variar consideravelmente, consoante a espécie. Se por um lado, os valores médios rondam os 22%, se estivermos a falar de peito de frango o teor de proteína aumenta para 34,5%. Por outro lado, a carne de pato apresenta um teor de proteínas inferior à média, rondando os 12,3% (Pereira et al., 2013).

Consoante a carne seja ou não processada e conforme o tipo de processamento (físico, químico ou bioquímico), existem classes distintas previstas pelo Regulamento (CE) n.º 853/2004 (Parlamento Europeu, 2004):

- **Carne fresca:** carne não submetida a qualquer processo de preservação que não a refrigeração, a congelação ou a ultra-congelação, incluindo carne embalada em vácuo ou em atmosfera controlada [n.º 1.10 do Anexo I do Regulamento (CE) n.º 853/2004];

- **Carne picada:** carne desossada que foi picada e contém menos de 1 % de sal [n.º 1.13 do Anexo I do Regulamento (CE) n.º 853/2004];

- **Carne separada mecanicamente:** produto obtido pela remoção da carne dos ossos carnudos ou de carcaças de aves de capoeira, utilizando meios mecânicos que provoquem a perda ou a alteração da estrutura das fibras musculares [n.º 1.14 do Anexo I do Regulamento (CE) n.º 853/2004];

- **Preparados de carne:** carne fresca, incluindo carne que tenha sido reduzida a fragmentos, à qual foram adicionados outros géneros alimentícios ou que foi submetida a um processamento insuficiente de modo a alterar a estrutura das fibras musculares e, assim, eliminar as suas características de carne fresca [n.º 1.15 do Anexo I do Regulamento (CE) n.º 853/2004];

- **Produtos à base de carne:** produtos transformados, resultantes da transformação da carne, de tal modo que a superfície de corte à vista permita constatar o desaparecimento das características da carne fresca [n.º 7.1 do Anexo I do Regulamento (CE) n.º 853/2004].

Embora as três primeiras classes de carne, por norma, não sejam consumidas cruas mas sim cozinhadas ou transformadas, estas podem ser consumidas cruas se não chegar qualquer tipo de informação ao consumidor que não o deverá fazer. Assim, cabe ao produtor ou fabricante de um determinado produto alimentar informar se o produto está pronto a ser consumido e qual a melhor maneira de o fazer (Costa et al., 2015).

Devido ao valor económico associado e à elevada procura de algumas espécies animais, a sua adulteração tornou-se num problema abrangente nos últimos anos, principalmente no que diz respeito a produtos processados e que apresentam matrizes complexas (Kashani, 2014; Yang et al., 2014).

1.3. Rastreabilidade

Ao longo das últimas décadas, a indústria alimentar, mais especificamente a indústria de produtos cárneos, tem vindo a aplicar fortes medidas para o estabelecimento de sistemas eficazes de rastreabilidade, de modo a preservar a segurança e qualidade dos alimentos (Fajardo et al., 2010).

De acordo com a União Europeia e a norma ISO 8402, a rastreabilidade é descrita como a capacidade de localizar qualquer substância, alimento, ou animal criado para alimentação, com a finalidade de ser consumido, em qualquer ponto da cadeia de produção, processamento e distribuição (Bosona et al., 2013; Storoy et al., 2013). A rastreabilidade animal pode ser definida como o acompanhamento dos animais, desde o nascimento até ao abate, detendo-se ao conhecimento de todos os eventos ocorridos durante a sua vida (Lara et al., 2003).

Segundo Opara (2003) existem seis elementos de rastreabilidade alimentar:

- Rastreabilidade de produto – localização física de um produto em qualquer fase da cadeia de distribuição alimentar;
- Rastreabilidade de processo – tipo e sequência de processos a que o produto é sujeito;
- Rastreabilidade genética – constituição genética do produto;
- Rastreabilidade de aditivos – tipo e origem de aditivos (ex: fertilizantes e conservantes);
- Rastreabilidade de doenças e pragas – epidemiologia de possíveis pragas e agentes patogénicos que possam contaminar o produto;
- Rastreabilidade metrológica – qualidade de uma medida relativamente a valores de referência.

Cada empresa integrante de uma cadeia alimentar deve conhecer os seus fornecedores (*tracing* – identificar a origem dos produtos) e clientes (*tracking* – seguir o caminho de uma unidade produzida) diretos, de modo a identificar a causa em situações irregulares (Bosona et al., 2013; Storoy et al., 2013). No entanto, alguns autores têm vindo a dar ênfase a um terceiro fator que completa a definição de rastreabilidade: a gestão logística de qualquer fluxo de informação que acompanha o percurso do produto alimentar (Figura 2) (Bosona et al., 2013; Dabbene et al., 2011).

Alguns autores acreditam que a rastreabilidade alimentar se encontra relacionada essencialmente com a qualidade e segurança dos alimentos, mas raramente com problemas de desenvolvimento de negócios e melhoria da logística. No entanto, a ligação entre a informação qualitativa e o fluxo físico é um ponto-chave no desenvolvimento de uma rastreabilidade efetiva e eficiente, devendo esta questão ser considerada do ponto de vista da gestão logística. Um exemplo claro diz respeito às embalagens dos produtos alimentares, que fazem parte das operações de logística na cadeia de suprimentos (Bosona et al., 2013).

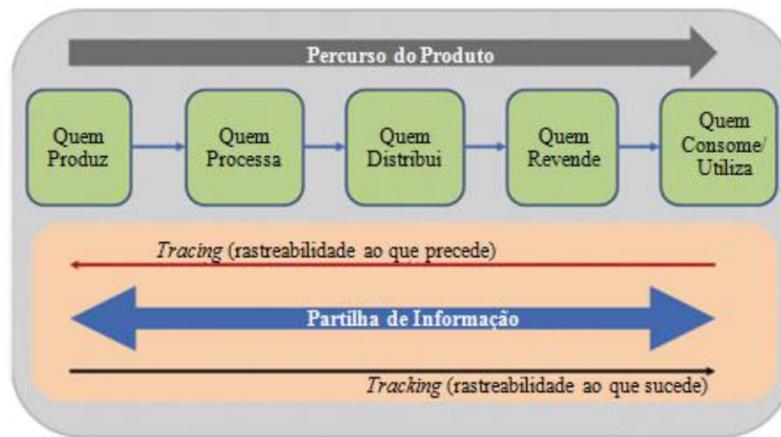


Figura 2 - Representação conceptual da rastreabilidade aplicada à cadeia de abastecimento alimentar.

Adaptado de Bosona et al. (2013).

O estabelecimento de redes de distribuição de menor custo, a redução das despesas inerentes à remoção de produtos em não conformidade do mercado, e a expansão das vendas de produtos com composição de difícil distinção, são alguns dos pontos que juntamente com os fatores preponderantes de crise económica e saúde pública fomentam o desenvolvimento de Sistemas de Rastreabilidade Alimentar (FTS) (Bosona et al., 2013; Storoy et al., 2013). O FTS consiste numa estratégia pró-ativa que se baseia na informação relativa à qualidade e segurança dos alimentos, facilitando na identificação dos produtos alimentares afetados, e que permite especificar o tipo de incidente, onde e quando ocorreu e, principalmente, quem é o responsável pela falha.

De acordo com Bosona et al., (2013), a implementação destes sistemas como parte integrante da gestão logística pode ser bastante útil para:

- a) Identificar o FTS apropriado para cada empresa de alimentos e incorporar numa fase inicial do *design* do sistema de logística da empresa;
- b) Reduzir a imprecisão na definição de rastreabilidade alimentar;
- c) Facilitar a implementação de FTSs;
- d) Treinar os funcionários em como lidar com produtos alimentares;
- e) Simplificar o serviço de manutenção (caso o sistema de rastreabilidade falhe);
- f) Aplicar dispositivos de rastreabilidade facilmente transmissíveis para parceiros e fortalecer a conectividade de informações ao longo da cadeia de fornecimento de alimentos;
- g) Aumentar a troca de comunicação e conhecimento entre especialistas em logística e especialistas em tecnologias de informação;
- h) Utilizar o banco de dados integrado para avaliar o desempenho de FTSs, gestão de logística e gestão da cadeia de fornecimento de alimentos.

Segundo Bosona et al., (2013), muitas são as preocupações/forças motrizes que impulsionam o desenvolvimento e implementação de FTSs:

- Legislativa – estabelecimento de nova legislação, introduzidas para abordar as preocupações de qualidade e segurança alimentar;
- Qualidade e Segurança – crises relacionadas com a segurança alimentar, como a BSE e crise das dioxinas;
- Social – aumento da confiança dos consumidores, mudança de estilos de vida e aumento da conscientização sobre a sua saúde;
- Económica – melhor acesso ao mercado, melhores preços dos produtos e o financiamento do governo são apontados como incentivos ao estabelecimento de FTSs, apesar do grande investimento inicial;
- Tecnológica – desenvolvimento de novos dispositivos de rastreabilidade (nanotecnológicos), mais simples e económicos estão a ser desenvolvidos, para fazer face aos iniciais sistemas que requerem dispositivos mais complexos e dispendiosos.

A *The TraceFood Framework*, financiada pela UE, consiste numa colaboração entre diversos projetos relacionados com a rastreabilidade de produtos alimentares, especialmente o projeto integrado TRACE onde a maior parte do trabalho relacionado à especificação, *design* e teste da estrutura ocorreu (Storoy et al., 2013).

O projeto Trace indica alguns métodos e princípios bem estabelecidos subjacentes à implementação de um eficiente sistema de rastreabilidade na indústria alimentar (Storoy et al., 2013):

- Identificação única de unidades rastreáveis – necessidade de criar uma unidade de rastreabilidade única (TRU). Segundo o artigo 3º da diretiva 1760/2000/CE, um dos elementos mais importantes para o sistema de identificação e registo de bovinos é a identificação única individual;
- Transformação documentada – acompanhamento de todos os produtos em qualquer ponto da cadeia de abastecimento e registo de qualquer transformação a que o produto seja submetido;
- Troca *standardizada* de informação: de modo a facilitar o intercâmbio eletrónico das informações relativas aos produtos, são necessários *standards* internacionais, que devem descrever o modo como a informação deve ser formulada, enviada e recebida, e ainda como cada elemento informativo deve ser identificado, medido, interpretado e armazenado.

A estratégia da *The TraceFood Framework* assenta nos parâmetros identificados na Figura

3, tendo esta já servido de base a diversos estudos piloto direcionados a produtos alimentares como água mineral, mel, peixe, marisco e criação de aves (Storoy et al., 2013).

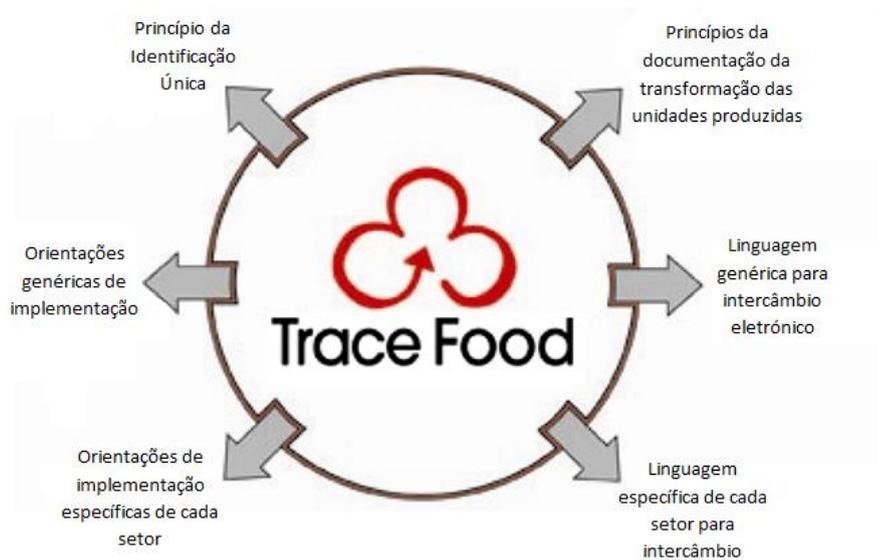


Figura 3 - Componentes da *The TraceFood Framework*. Adaptado de Storoy et al. 2013.

A implementação de projetos onde o *TraceFood Framework* foi utilizado, demonstrou que o principal obstáculo para uma implementação bem-sucedida e eficiente de sistemas de rastreabilidade em cadeias de produtos alimentares é organizacional e não técnico como se pensava. De um modo geral, as empresas do setor alimentar não se encontram motivadas para implementar novos padrões de rastreabilidade e intercâmbio de informações, por acharem que essas ações vão ter um custo adicional e por não estarem cientes dos benefícios associados. Além disso, as empresas não estão dispostas a fazer mudanças nas suas práticas operacionais atuais e, por outro lado, estão preocupadas com a segurança dos dados, não estando na grande maioria das vezes dispostas a compartilhar informações confidenciais (Storoy et al., 2013).

As crescentes exigências impostas pela legislação da UE, relativamente à rotulagem e rastreabilidade dos alimentos induziram a uma grande pesquisa para o desenvolvimento de metodologias moleculares fiáveis, sensíveis e robustas, para a autenticação de produtos alimentares, mesmo quando aplicadas em alimentos com matrizes complexas (Fajardo et al., 2010).

1.4. Métodos utilizados para a identificação de espécies em produtos cárneos

De modo a salvaguardar os consumidores, tornou-se imprescindível o desenvolvimento e estabelecimento de métodos rápidos e fiáveis, que permitissem a deteção de adulterações

fraudulentas, ou seja, que possibilitassem a quantificação quer das espécies esperadas, quer das espécies indevidas presentes em produtos com matrizes complexas (Köppel et al., 2009).

A escolha dos diferentes métodos a utilizar para a identificação de espécies e autenticidade de produtos alimentares depende de diversos fatores, como a matriz, especificidade e sensibilidade pretendidas e da rapidez necessária (Quinta et al., 2008).

Uma vez que as substituições em artigos similares ocorrem, muitas vezes, em misturas complexas, torna-se extremamente difícil distinguir as espécies presentes. A falta de identificação morfológica das diferentes espécies nos processados de carne destaca a importância da análise de proteínas e ADN, no suporte do sistema de rotulagem.

1.4.1. Métodos baseados na análise de proteínas

Desde a década de 1980, que têm vindo a ser desenvolvidas técnicas imunológicas e moleculares para a identificação de espécies em produtos alimentares e consequente avaliação da sua autenticidade. Inicialmente, muitos dos métodos baseavam-se na análise de proteínas, incluindo técnicas eletroforéticas, cromatográficas e ensaios imunológicos, as quais exigem a deteção de proteínas específicas de espécie (Cammà et al., 2012; Jorfi et al., 2012). No entanto, estas técnicas com o passar do tempo caíram em desuso, devido à sua baixa especificidade e inadequação no caso de matrizes complexas e sujeitas a processamentos, como é o caso de produtos que tenham sido congelados ou pré-cozinhados, que conduzem à degradação destas biomoléculas (Rojas et al., 2010). Embora não sejam muito utilizadas atualmente, estas técnicas apresentam vantagens como a elevada sensibilidade e rendimento de amostras, se considerarmos amostras de carne crua (Soares et al., 2013).

- **Técnicas eletroforéticas**

As técnicas eletroforéticas podem ser aplicadas na identificação de espécies, uma vez que os produtos cárneos são uma mistura de tecidos, constituídos essencialmente por proteínas. A composição proteica de um determinado produto pode variar consoante o tipo de tecido, o método de armazenamento utilizado e o tipo de processamento a que o produto é sujeito (Montowska & Pospiech, 2011). Na eletroforese, ocorre a separação das moléculas através da migração de partículas, sob a influência de um campo elétrico, sendo que a carga destas depende do pH do meio. Deste modo, é possível obter separações de elevada resolução das misturas de proteínas. A eletroforese em gel de poliacrilamida e dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) é o método eletroforético mais utilizado para a análise qualitativa de misturas de proteínas. Outros dos métodos utilizados são: o método de focagem isoeétrica (IEF), onde ocorre a separação das moléculas de

acordo com os seus pontos isoelétricos, e o método de eletroforese bidimensional (2-DE), que resulta da combinação do método de IEF com o SDS-PAGE (Wilson et al., 2010).

○ **Técnicas Cromatográficas**

A cromatografia é um processo de separação muito especial, na medida em que permite separar compostos de misturas complexas com elevada precisão. Mesmo elementos muito similares, como as proteínas que podem variar apenas num aminoácido, podem ser separados por cromatografia.

As técnicas cromatográficas funcionam com base na separação das substâncias de uma mistura em componentes individuais, através da determinação das propriedades de cada um dos componentes (Montowska & Pospiech, 2011). A cromatografia define-se como um processo de separação de componentes de uma amostra pela sua distribuição entre um fluido corrente (fase móvel) e um adsorvente (fase estacionária). No que respeita à fase estacionária, esta pode ser sólida, um líquido adsorvido a um sólido ou um gel. Por outro lado, a fase móvel pode ser um líquido ou um gás (Mota et al., 2006). Posteriormente à separação é realizada a quantificação, o que permite identificar quase todo o tipo de moléculas presentes num alimento (Montowska & Pospiech, 2011).

Conforme o tipo de eluente utilizado, pode considerar-se a cromatografia líquida (LC) e a cromatografia gasosa (GC). A primeira, em particular a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), tem a capacidade de detetar aminoácidos, proteínas, compostos fenólicos e hidratos de carbono. Por sua vez, a GC é mais adequada quando se trata da análise de moléculas voláteis ou semivoláteis (Reid et al., 2006). Estas técnicas apresentam algumas desvantagens, como o elevado custo, elevado tempo de espera e a complexa execução (Asensio et al., 2008).

○ **Ensaio Imunológico**

Os ensaios imunológicos são amplamente utilizados na identificação de produtos cárneos, dependendo de diversos fatores, como o grau de processamento, teor de gordura e nível de maturação. Estes são métodos rápidos, económicos, de fácil execução, específicos e sensíveis, quando o analito alvo é conhecido, sendo por estes motivos ideais para a deteção qualitativa e quantitativa de diversos tipos de proteínas (Asensio et al., 2008; Mafra et al., 2005).

Embora os ensaios imunológicos sejam muito utilizados para verificar a autenticidade dos alimentos, estes apresentam algumas limitações que condicionam a sua utilização. Algumas dessas limitações prendem-se com a falta de precisão e pela possibilidade de falha na deteção de espécies em produtos processados, onde as proteínas são desnaturadas (alteração dos epítomos) durante o

tratamento térmico. Isto deve-se ao facto de estes métodos serem otimizados para proteínas no seu estado nativo, ou seja, a sua estrutura deve estar o mais próximo possível do estado natural, para o sucesso do método (Nau et al., 2009; Soares et al., 2010). Para além disto, os ensaios imunológicos apresentam dificuldades iniciais na produção de um anticorpo específico para uma proteína em particular quando não existem *kits* comerciais, o que os torna muito dispendiosos (Reid et al., 2006). Existe ainda a possibilidade de ocorrerem reações cruzadas com proteínas de espécies estreitamente relacionadas e de não ser possível detetar diferenças na composição dos aminoácidos, entre proteínas (Di Pinto et al, 2005; Pfeiffer et al., 2004; Popping et al., 2010).

Os métodos imunológicos mais utilizados para a identificação de espécies animais são os ensaios em tiras de fluxo lateral, ELISA e a técnica de *Western blot*, apesar desta última ser mais apropriada para investigação do que para análises de rotina.

Tiras de Fluxo Lateral

As tiras de fluxo lateral utilizam dois tipos de anticorpos imobilizados e específicos para a proteína alvo, que são agrupados por um reagente corado, numa tira de nitrocelulose (Figura 4). Ao entrar em contato com a amostra em análise, o anticorpo marcado é solubilizado, ligando-se à proteína alvo (antigénio) e quando este complexo antigénio-anticorpo migra através da tira, passa através do local de ligação do segundo anticorpo (marcado). Se a amostra for positiva dá-se a ligação deste segundo anticorpo ao complexo anteriormente formado e surge uma primeira banda corada, seguida de uma segunda banda controlo que comprova que houve uma migração correta através da tira. Se a amostra for negativa, surge apenas uma banda (a segunda). Estes ensaios apenas indicam a ausência ou presença do analito alvo ou estabelecem o limite semiquantitativo do resultado (Mafra et al., 2005; Mark et al., 2010).

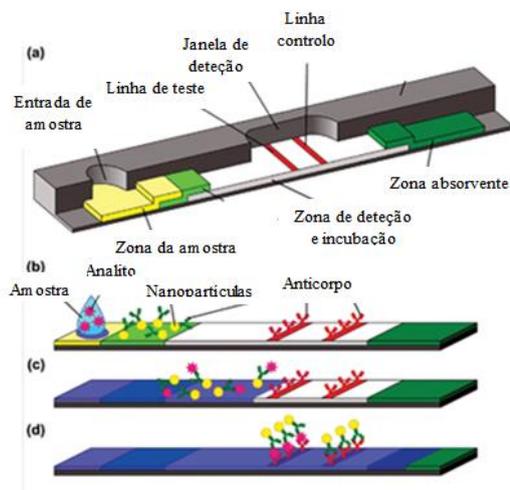


Figura 4 - Representação esquemática da técnica tiras de fluxo lateral. Adaptado de Mark et al. (2010).

ELISA

O método ELISA tem como base a imobilização de um antígeno ou um anticorpo a uma superfície sólida, e posterior detecção de reações antígeno-anticorpo, através de enzimas que convertem um substrato num produto cromático. As duas formas mais comuns de ELISA utilizadas na análise de componentes alimentares são o método indireto e o método *sandwich* (Figura 5) (Ali et al., 2012). Tanto um método como o outro envolve uma proteína que catalisa uma reação bioquímica (enzima) para detetar a presença de um antígeno ou anticorpo numa amostra. Os anticorpos e as proteínas que não se ligam são eliminados, ficando apenas retidos na superfície sólida os complexos anticorpo-proteína. Geralmente, o anticorpo marcado encontra-se ligado a uma enzima, que origina um produto corado aquando a presença do substrato (Asensio et al., 2008).

O método de ELISA pode ser aplicado em análises qualitativas, que apenas fornecem resultados positivos ou negativos, ou seja, só se verifica a presença ou ausência de determinada proteína/péptido, mas também se pode aplicar em análises quantitativas, através da interpolação da intensidade da fluorescência com uma curva *standard* gerada por diluições em série da proteína alvo (Ali et al., 2012). Alguns das restrições deste método dizem respeito à reduzida disponibilidade de diferentes anticorpos para as diversas espécies existentes (Ali et al., 2012; Lin et al., 2014), à existência de proteínas específicas de tecido (Cammà et al., 2012) e ainda à possibilidade de ocorrer reações cruzadas entre espécies relacionadas (Ali et al., 2012). Para além disto, alguns autores consideram que este método não se adequa a análises alimentares de rotina, pois a atividade biológica da maior parte das proteínas é perdida após o animal ser morto (Lin et al., 2014). Todas estas limitações afetam a sensibilidade do método, impossibilitando a aplicação do mesmo em amostras de matrizes complexas, compostas por diversas espécies (Ali et al., 2012).

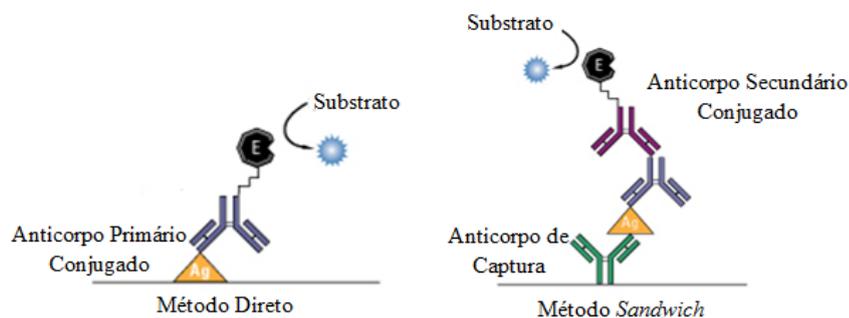


Figura 5 - Método ELISA, Direto e Sandwich. O antígeno de interesse é imobilizado por adsorção direta à placa de ensaio ou pela ligação a um anticorpo de captura à superfície da placa. A detecção do antígeno ocorre utilizando um anticorpo primário/secundário conjugado. Adaptado de Overview of ELISA (Thermo Fisher Scientific).

Western blot

Esta é uma técnica qualitativa com elevada especificidade, que fornece resultados do género presente ou ausente. A separação das proteínas normalmente é efetuada por SDS-PAGE, transferência dos componentes do gel para uma membrana de nitrocelulose, bloqueio dos locais de ligação das imunoglobulinas na membrana e adição de anticorpos como sonda (Figura 6). Não só por ser demorado, mas também devido ao elevado número de procedimentos, este método é mais utilizada em investigação do que em análises de rotina (Mafra et al., 2005).

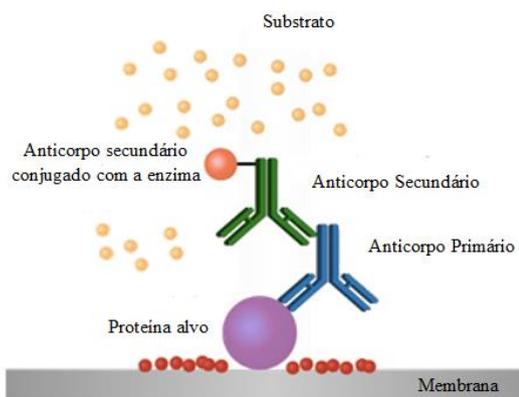


Figura 6 - Representação esquemática da técnica *Western blot*. Adaptado de Hegyi et al. (2013).

○ Proteómica

A abordagem proteómica usando a Espectrometria de Massa (MS) permite determinar o peso molecular e a sequência de aminoácidos de péptidos e proteínas, utilizando a sequenciação N-terminal baseada na degradação de Edman. O desenvolvimento de técnicas de ionização como MALDI e ESI possibilitam a ionização (de modo suave, preservando a estrutura polipeptídica) rápida de péptidos e proteínas antes da análise MS, permitindo assim a sua utilização como biomarcadores precisos e confiáveis, capazes de determinar a composição de produtos à base de carne (Sentandreu & Sentandreu, 2014). A MS permite a execução de análises qualitativas e quantitativas, devido à sua elevada especificidade. Um claro exemplo disto foi apresentado por Sentandreu et al. 2010, que identificaram biomarcadores peptídicos para porco, vaca, frango e peru, após a digestão e hidrólise de proteínas miofibrilares.

A abordagem proteómica apresenta um grande potencial em termos de robustez e confiabilidade na autenticação de produtos cárneos processados. A extração de péptidos e proteínas é mais acessível em comparação com os procedimentos de extração de ADN, o que facilita o desenvolvimento de protocolos de extração padronizados (Sentandreu & Sentandreu, 2014). Outra

das vantagens desta técnica diz respeito à possibilidade de detecção de proteínas específicas de tecido, possibilitando distinguir entre tecidos da mesma espécie (Primrose et al., 2010; Sentandreu & Sentandreu, 2014). Para além disto, a resistência da estrutura primária das proteínas às rígidas condições de processamento, aumenta a confiança do processo de quantificação das mesmas (Sentandreu & Sentandreu, 2014).

1.4.2. Métodos baseados na análise de ADN

Todas as dificuldades associadas aos métodos baseados na análise de proteínas para o estudo da autenticidade de produtos cárneos estimularam a aplicação de técnicas biomoleculares, baseadas na amplificação de ADN (Mafra et al., 2008; Ong et al., 2007). Os métodos moleculares baseados na análise de ADN mostraram um limite de detecção muito baixo (Ballin et al., 2009), desempenhando atualmente um papel central na identificação de espécies em misturas de carne crua ou cozinhada (Dooley et al., 2004; Sol et al., 2015).

1.4.2.1. ADN alvo a amplificar

Em comparação com os métodos baseados na análise de proteínas, os métodos baseados na análise de ADN apresentam diversas vantagens, como a elevada estabilidade da molécula de ADN quando comparada com as proteínas, o conteúdo de informação presente na molécula de ADN é maior do que nas proteínas, devido à degeneração do código genético (vários codões codificam o mesmo aminoácido), a ubiquidade em todos os tipos de células (Amaral et al., 2014), a sua variabilidade única e a existência de sequências específicas de espécie (Cammà et al., 2012).

Embora os ácidos nucleicos presentes nos alimentos não tenham qualquer valor nutricional, estes são característicos de cada produto alimentar. Assim, a partir da análise específica dos ácidos nucleicos, é possível determinar a presença ou ausência de um componente, ou identificar as suas características específicas num determinado alimento.

Uma diversidade de métodos baseados na análise de ADN tem sido utilizada na autenticação de produtos alimentares, sendo que a reação em cadeia da polimerase (PCR) se apresenta como uma alternativa rápida, simples, de elevada sensibilidade e especificidade (Mafra et al., 2008; Soares et al., 2010). Outra das vantagens das técnicas baseadas na PCR diz respeito à sua versatilidade, que permite o isolamento e extração de ADN a partir de diferentes materiais de origem, podendo aplicar-se esta técnica quer em amostras líquidas, quer em amostras de elevada rigidez (Natonek-Wiśniewska et al., 2013).

As técnicas biomoleculares têm sido, nos últimos anos, amplamente utilizadas no controlo de alimentos para consumo humano e animal (Sol et al., 2015), sendo que, consoante a finalidade

do ensaio, podemos recorrer ao ADN genómico (gADN) ou ao ADN mitocondrial (mtADN) (Ballin et al., 2012; Ballin et al., 2009).

A seleção adequada do marcador de ADN é extremamente importante e constitui um papel fundamental em qualquer método baseado na técnica de PCR. O genoma mitocondrial tem demonstrado ser uma melhor opção para diagnósticos moleculares em produtos de origem alimentar, apresentando diversas vantagens em relação ao ADN nuclear. O mtADN encontra-se presente nas células em elevado número de cópias, aumentando a probabilidade de ser detetada uma sequência específica, mesmo quando está presente em pequenas quantidades, bom como a probabilidade de se amplificarem fragmentos muito pequenos, resultantes do processamento térmico a que os alimentos estão sujeitos (Bottero et al., 2011; Fajardo et al., 2008; Fajardo et al., 2010).

A composição do mtADN, livre de sequências repetitivas, intrões complexos e pseudogenes, torna-se mais organizada comparativamente à do gADN (Zha et al., 2010). Além disso, o mtADN é haplóide, quase exclusivo de herança materna e não-recombinante, o que permite estabelecer ligações genéticas. O número de mitocôndrias existente por célula depende da sua atividade metabólica, sendo que no caso de uma célula animal, podem ser encontradas até 1000 mitocôndrias (cada mitocôndria possui entre 2 a 6 moléculas de ADN) (Fajardo et al., 2008; Murugaiah et al., 2009). O elevado número de número de mitocôndrias presentes na maioria das células é a principal vantagem deste tipo de ADN na determinação de espécies, refletindo-se num menor limite de deteção (LOD), ou seja, numa maior sensibilidade da PCR (Ballin et al., 2012; Ballin et al., 2009; Cammà et al., 2012; Rojas et al., 2010; Yang et al., 2014; Zha et al., 2010). O mtADN é herdado somente por via materna e não sofre recombinações, apresentando-se mais conservado que o gADN. Para além disto, os genes mitocondriais apresentam uma taxa de mutação relativamente elevada, conseguindo evoluir mais rapidamente que os genes nucleares, o que facilita a identificação de espécies filogeneticamente relacionadas (Fajardo et al., 2010). Outra característica do mtADN extremamente importante e que o distingue do gADN refere-se à resistência do mtADN à fragmentação, após exposição a elevadas temperaturas, favorecida pela sua forma circular (Sentandreu & Sentandreu, 2014; Yang et al., 2014). Num estudo efetuado por Musto (2011), foi possível verificar que a intensidade da banda produzida em gel de agarose, era superior quando a sequência amplificada correspondia a mtADN (comparando com a banda de gADN), indicando assim que o gADN sofre mais fragmentação (Musto, 2011).

Uma vez que existe variação do número de cópias de genes mitocondriais por células, entre diferentes espécies, diferentes indivíduos da mesma espécie e diferentes tecidos do mesmo indivíduo, surgem limitações na utilização do mtADN para a deteção e quantificação de espécies específicas (Ballin, 2010; Bottero et al., 2011).

A PCR, quando realizada com gADN, pode ter como alvo sequências de cópia única ou sequências repetitivas, como microssatélites, minissatélites, satélites, transposões, SINE e LINE, que diferem entre si na sua localização, organização e abundância (Ballin et al., 2009). Se por um lado, as sequências de cópia única permitem a obtenção de medições quantitativas mais coerentes (Sentandreu & Sentandreu, 2014), por outro, as sequências repetitivas permitem a obtenção de um menor LOD (Ballin et al., 2012). Tanto numa análise qualitativa como quantitativa, a escolha da técnica analítica e da sequência de ADN a analisar têm uma enorme influência no LOD e por consequência, na sensibilidade do sistema de amplificação (Ballin et al., 2009).

1.4.2.2. Sequências alvo

Os genes mitocondriais têm sido amplamente utilizados em estudos filogenéticos, aumentando o número de sequências de referência em bases de dados e possibilitando uma melhor avaliação da variabilidade intra e inter específica (Bottero et al., 2011; Teletchea, 2009). A grande variabilidade dos genes mitocondriais existentes permite uma identificação credível ao nível da espécie (Bottero et al., 2011).

Entre os genes mitocondriais, o gene do citocromo b (*cytb*), *D-loop*, subunidades ribossomais 12S e 15S, COII e ATPase8, são os marcadores mais utilizados para autenticação de produtos cárneos (Fajardo et al., 2010; Yang et al., 2014). A subunidade ribossomal 12S foi utilizada na identificação de espécies como búfalo, carneiro e vaca (Girish et al., 2005). A sequência mitocondrial *D-loop* possibilitou o desenho de *primers* específicos para detetar diversas espécies animais, como a cabra, ovelha, porco e veado (Fajardo et al., 2008).

O gene do *cytb* apresenta regiões conservadas e regiões de elevada variabilidade (Mohamad et al., 2013; Teletchea, 2009), o que possibilita uma reconstrução mais precisa e com elevada resolução da filogenia dos mamíferos, devido à sua elevada taxa de conservação intra-espécie e à considerável variabilidade da sua sequência inter-espécie (Amaral et al., 2014; Rahman et al., 2014; Yusop et al., 2012). Tudo isto contribui para que este seja o gene universalmente mais utilizado em análises de identificação de espécies (Amaral et al., 2014; Dooley et al., 2004; Teletchea, 2009; Yusop et al., 2012).

Além dos genes mitocondriais, também têm sido descritos genes nucleares para a discriminação de espécies de carne, devido à existência de intrões de diferentes tamanhos que permitem a amplificação de fragmentos de ADN específicos de espécie. Alguns exemplos de genes nucleares são o gene da hormona de crescimento (GH), o gene recetor da melanocortina 1 (MC1R), o gene da actina e o gene 18 srARN (Fajardo et al., 2010; Mohamad et al., 2013).

1.4.2.3. Extração e isolamento de ADN

A eficiência e o sucesso dos métodos baseados na análise de ADN dependem da escolha certa do método de extração e purificação dos ácidos nucleicos. Assim, o método de extração escolhido deve ser eficaz, de modo a obterem-se extratos de ADN de elevada qualidade e pureza, livres de inibidores que poderão afetar o sucesso da amplificação (Di Pinto et al., 2005; Somma, 2006). Uma vez que os produtos alimentares são matrizes complexas, a escolha do método de extração está dependente da origem do material biológico, do processamento a que foram submetidos (térmico, químico, enzimático) e da presença de potenciais inibidores de amplificação de ADN, como polissacarídeos, polifenóis, proteínas (Mafra et al., 2008; Popping et al., 2010; Stefanova et al., 2013), e óleos e gorduras (Safdar et al., 2015).

Existe uma grande diversidade de métodos de extração e purificação de ADN, sendo que a escolha da técnica mais apropriada deve ter sempre em conta alguns critérios fundamentais, como o ácido nucleico alvo da extração, a matriz do produto alimentar (origem do tecido e processamento), quais os resultados desejados (concentração e pureza) e qual a aplicação futura (PCR, clonagem, entre outras) (Somma, 2006). Nos últimos anos, têm sido empregues vários métodos de extração de ADN de produtos cárneos (Tabela 2), destacando-se o método baseado no reagente CTAB (brometo de cetiltrimetilamónio) e os *kits* comerciais.

Tabela 2 – Diferentes métodos de extração empregues em produtos cárneos.

Método de extração	Referências
CTAB modificado	Gryson et al., (2004) Mayer & Hochegger (2011) Pirondini et al., (2010) Stefanova et al. (2013)
DNeasy Tissue Kit (Qiagen)	Aida et al., (2005) Dalmaso et al., (2004) Farrokhi & Joozani (2011) La Neve et al., (2008) Murugaiah et al. (2009)
Fenol-Clorofórmio	Muhammed et al., (2015)
GenElute™ Mammalian Genomic DNA Extaction Kit (Promega)	Chisholm et al., (2008)
NucleoSpin® Food (Macherey-Nagel)	Sol et al., (2015)
QIAamp DNA Micro Kit (qiagen)	Tobe & Linacre (2008)
SureFood® Prep Animal X Kit (R-Biopharm)	Demirhan et al., (2012)
Tissue Mini Kit (Qiagen)	Di Pinto et al. (2005) Ghovvati et al., (2009)
Wizard® DNA Clean-up System Kit (Promega)	Brodmann et al., (2003) Chisholm et al. (2008) Fajardo et al. (2008) Martín et al. (2007) Rojas et al. (2008)
Wizard® Magnetic DNA Purification for Food (Promega)	Lanzilao et al., (2005) Stefanova et al. (2013)
Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System (Promega)	Koppel et al. (2009) Koppel et al. (2011)

A extração de ácidos nucleicos, das mais diversas matrizes alimentares, pressupõe a lise celular, a inativação de nucleases intercelulares e a separação dos ácidos nucleicos dos restantes compostos celulares. O processo de lise celular deve ser o mais rigoroso possível, de forma a romper as paredes/membranas celulares, sem danificar os ácidos nucleicos, podendo ser provocado

por ruptura mecânica, tratamento químico ou por digestão enzimática. A inativação das nucleases intercelulares pode ser feita em conjunto com a lise da membrana, utilizando uma solução que contenha detergentes que solubilizem as membranas e sais que inativem as nucleases. Posteriormente, a separação dos restantes compostos celulares é facilitada, por via de um processo de centrifugação ou precipitação (Somma, 2006).

1.4.2.4. Técnica de PCR Convencional

De todos os avanços tecnológicos que a biologia molecular moderna sofreu, a técnica de PCR é claramente o mais útil. Esta metodologia foi desenvolvida por Kary Mullis, em 1984, com o intuito de suprimir as limitações de sensibilidade inerentes aos protocolos de detecção existentes (Mullis et al., 1986). A técnica de PCR tem como princípio base gerar múltiplas cópias de uma sequência alvo de ADN, com recurso a um par de *primers* (oligonucleótidos), sendo que cada um hibrida com uma cadeia da molécula de ADN alvo, multiplicando exponencialmente a região por eles delimitada (Ballin et al., 2009; Kashani, 2014; Mafra et al., 2008).

A reação ocorre em três etapas distintas, determinadas por diferentes temperaturas e que permitem a desnaturação da dupla cadeia de ADN, o *annealing* dos *primers* e a extensão das cadeias (Figura 7) (Popping et al., 2010; Somma, 2006). Na primeira etapa, desnaturação de ADN, ocorre a separação da dupla cadeia de ADN, por desnaturação térmica ($T > 90\text{ }^{\circ}\text{C}$). Assim, com o aumento da temperatura, as ligações por pontes de hidrogénio são quebradas, aumentando consequentemente o número de bases desemparelhadas. A reação apenas termina quando todas as cadeias duplas se transformaram em cadeias simples. Posteriormente, as temperaturas baixam ($50\text{ }^{\circ}\text{C} < T < 60\text{ }^{\circ}\text{C}$) e o par de *primers* (*forward* e *reverse*) adicionado à reação liga-se à sequência complementar, delimitando o fragmento de ADN específico. A temperatura de *annealing* é específica para cada método e é essencial para a otimização do processo. Por último, ocorre a extensão das cadeias por ação da polimerase de ADN ($72\text{ }^{\circ}\text{C} < T < 78\text{ }^{\circ}\text{C}$). Esta enzima sintetiza a cadeia complementar, na direção 5'-3', com a ajuda de nucleótidos trifosfatos (dNTPs) presentes na reação. A duração desta etapa depende do tamanho da região de ADN que se pretende amplificar (quanto maior, mais tempo será necessário). No final de cada ciclo de PCR, obtêm-se duas novas cadeias de ADN, que servem de molde para o próximo ciclo e assim sucessivamente. Pode então concluir-se que o resultado da PCR é o aumento exponencial do número total de fragmentos específicos e cuja abundância é representada por um crescimento exponencial 2^n , onde o n representa o número de ciclos (Joshi & Deshpande, 2010; Somma, 2006).

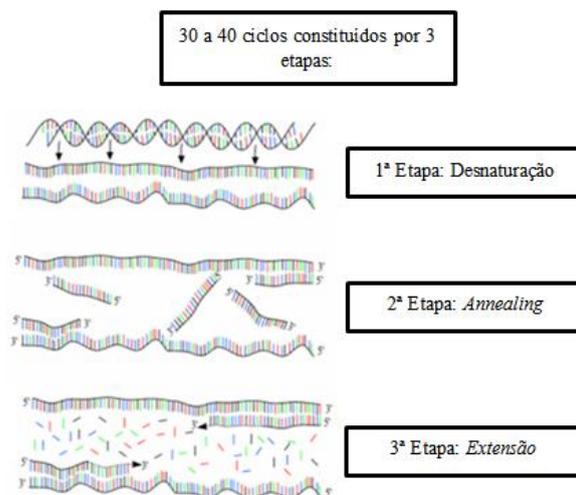


Figura 7 - Representação esquemática das etapas da PCR. Adaptado de Popping et al., (2010).

Dependendo da qualidade de ADN inicial, este ciclo de temperaturas é, normalmente, repetido 25 a 40 vezes. O sucesso da PCR depende não só da temperatura e dos ciclos de amplificação, mas também dos componentes que compõem a reação:

- **ADN alvo:** a amplificação por PCR pode ser normalmente realizada se existir, pelo menos, uma cópia intacta do gene alvo, sendo que quanto maior for o número de cópias do gene alvo, maior é a probabilidade da reação de amplificação ter sucesso. É extremamente importante realçar que o extrato deve ser o mais puro possível, por forma a evitar inibições enzimáticas no decorrer da amplificação.
- **Primers (*forward e reverse*):** estes dois oligonucleótidos iniciadores conferem elevada especificidade à técnica de PCR, quando desenhados de forma correta. Os *primers* são cadeias curtas que definem o local onde se inicia a replicação do ADN e são obtidos a partir de síntese química. Geralmente atuam em conjuntos de dois iniciadores diferentes, que não devem ser complementares entre si mas que são complementares ao local de reconhecimento no segmento de ADN alvo a ser amplificado.

O seu comprimento varia entre 18 e 25 nucleótidos, devendo conter entre 40% a 60% de bases GC (Guanina e Citosina). De modo a aumentar a hibridação da extremidade que se pretende estender, sempre que for possível, a extremidade 3' do *primer* deve ter uma grande quantidade de bases Citosina (C) e Guanina (G). Para além disto, o tamanho dos *primers* também tem uma enorme influência na eficiência da hibridação. Assim, quanto maior for o tamanho destes, menos eficaz será a hibridação. Na análise de alimentos muito

processados o par de *primers* deve ser desenhado, de modo a produzir um fragmento de tamanho pequeno (inferior a 150-200 pares de bases (pb)).

- **ADN polimerase:** enzima capaz de sintetizar uma nova molécula de ADN de cadeia dupla, atuando sempre na direção 5'-3'. Uma vez que a técnica de PCR envolve diversos ciclos de elevadas temperaturas, a enzima deve ser termoestável, ou seja, resistente a elevadas temperaturas. Este tipo de enzimas é, por norma, isolada de bactérias que residem em fontes de águas termais. A enzima mais utilizada em PCR é a *Taq* polimerase, extraída e purificada a partir da bactéria termofílica, *Thermus aquaticus* (*Taq*).
- **Tampão de reação:** o tampão regula o pH da reação e a sua composição depende das características da enzima utilizada na reação, daí ser comercializado normalmente com a ADN polimerase. Uma maior atividade da ADN polimerase é observada com tampões de pH acima de 8.
- **dNTPs:** os desoxirribonucleótidos trifosfatados livres são os quatro nucleótidos do ADN, desoxiadenina trifosfato (dATP), desoxicitosina trifosfato (dCTP), desoxiguanina trifosfato (dGTP) e desoxitimina trifosfato (dTTP). A presença de dNTPs é fundamental para a construção da nova cadeia dupla sintetizada pela ADN polimerase. A concentração dos quatro dNTPs deve ser equivalente, de modo a minimizar erros de incorporação.
- **Concentração de iões Mg²⁺:** o Mg²⁺ é um dos componentes mais críticos na reação de PCR e a sua concentração pode interferir na eficiência e especificidade da mesma. Os iões Mg²⁺ estimulam a atividade da ADN polimerase e formam um complexo solúvel com os dNTPs, de modo a facilitar a síntese da nova cadeia de ADN. Por norma, uma baixa concentração destes iões pode provocar baixo rendimento na reação de amplificação e uma elevada concentração pode levar à produção de produtos não específicos. A concentração de Mg²⁺ deve ser otimizada para cada reação.
- **Água:** deve ser ultra pura, isenta de nucleases de ADN e ARN, e isenta de qualquer outro componente que possa inibir a reação de PCR.

Os fragmentos de ADN (amplicões) produzidos pela PCR são, geralmente, visualizados através da eletroforese em gel de agarose. Este é um método sensível, rápido e normalizado, que permite separar e identificar fragmentos de ADN, através da migração de moléculas de ADN sob ação de um campo elétrico. Uma vez que os ácidos nucleicos têm carga negativa, a pH neutro, as moléculas migram do pólo negativo para o pólo positivo, separando-se de acordo com o tamanho dos fragmentos. Existe sempre a possibilidade de aparecer uma banda com o mesmo tamanho do fragmento alvo, que poderá não corresponder ao fragmento pretendido, tornando-se necessário

recorrer a outros métodos que permitam a confirmação dos resultados de PCR.

Alguns dos métodos que podem ser utilizados para a confirmação destes resultados são a sequenciação dos fragmentos amplificados, hibridação específica com sondas e recurso a enzimas de restrição (Mafra et al., 2008).

De modo a garantir a fiabilidade dos resultados, é necessário utilizar sempre controlos positivos e negativos na reação de PCR. O controlo positivo (analito presente) permite comprovar a eficácia da extração e amplificação e o controlo negativo (analito ausente) permite verificar a ocorrência de contaminações, durante a fase de extração e purificação do ADN e na preparação da reação de amplificação (Popping et al., 2010; Somma, 2006).

A técnica de PCR apresenta maior sensibilidade e especificidade, em relação a outras técnicas utilizadas, constituindo por esse motivo uma ferramenta simples, rápida, sensível e específica no que respeita à deteção de constituintes de origem animal em alimentos (Fajardo et al., 2010) e à deteção de adulteração de carne e produtos derivados (Ali et al., 2012; Ulca et al., 2013). Para além disto, esta técnica possibilita a amplificação de uma cópia de ADN alvo, sendo por esse motivo, o LOD mais baixo (Cammà et al., 2012) do que o observado em métodos de análise proteica. Esta particularidade é uma mais-valia para a determinação de espécies em amostras de ADN de qualidade reduzida (Ballin et al., 2009).

No entanto, a PCR apresenta algumas desvantagens, como a necessidade de dados específicos sobre a espécie alvo, para que os *primers* possam ser desenhados (Fajardo et al., 2010). Para além disto, os resultados da PCR convencional apenas podem ser avaliados no final de todos os ciclos de amplificação estarem concluídos (Ballin et al., 2009; Rojas et al., 2010), sendo a análise feita com base na avaliação da dimensão dos fragmentos (Biosystems, 2002). O risco de contaminação e de falsos-positivos aumentam consideravelmente, devido ao manuseamento de produtos amplificados (Rojas et al., 2010). Devido a isto, esta análise é unicamente qualitativa ou, por vezes, semi-quantitativa, se forem efetuadas diluições da amostra, como modelo de comparação (Ballin et al., 2009).

1.4.2.5. PCR em Tempo Real

De forma a solucionar os problemas gerados pela PCR convencional, surgiram métodos de PCR quantitativa, como é o exemplo da PCR em tempo real, que tem como finalidade estabelecer uma relação entre a concentração de ADN alvo e a quantidade de produto gerado pela PCR (Mafra et al., 2005).

A PCR em Tempo Real – também designada de PCR quantitativa (Q-PCR, q-PCR, qrt-PCR) – foi descrita, pela primeira vez nos anos 90, por Russell Higuchi e seus colaboradores (Higuchi et al., 1993). Higuchi e os seus colaboradores construíram um sistema ao qual acoplaram

uma câmara de vídeo, de modo a monitorizar todos os ciclos da PCR, o que lhes permitia assim detetar o aumento da fluorescência durante a reação, devido à ligação de brometo de etídio às moléculas de ADN de cadeia dupla, recém-sintetizadas. O brometo de etídio, quando ligado à cadeia dupla de ADN, e excitado por luz UV, emitia uma fluorescência que aumentava com o aumento da quantidade de ADN presente na amostra. Assim, o aumento do produto de PCR podia ser visualizado a cada ciclo (Pfaffl et al., 2009; Valasek & Repa, 2005).

Esta técnica baseia-se nos princípios gerais da PCR convencional, diferindo principalmente na possibilidade de quantificação em tempo real do ADN amplificado em cada ciclo. A deteção dos produtos de amplificação é efetuada, atualmente, através da emissão de fluorescência por parte de fluoróforos que são incluídos na reação, deixando assim de lado o brometo de etídio utilizado inicialmente. A quantidade de fluorescência emitida é diretamente proporcional à quantidade dos produtos de PCR.

As fases de amplificação, deteção e quantificação são totalmente automatizadas neste método, ocorrendo em simultâneo e em tempo real. Para tal, esta técnica requer uma plataforma de instrumentação que contém um termociclador com sistema ótico para mensurar a emissão de fluorescência, e um computador com *software* para a aquisição dos dados (Pfaffl et al., 2009).

A PCR em tempo real, em comparação com a técnica convencional, permite a discriminação e medição de vestígios de diferentes espécies animais, em alimentos de composição complexa. Enquanto técnica quantitativa, a PCR em tempo real tem sido amplamente aceite como um ensaio robusto, devido à sua maior gama de deteção, maior especificidade e sensibilidade, menor risco de contaminação, facilidade de execução e rapidez (Fajardo et al., 2008; Kesmen et al., 2009; Pfaffl et al., 2009; Rojas et al., 2012). Esta técnica tem demonstrado ser um bom teste de rotina, devido à possibilidade de discriminar diversas espécies simultaneamente, através da PCR *multiplex*, com recurso a marcadores distintos, permitindo desse modo a análise de matrizes complexas (Ballin et al., 2009). A utilização de fluorescência para fins de deteção elimina a necessidade de realizar eletroforese em gel de agarose, o que permite a avaliação direta dos resultados após a PCR estar concluída e diminui ainda o risco de contaminação, pois a análise pós-PCR ocorre num tubo fechado e sem intervenção do operador (Fajardo et al., 2008; Kesmen et al., 2009; Pfaffl et al., 2009; Rojas et al., 2012). Além disso, a PCR em tempo real permite a identificação de pequenos fragmentos de ADN em comparação com a técnica convencional, o que facilita a cinética da reação e torna possível a análise de alimentos crus e processados (Levin, 2004).

A par de todas estas vantagens, esta técnica também apresenta algumas limitações, como o elevado custo dos equipamentos necessários para a análise, o elevado custo das sondas específicas, e o elevado nível de competência técnica requerida para a elaboração dos protocolos (Pfaffl et al.,

2009). Por outro lado, a elevada sensibilidade desta técnica, pode dificultar a distinção entre contaminação cruzada e práticas fraudulentas, em particular nos estudos de autenticação de produtos alimentares (Bottero et al., 2011; Primrose et al., 2010).

A necessidade de desenvolver métodos que garantam resultados quantitativos cresceu, devido à introdução de obrigações de rotulagem estabelecidas pelas *Authorized Food Control Agencies* (Kashani, 2014). A quantificação exata de um ingrediente revela-se de extrema importância quando (Soares et al., 2014):

- o limite de contaminação acidental é estabelecido (quantidades < 0.9 % não é necessário rotular – *Commission Regulation EC No. 1829/2003*);
- existe necessidade de verificar a veracidade dos rótulos face às quantidades declaradas dos ingredientes utilizados;
- limite máximo de um ingrediente adicionado se encontra instituído.

Nos últimos anos, muitos têm sido os ensaios descritos para a deteção de espécies animais como o cavalo, galinha, pato, porco e vaca. A PCR em tempo real permite a deteção de pequeníssimas quantidades de ADN de diversas espécies animais em produtos com composição complexa, tendo-se tornado uma ferramenta promissora para a autenticação de produtos cárneos. A vasta utilidade e diversidade de áreas em que esta técnica pode ser empregue fazem com que seja uma das mais acessíveis e utilizadas em grande parte dos laboratórios e indústrias alimentares, com aplicação tanto na investigação, como em programas de inspeção (Kashani et al., 2014).

1.4.2.5.1. Análise HRM (High-Resolution Melting Analysis)

A análise das curvas de *melting* é uma das abordagens mais utilizadas para análise dos resultados obtidos por PCR em tempo real. A dissociação da dupla cadeia de ADN é conhecida como desnaturação ou *melting*, podendo ser induzida quer pelo aumento da temperatura, quer por métodos químicos. Esta desnaturação pode ser seguida com corantes intercalares, que apresentam emissão de fluorescência na presença de ADN de cadeia dupla. Assim, a fluorescência emitida é monitorizada e pode ser analisada com base na temperatura de *melting* (T_m), que consiste na temperatura em que 50% do ADN se apresenta em dupla cadeia e o restante em cadeia simples (Wittwer et al., 2003).

A HRM é uma análise pós-PCR, frequentemente utilizada para identificar variações genéticas nas sequências de ADN (Vossen et al., 2009).

1.4.2.5.2. Quantificação

Na PCR em tempo real, a amplificação do ADN alvo pode ser controlada e quantificada no final de cada ciclo (Weighardt, 2010), sendo esta a principal vantagem comparativamente à PCR convencional (Soares et al., 2013), onde apenas se consegue visualizar os produtos amplificados no final de todos os ciclos estarem concluídos. Assim, é possível quantificar vestígios ínfimos de espécies de carne em produtos alimentares (Sentandreu & Sentandreu, 2014).

As curvas de amplificação, obtidas durante a reação, são compostas por três fases distintas: (1) fase inicial, (2) fase exponencial ou fase “log” e (3) fase “plateau”. A primeira fase ocorre durante os primeiros ciclos da PCR e é onde se acumulam níveis de fluorescência de fundo, correspondendo muitas vezes ao ruído do aparelho. Esta fase inicial encontra-se sempre abaixo da linha *threshold*. Na segunda fase, ocorre um aumento exponencial dos sinais de fluorescência, proporcional à quantidade de ADN que está a ser amplificada a cada ciclo. É na fase exponencial que ocorre a quantificação. Por último, na fase de “plateau”, os reagentes estão esgotados e a acumulação dos produtos amplificados mantém os valores de fluorescência constantes (declive tende para zero) (Rodriguez-Lazaro et al., 2013; Weighardt, 2010).

O número de ciclos de PCR necessários para que seja detetado, pela primeira vez, um sinal de fluorescência, estatisticamente acima do nível de ruído, designa-se *cycle threshold (Ct)* (Figura 8). O valor de *Ct* é inversamente proporcional ao logaritmo da quantidade inicial de ADN alvo, desde que a eficiência da PCR seja constante (Weighardt, 2010). Este valor é sempre detetado na fase exponencial da amplificação, onde a reação é mais eficiente e a quantificação é menos afetada por condições limitantes da reação (Rodriguez-Lazaro et al., 2013). Se numa determinada amostra estiver presente uma grande quantidade de ADN alvo, serão necessários menos ciclos para a reação de PCR entrar na fase exponencial, e o valor de *Ct* será conseqüentemente menor. Por outro lado, se concentração de ADN alvo for menor, o valor de *Ct* será automaticamente maior.

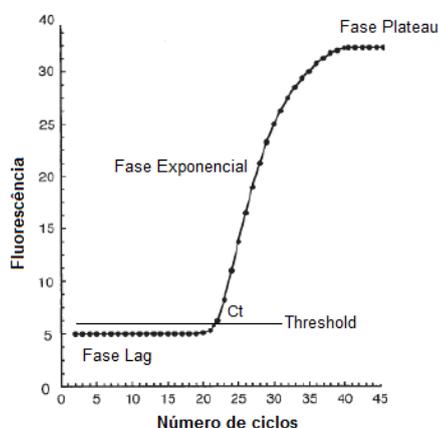


Figura 8 - Gráfico de amplificação da PCR em Tempo Real. Adaptado de Levin, (2004).

Existem dois métodos básicos para a quantificação de ADN de amostras desconhecidas, sendo eles o método de quantificação absoluta e relativa (Mohamad et al., 2013; Popping et al., 2010).

- **Quantificação absoluta (Curva Standard)**

A quantificação absoluta realiza-se a partir de um conjunto de diluições em série de uma concentração conhecida de ADN, que será amplificado através de PCR em tempo real. Uma curva de calibração é então construída através da interpolação dos valores de C_t obtidos para cada uma das diluições, em função do logaritmo da quantidade de ADN (Fajardo et al., 2010; Mohamad et al., 2013).

A curva *standard* é gerada através da correlação entre o logaritmo da quantidade inicial de ADN e o número de C_t gerado para cada uma das diluições (Figura 9). Idealmente, a curva deve consistir em pelo menos 4 pontos, e cada diluição deve ser realizada em duplicado, se possível (Agilent Technologies, 2014).

A quantificação absoluta, por PCR em tempo real, destaca-se pela precisão e consistência dos resultados obtidos (Butler., 2005).

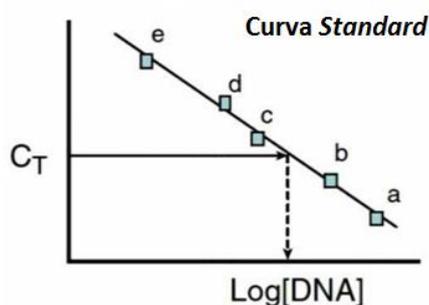


Figura 9 - Curva *standard* obtida por sucessiva análise de amostras com concentrações conhecidas de ADN.

Adaptado de Butler, 2005.

- **Quantificação Relativa (Método ΔC_t)**

De modo a desenvolverem-se metodologias quantitativas mais robustas, deve recorrer-se à utilização de uma sequência controlo, como a região conservada 18S rARN. A utilização de uma sequência controlo para a quantificação é extremamente importante, principalmente quando as amostras a analisar são produtos alimentares processados e de complexa composição (Soares et al.,

2013). Um exemplo muito claro disto são os produtos cárneos, que podem conter diversos químicos, podendo funcionar como inibidores da reação de PCR, impedindo a ligação dos *primers* aos locais específicos e reduzindo a eficiência da amplificação. Para além disto, a reatividade cruzada entre *primers* específicos de espécie e ADN de outras espécies é também um grande inconveniente à PCR em tempo real (Cammà et al., 2012; Rojas et al., 2010).

No método ΔCt , utilizam-se padrões com concentrações conhecidas e estabelece-se comparação entre a amplificação relativa da sequência alvo presente nas amostras e a amplificação da sequência do gene de referência da amostra controlo. O resultado desta comparação traduz-se numa curva de valores de ΔCt (diferença entre o Ct do gene de referência e o Ct do gene alvo) em função do logaritmo da quantidade do ADN alvo a analisar. A quantidade do ADN alvo presente na amostra é obtida, calculando o valor ΔCt da amostra e por interpolação com a curva padrão (Mohamad et al., 2013; Popping et al., 2010).

Posteriormente à realização da PCR é possível avaliar o desempenho da reação, através do cálculo da eficiência da mesma. Este cálculo é realizado através do declive da curva padrão, recorrendo à seguinte expressão:

$$E (\%) = 10^{\left(-\frac{1}{\text{declive}}\right)} - 1$$

O valor de E é normalmente apresentado em percentagem e deve ser entre 90% e 110%. O Coeficiente de Correlação de Pearson (R^2) permite avaliar a linearidade da curva, devendo o valor deste situar-se próximo de 1 ($\geq 0,985$). Uma curva linear apresenta uma forte correlação entre as duas variáveis (Agilent Technologies, 2014; Soares et al., 2013).

1.4.2.5.3. Métodos de Detecção na PCR em Tempo Real

A PCR em tempo real encontra-se associada à emissão de um sinal fluorescente proporcional à quantidade de produto produzido. Assim, foram desenvolvidos diferentes métodos químicos baseados em fluorescência, cujo sinal é suscetível de ser detetado por um laser do termociclador ao longo do processo. Os fluoróforos podem ser divididos em dois grandes grupos, corantes que se intercalam na dupla cadeia de ADN e sondas específicas para a sequência alvo (BIO-RAD, 2006; Fajardo et al., 2008; Yusop et al., 2012).

- **Corantes fluorescentes intercalares (Exs: SYBR® Green I; EvaGreen®)**

O método de corantes intercalares é a forma mais simples e económica de monitorizar a PCR em tempo real. Estes corantes iniciam a emissão de fluorescência apenas quando se ligam a ADN de cadeia dupla (dsADN). Assim, à medida que o número de cópias de ADN aumenta durante a reação, a fluorescência também aumenta.

Uma das vantagens da utilização deste método de deteção é o facto de possibilitar a verificação da especificidade dos produtos amplificados, com base na interpretação de curvas de *melting*, que permitem efetuar a distinção entre deleções e mutações (Ballin et al., 2009) e ainda a formação de artefactos, como é o caso dos dímeros de *primer*, que apresentam uma T_m muito inferior (Kashani, 2014). A maior desvantagem da utilização deste método é a falta de especificidade, pois estes corantes ligam-se a qualquer ADN de cadeia dupla, incluindo dímeros de *primers* e outros produtos não específicos. Uma vez que este método não é específico para uma determinada sequência de ADN, só pode ser utilizado em reações *singleplex* (BIO-RAD, 2006).

Um dos corantes mais utilizados na PCR em tempo real é o SYBR® Green, sendo considerado o método mais simples, económico e direto (Figura 10) (Kashani, 2014; Soares et al., 2013). Quando este corante se encontra intercalado na *minor groove* da molécula da dsADN, a sua fluorescência revelada sob luz UV aumenta consideravelmente (Ballin et al., 2009; Fajardo et al., 2010; Kashani, 2014).

Estudos relataram que o corante SYBR® Green poderia interferir diretamente na reação de PCR, sendo aconselhada a utilização de pequenas quantidades de corante. De modo a tentar resolver este problema, surgiram novos corantes fluorescentes, que apresentam elevada afinidade para o ADN de cadeia dupla. Dentro destes corantes de nova geração, destaca-se o EvaGreen®. Este corante também se intercala na *minor groove* do ADN, tal como acontece com o SYBR Green®. O EvaGreen® apresenta maior sensibilidade e eficácia, por apresentar um perfil de ligação superior ao ADN. Para além disto, este corante apresenta um baixo nível de inibição da PCR, permitindo a sua utilização em concentrações mais elevadas sem provocar inibição enzimática, aumentando o nível de fluorescência e tornando-se mais estável (Mohamad et al., 2013; Safdar et al., 2014).

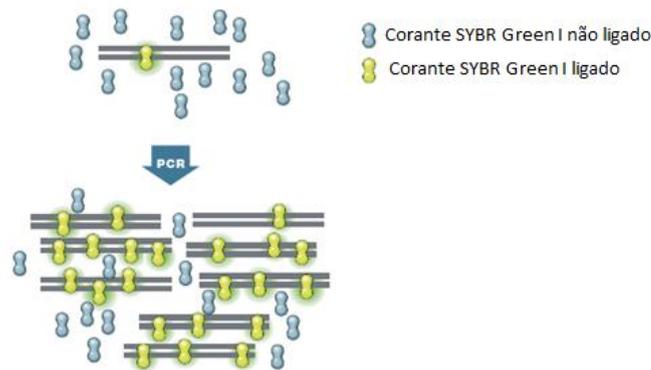


Figura 10 - Esquema ilustrativo do mecanismo de ação do corante intercalar SYBR Green®. Adaptado de BIO-RAD (2006).

○ Sondas Fluorescentes

O uso de sondas específicas para a sequência de ADN alvo marcadas com fluoróforo confere à PCR em tempo real elevada especificidade, funcionando como mais um parâmetro de confirmação de que o fragmento amplificado é o pretendido (Kesmen et al., 2012; Weighardt, 2010). Estas, geralmente apresentam cerca de 27 nucleótidos de extensão e uma temperatura de *melting* de 8°C a 10°C superior à dos *primers* (Mohamad et al., 2013).

Sondas de Hidrólise (ex: *TaqMan*)

As sondas *TaqMan* são o tipo de sondas mais simples, apresentando na extremidade 5' uma molécula fluorescente denominada *reporter* (R) e na extremidade 3' uma molécula fluorescente designada *quencher* (Q). Enquanto a sonda se encontra intacta, ou seja, enquanto o R se encontra próximo do Q, a emissão de fluorescência é muito baixa ou mesmo nula, devido à capacidade do Q em absorver a fluorescência do R. Durante o decorrer da PCR, a sonda liga-se à sequência alvo e na etapa de extensão, o R é clivado pela atividade exonuclease 5' da *Taq* DNA polimerase. Esta clivagem separa o R do Q, resultando num aumento da intensidade da fluorescência (Figura 11) (Butler, 2009; Goodwin et al., 2011; Reece, 2004). O sinal de fluorescência resultante permite a medição quantitativa do produto acumulado durante a fase exponencial da PCR (Ballin et al., 2009; Dooley et al., 2004).

A tecnologia das sondas *TaqMan* é um método mais simples e confiável, em comparação com outras sondas fluorescentes. Este apresenta uma elevada especificidade dos *primers* e uma maior especificidade providenciada pela sonda, uma vez que estas são desenhadas especificamente para cada espécie animal, o que confere um aumento significativo da especificidade e confiabilidade do ensaio (Ali et al., 2012). Comparativamente aos corantes intercalares, as sondas

TaqMan permitem aumentar o limite de detecção do ensaio e são menos suscetíveis à formação de dímeros de *primers*. Estas são também eficazes na detecção de polimorfismos de nucleótidos únicos (Yusop et al., 2012). O elevado custo das sondas torna-se uma grande desvantagem para este método.

A utilização de sondas de hidrólise *TaqMan* tem sido descrita como o método mais rápido e sensível na identificação de espécies em amostras complexas (Cammà et al., 2012).

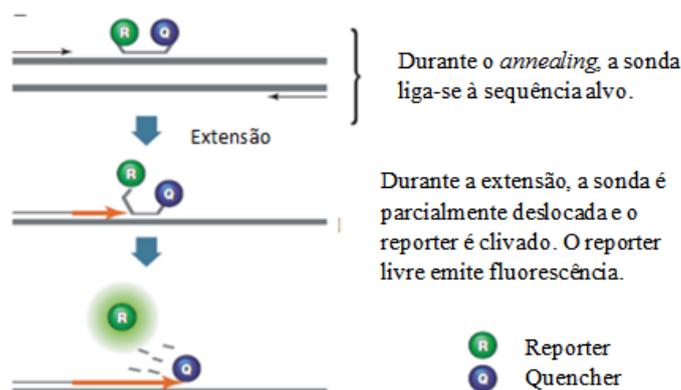


Figura 11 - Esquema ilustrativo do mecanismo de ação da sonda *TaqMan*®. Adaptado de BIO-RAD (2006).

1.4.2.6. Outros métodos baseados na técnica de PCR

A realização da PCR pode ser efetuada sem o prévio conhecimento da sequência de ADN que se pretende amplificar e também se pode efetuar através da utilização de *primers* específicos, sendo necessária a informação prévia relativa à sequência alvo. Na primeira abordagem, podem incluir a amplificação aleatória de ADN polimórfico (RAPD) e o polimorfismo conformacional de cadeia única (PCR-SSCP). Por outro lado, nas técnicas de polimorfismo de tamanho do fragmento de restrição (PCR-RFLP), PCR com *primers* específicos de espécies, PCR *multiplex*, reação em cadeia da polimerase com polimorfismos de tamanho do fragmento de restrição (PCR-RFLP) e sequenciação, é necessário o prévio conhecimento das sequências alvo a amplificar.

- **Amplificação aleatória de ADN polimórfico (RAPD-PCR)**

Esta técnica consiste na amplificação de fragmentos de ADN, utilizando um par de *primers* de tamanho reduzido e sequência arbitrária, que hibridam em várias regiões do ADN genómico, produzindo um variado leque de produtos de amplificação. Posteriormente, estes são separados, por

tamanho, através da eletroforese em gel de agarose (Fajardo et al., 2010), podendo ser visualizados sob luz UV (Arif et al., 2010), dando origem ao perfil ou *fingerprint* de um indivíduo (Fajardo et al., 2010).

Em comparação com outras técnicas utilizadas para a identificação de espécies, a técnica RAPD é mais barata e mais rápida, evitando etapas analíticas mais complexas, como sequenciamento (Fajardo et al., 2010). Para além disto, não é necessário qualquer tipo de informação relativa à sequência a analisar, desde que se possua material de referência, para posterior comparação (Ballin et al., 2009; Fajardo et al., 2010). No entanto, esta técnica apresenta como desvantagem a baixa reprodutibilidade dos resultados obtidos, uma vez que as amplificações através de PCR devem ser desenvolvidas sob condições controladas e *standardizadas* (número de ciclos, temperatura de cada ciclo ou concentração dos reagentes) (Arif et al., 2010; Fajardo et al., 2010). Assim, este método torna-se pouco útil e adequado para a deteção de uma determinada espécie, em alimentos processados, onde os ácidos nucleicos se podem encontrar degradados, ou em alimentos que contenham diversas espécies na sua composição, uma vez que a qualidade do ADN inicial é extremamente importante para o sucesso da reação de amplificação (Fajardo et al., 2010; Rastogi et al., 2007).

O PCR-RAPD para a identificação de espécies, provavelmente será restringido apenas a uma análise qualitativa rápida. Esta técnica ainda não pode ser empregue para a análise de produtos processados, pois uma vez que se trata de uma amplificação não específica, não permite a identificação de espécies em tecidos (Fajardo et al., 2010).

- **Polimorfismo Conformacional de Cadeia Única (SSCP-PCR)**

Esta técnica baseia-se na relação entre a mobilidade eletroforética de uma molécula de ADN de cadeia simples e as suas possíveis conformações, que reflete a sua sequência nucleotídica. O produto amplificado é desnaturado e submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE). As diferentes migrações de ssADN têm origem na diferença entre a sequência de ADN de diferentes amostras. A sensibilidade desta técnica tende a aumentar quando o comprimento dos fragmentos é pequeno. No que respeita à análise de carne crua, onde os fragmentos normalmente apresentam um tamanho de 500 a 1000 pb, é necessário usar previamente enzimas de restrição, de forma a obterem-se fragmentos de ADN menores.

A SSCP-PCR é uma técnica rápida e fácil de executar, onde se pode discriminar com precisão espécies muito próximas, mesmo que se utilizem fragmentos muito curtos de ADN. No entanto, esta técnica também apresenta algumas desvantagens, como o facto de ser sempre necessário correr as amostras com controlos e a variabilidade intra-espécie pode resultar em diferentes conformações, que podem conduzir a uma incorreta identificação da espécie. Por vezes,

podem ser visíveis mais de duas bandas, o que se pode dever ao facto de o ssADN existir em vários estados de conformação, consoante as condições eletroforéticas (tipo de gel, tampão utilizado e temperatura) (Teletchea, 2009).

- **Polimorfismo de Tamanho do Fragmento de Restrição (PCR-RFLP)**

A técnica de PCR-RFLP é uma extensão da técnica de PCR, utilizada para diferenciar espécies (Hsieh et al., 2007). A utilização de um único par de *primers* permite a obtenção de um fragmento que, após uma escolha adequada das enzimas de restrição, permite a diferenciação de múltiplas espécies (Teletchea, 2009). Cada espécie apresenta um padrão de fragmentos único, quando submetido a eletroforese, o que permite a sua diferenciação (Ballin et al., 2009; Fajardo et al., 2010). A técnica de PCR-RFLP foi empregue na identificação de espécies em carne e produtos à base de carne, sendo um dos métodos muito utilizados para a identificação de espécies de caça.

Esta é uma técnica prática, reprodutível, fiável e pouco dispendiosa, onde os equipamentos necessários para a sua execução fazem parte da maior parte dos laboratórios de biotecnologia. Além disto, produz marcadores genéticos codominantes e requer menor quantidade de ADN, sendo que a sua qualidade não tem mostrado ser essencial para o sucesso da amplificação e tornando-a favorável aos programas de inspeção alimentar (Fajardo et al., 2010; Pereira et al., 2008). A necessidade de combinação de várias enzimas, de modo a distinguir espécies estreitamente relacionadas é uma das desvantagens desta técnica (Pereira et al., 2008), bem como a possível existência de mutações aleatórias nos locais de restrição que podem conduzir a resultados erróneos, com a perda ou o ganho de fragmentos de restrição (Pereira et al., 2008; Teletchea, 2009).

A seleção das enzimas de restrição baseia-se na informação da sequência dos fragmentos amplificados por PCR. Estas devem ser de baixo custo, fácil disponibilidade e a digestão dos fragmentos de ADN deve ser completa, permitindo assim uma elevada diferenciação entre as espécies. Para além disto, também se deve ter em conta o tipo de gel a utilizar na eletroforese, para a seleção das enzimas de restrição (Popping et al., 2010).

- **PCR Específico de Espécies**

Esta técnica consiste na amplificação de um gene através da utilização de um par de *primers* específicos, desenhados num fragmento de ADN com uma sequência característica da espécie (Fajardo et al., 2010; Nau et al., 2009), sendo os produtos de PCR posteriormente separados em gel de agarose ou poliacrilamida (Ali et al., 2012). Esta técnica encontra-se direcionada para pequenos fragmentos de ADN, oferecendo elevada simplicidade, sensibilidade e especificidade em estudos de autenticação alimentar de produtos processados (Fajardo et al., 2010).

Embora os fragmentos devam ser pequenos, estudos demonstram que estes não devem ser extremamente pequenos, uma vez que podem comprometer a especificidade da técnica (Ali et al., 2012).

A técnica de PCR com *primers* específicos de espécie é muito útil para análises de rotina de um grande número de amostras, mesmo quando previamente sujeitas a tratamentos de processamento agressivos, já que é uma técnica simples, rápida, económica e robusta. No entanto, um fator limitante para esta técnica associa-se ao desenho dos *primers*, pois requer o conhecimento preciso da sequência alvo a amplificar e uma posterior avaliação para testar a possibilidade de reações cruzadas (Fajardo et al., 2010; Nau et al., 2009; Teletchea, 2009). O desenvolvimento desta técnica permitiu ainda a identificação de espécies, sem recurso à digestão de produtos de PCR com enzimas de restrição ou à sequenciação (Martín et al., 2007).

- **PCR Multiplex**

A PCR *multiplex* tem o mesmo princípio da PCR com *primers* específicos. Nesta técnica, um dos pares de *primers* hibrida com uma região conservada da sequência a amplificar, e um segundo par de *primers* hibrida com uma região variável, o que permite obter uma variedade de fragmentos com diferentes dimensões, conforme cada uma das espécies estudada (Ali et al., 2012).

Esta técnica, utilizada para autenticação de produtos cárneos, é executada com maior rapidez, uma vez que todas as análises são feitas em simultâneo, sendo menos dispendiosa, produzindo menos erros e permitindo uma melhor análise de resultados, pois não é necessário compilar os resultados, ao contrário do que acontece na PCR *singleplex* (Köppel et al., 2009; Zha et al., 2010).

Existem alguns fatores a ter em conta aquando da execução desta técnica, como a diferença de tamanho dos fragmentos amplificados, que devem diferir entre pelo menos 40 a 50 pb no comprimento, para permitir a sua separação adequada por eletroforese em gel de agarose (Amaral et al., 2014; Bottero et al., 2011). Outro aspeto muito importante a ter em conta para a execução desta técnica é o facto de existir mais do que um par de *primers* na PCR, que poderá resultar na formação produtos não específicos. Para evitar tais formações, é necessário que os *primers* sejam mais longos (28-30 pb), para que a reação seja realizada a temperaturas de *annealing* mais elevadas, o que evitará a formação dos produtos não específicos (Bottero et al., 2011; Somma, 2006)

Podemos concluir que esta técnica é uma ferramenta bastante útil para a identificação de espécies em produtos cárneos (Köppel et al., 2009; Ren et al., 2017; Soares et al., 2010).

- **Sequenciação**

A sequenciação de ADN é uma técnica que permite a determinação da ordem das bases nucleotídicas (A, C, T e G) ao longo da cadeia de ADN, possibilitando uma completa análise da molécula. Este é o método de identificação mais direto e rigoroso, permitindo diferenciar espécies geneticamente próximas (Ali et al., 2012; Fajardo et al., 2010), sendo amplamente utilizado na confirmação de resultados após PCR em tempo real ou eletroforese (Ballin et al., 2009).

Quando a matriz do alimento é completamente desconhecida, e as características organolépticas não são totalmente atribuíveis às espécies em questão, o diagnóstico de presença ou ausência de uma determinada espécie não é suficiente, sendo o sequenciamento a opção mais viável. A sequência obtida é posteriormente comparada com as sequências de GenBank para verificar se existe ou não correspondência de espécies. A utilização deste método pode estar comprometida no caso de espécies raras, em que a sua sequência pode não estar presente na base de dados (Bottero et al., 2011).

Devido ao seu nível de mutação e à grande disponibilidade de sequências em bases de dados, os genes mitocondriais do *cytb*, 12S e 16S rARN são os marcadores genéticos mais extensos para a discriminação de espécies por sequenciamento (Fajardo et al., 2010).

A Sequenciação de Nova Geração tornou-se, nos últimos anos, uma das tecnologias de eleição para análises genéticas complexas. Estas tecnologias, em rápida evolução, demonstraram vantagens sobre a sequenciação por Sanger, sendo a mais relevante a capacidade de gerar grandes quantidades de dados e de processar quantidade consideráveis de informação, devido à sua enorme capacidade de sequenciação em paralelo, tudo isto com grande economia de tempo e custos (Metzker, 2010).

- **ADN *barcoding***

Grandes avanços na tecnologia de sequenciação de nucleótidos têm sido efetuados, progredindo para ferramentas mais robustas e acessíveis para a identificação de espécies. Recentemente, o método de ADN *barcoding* ganhou um interesse considerável por parte de alguns autores, que o consideram um método rápido, económico e eficaz na autenticação de alimentos, análise forense, biossegurança e até mesmo aplicação na vida selvagem, para evitar a caça furtiva ou o comércio ilegal de espécies ameaçadas.

O ADN *barcoding* baseia-se na amplificação de uma pequena região genética *standard* do genoma, seguida de sequenciação, para a identificação biológica de espécies (Ali et al., 2012; Kane et al., 2015). Esta técnica emprega metodologias computacionais *standard* como plataforma de apoio, permitindo o acesso a bases de dados, facilitando assim a identificação de espécies em

estudo, através da comparação com sequências de referência de ADN (Fajardo et al., 2010; Kane et al., 2015).

Um marcador genético adequado, deve apresentar maior variabilidade entre espécies do que intra-espécie. Muitos genes mitocondriais codificantes de proteínas apresentam as características necessárias para servir como marcador *barcode* (Ali et al., 2012).

Para a grande maioria das espécies animais, é utilizada uma sequência da região do mtADN, com aproximadamente 650 pb, que codifica o gene citocromo oxidase I (COI). Este detém uma elevada divergência genética inter-espécies e reduzida variabilidade genética intra-espécies (Fajardo et al., 2010; Kane et al., 2015).

O método de ADN *barcoding* foi utilizado com sucesso para identificar espécies numa grande variedade de produtos alimentares, incluindo produtos cárneos e marisco (Kane et al., 2015). O gene COI foi utilizado para decifrar a filogenia de aves e espécies animais. Por outro lado, um segmento do gene 16S, ADN *D-loop* com 422 pb, foi utilizado como marcador na distinção de espécies de búfalo (Ali et al., 2012).

Embora o ADN *barcoding* tenha demonstrado grande efetividade na identificação de múltiplas espécies animais, este método ainda não pode ser utilizado para identificar múltiplas espécies num único produto, em simultâneo. A necessidade de sequenciar o produto amplificado torna todo o processo mais demorado e dispendioso, em comparação com o PCR específico de espécies. No que diz respeito a alimentos processados, a aplicação deste método ainda é limitada, uma vez que o tamanho dos fragmentos a amplificar é considerável, como é o exemplo do tamanho do gene COI (Kane et al., 2015).

1.5. Aplicação de técnicas de PCR na identificação de espécies em produtos cárneos

Nos últimos anos, têm sido desenvolvidas numerosas técnicas de PCR para a identificação de espécies animais, por se tratar de uma ferramenta rápida, simples, eficaz e sensível para a deteção de constituintes de origem animal, em produtos alimentares. A maioria das aplicações das técnicas de PCR visa a identificação de animais domésticos, como bovino, suíno, ovino, caprino, peru ou frango. Para além destas, as carnes de caça e a espécie *Eqqus caballus* também têm sido alvo de estudo e identificação em produtos alimentares, pois possuem maior valor económico e são, consequentemente, mais propícias a adulterações (Amaral et al., 2015). A Tabela 3 resume alguns dos trabalhos reportados na literatura relativos à identificação de espécies em produtos alimentares.

Tabela 3 - Resumo de alguns trabalhos reportados na literatura, baseados na análise de ADN.

Espécies	Amostras	Técnica utilizada	Gene alvo	Limite de deteção	Referência
Bovino, Cordeiro, Galinha, Peru, Suíno	Misturas de carne	PCR em Tempo Real	<i>cytb</i>	0,012% para Bovino	Dooley et al., (2004)
Bovino	Misturas de carne com farinha de trigo	PCR Específico de Espécie	<i>cytb</i>	0,025%	Pascoal et al., (2005)
Burro, Cavalo	Produtos comerciais com cavalo	PCR em Tempo Real	<i>cytb</i>	25 pg de ADN	Chisholm et al., (2005)
Burro, Cavalo, Suíno	Salsichas cozinhadas	PCR Específico de Espécie	ATPase8/ATPase6 ND5	0,1%	Kesmen et al., (2007)
Bovino, Cavalo, Galinha, Ovino, Peru, Suíno	Mistura de carne	PCR em Tempo Real	<i>cytb</i> Satellite IV	125 pg de ADN 0,1%	Jonker et al., (2007)
Suíno, Veado	Misturas de carne crua e processada	PCR em Tempo Real	12s rARN	0,001%	Fajardo et al., (2008)
Burro, Cavalo, Suíno	Produtos cárneos crus e processados	PCR em Tempo Real	ATPase8/ATPase6 ND2 ND5	0,1 pg de ADN 0,0001%	Kesmen et al., (2009)
Bovino, Cavalo, Caprino, Galinha, Ovino, Peru, Suíno	Salsichas cruas e processadas	PCR em <i>Multiplex</i>	<i>cytb</i> <i>β-actin</i>	2% para peru, ovino e caprino e 1% para os restantes	Köppel et al., (2009)
Suíno, Aves	Mistura de carne	PCR <i>duplex</i>	<i>cytb</i>	0,1%	Soares et al., (2010)
Bovino, Cavalo, Caprino, Suíno	Salsichas cruas e processadas	PCR em <i>Multiplex</i>	<i>β-actin</i>	320 pg de ADN	Köppel et al., (2011)
Avestruz, Bovino, Cavalo, Caprino, Galinha, Suíno	Carnes comerciais e produtos cárneos	Deteção direta em multiplex	<i>cytb</i> , 12s rARN, t-Glu- <i>cytb</i> , COI	12,500 cópias de mtADN em suíno, cordeiro, galinha e ovino. 25,000 e 50,000 cópias de mtADN em cavalo e avestruz, respetivamente	Kitpipit et al., (2014)

2. Objetivos

A avaliação da autenticidade de produtos cárneos baseia-se na identificação de espécies não declaradas no rótulo e na substituição de espécies de maior valor económico, por outras de valor inferior. A necessidade de verificação da autenticidade, aliada ao progresso tecnológico tem constituído uma força impulsionadora para o desenvolvimento de métodos analíticos apropriados.

Embora uma variedade de metodologias analíticas baseadas na análise de proteínas ou em ensaios imunológicos tenham sido amplamente desenvolvidas, estas técnicas apresentam algumas limitações. Assim, os investigadores recorrem atualmente a técnicas baseadas na amplificação de ADN, uma vez que são mais robustas, eficientes, versáteis e sensíveis. A Reação em Cadeia da Polimerase permite uma amplificação de regiões específicas do ADN, facilitando a deteção de uma determinada espécie, mesmo em alimentos que apresentem várias espécies na sua composição.

Esta dissertação teve como objetivo a aplicação da técnica de PCR em tempo real *multiplex* na identificação de diferentes espécies de carne, *Bos taurus* (vaca), *Sus scrofa* (porco), *Equus caballus* (cavalo) e *Ovis aries* (ovelha). Posteriormente foi avaliada a autenticidade de diversas amostras comerciais de processados de carne de bovino, de forma a averiguar a veracidade e rigor da rotulagem em relação ao conteúdo do produto.

Este trabalho não visou apenas a deteção de possíveis adulterações em produtos processados de carne, mas também se pretendeu valorizar os produtos e produtores que apresentem os seus produtos em conformidade com a rotulagem.

3. Material e Métodos

3.1. Amostras

No âmbito do presente estudo, as espécies selecionadas para o mesmo foram: *Bos taurus* (vaca), *Sus scrofa* (porco), *Eqqus caballus* (cavalo) e *Ovis aries* (ovelha) (Tabela 4), sendo que as amostras de carne *Bos taurus*, *Sus scrofa* e *Ovis aries* foram adquiridas no “Talho Agostinho”, em Anadia, e a amostra de *Eqqus caballus* foi adquirida no “Talho do Centro”, em Viseu. A identificação da espécie referente a cada amostra recolhida encontra-se discriminada no Anexo I.

Tabela 4 - Identificação das amostras de referência das espécies utilizadas.

Amostras de Referência	Espécies
V	<i>Bos taurus</i>
P	<i>Sus scrofa</i>
C	<i>Eqqus caballus</i>
O	<i>Ovis aries</i>

Com base nos dados adquiridos através da realização de um inquérito *online*, dirigido à comunidade académica da Universidade de Aveiro, definiu-se a amostragem do presente estudo. A finalidade desse inquérito consistia em selecionar os produtos alimentares a adquirir nas superfícies comerciais, tendo sido realizado entre março e setembro de 2015 (Anexo II). Obtiveram-se um total de 196 respostas, que permitiram obter uma amostragem significativa da comunidade universitária (Anexo III). Com este inquérito, foi possível apurar quais os produtos processados à base de carne eram mais consumidos, quais as marcas mais adquiridas e qual era a preferência no que diz respeito à superfície comercial.

Assim, além das amostras de referência acima mencionadas, foram também adquiridas amostras comerciais de produtos processados de carne de bovino, de marca branca. Estas amostras têm origem comercial e foram adquiridas em supermercados e hipermercados da região de Aveiro (Tabela 5).

Tabela 5 - Descrição das amostras comerciais analisadas.

Código	Tipo de amostras	Espécies Rotuladas
H1	Hambúrguer	Bovino (100%)
H2	Hambúrguer	Bovino (47,6%)
H3	Hambúrguer	Bovino (98%)
H4	Hambúrguer	Bovino (60%)
H5	Hambúrguer	Bovino (51%)
A1	Almôndegas	Bovino (60%)
A2	Almôndegas	Bovino (47,6%)
A3	Almôndegas	Bovino (100%)
C1	<i>Cannelloni</i>	Bovino (11,5%)
E1	Esparguete à bolonhesa	Bovino (25%)
E2	Esparguete à bolonhesa	Bovino (6,4%)
L1	Lasanha	Vitela (35%)
L2	Lasanha	Bovino (10%)
L3	Lasanha	Bovino (18,1%)

Na tabela 5, estão reunidas algumas das informações que constavam nos rótulos das amostras comerciais de processados de carne de bovino adquiridas, sendo que a descrição detalhada de cada rótulo se encontra no Anexo IV. No que diz respeito às primeiras cinco amostras comerciais, foram adquiridas duas embalagens, com lotes diferentes (lote 1 e lote 2), e foram analisadas duas amostras distintas de cada uma das embalagens. Das restantes amostras comerciais, foi adquirida uma embalagem de cada lote (lote 1 e lote 2), perfazendo um total de 38 amostras analisadas. Todas as amostras, depois de recolhidas, foram armazenadas num recipiente esterilizado, rotulado e acondicionado à temperatura de -20°C até à sua utilização, de modo a evitar a degradação enzimática do ADN.

3.2. Homogeneização de Tecidos e Extração de ADN

3.2.1. Preparação de Soluções

- **Solução de Isopropanol a 80%**

Adicionar 80 mL de Isopropanol 100% a 20 mL de água desionizada.

Armazenou-se a 4°C.

- **Solução de Precipitação CTAB**

Pesaram-se 1 g de CTAB e 0,5 g de NaCl que foram dissolvidas em 100 mL de água desionizada. Ajustou-se o pH a 8 com NaOH. Perfez-se o volume de 200 mL adicionando água desionizada. Armazenou-se a 4°C.

- **Solução de NaCl 1,2 M**

Pesaram-se 7 g de NaCl e dissolveram-se em 100 mL de água desionizada.

Armazenou-se à temperatura ambiente.

- **Tampão TBE 1X**

Diluíram-se 10 mL de TBE 10X (Lonza) em 90 mL de água destilada.

3.2.2. Homogeneização do Tecido Animal

Antes de se efetuar a extração de ADN, as amostras de tecido recolhidas foram homogeneizadas segundo as etapas propostas pelo protocolo “*ilustra tissue & cells genomicPrep Mini Spin Kit*”, com algumas alterações. Assim, às amostras ainda congeladas foram adicionados 60 µL de PBS, homogeneizando-se com a ajuda do pilão.

3.2.3. Extração de ADN

A extração de ADN de todas as amostras em estudo foi efetuada através do método de CTAB modificado, de acordo com o protocolo descrito por Stefanova et al. (2013). Assim, 200 mg de amostra homogeneizada foram pesadas e colocadas num tubo de reação de 2 mL. A este, adicionaram-se 400 µL de água desionizada, 1000 µL de Tampão de Extração CTAB e 20 µL de Proteínase K (20 mg/mL). De seguida, as amostras foram vortexadas e deixadas a incubar durante 60 minutos a 65°C. Posteriormente adicionaram-se 20 µL de RNase A (10mg/mL), homogeneizaram-se as amostras e incubou-se novamente a 65°C durante 10 minutos. Após centrifugação, a 16.000 g durante 10 minutos, o sobrenadante (1000 µL) foi transferido para um novo tubo de reação de 2 mL. Ao novo tubo, adicionaram-se 800 µL de clorofórmio, vortexaram-se as amostras vigorosamente e centrifugaram-se, a 16.000 g durante 10 minutos. Esta última sequência de eventos foi repetida novamente. O sobrenadante foi depois misturado com o dobro do volume do Tampão de Precipitação CTAB e incubou-se durante 60 minutos à temperatura ambiente. Após centrifugar as amostras a 16.000 g durante 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi dissolvido em 700 µL de NaCl 1,2 M e extraído com igual volume de clorofórmio. As amostras foram posteriormente centrifugadas a 16.000 g durante 10 minutos e

recolheu-se a fase superior para um novo tubo de reação de 2 mL. A este, adicionaram-se 0,6 partes de volume de isopropanol e incubou-se 10 minutos à temperatura ambiente. Depois de centrifugar, a 16.000 g durante 10 minutos, descartou-se o sobrenadante e lavou-se o *pellet* com 1000 µL de etanol a 70%. Centrifugaram-se as amostras a 16.000 g durante 10 minutos, descartou-se o sobrenadante e secou-se o *pellet* a 37°C, durante 30 minutos. Por último, o *pellet* foi dissolvido em 100 µL de H₂O desionizada e as amostras foram armazenadas a -20°C.

3.3. Quantificação e Análise da Pureza do ADN extraído

A deteção e quantificação de ADN é uma etapa extremamente importante para a aplicação das técnicas biomoleculares que se seguem, sendo fulcral proceder-se à verificação da existência de material genético nas amostras. Para tal, e de modo a garantir não só a existência de ADN mas também de modo a avaliar a sua pureza, foram empregues dois métodos de quantificação de ácidos nucleicos distintos: a fluorimetria (Qubit™) e a espectrofotometria (Nanodrop™ 1000). Apenas este último método possui a capacidade de avaliar a pureza do ADN.

Os valores das concentrações de ADN obtidos foram ajustados, por comparação à quantificação de ADN de uma amostra controlo de concentração 10 ng/ µL (9947A DNA, Promega).

3.3.1. Quantificação do ADN por Fluorimetria (Qubit™)

A fim de quantificar as amostras pelo método de fluorimetria, utilizou-se o fluorómetro *Qubit™ Fluorometer* (Invitrogen) e o kit *Quant-iT™ BR assay* (Invitrogen). Este método de quantificação combina um fluorímetro com ensaios de quantificação baseados em fluorescência elevadamente sensíveis para a cadeia dupla de ADN e de precisão para amostras com concentrações entre 100 pg/µL e 1000 ng/µL.

Inicialmente, procedeu-se à preparação de uma solução *Quant-iT™*, composta por 199 µL de Tampão *Quant-iT™* e 1 µL de Reagente *Quant-iT™*, por cada amostra em estudo. De seguida, prepararam-se os *Standards* (S1 e S2), por adição de 10 µL da solução *standard* do kit a 190 µL da solução de trabalho. A preparação das amostras realizou-se da mesma forma, através da adição de 10 µL de amostra extraída a 190 µL da solução de trabalho. Os tubos contendo os *standards* e as amostras foram vortexados, durante 3 segundos, e incubados à temperatura ambiente, durante 2 minutos. Para a determinação da quantificação do ADN, ligou-se o *Quant-iT™ Fluorometer* (Invitrogen) e seleccionou-se a opção “*dsDNA BR assay Kit*” (para 2-1000 ng de ADN) e, seguidamente, “*Run new calibration*” para efetuar a calibração com a leitura dos dois *standards*. Após a calibração estar concluída, as amostras foram inseridas, individualmente, de modo a realizar-se a leitura fluorométrica. O valor apresentado no ecrã a cada leitura corresponde à

concentração de ácidos nucleicos no tubo de reação. De modo a obter a concentração da amostra, o valor apresentado deve ser multiplicado pelo fator de diluição (volume total/volume utilizado de amostra).

3.3.2. Quantificação e Avaliação da Pureza do DNA (NanoDrop™ 1000)

Na quantificação das amostras pelo método de espectrofotometria, o *NanoDrop™ 1000* (Thermo Scientific) mede a concentração e a pureza dos ácidos nucleicos com elevada precisão e reprodutibilidade. A tecnologia de retenção da amostra é baseada na tensão superficial, o que permite eliminar a necessidade de utilizar cuvetes, simplificando assim esta etapa de análise. Para além disto, o espectrofotómetro *NanoDrop™ 1000* (Thermo Scientific) permite medir amostras altamente concentradas, sem necessidade de diluição prévia.

O volume de 1 µL de amostra é pipetado na extremidade de um cabo de fibra ótica (fibra recetora). Um segundo cabo de fibra ótica é colocado em contacto com a amostra fazendo com que esta preencha o espaço entre as duas extremidades da fibra ótica. Uma lâmpada de xénon pulsado fornece a fonte de luz e o espectrómetro, utilizando um sensor CCD linear, é usado para analisar a luz depois de esta passar através da amostra. Este instrumento encontra-se acoplado a um computador com um *software*, onde os dados recolhidos são registados.

Para quantificar as amostras, primeiramente é necessário seleccionar o módulo de ácidos nucleicos no *software* do computador e efetuar-se a calibração com o tampão onde se encontra diluído o ADN, segundo cada protocolo de extração utilizado. A leitura da concentração e pureza do ADN foi posteriormente realizada, aplicando 1 µL de amostra para a determinação da concentração e pureza do ADN.

A razão de absorvância a 260/280 permite avaliar a pureza do ADN, sendo que o valor aceite é aproximadamente 1.8, para ADN considerado puro. No caso de este valor ser menor, pode ser indicador da presença de proteínas ou outros contaminantes, como por exemplo hidratos de carbono, compostos aromáticos ou o fenol, que absorve próximo de 280nm. A razão de absorvância da amostra a 260/230 é considerada uma medição secundária da pureza dos ácidos nucleicos e permite verificar a contaminação por compostos como o hidrocloreto de guanidina ou EDTA, muitas vezes utilizados na extração de ADN. Para considerar o ADN puro, o seu valor deve ser superior ao valor da razão da absorvância a 260/280, encontrando-se num intervalo de 1.8 a 2.2 (Somma, 2006).

3.4. Amplificação de ADN

As reações de amplificação das amostras de ADN foram realizadas no termociclador *CFX96™ Real-Time PCR Detection System* (Bio-Rad), e os dados foram analisados pelo *software*

Bio-Rad CFX Manager 2.0 (Bio-Rad).

3.4.1. Amplificação de ADN com o kit de amplificação *AllHorse* (Microsynth)

O Kit de amplificação *Tetraplex AllHorse* foi desenvolvido por Koppel *et al.* (2011). Este permite a deteção simultânea de vaca (*Bos taurus*), porco (*Sus scrofa*), cavalo (*Equus caballus*) e ovelha (*Ovis aries*), através da amplificação de sequências nucleotídicas genómicas, específicas de espécie, e da utilização de sondas fluorescentes (Tabela 6).

A sonda respetiva de cada espécie encontra-se marcada com um fluoróforo particular, tal como se pode verificar na tabela 6. Apesar de na espécie *Sus scrofa*, o marcador ser JOE, uma vez que este marcador não se encontra na lista de marcadores detetados pelo sistema de PCR utilizado, este foi substituído pelo marcador HEX, uma vez que apresenta um intervalo de emissão e absorção similar (*Fluorogenic Probes & Primers for Real-Time qPCR, Bioresarch® Technologies*).

Antes de iniciar o processo de amplificação das amostras, é necessário preparar previamente o *MasterMix Ready to Use*, segundo o protocolo descrito pelo *kit*. Assim, ao tubo contendo os *primers* e sondas liofilizados, foram adicionados 150 µL de água para PCR (*PCR Grade*) e incubou-se, durante 5 minutos a 60°C. De seguida, foram adicionados 250 µL de *PerfeCTa® MultiPlex qPCR ToughMix®* (Quanta Bioscience), sendo depois armazenado a 4°C até posterior utilização.

O ensaio de PCR em tempo real foi realizado com uma solução total de 25 µL, contendo 20 µL de *MasterMix Ready to Use* (Quanta Bioscience) e 5 µL de amostra ou controlo, segundo o seguinte protocolo de amplificação: 95°C durante 3 minutos, 45 ciclos a 95°C durante 15 segundos e 62°C durante 90 segundos, com a deteção de sinal fluorescente no final de cada ciclo.

Tabela 6 - Descrição dos *primers* e sondas constituintes do *Kit Tetraplex AllHorse*. Adaptado de Koppel *et al.* (2011).

Primer/Sonda	Concentração Final (µM)	Sequência	Fragmento Amplificado	Nº Acc GenBank Marcação
Vaca				
Rd 1 F	0.2	GTA GGT GCA CAG TAC GTT CTG AAG	96 pb	Gene β-actina EH170825 ROX-BHQ2
Rd 1 R	0.2	GGC CAG ACT GGG CAC ATG		
Bos-ActiB_Rox	0.08	CGG CAC ACT CGG CTG TGT TCC TTG C		
Porco				
Sus_ACTB-F	0.2	GGA GTG TGT ATC CCG TAG GTG	103 pb	Gene β-actina DQ452569 JOE-BHQ1
Sus_ACTB-R	0.2	CTG GGG ACA TGC AGA GAG TG		
Sus1 TMP	0.08	TCT GAC GTG ACT CCC CGA CCT GG		
Cavalo				
EC-GHR1-F	0.2	CCA ACT TCA TCA TGG ACA ACG C	107 pb	Recetor da Hormona de Crescimento AF392878 Cy5-BHQ2
EC-GHR1-R	0.2	GTT AAA GCT TGG CTC GAC ACG		
EC-GHR1-Cy5	0.08	AAG TGC ATC CCC GTG GCC CCT CA		
Ovelha				
OA-PRLR-F	0.2	CCA ACA TGC CTT TAA ACC CTC AA	88 pb	Recetor da Prolactina AF041979 Fam-BHQ1
OA-PRLR-R	0.2	GGA ACT GTA GCC TTC TGA CTC G		
OA-PRLRFam	0.08	TGC CTT TCC TTC CCC GCC AGT CTC		

3.5. Eletroforese em gel de agarose (2%)

O ADN extraído das amostras de referência foi sujeito a eletroforese através de gel de agarose a 2%, para avaliar a integridade do mesmo.

Para a preparação do gel de agarose a 2%, pesaram-se 2g de *Agarose* (Lonza) aos quais se adicionou 100mL de TBE 1x (Lonza). A mistura foi aquecida no micro-ondas para a completa dissolução da agarose. De seguida, foram adicionados 4µL de *GelRed* (Biotium). A mistura obtida foi, posteriormente, vertida numa moldeira nivelada, contendo um pente para a formação dos poços. Após deixar polimerizar o gel, durante cerca de 20 minutos, este foi colocado numa tina de eletroforese preenchida com TBE 1x.

As amostras de ADN amplificado a carregar, nos poços, foram preparadas pela adição de 5 µL de amostra de ADN amplificada a 1 µL de 6x *Orange DNA Loading Dye*. Para determinar o tamanho do fragmento amplificado, deve ser corrido simultaneamente o marcador molecular (*ladder*). Este é preparado através da adição de 4 µL de água ultra pura a 2 µL de *Ready Ladder™ 50 bp DNA Marker* (Amresco).

Após os poços serem carregados com as amostras e o marcador molecular, o gel foi colocado a correr com uma corrente de 130 V e 400 A, durante 35 minutos. Uma vez terminada a corrida, o gel foi observado no transluminador, *Gel Image System, Biodoc IT* (UVP), sob luz UV, e fotografado.

3.6. Cuidados especiais

De forma a minimizar ao máximo o risco de contaminação durante a extração de ADN, preparação das soluções e das misturas de amplificação, foram cumpridas diversas medidas. Uma vez que as bancadas, o equipamento, a câmara de extração ou até mesmo as pipetas podem ser fontes de contaminação, tudo foi submetido a esterilização. Além disso, foram tomadas outras medidas:

- Separação espacial e temporal dos processos de extração e amplificação de ADN das amostras;
- Utilização, de forma adequada, de equipamento de proteção individual, nomeadamente bata, luvas e máscara descartáveis;
- A sala de preparação das misturas da PCR estava equipada com equipamento e material próprios e luz UV, para esterilização do material;
- Os tubos utilizados na extração de ADN e nas misturas da PCR eram isentos de ADNases e ARNases;
- Soluções preparadas com reagentes de grau de pureza apto para utilização em biologia molecular.

4. Resultados e Discussão

4.1. Avaliação do ADN extraído de amostras de carne fresca (amostras de referência)

4.1.1. Avaliação da concentração e pureza do ADN extraído das amostras de carne fresca (amostras de referência)

Após a recolha e armazenamento das amostras de referência, o ADN foi extraído pelo método de CTAB modificado. Os resultados da avaliação da concentração e pureza do ADN extraído encontram-se na Tabela 7. Através da análise dos resultados da mesma, verifica-se que as concentrações de ADN se encontram entre 14,5 e 68,1 $\mu\text{g/mL}$, e os valores da razão A_{260}/A_{280} variam entre 1,77 e 1,93, o que indica que os extratos apresentam uma elevada pureza.

Tabela 7 - Dados da quantificação do ADN extraído das amostras de carne fresca (amostras de referência).

<i>Qubit™ Fluorometer (Invitrogen)</i>			
Amostra	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração em 10 μL ($\mu\text{g/mL}$)	
V ₁	0,926	18,5	
V ₂	1,43	28,5	
P ₁	1,01	20,3	
P ₂	1,08	21,7	
C ₁	2,43	64,3	
C ₂	1,49	29,7	
O ₁	0,718	14,4	
O ₂	0,503	10,1	
<i>NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific)</i>			
Amostra	Concentração ($\text{ng}/\mu\text{L}$)	Pureza	
		A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
V ₁	23,9	1,93	2,21
V ₂	35,1	1,87	2,11
P ₁	24,6	1,79	2,34
P ₂	26,0	1,82	2,27
C ₁	61,5	1,84	2,45
C ₂	68,1	1,80	2,32
O ₁	17,2	1,77	1,89
O ₂	14,5	1,86	2,12

4.1.2. Avaliação da integridade do ADN extraído das amostras de carne fresca (amostras de referência)

A avaliação da integridade do ADN extraído das amostras de referência foi avaliada através do tamanho dos fragmentos e proporção de arrastamento obtidos em gel de agarose. Como é possível visualizar na Figura 12, as amostras C₁ e C₂ revelam uma maior fluorescência, o que vai de encontro aos valores apresentados na Tabela 7, onde é possível verificar que estas são as amostras que apresentam maior concentração de ADN extraído. O método de extração empregue (CTAB modificado) produziu ADN de elevado peso molecular com reduzido arrastamento, evidenciando assim a sua integridade.

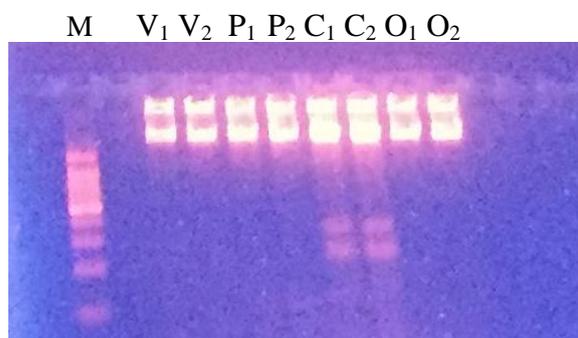


Figura 12 - Estado de fragmentação do ADN extraído: M (marcador molecular 100pb); V₁ e V₂ (amostras *Bos taurus*); P₁ e P₂ (amostras *Sus scrofa*); C₁ e C₂ (amostras *Equus caballus*); O₁ e O₂ (amostras *Ovis aries*).

4.2. Determinação da especificidade do sistema de amplificação integrante do kit *Tetraplex AllHorse* e avaliação da performance da PCR em Tempo Real para amplificação do ADN.

As amostras controlo de ADN das quatro espécies em estudo foram amplificadas com o *kit Tetraplex AllHorse*, com a finalidade de avaliar a especificidade do seu sistema de amplificação e identificar possíveis contaminações.

Estamos perante um sistema de amplificação *multiplex*, composto por quatro pares de *primers* e quatro sondas distintas, cada uma com a sua temperatura de *annealing*. Assim, como é utilizada apenas uma temperatura de *annealing* comum, mesmo que otimizada, os diferentes pares de *primers* e sondas apresentam eficiências distintas aquando da reação de amplificação. De modo a tornar a comparação mais eficiente, todas as amostras foram diluídas a uma concentração de 2ng/ μ L.

Na Figura 13 é possível verificar que o sistema de amplificação para a espécie *Bos taurus* não detetou nenhuma das outras espécies em estudo, apresentando um valor *Ct* de 21,05.

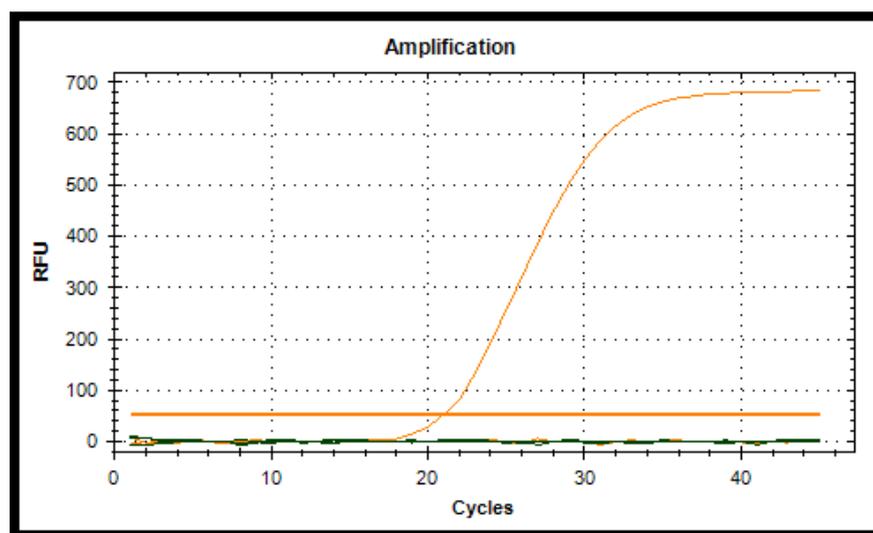


Figura 13 - Amplificação do ADN extraído da amostra *Bos taurus* (vaca), com o *kit* de amplificação *Tetraplex AllHorse*.

A Figura 14 diz respeito à amplificação da amostra de referência da espécie *Sus scrofa*, onde se verifica que este não detetou qualquer outra das espécies em estudo. O valor de *Ct* correspondente a esta amostra é de 27,53.

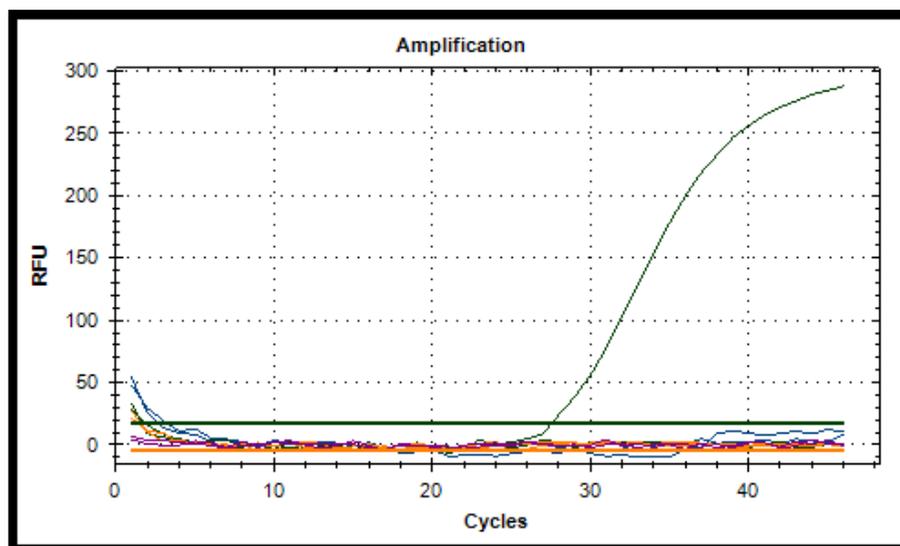


Figura 14 - Amplificação do ADN extraído da amostra *Sus scrofa* (porco), com o *kit* de amplificação *Tetraplex AllHorse*

No que respeita à espécie *Eqqus caballus*, é possível verificar, na Figura 15, que não foi detetada qualquer outra das espécies em estudo, apresentando um valor de C_t de 21,07.

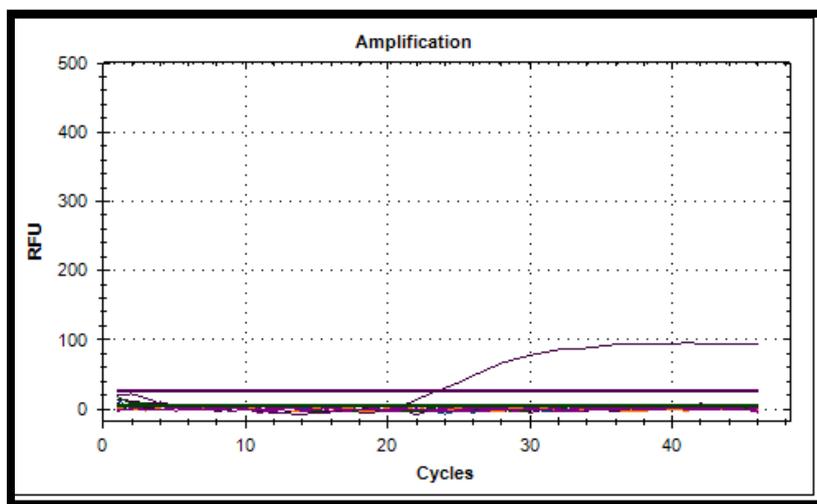


Figura 15 - Amplificação do ADN extraído da amostra *Eqqus caballus* (cavalo), com o kit de amplificação *Tetraplex AllHorse*.

Para a espécie *Ovis aries*, pode verificar-se na Figura 16 que não foi detetada outra espécie em estudo, sendo o valor C_t desta curva de amplificação de 33,37.

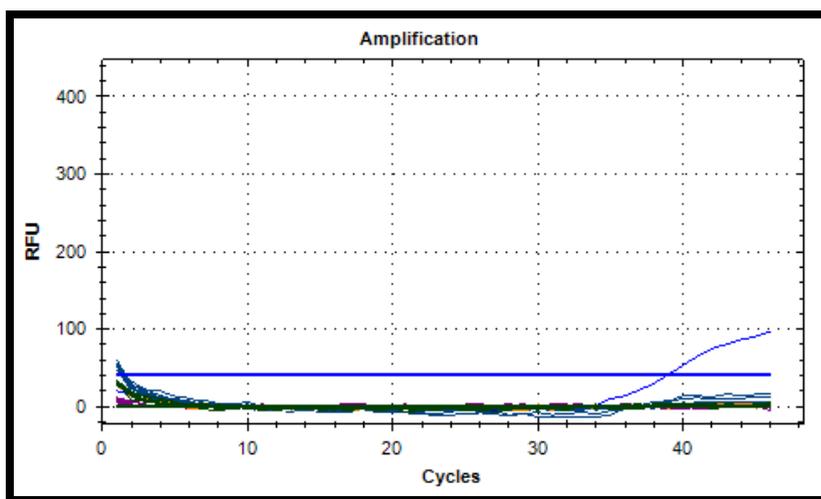


Figura 16 - Amplificação do ADN extraído da amostra *Ovis aries* (ovelha), com o kit de amplificação *Tetraplex AllHorse*.

Através da avaliação das diferentes curvas de amplificação foi possível verificar que sistema de amplificação que compõe este *kit* apresenta especificidade para cada uma das espécies em particular, não tendo sido verificada qualquer tipo de amplificação cruzada entre as diferentes espécies em estudo. Além do mais, também se verificou que existem diferenças significativas entre os níveis de fluorescência e os valores de C_t detetados para cada uma das espécies.

4.3. Avaliação do ADN extraído de amostras comerciais (processados de carne de bovino)

4.3.1. Avaliação da concentração e pureza do ADN extraído de amostras comerciais (processados de carne de bovino)

Após a recolha e armazenamento das amostras comerciais de processados de carne de bovino, o ADN foi extraído pelo método de CTAB modificado. Posteriormente, e à semelhança das amostras de referência, o ADN obtido foi quantificado pelo método de fluorimetria, que apenas permite verificar a concentração de ADN extraído, e pelo método de espectrofotometria, que possibilita não só avaliar a concentração de ADN como também a pureza do mesmo. Os resultados obtidos encontram-se nas Tabelas 8, 9, 10 e 11.

A concentração de ADN obtida não seguiu nenhum padrão específico, sendo superior à concentração das amostras de referência, em alguns casos, e noutras ligeiramente inferior. No que respeita aos valores da razão A_{260}/A_{280} , estes variam entre 1,70 e 1,97, o que nos permite concluir que o ADN extraído apresenta uma elevada pureza. Apesar de os valores da razão A_{260}/A_{230} não se situarem entre o intervalo de 1,8-2,2, todos os valores obtidos são superiores a 2, pelo que podemos concluir que não se encontram presentes contaminantes provenientes dos reagentes utilizados durante o procedimento de extração de ADN.

Com base nos resultados obtidos pela quantificação de ADN por espectrofotometria, todas as amostras foram diluídas a uma concentração de 2 ng/ μ l, através da adição de água ultrapura.

Tabela 8 - Dados da quantificação do ADN extraído das amostras comerciais de processados de carne de bovino do lote 1, por espectrofotometria (*NanoDrop™ 1000*) e fluorimetria (*Qubit™ Fluorometer*). **H1, H2, H3, H4, H5** – amostras comerciais (processados de carne de bovino); **A1, A2, B1, B2** – réplicas; **L1** – lote 1.

Designação da amostra	<i>NanoDrop™ 1000</i> (Thermo Scientific)			<i>Qubit™ Fluorometer</i> (Invitrogen)	
	Concentração ADN (ng/μl)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	Concentração ADN (μg/ml)	Concentração em 10 μL (μg/ml)
H1A1L1	175,2	1,90	2,58	7,9	160
H1A2L1	8,8	1,85	2,83	0,0604	1,21
H1B1L1	129,5	1,87	2,24	4,18	83,6
H1B2L1	101,1	1,88	2,32	3,21	64,3
H2A1L1	66,9	1,70	2,24	2,00	139,9
H2A2L1	51,6	1,83	2,66	2,19	43,9
H2B1 L1	45,5	1,85	2,23	1,29	25,9
H2B2 L1	50,5	1,85	2,35	1,25	25,1
H3A1 L1	15,3	1,85	2,34	0,0457	0,914
H3A2 L1	24,1	1,92	2,27	0,0436	0,872
H3B1 L1	54,0	1,85	3,04	0,0266	0,914
H3B2 L1	91,7	1,89	2,79	0,209	0,872
H4A1 L1	8,8	1,85	2,11	0,0604	1,21
H4A2 L1	13,8	1,74	1,89	0,0343	0,686
H4B1 L1	83,4	1,88	2,80	1,04	20,9
H4B2 L1	81,3	1,83	2,83	1,01	20,3
H5A1 L1	12,7	1,83	2,14	0,0241	0,483
H5A2 L1	26,1	1,85	2,67	0,567	11,3
H5B1 L1	73,7	1,91	2,84	1,19	23,8
H5B2 L1	55,6	1,93	2,45	0,564	11,3

Tabela 9 - Dados da quantificação do ADN extraído das amostras comerciais de processados de carne de bovino do lote 2, por espectrofotometria (*NanoDrop™ 1000*) e fluorimetria (*Qubit™ Fluorometer*). **H1, H2, H3, H4, H5** – amostras comerciais (processados de carne de bovino); **A1, A2, B1, B2** – réplicas; **L2** – lote 2.

Designação da amostra	<i>NanoDrop™ 1000</i> (Thermo Scientific)			<i>Qubit™ Fluorometer</i> (Invitrogen)	
	Concentração ADN (ng/μl)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	Concentração ADN (μg/ml)	Concentração em 10 μL (μg/ml)
H1A1L2	141,7	1,82	2,84	7,5	49,0
H1A2L2	145,5	1,85	2,29	7,8	49,7
H1B1L2	175,7	1,85	2,22	9,0	180
H1B2L2	143,1	1,83	2,50	8,9	180
H2A1L2	47,3	1,97	2,41	2,07	41,3
H2A2L2	67,3	1,83	2,15	2,14	42,8
H2B1 L2	70,6	1,97	2,43	1,97	39,3
H2B2 L2	72,3	1,67	2,20	2,08	41,7
H3A1 L2	50,9	1,89	2,21	2,45	49,0
H3A2 L2	52,5	1,79	2,28	2,48	49,7
H3B1 L2	59,7	1,82	2,88	2,69	53,8
H3B2 L2	60,1	1,82	2,51	1,93	38,7
H4A1 L2	54,6	1,80	2,11	2,49	49,9
H4A2 L2	69,0	1,90	1,21	2,45	48,7
H4B1 L2	73,4	1,77	2,51	2,20	44,0
H4B2 L2	65,1	1,74	2,56	1,96	39,2
H5A1 L2	93,9	1,82	2,04	2,81	56,2
H5A2 L2	91,5	1,90	2,52	2,44	48,8
H5B1 L2	53,9	1,73	2,35	1,97	39,2
H5B2 L2	92,4	1,75	2,39	2,78	55,6

Tabela 10 - Dados da quantificação do ADN extraído das amostras comerciais de processados de carne de bovino do lote 1, por espectrofotometria (*NanoDrop™ 1000*) e fluorimetria (*Qubit™ Fluorometer*). **A1, A2, A3, C1, E1, E2, L1, L2, L3** – amostras comerciais (processados de carne de bovino); **A1, A2** – réplicas; **L1** – lote 1.

Designação da amostra	<i>NanoDrop™ 1000</i> (Thermo Scientific)			<i>Qubit™ Fluorometer</i> (Invitrogen)	
	Concentração ADN (ng/μl)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	Concentração ADN (μg/ml)	Concentração em 10 μL (μg/ml)
A1A1L1	87,9	1,84	2,82	3,20	64,0
A1A2L1	91,7	1,89	2,79	3,22	64,4
A2A1L1	52,0	1,91	2,39	0,564	11,3
A2A2L1	48,8	1,78	2,84	0,452	10,2
A3A1L1	188,9	1,88	2,45	8,90	180
A3A2L1	190,6	1,87	2,27	9,10	180
C1A1L1	192,2	1,87	2,32	1,96	39,2
C1A2L2	242,3	1,87	2,47	2,78	55,6
E1A1L2	35,3	1,91	2,84	1,19	23,8
E1A2L2	39,8	1,70	2,59	1,23	24,1
E2A1L2	32,0	1,87	2,04	1,08	21,7
E2A2L2	37,8	1,90	2,17	1,14	23,1
L1A1L2	72,5	1,89	2,21	0,876	17,5
L1A2L2	66,3	1,86	2,49	0,570	11,4
L2A1L2	48,3	1,82	2,84	1,32	25,6
L2A2L2	48,8	1,78	2,78	1,34	26,1
L3A1L2	26,4	1,89	2,21	0,284	5,68
L3A2L2	20,4	1,73	2,09	0,146	2,91

Tabela 11 - Dados da quantificação do ADN extraído das amostras comerciais de processados de carne de bovino do lote 2, por espectrofotometria (*NanoDrop™ 1000*) e fluorimetria (*Qubit™ Fluorometer*). A1, A2, A3, C1, E1, E2, L1, L2, L3 – amostras comerciais (processados de carne de bovino); A1, A2 – réplicas; L2 – lote 2.

Designação da amostra	<i>NanoDrop™ 1000</i> (Thermo Scientific)			<i>Qubit™ Fluorometer</i> (Invitrogen)	
	Concentração ADN (ng/μl)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	Concentração ADN (μg/ml)	Concentração em 10 μL (μg/ml)
A1A1L2	89,2	1,82	2,43	3,22	64,4
A1A2L2	94,2	1,85	2,37	3,34	65,2
A2A1L2	52,0	1,90	2,41	2,20	44,0
A2A2L2	58,2	1,88	2,10	2,24	44,9
A3A1L2	132,5	1,88	2,45	2,51	50,3
A3A2L2	127,3	1,78	2,33	2,45	49,0
C1A1L2	198,2	1,89	2,34	2,51	50,3
C1A2L2	184,3	1,87	2,42	2,45	49,0
E1A1L2	73,7	1,86	2,35	1,19	23,8
E1A2L2	39,8	1,72	2,51	0,258	5,16
E2A1L2	24,8	1,84	2,28	0,425	8,55
E2A2L2	32,0	1,87	2,04	0,564	11,3
L1A1L2	18,2	1,90	2,40	0,0271	0,542
L1A2L2	20,4	1,86	2,49	0,0359	0,718
L2A1L2	19,2	1,74	2,72	0,132	2,73
L2A2L2	21,6	1,85	2,84	0,147	2,94
L3A1L2	26,2	1,92	2,27	0,284	5,68
L3A2L2	51,2	1,89	2,30	0,793	15,0

4.3.2. Análise por PCR em Tempo Real das amostras comerciais (processados de carne de bovino) com o kit *Tetraplex AllHorse*

Após a análise dos dados da quantificação do ADN extraído das amostras comerciais de processados de carne de bovino, estas foram testadas para amplificação com o kit *Tetraplex AllHorse*, de modo a detetar, em simultâneo, a presença das espécies *Bos taurus*, *Sus scrofa*, *Equus caballus* e *Ovis aries*, em caso de contaminação acidental ou mesmo fraude alimentar.

Inicialmente amplificaram-se, em simultâneo, as amostras de referência para as quatro espécies em estudo, de forma a descartar falsos negativos, em caso de inibição da PCR. Através da

análise da Figura 17, é possível observar as curvas de amplificação das amostras de referência, embora apresentem valores de Ct e RFU muito diferentes, devido ao que já foi explicado anteriormente, e na Tabela 12, o número de ciclos no qual se iniciou a amplificação (Ct).

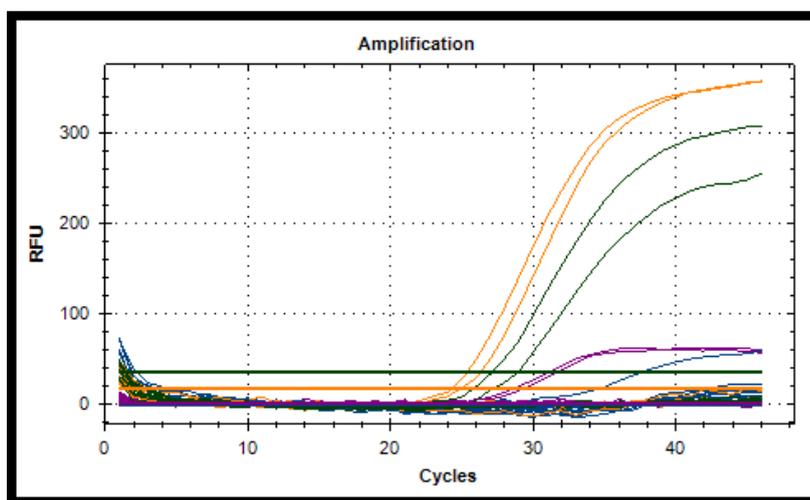


Figura 17 - Gráfico representativo das curvas de amplificação das amostras de referência para cada espécie. laranja – *Bos taurus*; verde – *Sus scrofa*; roxo – *Equus caballus*; azul – *Ovis aries*.

Tabela 12 - Tabela dos dados correspondentes às curvas de amplificação das amostras de referência. NTC – Controlo negativo.

Resultados da amplificação			
Amostra	Conteúdo	Fluoróforo	Ct
V1	Amostra de Referência	ROX	24,30
V2	Amostra de Referência	ROX	24,92
P1	Amostra de Referência	HEX	29,02
P2	Amostra de Referência	HEX	27,18
C1	Amostra de Referência	Cy5	25,14
C2	Amostra de Referência	Cy5	24,73
O1	Amostra de Referência	FAM	29,09
O2	Amostra de Referência	FAM	29,08
NTC	NTC	ROX, HEX, FAM, Cy5	-

Após as amostras de referência estarem amplificadas, procedeu-se à amplificação das amostras comerciais de processados de carne de bovino. Nas figuras 18-31, é possível visualizar as

curvas de amplificação das diferentes amostras comerciais em estudo. Os valores de *Ct* obtidos podem ser analisados nas Tabelas 13-26. Através da análise das figuras e tabelas acima mencionadas, pode verificar que tal como se encontra descrito nos rótulos das amostras comerciais (processados de carne de bovino) em estudo, a única espécie animal detetada foi a *Bos taurus* (vaca), pelo que nenhuma das amostras comerciais testadas apresenta qualquer outra das espécies em estudo (*Sus scrofa*, *Eqqus caballus* e *Ovis aries*).

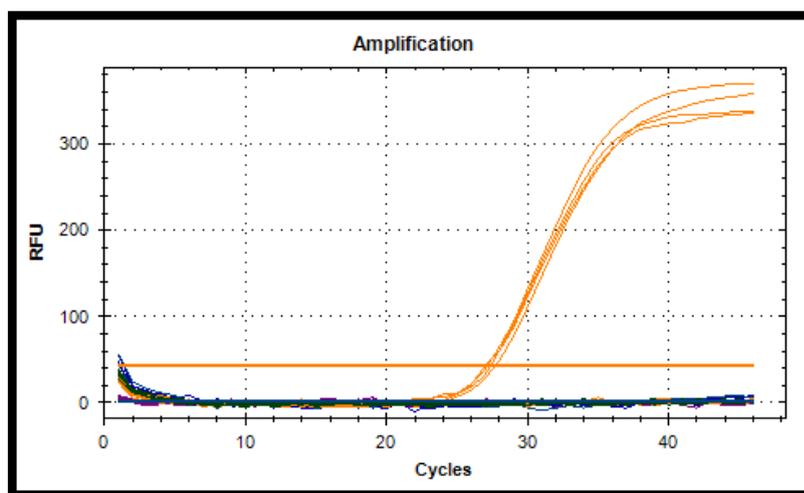


Figura 18 - Gráfico representativo das curvas de amplificação das amostras comerciais (processados de carne de bovino) do lote 1.

Tabela 13 - Tabela dos dados correspondentes às curvas de amplificação das amostras comerciais (processados de carne de bovino) do lote 1. **NTC** – Controlo negativo.

Resultados da amplificação			
Amostra	Conteúdo	Fluoróforo	<i>Ct</i>
H1A1L1	Amostra	ROX	27,40
H1A2L1	Amostra	ROX	27,18
H2A1L1	Amostra	ROX	27,03
H2A2L1	Amostra	ROX	27,72
NTC	NTC	ROX, HEX. FAM, Cy5	-

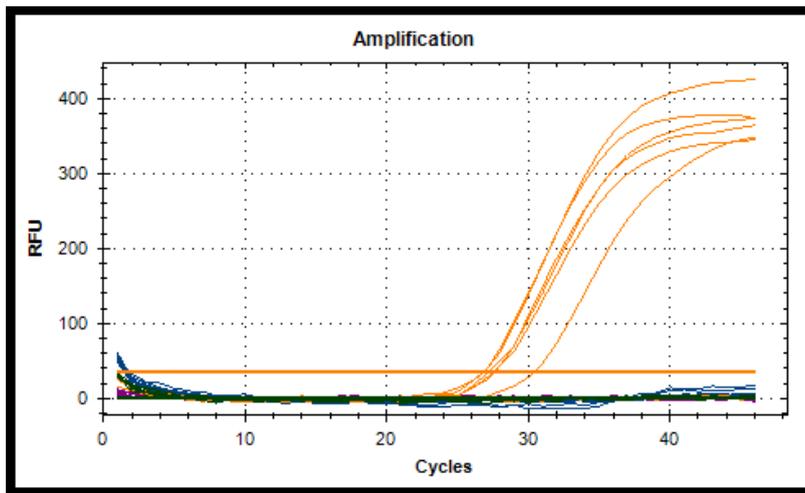


Figura 19 - Gráfico representativo das curvas de amplificação das amostras comerciais (processados de carne de bovino) do lote 1.

Tabela 14 - Tabela dos dados correspondentes às curvas de amplificação das amostras comerciais (processados de carne de bovino) do lote 1. **NTC** – Controlo negativo.

Resultados da amplificação			
Amostra	Conteúdo	Fluoróforo	Ct
H3A1L1	Amostra	ROX	26,86
H3A2L1	Amostra	ROX	26,84
H4A1L1	Amostra	ROX	27,47
H4A2L1	Amostra	ROX	27,14
H5A1L1	Amostra	ROX	30,35
H5A2L1	Amostra	ROX	27,57
NTC	NTC	ROX, HEX. FAM, Cy5	-

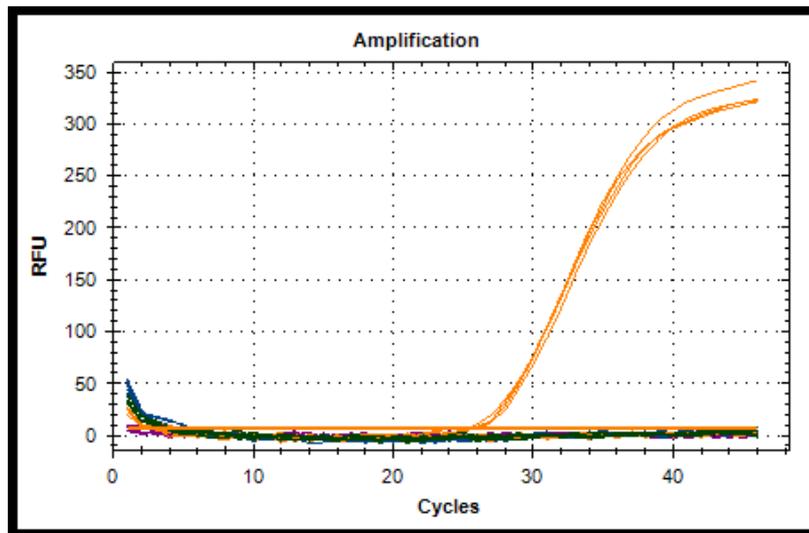


Figura 20 - Gráfico representativo das curvas de amplificação das amostras comerciais (processados de carne de bovino) do lote 1.

Tabela 15 - Tabela dos dados correspondentes às curvas de amplificação das amostras comerciais (processados de carne de bovino) do lote 1. **NTC** – Controlo negativo.

Resultados da amplificação			
Amostra	Conteúdo	Fluoróforo	<i>Ct</i>
H1B1L1	Amostra	ROX	25,41
H1B2L1	Amostra	ROX	25,19
H2B1L1	Amostra	ROX	25,69
H2B2L1	Amostra	ROX	26,08
NTC	NTC	ROX, HEX. FAM, Cy5	-

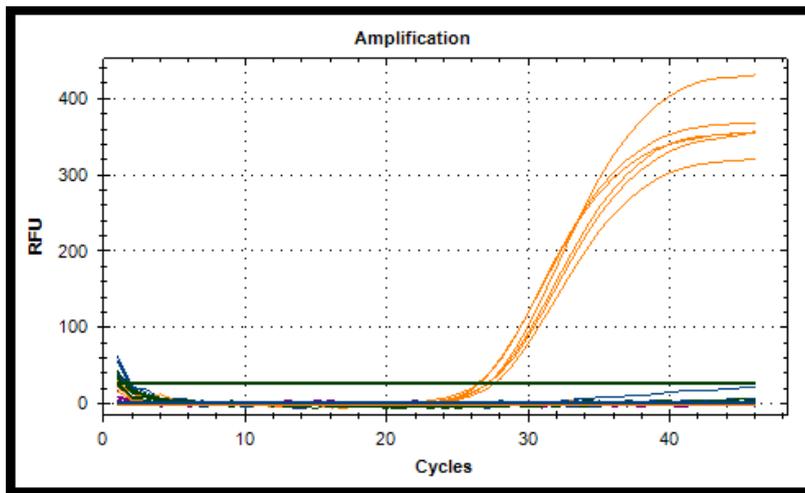


Figura 21 - Gráfico representativo das curvas de amplificação das amostras comerciais (processados de carne de bovino) do lote 1.

Tabela 16 - Tabela dos dados correspondentes às curvas de amplificação das amostras comerciais (processados de carne de bovino) do lote 1. **NTC** – Controlo negativo.

Resultados da amplificação			
Amostra	Conteúdo	Fluoróforo	Ct
H3B1L1	Amostra	ROX	21,56
H3B2L1	Amostra	ROX	20,29
H4B1L1	Amostra	ROX	23,42
H4B2L1	Amostra	ROX	23,80
H5B1L1	Amostra	ROX	20,72
H5B2L1	Amostra	ROX	21,79
NTC	NTC	ROX, HEX. FAM, Cy5	-

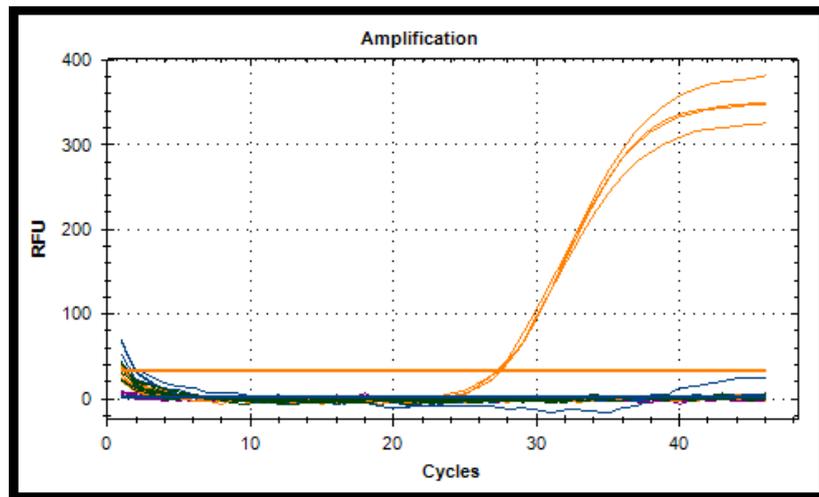


Figura 22 - Gráfico representativo das curvas de amplificação das amostras comerciais (processados de carne de bovino) do lote 2.

Tabela 17 - Tabela dos dados correspondentes às curvas de amplificação das amostras comerciais (processados de carne de bovino) do lote 2. NTC – Controlo negativo.

Resultados da amplificação			
Amostra	Conteúdo	Fluoróforo	Ct
H2A1L2	Amostra	ROX	27,20
H2A2L2	Amostra	ROX	27,48
H4A1L2	Amostra	ROX	27,25
H4A2L2	Amostra	ROX	27,42
NTC	NTC	ROX, HEX. FAM, Cy5	-

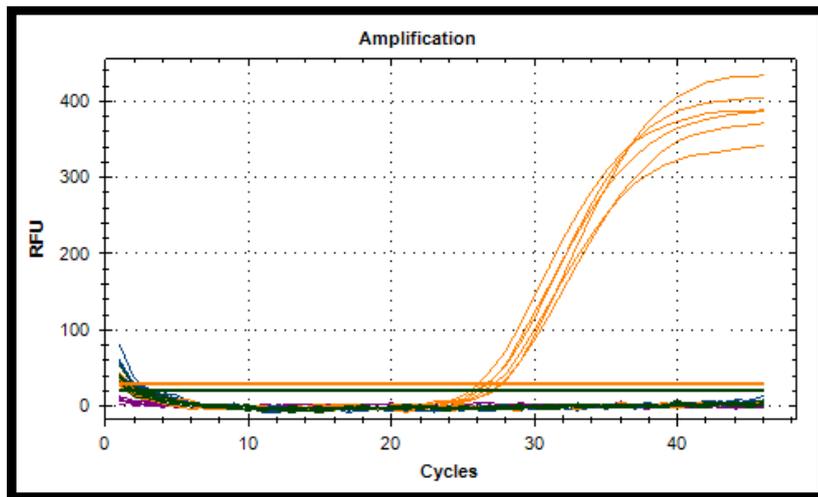


Figura 23 - Gráfico representativo das curvas de amplificação das amostras comerciais (processados de carne de bovino) do lote 2.

Tabela 18 - Tabela dos dados correspondentes às curvas de amplificação das amostras comerciais (processados de carne de bovino) do lote 2. NTC – Controlo negativo.

Resultados da amplificação			
Amostra	Conteúdo	Fluoróforo	Ct
H1A1L2	Amostra	ROX	26,12
H1A2L2	Amostra	ROX	26,60
H3A1L2	Amostra	ROX	27,12
H3A2L2	Amostra	ROX	26,73
H5A1L2	Amostra	ROX	27,61
H5A2L2	Amostra	ROX	27,75
NTC	NTC	ROX, HEX. FAM, Cy5	-

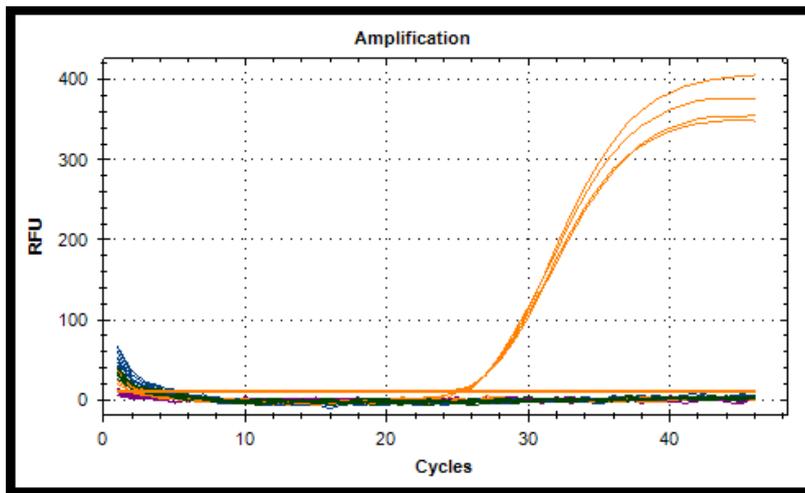


Figura 24 - Gráfico representativo das curvas de amplificação das amostras comerciais (processados de carne de bovino) do lote 2.

Tabela 19 - Tabela dos dados correspondentes às curvas de amplificação das amostras comerciais (processados de carne de bovino) do lote 2. **NTC** – Controlo negativo.

Resultados da amplificação			
Amostra	Conteúdo	Fluoróforo	Ct
H2B1L2	Amostra	ROX	24,60
H2B2L2	Amostra	ROX	25,02
H4B1L2	Amostra	ROX	24,77
H4B2L2	Amostra	ROX	24,98
NTC	NTC	ROX, HEX. FAM, Cy5	-

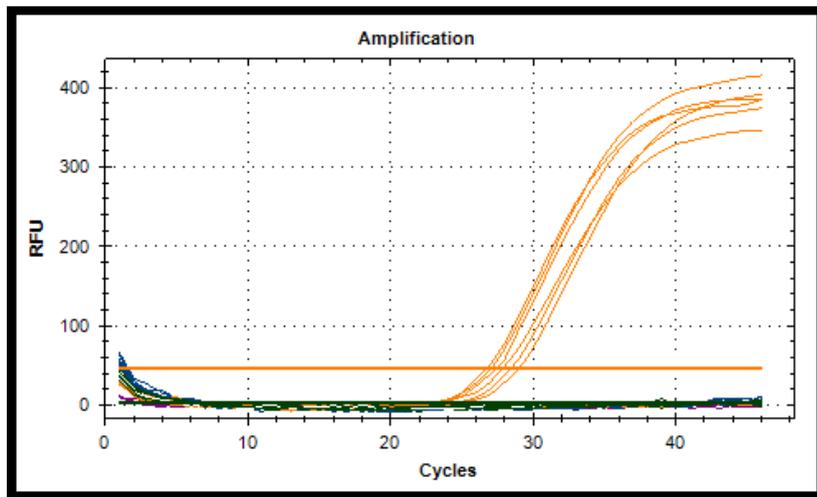


Figura 25 - Gráfico representativo das curvas de amplificação das amostras comerciais (processados de carne de bovino) do lote 2.

Tabela 20 - Tabela dos dados correspondentes às curvas de amplificação das amostras comerciais (processados de carne de bovino) do lote 2. **NTC** – Controlo negativo.

Resultados da amplificação			
Amostra	Conteúdo	Fluoróforo	Ct
H1B1L2	Amostra	ROX	27,38
H1B2L2	Amostra	ROX	26,69
H3B1L2	Amostra	ROX	27,83
H3B2L2	Amostra	ROX	27,03
H5B1L2	Amostra	ROX	28,40
H5B2L2	Amostra	ROX	29,02
NTC	NTC	ROX, HEX. FAM, Cy5	-

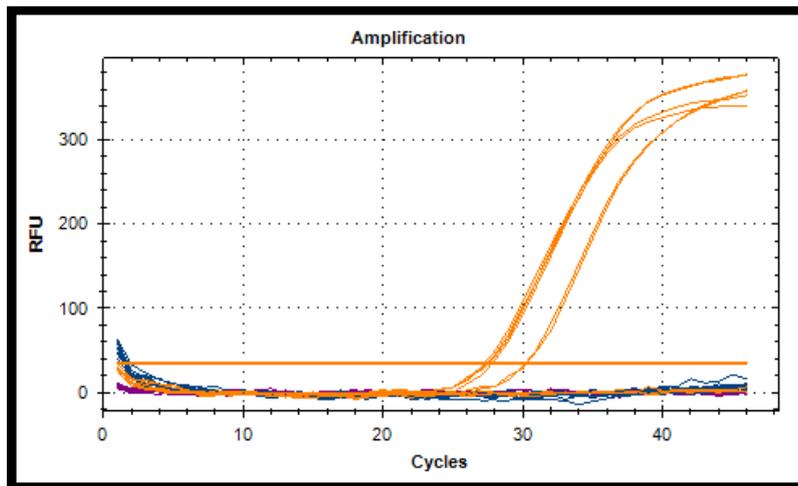


Figura 26 - Gráfico representativo das curvas de amplificação das amostras comerciais (processados de carne de bovino) do lote 1.

Tabela 21 - Tabela dos dados correspondentes às curvas de amplificação das amostras comerciais (processados de carne de bovino) do lote 1. NTC – Controlo negativo.

Resultados da amplificação			
Amostra	Conteúdo	Fluoróforo	Ct
A1A1L1	Amostra	ROX	27,48
A1A2L1	Amostra	ROX	27,80
C1A1L1	Amostra	ROX	30,17
C1A2L1	Amostra	ROX	30,29
E1A1L1	Amostra	ROX	27,24
E1A2L1	Amostra	ROX	27,41
NTC	NTC	ROX, HEX. FAM, Cy5	-

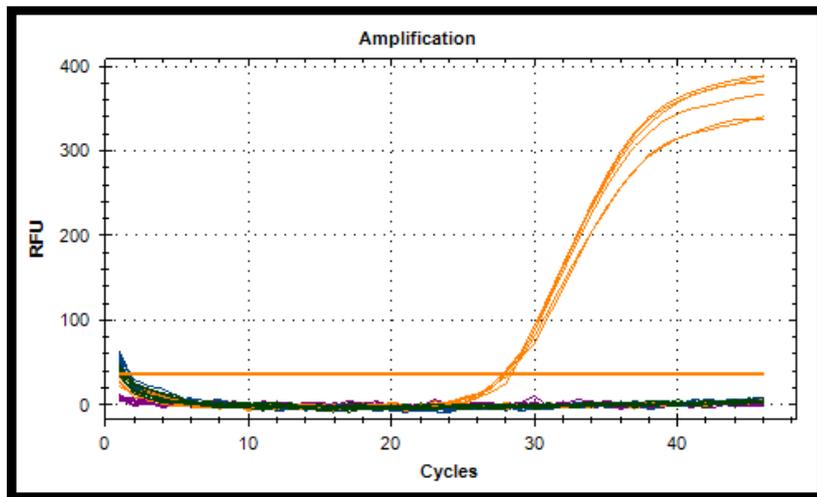


Figura 27 - Gráfico representativo das curvas de amplificação das amostras comerciais (processados de carne de bovino) do lote 1.

Tabela 22 - Tabela dos dados correspondentes às curvas de amplificação das amostras comerciais (processados de carne de bovino) do lote 1. **NTC** – Controlo negativo.

Resultados da amplificação			
Amostra	Conteúdo	Fluoróforo	Ct
A2A1L1	Amostra	ROX	27,89
A2A2L1	Amostra	ROX	27,74
A3A1L1	Amostra	ROX	27,96
A3A2L1	Amostra	ROX	27,41
L1A1L1	Amostra	ROX	28,16
L1A2L1	Amostra	ROX	27,81
NTC	NTC	ROX, HEX. FAM, Cy5	-

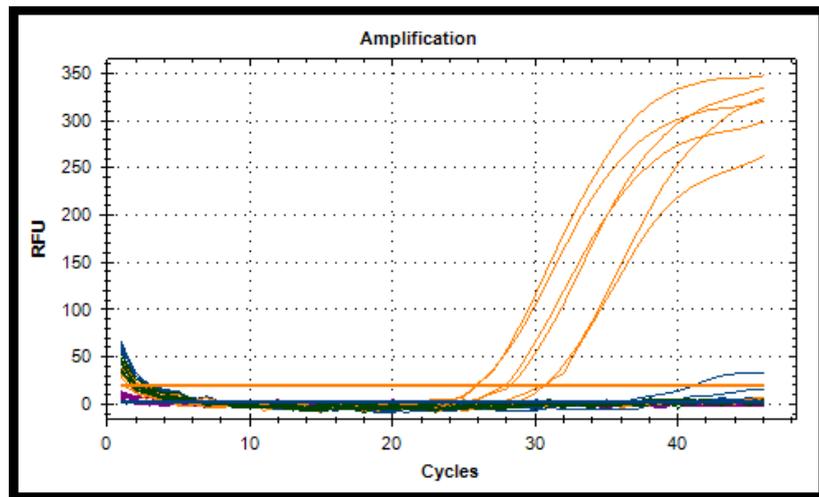


Figura 28 - Gráfico representativo das curvas de amplificação das amostras comerciais (processados de carne de bovino) do lote 1.

Tabela 23 - Tabela dos dados correspondentes às curvas de amplificação das amostras comerciais (processados de carne de bovino) do lote 1. **NTC** – Controlo negativo.

Resultados da amplificação			
Amostra	Conteúdo	Fluoróforo	Ct
L2A1L1	Amostra	ROX	30,40
L2A2L1	Amostra	ROX	30,56
L3A1L1	Amostra	ROX	27,82
L3A2L1	Amostra	ROX	28,20
E2A1L1	Amostra	ROX	25,79
E2A2L1	Amostra	ROX	25,84
NTC	NTC	ROX, HEX. FAM, Cy5	-

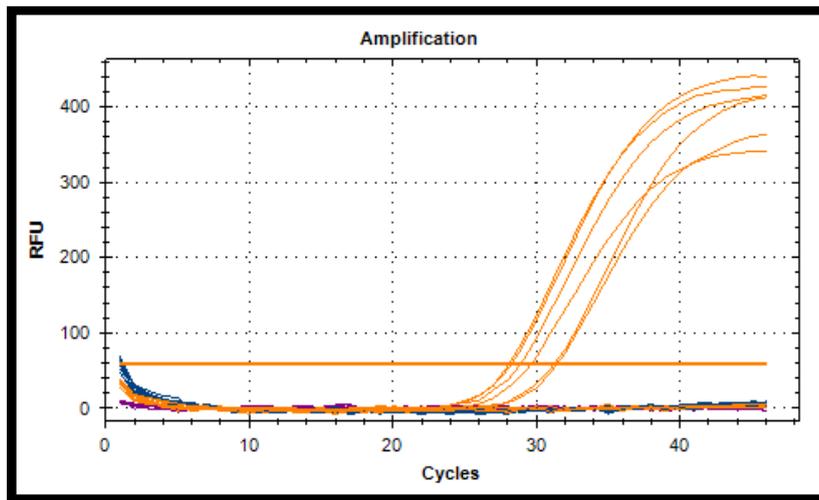


Figura 29 - Gráfico representativo das curvas de amplificação das amostras comerciais (processados de carne de bovino) do lote 2.

Tabela 24 - Tabela dos dados correspondentes às curvas de amplificação das amostras comerciais (processados de carne de bovino) do lote 2. NTC – Controlo negativo.

Resultados da amplificação			
Amostra	Conteúdo	Fluoróforo	Ct
A1A1L2	Amostra	ROX	29,62
A1A2L2	Amostra	ROX	28,91
C1A1L2	Amostra	ROX	31,23
C1A2L2	Amostra	ROX	31,42
E1A1L2	Amostra	ROX	28,09
E1A2L2	Amostra	ROX	28,25
NTC	NTC	ROX, HEX. FAM, Cy5	-

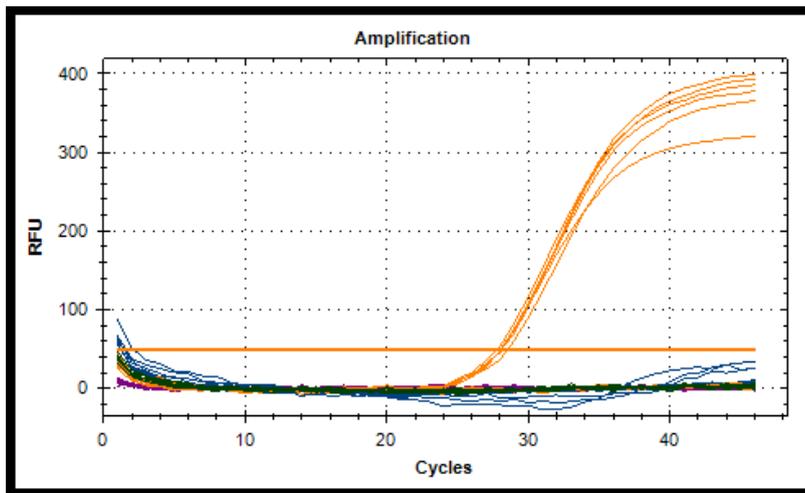


Figura 30 - Gráfico representativo das curvas de amplificação das amostras comerciais (processados de carne de bovino) do lote 2.

Tabela 25 - Tabela dos dados correspondentes às curvas de amplificação das amostras comerciais (processados de carne de bovino) do lote 2. **NTC** – Controlo negativo.

Resultados da amplificação			
Amostra	Conteúdo	Fluoróforo	Ct
A2A1L2	Amostra	ROX	28,09
A2A2L2	Amostra	ROX	28,08
A3A1L2	Amostra	ROX	28,03
A3A2L2	Amostra	ROX	27,78
L1A1L2	Amostra	ROX	28,52
L1A2L2	Amostra	ROX	28,11
NTC	NTC	ROX, HEX. FAM, Cy5	-

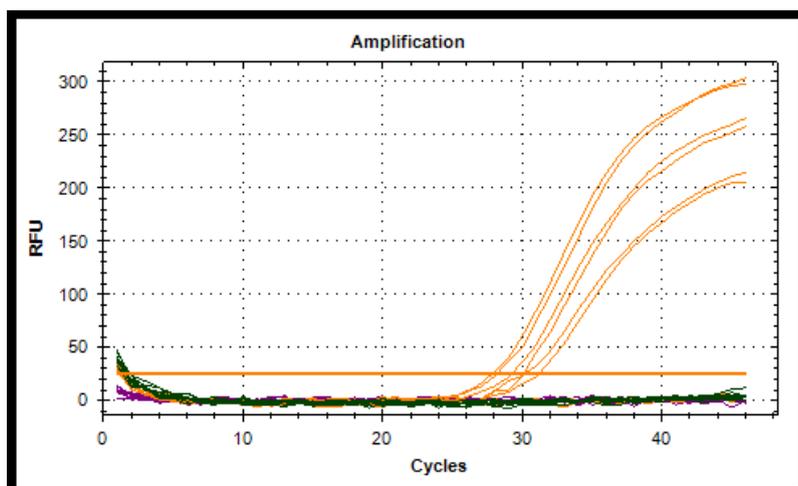


Figura 31 - Gráfico representativo das curvas de amplificação das amostras comerciais (processados de carne de bovino) do lote 2.

Tabela 26 - Tabela dos dados correspondentes às curvas de amplificação das amostras comerciais (processados de carne de bovino) do lote 2. NTC – Controlo negativo.

Resultados da amplificação			
Amostra	Conteúdo	Fluoróforo	Ct
L2A1L2	Amostra	ROX	30,11
L2A2L2	Amostra	ROX	31,22
L3A1L2	Amostra	ROX	30,18
L3A2L2	Amostra	ROX	29,24
E2A1L2	Amostra	ROX	28,17
E2A2L2	Amostra	ROX	27,87
NTC	NTC	ROX, HEX. FAM, Cy5	-

5. Discussão e Conclusão

O conceito de segurança alimentar tem vindo a impor-se de forma crescente ao consumidor e à indústria alimentar nos últimos anos, devido a uma evolução dos hábitos alimentares e de um controlo cada vez mais rigoroso no que respeita à qualidade dos alimentos. Com esta modificação de hábitos, aumentou o número de produtos de elevada qualidade e, conseqüentemente, o preço comercial dos mesmos, o que determinou a exigência de certas características para que os mesmos possam ser considerados autênticos. No entanto, o conceito de segurança alimentar tem sofrido pequenas alterações, englobando agora também as questões da autenticidade dos produtos alimentares.

A questão da autenticidade dos alimentos coloca-se, muito provavelmente, desde o início da sua comercialização e tem sido, ao longo dos anos, orientada pelas tendências do mercado. A autenticidade abrange diversos aspetos desde as adulterações acidentais ou intencionais, até à segurança e inocuidade dos produtos alimentos.

Devido à grande necessidade de verificação da autenticidade alimentar, foram desenvolvidas metodologias analíticas que permitem avaliar, especificamente e inequivocamente, a identificação das diferentes espécies de carne presentes. Os métodos baseados na análise de ADN são considerados ferramentas essenciais para a identificação de espécies em produtos de origem animal e produtos alimentares, estando a ser amplamente utilizados para este efeito.

A elaboração desta dissertação visou a avaliação da autenticidade de amostras comerciais de produtos processados à base de carne de bovino. As metodologias utilizadas para tal, basearam-se na análise de ADN, uma vez que todos os produtos comerciais a analisar foram submetidos a processamento. Assim, os métodos baseados na análise de proteínas não seriam tão eficazes, devido à desnaturação das proteínas quando se submete os produtos a um tratamento térmico.

Numa primeira fase, procedeu-se à extração de ADN das amostras de carne fresca (amostras de referência) das espécies *Bos taurus* (vaca), *Sus scrofa* (porco), *Eqqus caballus* (cavalo) e *Ovis aries* (ovelha), adquiridas num talho, pelo método de CTAB modificado.

Com base na análise dos dados obtidos relativos aos valores de concentração e pureza do ADN extraído, obtida pelas razões de absorvância A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} , do grau de arrastamento do ADN em gel de agarose e da sua viabilidade para amplificação com o kit *Tetraplex AllHorse*, podemos concluir que o método de CTAB modificado se adequa perfeitamente à extração de ADN das amostras de referência, uma vez que os extratos de ADN apresentavam valores de pureza elevados e reduzido arrastamento.

À semelhança das amostras de referência, o ADN das amostras comerciais de processados

de carne de bovino também foi extraído pelo protocolo de CTAB modificado, sendo posteriormente avaliada a sua concentração e pureza. Os valores de concentração de ADN obtidos diferem de amostra para amostra, devido ao grau de processamento a que cada uma é sujeita durante o seu fabrico. No que respeita aos valores da razão A_{260}/A_{280} , estes vão ao encontro dos valores obtidos com as amostras de referência, o que nos permite concluir que o ADN extraído apresenta uma elevada pureza. Deste modo, podemos concluir que o protocolo de extração empregue neste estudo se adequa tanto a amostras de carne fresca, como à extração de ADN de processados de carne de bovino.

Após as etapas de extração e quantificação do ADN estarem concluídas, o ADN extraído das amostras comerciais de processados de carne de vaca foi amplificado com o *kit Tetraplex AllHorse*, para a deteção das quatro espécies em estudo.

De todas as amostras comerciais analisadas, nenhuma revelou a presença de qualquer outra das espécies em estudo, para além da mencionada no rótulo de cada uma, pelo que não foi necessário proceder-se à posterior quantificação da mesma. Assim, através da utilização de metodologias de biologia molecular, podemos concluir que a rotulagem está em conformidade com o conteúdo do produto alimentar.

Numa avaliação global de todas as metodologias empregues no presente estudo, estas demonstraram ter uma grande aplicabilidade na monitorização de alimentos frescos e processados, dado serem técnicas de rápida execução e com uma relação de custo/tempo aceitável. Estas permitiram, através de uma análise qualitativa, detetar a presença ou ausência das espécies analisadas. Uma vez que o protocolo de amplificação utilizado neste trabalho demonstrou estar otimizado para um grande número de amostras comerciais de processados de carne de bovino testadas, podemos concluir que o *kit Tetraplex AllHorse* pode ser aplicado em análises de rotina, na indústria alimentar, o que permite aumentar os níveis de excelência dos produtos e garantir a autenticidade dos mesmos.

De forma a aumentar a concentração de ADN extraído por amostra, é fulcral que no futuro se proceda à otimização e definição de um protocolo global de homogeneização das amostras, que continua a ser um ponto muito vulnerável neste tipo de amostras altamente processadas e com elevados teores de gordura.

Para um trabalho futuro dentro desta área, seria interessante estudar não só amostras comerciais de processados de carne de bovino de marca branca e de outras marcas comerciais, como também seria extremamente interessante alargar o número de espécies em estudo, para espécies de aves como é o caso de *Gallus gallus domesticus* (galinha) e *Meleagris gallopavo* (peru). Assim sendo, teriam de ser adquiridas em superfícies comerciais amostras de processados de carne de aves. Após a análise de todas as amostras estar concluída e de se verificar se existe ou

não a presença de espécies não declaradas no rótulo, por PCR em tempo real com um *kit* de amplificação específico para as espécies em estudo, no caso de efetivamente existir fraude alimentar, seria muito interessante efetuar uma PCR quantitativa, de modo a perceber qual a quantidade da espécie indevida presente no produto alimentar.

Com este trabalho não se pretendeu apenas a deteção de possíveis adulterações em processados de carne de bovino, pretendeu-se também valorizar os produtores que apresentam produtos em conformidade com a rotulagem, preservando assim a sua identidade e propriedades. O aumentando da transparência de todo o processo aumenta também a confiança dos consumidores nos produtos que adquirem, podendo conduzir a um acréscimo das vendas no mercado interno e até mesmo nas exportações.

6. Referências Bibliográficas

- Agilent Technologies. (2014). Introduction to Quantitative PCR Methods and Applications Guide, 1–109.
- 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.
- Ali, M. E., Hashim, U., Dhahi, T. S., Mustafa, S., Man, Y. B. C., & Latif, M. A. (2012). Analysis of Pork Adulteration in Commercial Burgers Targeting Porcine-Specific Mitochondrial Cytochrome B Gene by TaqMan Probe Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Food Analytical Methods*, 5(4), 784–794. <https://doi.org/10.1007/s12161-011-9311-4>
- Ali, M. E., Kashif, M., Uddin, K., Hashim, U., Mustafa, S., & Che Man, Y. Bin. (2012). Species Authentication Methods in Foods and Feeds: The Present, Past, and Future of Halal Forensics. *Food Analytical Methods*, 5(5), 935–955. <https://doi.org/10.1007/s12161-011-9357-3>
- Amaral, J. S., Mafra, I., & Oliveira, M. B. P. P. (2015). Riscos e alimentos - Riscos e benefícios associados ao consumo de carne de caça. *Asae*, 9, 17–19.
- Amaral, J. S., Santos, C. G., Melo, V. S., Oliveira, M. B. P. P., & Mafra, I. (2014). Authentication of a traditional game meat sausage (Alheira) by species-specific PCR assays to detect hare, rabbit, red deer, pork and cow meats. *Food Research International*, 60, 140–145. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.11.003>
- Antônio, J., Lara, F. De, & Soares, A. L. P. N. D. L. E. I. I. ; M. S. (2003). Rastreabilidade da carne bovina: uma exigência para a segurança alimentar | demand for food safety. *Semina: Ciências Agrárias*, 24, 143–148. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2003v24n1p143>
- Arif, I. A., Bakir, M. A., Khan, H. A., Al Farhan, A. H., Al Homaidan, A. A., Bahkali, A. H., ... Shobrak, M. (2010). A brief review of molecular techniques to assess plant diversity. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(5), 2079–2096. <https://doi.org/10.3390/ijms11052079>
- ASAE. (n.d.-a). Notícias on-line 2013 - apreensão no concelho de Coimbra.
- ASAE. (n.d.-b). Notícias on-line 2013 - apreensão no concelho de Leiria.
- Asensio, L., González, I., García, T., & Martín, R. (2008). Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Food Control*, 19(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.02.010>
- Ballin, N. Z. (2010). Authentication of meat and meat products. *Meat Science*, 86(3), 577–587. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.06.001>

- Ballin, N. Z., Vogensen, F. K., & Karlsson, A. H. (2009). Species determination - Can we detect and quantify meat adulteration? *Meat Science*, 83(2), 165–174. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.06.003>
- Ballin, N. Z., Vogensen, F. K., & Karlsson, A. H. (2012). PCR amplification of repetitive sequences as a possible approach in relative species quantification. *Meat Science*, 90(2), 438–443. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.09.002>
- BIO-RAD. (2006). Real-time PCR: Applications Guide. *Bio-Rad Laboratories*, 2–84.
- Biosystems, A. (2002). Real-Time PCR Vs . Traditional PCR. *Evolution*, 58, 1–15. <https://doi.org/10.1227/01.NEU.0000210361.83548.D0>
- Bosona, T., & Gebresenbet, G. (2013). Food traceability as an integral part of logistics management in food and agricultural supply chain. *Food Control*, 33(1), 32–48. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.02.004>
- Bottero, M. T., & Dalmaso, A. (2011). Animal species identification in food products: Evolution of biomolecular methods. *Veterinary Journal*, 190(1), 34–38. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.09.024>
- Brodmann, P. D., & Moor, D. (2003). Sensitive and semi-quantitative TaqMan™ real-time polymerase chain reaction systems for the detection of beef (*Bos taurus*) and the detection of the family Mammalia in food and feed. *Meat Science*, 65(1), 599–607. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(02\)00253-X](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(02)00253-X)
- Butler, J. M. (2009). *No Title Fundamentals of Forensic DNA Typing: Academic Press*.
- CAC - Codex Alimentarius Commission. (2003). General Principles of Food Hygiene. CAC/RCP 1-1969 Rev. 4. *Codex Alimentarius Commission*, 1–31. Retrieved from <http://www.fao.org/>
- Cammà, C., Di Domenico, M., & Monaco, F. (2012). Development and validation of fast Real-Time PCR assays for species identification in raw and cooked meat mixtures. *Food Control*, 23(2), 400–404. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.08.007>
- Caporale, V., Giovannini, a, Di Francesco, C., & Calistri, P. (2001). Importance of the traceability of animals and animal products in epidemiology. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 20(2), 372–378. <https://doi.org/10.20506/rst.20.2.1279>
- Chisholm, J., Conyers, C., Booth, C., Lawley, W., & Hird, H. (2005). The detection of horse and donkey using real-time PCR. *Meat Science*, 70, 727–732.
- Chisholm, J., Sánchez, A., Brown, J., & Hird, H. (2008). The development of species-specific real-time pcr assays for the detection of pheasant and quail in food. *Food Analytical Methods*, 1(3), 190–194. <https://doi.org/10.1007/s12161-008-9026-3>
- Codex Alimentarius Commission - Codex Committee on Meat Hygiene. (2005). Código de Práticas de Higiene para a Carne (CAC/RCP 58-2005), 1(1985), 55.

- Cunha, L., & Moura, A. (2008). Consumidor Português Face à Segurança Alimentar. *Segurança E Qualidade Alimentar*, 4, 46–49.
- Dabbene, F., & Gay, P. (2011). Food traceability systems: Performance evaluation and optimization. *Computers and Electronics in Agriculture*, 75(1), 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2010.10.009>
- 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(2), 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2003.09.006>
- Demirhan, Y., Ulca, P., & Senyuva, H. Z. (2012). Detection of porcine DNA in gelatine and gelatine-containing processed food products-Halal/Kosher authentication. *Meat Science*, 90(3), 686–689. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.10.014>
- 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(5), 391–394. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2004.04.004>
- 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(3), 431–438. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.04.010>
- EFSA. (2012). A ciência em prol da proteção dos consumidores - Desde o campo até à mesa. Retrieved from http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/corporate_publications/files/efsacorporatebrochure_es.pdf
- Ellis, D. I., Muhamadali, H., Haughey, S. A., Elliott, C. T., & Goodacre, R. (2015). Point-and-shoot: rapid quantitative detection methods for on-site food fraud analysis – moving out of the laboratory and into the food supply chain. *Anal. Methods*, 7(22), 9401–9414. <https://doi.org/10.1039/C5AY02048D>
- Estiri, M., Hasangholipour, T., Yazdani, H., Nejad, H. J., & Rayej, H. (2010). Food products consumer behaviors: The role of packaging elements. *Journal of Applied Sciences*. <https://doi.org/10.3923/jas.2010.535.543>
- Fajardo, V., González, I., Martín, I., Rojas, M., Hernández, P. E., García, T., & Martín, R. (2008). 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(2), 289–298. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.09.013>
- Fajardo, V., González Isabel, I., Rojas, M., García, T., & Martín, R. (2010). A review of current PCR-based methodologies for the authentication of meats from game animal species. *Trends in Food Science and Technology*, 21(8), 408–421. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.06.002>

- FAO/OMS, F. M. (2002). *Fao/oms*, 28–30.
- Farrokhi, R., Jafari Joozani, R. (2011). Identification of pork genome in commercial meat extracts for Halal authentication by SYBR green I real-time PCR. *International Journal of Food Science & Technology*, 46(5), 951–955.
- G. Mariano, M. M. (2015). Aditivos alimentares em produtos à base de carne.
- 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(8), 696–699. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.09.002>
- Girish PS, Anjaneyulu AS, Viswas KN, Shivakumar BM, Anand M, Patel M, S. B. (2005). Meat species identification by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) of mitochondrial 12S rRNA gene. *Meat Science*, 70(1):107-.
- Goodwin, W., Linacre, A., & Hadi, S. (2011). *An Introduction to Forensic Genetics (Second ed.): Wiley*.
- Gryson, N., Messens, K., & Dewettinck, K. (2004). Evaluation and optimisation of five different extraction methods for soy DNA in chocolate and biscuits. Extraction of DNA as a first step in GMO analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(11), 1357–1363. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1767>
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., & Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/technology*. <https://doi.org/10.1038/nbt0993-1026>
- Hsieh, H. S., Chai, T. jyi, & Hwang, D. F. (2007). Using the PCR-RFLP method to identify the species of different processed products of billfish meats. *Food Control*, 18(4), 369–374. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.11.002>
- JM., B. (2005). *Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers. USA: Edições Academic Press*.
- Jonker, K.M., Tilburg, J.J., Hagele, G.H., & De Boer, E. (2007). Species identification in meat products using real-time PCR. *Food Additives and Contaminant Part A*, 25, 527–33.
- Joshi, M., & Deshpande, J. D. (2010). Polymerase Chain Reaction : Methods , Pr. *International Journal of Biomedical Research*, 1(5), 81–97. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.7439/ijbr.v2i1.83>
- Kane, D. E., & Hellberg, R. S. (2015). Identification of species in ground meat products sold on the U.S. commercial market using DNA-based methods. *Food Control*, 59, 158–163. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.05.020>
- Kashani, A. (2014). Real-Time PCR and Real-Time RT-PCR Applications in Food Labelling and Gene Expression Studies. *International Journal of Genetics and Genomics*, 2(1), 6.

- <https://doi.org/10.11648/j.ijgg.20140201.12>
- Kesmen, Z., Sahin, F., & Yetim, H. (2007). PCR assay for the identification of animal species in cooked sausages. *Meat Science*, *77*, 649–53.
- Kesmen, Z., Gulluce, A., Sahin, F., & Yetim, H. (2009). Identification of meat species by TaqMan-based real-time PCR assay. *Meat Science*, *82*(4), 444–449. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.02.019>
- Kesmen, Z., Yetiman, A. E., Şahin, F., & Yetim, H. (2012). Detection of Chicken and Turkey Meat in Meat Mixtures by Using Real-Time PCR Assays. *Journal of Food Science*, *77*(2), 167–173. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02536.x>
- Kitpipit, T., Sittichan, K., & Thanakiatkrai, P. (2014). Direct-multiplex PCR assay for meat species identification in food products. *Food Chemistry*, *163*, 77–82.
- Köppel, R., Ruf, J., & Rentsch, J. (2011). Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from beef, pork, horse and sheep. *European Food Research and Technology*, *232*(1), 151–155. <https://doi.org/10.1007/s00217-010-1371-y>
- 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*(1), 125–133. <https://doi.org/10.1007/s00217-009-1154-5>
- L. Meira, I. Mafra, J. Costa, J. Amaral, F. Ramos, M. B. O. (2015). Novas metodologias para a identificação de adulterações de produtos cárneos com carne de cavalo. *Riscos E Alimentos N° 9*.
- 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*(2), 216–224. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.11.027>
- 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.
- Levin, R. E. (2004). The Application of Real-Time PCR to Food and Agricultural Systems. A Review. *Food Biotechnology*, *18*(1), 97–133. <https://doi.org/10.1081/FBT-120030386>
- Lin, C. C., Fung, L. L., Chan, P. K., Lee, C. M., Chow, K. F., & Cheng, S. H. (2014). A rapid low-cost high-density DNA-based multi-detection test for routine inspection of meat species. *Meat Science*, *96*(1), 922–929. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.09.001>
- Lotta, F., & Bogue, J. (2015). Defining food fraud in the modern supply chain. *European Food and Feed Law Review*, *10*(2), 114–122.
- M. Sol, A. R. Albery, I. Mâncio, T. M. (2015). Detecção de fraudes alimentares em carne - análise

de ADN.

- Mafalda T. Costa, Ana Teresa Roldão, I. R. (2015). A segurança alimentar dos produtos cárneos no mercado retalhista, face aos resultados do Plano Nacional de Colheita de Amostras (PNCA).
- MAFRA, I., OLIVEIRA, M.B.P.P.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., Ferreira, I. M. P. L. V. O., & Oliveira, M. B. P. P. (2008). Food authentication by PCR-based methods. *European Food Research and Technology*, 227(3), 649–665. <https://doi.org/10.1007/s00217-007-0782-x>
- Manuela, P., Cardoso, D. C., Filipa, A., & Vicente, B. (2013). Meat nutritional composition and nutritive role in the human diet, 93, 586–592.
- Mark, D., Haerberle, S., Roth, G., Von Stetten, F., & Zengerle, R. (2010). Microfluidic lab-on-a-chip platforms: Requirements, characteristics and applications. *NATO Science for Peace and Security Series A: Chemistry and Biology*, (3), 305–376. <https://doi.org/10.1007/978-90-481-9029-4-17>
- Martín, I., García, T., Fajardo, V., López-Calleja, I., Rojas, M., Hernández, P. E., ... 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(4), 721–729. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.02.013>
- Martín I., , García T., Fajardo V., Rojas M., Pegels N., Hernández P.E., ... Ma. (2010). Polymerase chain reaction detection of rabbit DNA in food and animal feed. *World Rabbit Science*, 17(1), 27–36. <https://doi.org/10.4995/wrs.2009.667>
- 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.
- Metzker, M. L. (2010). Sequencing technologies — the next generation. *Nature Reviews Genetics*, 11(1), 31–46. <https://doi.org/10.1038/nrg2626>
- Mohamad, N. A., El Sheikha, A. F., Mustafa, S., & Mokhtar, N. F. K. (2013). Comparison of gene nature used in real-time PCR for porcine identification and quantification: A review. *Food Research International*, 50(1), 330–338. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.10.047>
- Montowska, M., & Pospiech, E. (2011). Authenticity determination of meat and meat products on the protein and DNA basis. *Food Reviews International*, 27(1), 84–100. <https://doi.org/10.1080/87559129.2010.518297>
- Mota, M., Teixeira, J., Yelshin, A., & Cortez, S. (2006). *Novas Técnicas Cromatográficas*.

- Muhammed, M. A., Bindu, B. S. C., Jini, R., Prashanth, K. V. H., & Bhaskar, N. (2015). Evaluation of different DNA extraction methods for the detection of adulteration in raw and processed meat through polymerase chain reaction—restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). *Journal of Food Science and Technology*, *52*(1), 514–520. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-1024-9>
- Mukhtar, A., & Mohsin Butt, M. (2012). Intention to choose *Halal* products: the role of religiosity. *Journal of Islamic Marketing*, *3*(2), 108–120. <https://doi.org/10.1108/17590831211232519>
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, *LI*(Table 1), 263–273. <https://doi.org/10.1101/SQB.1986.051.01.032>
- Murugaiah, C., Noor, Z. M., Mastakim, M., Bilung, L. M., Selamat, J., & Radu, S. (2009). Meat species identification and Halal authentication analysis using mitochondrial DNA. *Meat Science*, *83*(1), 57–61. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.03.015>
- Musto, M. (2011). DNA quality and integrity of nuclear and mitochondrial sequences from beef meat as affected by different cooking methods. *Food Technology and Biotechnology*, *49*(4), 523–528.
- Natonek-Wisniewska, M., Krzyścin, P., & Piestrzyńska-Kajtoch, A. (2013). The species identification of bovine, porcine, ovine and chicken components in animal meals, feeds and their ingredients, based on COX I analysis and ribosomal DNA sequences. *Food Control*, *34*(1), 69–78. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.04.014>
- Nau, F., Desert, C., Cochet, M. F., Pasco, M., Jan, S., Baron, F., ... Gu??rin-Dubiard, C. (2009). Detection of turkey, duck, and guinea fowl egg in hen egg products by species-specific PCR. *Food Analytical Methods*, *2*(3), 231–238. <https://doi.org/10.1007/s12161-009-9077-0>
- Ong, S. B., Zuraini, M. I., Jurin, W. G., Cheah, Y. K., Tunung, R., Chai, L. C., ... Son, R. (2007). Meat molecular detection: Sensitivity of polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism in species differentiation of meat from animal origin. *International Food Research Journal*, *14*(1), 51–59.
- Opara, L. U., Vol, E., Opara, L. U., & Vol, E. (2003). Traceability in agriculture and food supply chain : A review of basic concepts , technological implications , and future prospects. *Food, Agriculture & Environment*, *1*(1), 101–106. Retrieved from <http://www.aseanfood.info/Articles/11020000.pdf>
- Overview of ELISA (Thermo Fisher Scientific). (n.d.).
- Parlamento Europeu. (2004). Regulamento (CE) N^o 853/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de Abril de 2004. *Jornal Oficial Da Uni?o Europeia*, *139*, 1–51.

- Pascoal, A.; Prado, M.; Calo, P.; Cepeda, A. . V. J. B. (2005). Detection of bovine DNA in raw and heat-processed foodstuffs, comercial foods and specific risk materials by a novel specific polymerase chain reaction method. *European Food Research and Technology* 220, 444–450.
- 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(3), 187–199. <https://doi.org/10.2174/187221508786241738>
- Pfaffl, M. W., Vandesompele, J., & Kubista, M. (2009). Data Analysis Software. *Real-Time PCR: Current Technology and Applications*, 4, 65–83.
- 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. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-5-30>
- Pirondini, A., Bonas, U., Maestri, E., Visioli, G., Marmioli, M., & Marmioli, N. (2010). Yield and amplificability of different DNA extraction procedures for traceability in the dairy food chain. *Food Control*, 21(5), 663–668. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.10.004>
- Popping, B., Diaz-Amigo, C., & Hoenicke, K. (2010). *Molecular Biological and Immunological Techniques and Applications for Food Chemists. Molecular Biological and Immunological Techniques and Applications for Food Chemists*. <https://doi.org/10.1002/9780470637685>
- Primrose, S., Woolfe, M., & Rollinson, S. (2010). Food forensics: Methods for determining the authenticity of foodstuffs. *Trends in Food Science and Technology*, 21(12), 582–590. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.09.006>
- QUINTA, R., OLIVEIRA, A., HENRIQUES, A. (2008). Biotecnologia no Apoio à Segurança Alimentar. *Segurança E Qualidade Alimentar*, 4, 60–61.
- Rahman, M. M., Ali, M. E., Hamid, S. B. A., Mustafa, S., Hashim, U., & Hanapi, U. K. (2014). Polymerase chain reaction assay targeting cytochrome b gene for the detection of dog meat adulteration in meatball formulation. *Meat Science*, 97(4), 404–409. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.03.011>
- Ramin Jorfi. (2012). Differentiation of pork from beef, chicken, mutton and chevon according to their primary amino acids content for halal authentication. *African Journal of Biotechnology*, 11(32), 8160–8166. <https://doi.org/10.5897/AJB11.3777>
- Rastogi, G., Dharne, 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(4), 666–674. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.02.006>
- Reece, R. J. (2004). Analysis of Genes and Genomes. *John Wiley & Sons*.
- Reid, L. M., O'Donnell, C. P., & Downey, G. (2006). Recent technological advances for the determination of food authenticity. *Trends in Food Science and Technology*, 17(7), 344–353.

<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.01.006>

- Ren, J., Deng, T., Huang, W., Chen, Y., & Ge, Y. (2017). A digital PCR method for identifying and quantifying adulteration of meat species in raw and processed food. *PLoS ONE*, *12*(3), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173567>
- Robertson, A., Tirado, C., Lobstein, T., Jermini, M., Knai, C., Jensen, J. H., ... James, W. P. (2004). Food and health in Europe: a new basis for action. *WHO Regional Publications. European Series*, (96), i–xvi, 1-385, back cover.
- Rodriguez-Lazaro, D., Hernandez, M., Rodríguez-Lázaro, D., & Hernández, M. (2013). Real-time PCR in Food Science: Introduction. *Current Issues in Molecular Biology*, *15*, 25–38. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23513038>
- Rogberg-Muñoz, A., Wei, S., Ripoli, M. V., Guo, B. L., Carino, M. H., Castillo, N., ... Giovambattista, G. (2014). Foreign meat identification by DNA breed assignment for the Chinese market. *Meat Science*, *98*(4), 822–827. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.07.028>
- Rojas, M., González, I., García, T., Hernández, P. E., & Martín, R. (2012). Authentication of meat and commercial meat products from common pigeon (*Columba livia*) woodpigeon (*Columba palumbus*) and stock pigeon (*Columba oenas*) using a TaqMan?? real-time PCR assay. *Food Control*, *23*(2), 369–376. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.07.034>
- Rojas, M., González, I., Pavón, M. A., Pegels, N., Lago, A., Hernández, P. E., ... Martín, R. (2010). Novel taqman real-time polymerase chain reaction assay for verifying the authenticity of meat and commercial meat products from game birds. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, *27*(6), 749–763. <https://doi.org/10.1080/19440040903503070>
- Rojas R; Feyenb L; Dassargues A. (n.d.). Sensitivity analysis of prior model probabilities and the value of prior knowledge in the assessment of conceptual model uncertainty in groundwater modelling.
- Safdar, M., & Junejo, Y. (2015). A multiplex-conventional PCR assay for bovine, ovine, caprine and fish species identification in feedstuffs: Highly sensitive and specific. *Food Control*, *50*, 190–194. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.08.048>
- Safdar, M., Junejo, Y., Arman, K., & Abasiyanik, M. F. (2014). A highly sensitive and specific tetraplex PCR assay for soybean, poultry, horse and pork species identification in sausages: Development and validation. *Meat Science*, *98*(2), 296–300. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.06.006>
- Salgueiro, I. (2009). Suplementos alimentares sujeitos ao HACCP. *Segurança E Qualidade Alimentar*, *6*, 17–19. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Sentandreu, M. Á., & Sentandreu, E. (2014). Authenticity of meat products: Tools against fraud.

- Food Research International*, 60, 19–29. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.03.030>
- Shaw, I. C. (2012). Food safety: the science of keeping food safe. *Choice: Current Reviews for Academic Libraries*, 51(2), 292. Retrieved from <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&AuthType=ip,url,cookie,uid&db=lxh&AN=90301311&site=ehost-live&scope=site>
- 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(3), 531–536. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.03.001>
- Soares, S., Amaral, J. S., Oliveira, M. B. P. P., & Mafra, I. (2013). A SYBR Green real-time PCR assay to detect and quantify pork meat in processed poultry meat products. *Meat Science*, 94(1), 115–120. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.12.012>
- Soares, S., Amaral, J. S., Oliveira, M. B. P. P., & Mafra, I. (2014). Quantitative detection of soybean in meat products by a TaqMan real-time PCR assay. *Meat Science*, 98(1), 41–46. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.04.002>
- Somma, M. (2006). *The Analysis of Food Samples for the Presence of Genetically Modified Organisms, The Analysis of Food Samples for the Presence of Genetically Modified Organisms*.
- Stefanova, P., Taseva, M., Georgieva, T., Gotcheva, V., & Angelov, A. (2013). A modified CTAB method for dna extraction from soybean and meat products. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 27(3), 3803–3810. <https://doi.org/10.5504/BBEQ.2013.0026>
- Storoy, J., Thakur, M., & Olsen, P. (2013). The TraceFood Framework - Principles and guidelines for implementing traceability in food value chains. *Journal of Food Engineering*, 115(1), 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.09.018>
- Teletchea, F. (2009). Molecular identification methods of fish species: Reassessment and possible applications. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 19(3), 265–293. <https://doi.org/10.1007/s11160-009-9107-4>
- 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.
- Ulca, P., Balta, H., Çağın, I., & Senyuva, H. Z. (2013). Meat species identification and halal authentication using pcr analysis of raw and cooked traditional turkish foods. *Meat Science*, 94(3), 280–284. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.03.008>
- Valasek, M. A., & Repa, J. J. (2005). The power of real-time PCR. *AJP: Advances in Physiology Education*, 29(3), 151–159. <https://doi.org/10.1152/advan.00019.2005>
- Vieira, A. (2017). Fraude alimentar - Uma realidade na mira dos reguladores, 1–2.
- Vossen, R. H. A. M., Aten, E., Roos, A., & Den Dunnen, J. T. (2009). High-resolution melting

- analysis (HRMA) - More than just sequence variant screening. *Human Mutation*, 30(6), 860–866. <https://doi.org/10.1002/humu.21019>
- Weighardt, F. (2010). The Analysis of Food Samples for the Presence of Genetically Modified Organisms Session 10 Quantitative PCR for the Detection of GMOs, 1–19.
- Wilson, K. (2010). *Enzymes Principles and techniques of biochemistry and molecular biology*. Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl830>
- Wittwer, C. T., Reed, G. H., Gundry, C. N., Vandersteen, J. G., & Pryor, R. J. (2003). High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clinical Chemistry*, 49(6), 853–860. <https://doi.org/10.1373/49.6.853>
- Yang, L., Fu, S., Peng, X., Li, L., Song, T., & Li, L. (2014). Identification of pork in meat products using real-time loop-mediated isothermal amplification. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 28(5), 882–888. <https://doi.org/10.1080/13102818.2014.963789>
- Yusop, M. H. M., Mustafa, S., Man, Y. B. C., Omar, A. R., & Mokhtar, N. F. K. (2012). Detection of Raw Pork Targeting Porcine-Specific Mitochondrial Cytochrome B Gene by Molecular Beacon Probe Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Food Analytical Methods*, 5(3), 422–429. <https://doi.org/10.1007/s12161-011-9260-y>
- Zha, D., Xing, X., & Yang, F. (2010). A multiplex PCR assay for fraud identification of deer products. *Food Control*, 21(10), 1402–1407. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.04.013>

Anexos

Anexo I – Etiquetas de identificação das amostras de talho analisadas.

Espécies	Etiquetas de Identificação
<i>Bos taurus</i>	 <p>MATADOUROS DA BEIRA LITORAL S.A. PT B-92 CE</p> <p>Ident. do animal: PT119629374</p> <p>Origem: PORTUGAL</p> <p>Abatido em: PORTUGAL PT-B-92-CE</p> <hr/> <p>Sequência: 27 Apresentante: 99.10011 1706 0257 0002 Data de Abate: 12062017</p> <p>Peso: 91,58Kg  colimfor</p> <p>Class: Z o.2. A201706121302570002</p> <p>Sexo: M Idade Meses: 10Z</p>
<i>Sus scrofa</i>	 <p>NCARPO S.A. 3150-194 Condeixa-a-Nova Telf. 239949020</p> <p>CRIADO EM: PORTUGAL ABATIDO EM: PORTUGAL</p> <p>ORDEM: 0001 PT B 10 CE SUB ORDEM: 0016 Class.: ***** LOTE: 241630617</p> <p style="text-align: right;">000016 *****</p>
<i>Eqqus caballus</i>	 <p>Matadouro Regional Beira Serra PT B 06 CE</p> <p>Identificação do animal:</p> <p>Origem: PORTUGAL</p> <p>Abatido em: PORTUGAL PT B 06 CE</p> <p>00010001 DESTINATÁRIO: 0100331</p> <p>Data: 06/2017  colimfor</p> <p>Class: P.L.:MEIA/INTEIRA 201706064100010001 94,27 / 192,07Kg Idade Meses: 0 0</p>
<i>Ovies aries</i>	 <p>MATADOURO INDUSTRIAL ANTÓNIO VIEIRA GOMES, LDA.</p> <p> PT D-44 CE</p> <p>Ovinos/Caprinos</p> <p>Origem: Portugal</p> <p>Referência: 17/27/0055</p> <p> (Conservar entre 0 e 7°C) </p> <p>Rua do Cruzeiro nº 348/ 4630-666 Soalheiros Portugal Tel: 266 611 706/ Fax: 266 611 086/ E-mail: avglida@aapo.pt</p>

Anexo II - Inquérito *online* dirigido à comunidade académica da Universidade de Aveiro.

Comida Processada

O seguinte questionário visa identificar quais as preferências dos estudantes da Universidade de Aveiro face aos produtos de comida processada presentes nas diversas superfícies comerciais. A resposta ao mesmo é de extrema importância e não requer qualquer tipo de identificação. São apenas necessários breves instantes, para o preenchimento do mesmo. Obrigada!

Consome comida processada?

- Sim
- Não

Sobre que produtos recai a sua preferência?

- Hamburgers
- Almôndegas
- Lasanha/Canelones
- Nuggets
- Salsichas

Quais as marcas que costuma adquirir?

Qual a superfície comercial onde adquire os mesmos?

- Jumbo
- Pingo Doce
- Continente
- Minipreço
- Lidl

Anexo III - Respostas obtidas no inquérito *online* dirigido à comunidade académica da universidade de Aveiro.

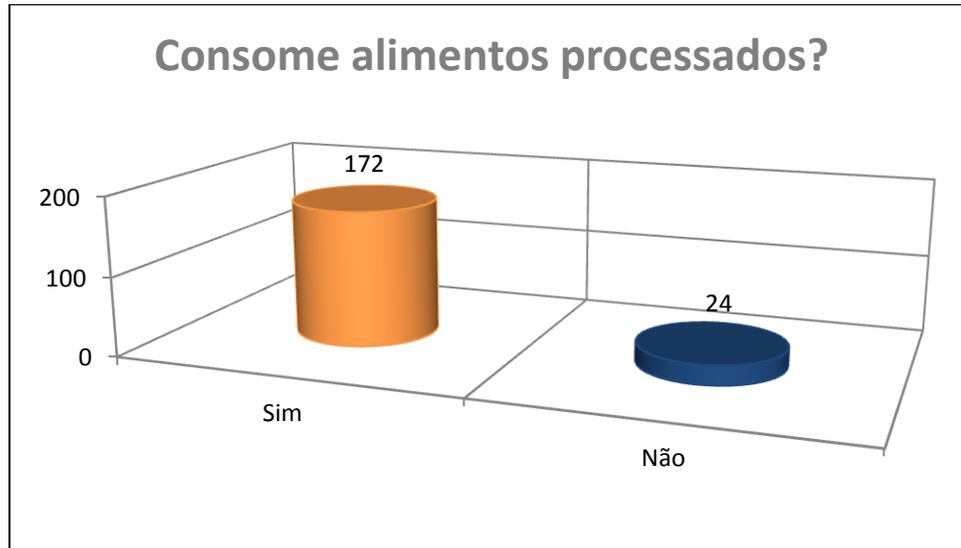


Gráfico 1 – Respostas à primeira pergunta do inquérito “Consome alimentos processados?”

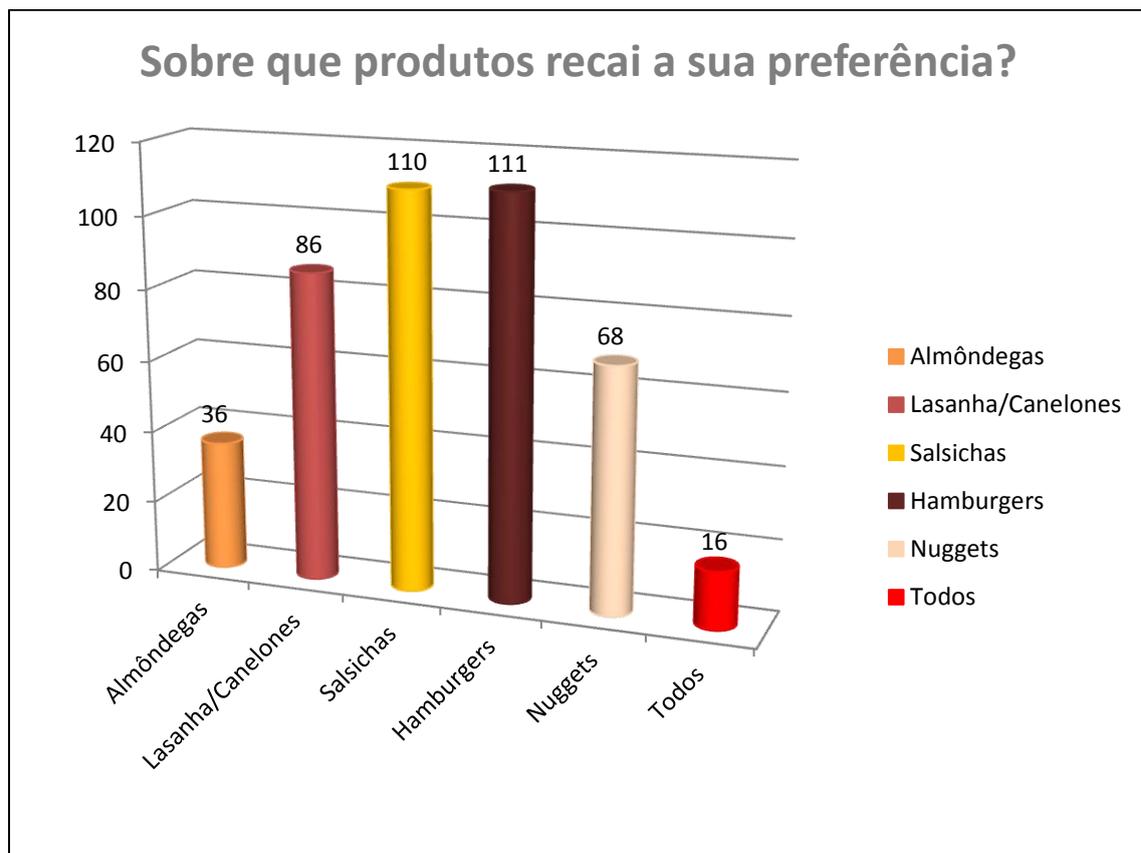


Gráfico 2 – Respostas à segunda pergunta do inquérito “Sobre que produtos recai a sua preferência?”



Gráfico 3 – Respostas à terceira pergunta do inquérito “Que marcas costuma adquirir?”

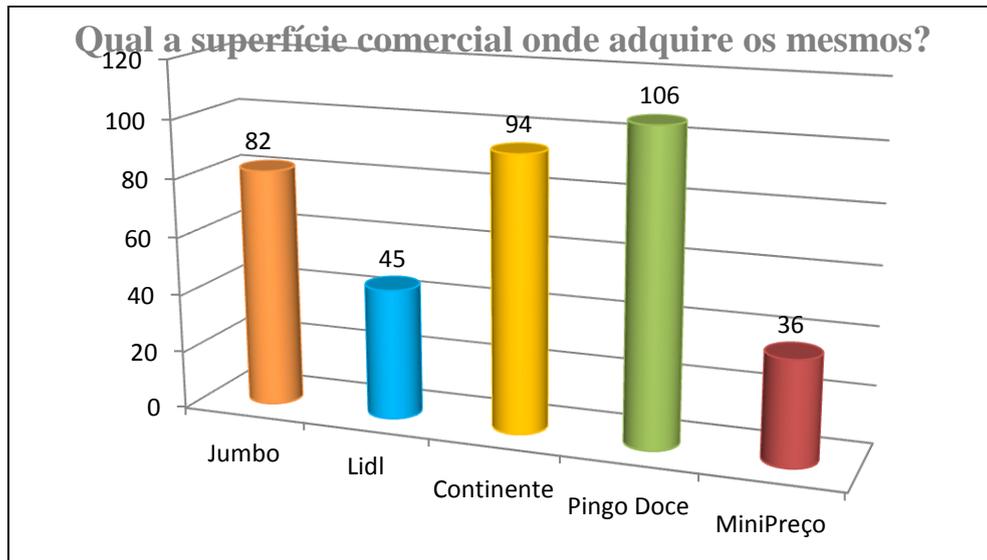


Gráfico 4 – Respostas à quarta pergunta do inquérito “Qual a superfície comercial onde adquire os mesmos?”

Anexo IV – Descrição detalhada do rótulo das amostras comerciais analisadas.

Código	Ingredientes
H1	100% carne de bovino Carnalentejana – DOP
H2	Carne de bovino picada 47,6%, proteínas de soja reidratadas 24%, água, gordura de bovino 3,4%, lactose (contém leite), sal, proteínas de leite , pão ralado (farinha de trigo (contém glúten), farinha integral de trigo (contém glúten), levedura e sal), amido de tapioca, plantas aromáticas, aromas, sumo de beterraba em pó. Pode conter vestígios de aipo . Percentagem de matérias gordas inferior a 15%. Relação colagénio/proteína da carne inferior a 25%.
H3	Carne de bovino (98%), sal e condimento (sal, alho desidratado (contém sulfitos), cebola desidratada, açúcar, especiarias e antioxidante (E331iii)). Pode conter vestígios de leite, ovo, soja, glúten, aipo e mostarda.
H4	Carne de bovino (60%), água, proteína se soja , pão ralado (farinha de trigo (T65), água e levedura), fibra vegetal, sal, especiarias, cebola refogada [cebola (75%), matéria gorda vegetal (palma), farinha de trigo e sal], açúcar, antioxidante (ascorbato de sódio), proteína vegetal hidrolisada (milho, semente de colza) e extratos de levedura.
H5	Carne de Bovino (51%), proteína de soja hidratada (37,6%), flocos de aveia hidratados, fibra vegetal, cebolas tostadas (cebola, óleo de palma, farinha de trigo e sal), sal e condimento (sal, alho desidratado (contém sulfitos), cebola desidratada, açúcar, especiarias e antioxidante (E331iii)). Pode conter vestígios de leite, ovo, aipo e mostarda.
A1	Carne de bovino (60%), água, proteína de soja , pão ralado [farinha de trigo (T65), água e levedura], fibra vegetal, sal, especiarias, cebola refogada [cebola (75%), matéria gorda vegetal (palma), farinha de trigo e sal], açúcar, antioxidante (ascorbato de sódio), proteína vegetal hidrolisada (milho, semente de colza) e extratos de levedura.
A2	Carne de bovino picada 47,6%, proteínas de soja reidratadas 24%, água, gordura de bovino 3,4%, lactose (contém leite), sal, proteínas de leite , pão ralado (farinha de trigo (contém glúten), farinha integral de trigo (contém glúten), levedura e sal), amido de tapioca, plantas aromáticas, aromas, sumo de beterraba em pó.
A3	100% carne de bovino Carnalentejana – DOP
C1	leite , massa alimentícia (20%) [farinha de trigo , sêmola de trigo duro, água], tomate pelado (11,9%), carne de bovino (11,5%), cebola, água, queijo emmental ralado [leite de vaca, fermentos lácteos , coalho, sal], margarina vegetal [matérias gordas vegetais (palma, girassol, em proporções variáveis), água, sal , emulsionantes (mono e diglicerídeos de ácidos gordos), regulador de acidez (ácido cítrico) e aromas], farinha de trigo , amido de milho, azeite, pão ralado (farinha de trigo , água, sal e levedura), extrato de levedura, aromas, caldo de carne [matéria gorda vegetal (palma), extrato de carne, extrato de levedura, água, concentrado de beterraba, sal, sumo concentrado de limão], especiarias (noz-moscada, orégãos, manjeriço, alho e salsa), concentrado vegetal e extrato de pimentão.
E1	Sêmola de trigo duro, carne de bovino (25%), molho de tomate (18,2%) [tomate e regulador de acidez (ácido cítrico)], água, ovo pasteurizado, cenoura, azeite, cebola, sal, açúcar, manjeriço, alho, orégãos, óleo vegetal (girassol).
E2	Esparguete cozido 40% (água, sêmola de trigo duro (contém glúten), óleo de girassol, sal), água, tomate pelado triturado 17,4% (tomate, sumo de tomate), polpa de tomate duplamente concentrada 7,5%, carne de bovino cozida 6,4%, cebolas, cenouras, queijo (contém leite), açúcar, molho com aroma de vitela (contém glúten) (amido modificado de batata, sal, farinha de trigo, tomate, cebola, extrato de levedura, aroma, carne de vitela, açúcar, óleo de girassol, plantas aromáticas), aromas, alho, azeite virgem extra 0,4%, farinha de trigo (contém glúten), amido modificado de milho, manjeriço, corante: extrato de pimentão, sal, salsa, tomilho. Pode conter vestígios de ovos .

L1	<p>Recheio de carne (39%): molho de tomate (tomate, água, óleo de girassol, açúcar, amido de milho, sal, cebola, alho e especiarias), carne de vitela (35%), água, cenoura, óleo de girassol, cebola, amido de batata, molho bechamel (água, amido de batata, leite gordo em pó, sólidos lácteos, gordura de palma, sal, emulsionantes (fosfato e alginato de sódio) e especiarias. <u>Molho bechamel (33%):</u> água amido de batata, leite gordo em pó, sólidos lácteos, gordura de palma, sal, emulsionantes (fosfato e alginato de sódio) e especiarias. <u>Massa fresca com ovo (20%):</u> sêmola de trigo duro (glúten), água, ovo (12%), glúten de trigo e sal. <u>Molho de tomate (5%):</u> tomate, água, óleo de girassol, açúcar, amido de milho, sal, cebola, alho e especiarias. Queijo emmental ralado (3%): Leite, sal, fermentos lácteos e coalho.</p>
L2	<p>Molho à bolonhesa 59%: água, carne de bovino crua 10%, concentrado de tomate, cenouras, amido modificado de milho, aipo, cebolas desidratadas, vinho branco, tomate picado (tomates, sumo de tomate acidificante: ácido cítrico, agente de endurecimento: cloreto de cálcio), açúcar, sal, alho, fibras vegetais (contém glúten), manjeriço, aroma, salva.</p>
L3	<p><u>Molho bolonhesa 49,5%:</u> água, carne de bovino 18,1%*, concentrado de tomate 11,7%*, tomate pelado triturado 9,4%* (cubos de tomate, sumo de tomate, acidificante: ácido cítrico), cenouras 7%*, cubos de cebola 4,7%*, LEITE magro reidratado, amido modificado de batata, aromas (contem LEITE e GLUTEN), vinho branco (contém SULFITOS), óleo de bagaço de azeitona, sal, matéria gorda vegetal (óleo de colza, água, emulsionante: mono e diglicerídeos de ácidos gordos, sal, regulador de acidez: ácido cítrico), farinha de TRIGO (contem GLUTEN), açúcar, alho, óleo de girassol, manjeriço, pimenta-branca, tomilho, ervas de Provença, orégãos, paprica, açafraão, macis, louro, cravinho. Molho Bechamel 26,3%: LEITE magro reidratado 72,9%*, matéria gorda vegetal (óleo de colza, água, emulsionante: mono e diglicerídeos de ácidos gordos, sal, regulador de acidez: ácido cítrico), farinha de TRIGO (contem GLUTEN), água, sal, macis. Massas 22%: semola de TRIGO (contem GLUTEN), água, clara de OVO, OVO inteiro, sal. Queijo 2%: queijo emmental (contem LEITE), maltodextrina de milho. Óleo de girassol.</p>

Anexo V – Proposta de artigo.

SCREENING OF FOOD FRAUD IN PROCESSED MEAT BY BIOMOLECULAR METHODS

Juliana Abrantes¹ Luís Souto¹

¹Department of Biology, University of Aveiro

Abstract

The identification of species in food for human consumption is increasingly important to assess its authenticity. The information available related to food products, on the basis of the label, is essential to ensure the identity and quality of the food product the consumer wishes to acquire, especially in processed products, where a difference in species is extremely difficult, making those easy targets for adulterations.

In order to safeguard consumers it was essential to develop and establish fast and reliable methods for detecting fraudulent adulterations, including PCR analysis of DNA.

In this study, the extraction and identification of DNA by real-time PCR of different species of reference samples is initially performed. Subsequently, the authenticity of 38 commercial samples of meat products containing only beef in their labeling was assessed to ascertain the veracity and accuracy of the labeling in relation to the product content. All of the commercial samples analyzed none revealed the presence of any other species under study, in addition to the one mentioned in the label.

Keywords: Food safety; Food fraud; Processed meat; Real Time PCR.

1. Introduction

Nowadays food safety is a priority requirement for consumers, who want healthy and safe food. This issue has become increasingly relevant, being a source of concern and interest on the part of consumers and food companies (Caporale *et al.*, 2001).

The authenticity of food is increasingly apparent in consumer concerns and is currently covered by the concept of food safety. The identification of meat species in processed food products has gained interest in recent years. Some reasons have already been pointed out for the practice of food fraud, such as economic, legal, religious, ethical, public health and species protection reasons, especially those that are on the verge of extinction. The assessment of authenticity of meat products includes a number of issues such as the substitution of species of higher commercial value by lower value ones, the presence of undeclared species on the label, the substitution of meat for vegetable proteins, the incorrect labeling (fraudulent or involuntary)

(Amaral *et al.*, 2014) and substitution of game species by domestic species (Montowska & Pospiech, 2011).

The difficulties associated with the methods based on the analysis of proteins to study the authenticity of meat products stimulated the application of biomolecular techniques, based on DNA amplification, especially Polymerase Chain Reaction (PCR) (Mafra *et al.*, 2008; Ong *et al.*, 2007).

In this study, DNA was extracted from different species of fresh meat (reference samples) acquired in butchery, *Bos taurus* (cow), *Sus scrofa* (pig), *Equus caballus* (horse) and *Ovis aries* (sheep). Next, the species under study were identified using a real-time multiplex amplification protocol. Subsequently, the authenticity of 38 commercial samples of meat products containing only beef in their labeling was assessed in order to ascertain the veracity and accuracy of the labeling in relation to the product content.

2. Material and Methods

2.1. Samples and DNA Extraction

We collected, in butchery, reference samples of the four animal species under study, *Bos taurus* (cow), *Sus scrofa* (pig), *Equus caballus* (horse) and *Ovis aries* (sheep). We also acquired 38 commercial samples of processed beef products. DNA extraction from the samples was performed by the modified CTAB method, according to the protocol described by Stefanova *et al.* (2013).

2.2. DNA Quantification

DNA concentration was measured using NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific).

2.3. Amplification

The DNA samples were amplified through the Tetraplex AllHorse kit. This allows the simultaneous detection of cow (*Bos taurus*), pig (*Sus scrofa*), horse (*Equus caballus*) and sheep (*Ovis aries*). The real-time PCR assay was performed with a total solution of 25 µl containing 20 µl of MasterMix Ready to Use (Quanta Bioscience) and 5 µl of sample or control, according to the following amplification protocol: 95 ° C for 3 minutes, 45 cycles at 95 ° C for 15 seconds and 62 ° C for 90 seconds, with detection of fluorescent signal at the end of each cycle.

Table 1 - Description of the constituent primers and probes of the AllHorse Tetraplex Kit. Adapted from Koppel et al. (2011).

Primer/Probe	Final Concentration (µM)	Sequence	Amplicon	GenBank acc.no./ source/labelling
Beef				
Rd 1 F	0.2	GTA GGT GCA CAG TAC GTT CTG AAG	96 bp	Beta-actin-gen EH170825 ROX-BHQ2
Rd 1 R	0.2	GGC CAG ACT GGG CAC ATG		
Bos-ActiB_Rox	0.08	CGG CAC ACT CGG CTG TGT TCC TTG C		
Pork				
Sus_ACTB-F	0.2	GGA GTG TGT ATC CCG TAG GTG	103 bp	Beta-actin-gen DQ452569 JOE- BHQ1
Sus_ACTB-R	0.2	CTG GGG ACA TGC AGA GAG TG		
Sus1 TMP	0.08	TCT GAC GTG ACT CCC CGA CCT GG		
Horse				
EC-GHR1-F	0.2	CCA ACT TCA TCA TGG ACA ACG C	107 bp	Growth hormone receptot AF392878 Cy5-BHQ2
EC-GHR1-R	0.2	GTT AAA GCT TGG CTC GAC ACG		
EC-GHR1-Cy5	0.08	AAG TGC ATC CCC GTG GCC CCT CA		
Sheep				
OA-PRLR-F	0.2	CCA ACA TGC CTT TAA ACC CTC AA	88 pb	Prolactin receptor AF041979 Fam- BHQ1
OA-PRLR-R	0.2	GGA ACT GTA GCC TTC TGA CTC G		
OA-PRLRFam	0.08	TGC CTT TCC TTC CCC GCC AGT CTC		

3. Results

Initially, the positive controls were amplified with the Tetraplex AllHorse Kit at the same time, in order to rule out false negatives, in case of PCR inhibition (Table 2).

Table 2 - Data corresponding to the amplification curves of the reference samples.

Amplification Results			
Sample	Type	Fluorophore	Ct value
V1	Reference Sample	ROX	24,30
V2	Reference Sample	ROX	24,92
P1	Reference Sample	HEX	29,02
P2	Reference Sample	HEX	27,18
C1	Reference Sample	Cy5	25,14
C2	Reference Sample	Cy5	24,73
O1	Reference Sample	FAM	29,09
O2	Reference Sample	FAM	29,08
NTC	NTC	ROX, HEX, FAM, Cy5	-

After analyzing the DNA quantification data extracted from the commercial samples of meat processed, they were tested for amplification with the Tetraplex AllHorse kit, in order to simultaneously detect the presence of the species *Bos taurus*, *Sus scrofa*, *Equus caballus* and *Ovis aries* in case of accidental contamination or even food fraud. The Ct values obtained can be analyzed in Tables 3-6. By analyzing the abovementioned tables, we can verify that as described on the labels of the commercial (beef processed) samples tested, the only animal species detected was *Bos taurus* (cow), so that, none of the commercial samples tested presents any other species under study (*Sus scrofa*, *Equus caballus* and *Ovis aries*).

Table 3 - Data corresponding to the amplification curves of the commercial samples (processed from beef) of lot 1. **H1, H2, H3, H4, H5** - commercial samples (processed beef); **A1, A2, B1, B2** - replicates; L1 - lot 1; **NTC** – no template control

Amplification Results			
Sample	Type	Fluorophore	Ct value
H1A1L1	Sample	ROX	27,40
H1A2L1	Sample	ROX	27,18
H2A1L1	Sample	ROX	27,03
H2A2L1	Sample	ROX	27,72
H3A1L1	Sample	ROX	26,86
H3A2L1	Sample	ROX	26,84
H4A1L1	Sample	ROX	27,47
H4A2L1	Sample	ROX	27,14
H5A1L1	Sample	ROX	30,35
H5A2L1	Sample	ROX	27,57
H1B1L1	Sample	ROX	25,41
H1B2L1	Sample	ROX	25,19
H2B1L1	Sample	ROX	25,69
H2B2L1	Sample	ROX	26,08
H3B1L1	Sample	ROX	21,56
H3B2L1	Sample	ROX	20,29
H4B1L1	Sample	ROX	23,42
H4B2L1	Sample	ROX	23,80
H5B1L1	Sample	ROX	20,72
H5B2L1	Sample	ROX	21,79
NTC	NTC	ROX, HEX. FAM, Cy5	-

Table 4 - Data corresponding to the amplification curves of commercial samples (processed from beef) of lot 1. **A1, A2, A3, C1, E1, E2, L1, L2, L3** - commercial samples (processed beef) ; **A1, A2** - replicates; **L1** - lot 1; **NTC** – no template control.

Amplification Results			
Sample	Type	Fluorophore	Ct value
A1A1L1	Sample	ROX	27,48
A1A2L1	Sample	ROX	27,80
A2A1L1	Sample	ROX	27,89
A2A2L1	Sample	ROX	27,74
A3A1L1	Sample	ROX	27,96
A3A2L1	Sample	ROX	27,41
C1A1L1	Sample	ROX	30,17
C1A2L1	Sample	ROX	30,29
E1A1L1	Sample	ROX	27,24
E1A2L1	Sample	ROX	27,41
E2A1L1	Sample	ROX	25,79
E2A2L1	Sample	ROX	25,84
L1A1L1	Sample	ROX	28,16
L1A2L1	Sample	ROX	27,81
L2A1L1	Sample	ROX	30,40
L2A2L1	Sample	ROX	30,56
L3A1L1	Sample	ROX	27,82
L3A2L1	Sample	ROX	28,20
NTC	NTC	ROX, HEX. FAM, Cy5	-

Table 5 - Data corresponding to the amplification curves of the commercial samples (processed from beef) of lot 1. **H1, H2, H3, H4, H5** - commercial samples (processed beef); **A1, A2, B1, B2** - replicates; L2 - lot 2; NTC – no template control.

Amplification Results			
Sample	Type	Fluorophore	Ct value
H1A1L2	Sample	ROX	26,12
H1A2L2	Sample	ROX	26,60
H2A1L2	Sample	ROX	27,20
H2A2L2	Sample	ROX	27,48
H3A1L2	Sample	ROX	27,12
H3A2L2	Sample	ROX	26,73
H4A1L2	Sample	ROX	27,25
H4A2L2	Sample	ROX	27,42
H5A1L2	Sample	ROX	27,61
H5A2L2	Sample	ROX	27,75
H1B1L2	Sample	ROX	27,38
H1B2L2	Sample	ROX	26,69
H2B1L2	Sample	ROX	24,60
H2B2L2	Sample	ROX	25,02
H3B1L2	Sample	ROX	27,83
H3B2L2	Sample	ROX	27,03
H4B1L2	Sample	ROX	24,77
H4B2L2	Sample	ROX	24,98
H5B1L2	Sample	ROX	28,40
H5B2L2	Sample	ROX	29,02
NTC	NTC	ROX, HEX. FAM, Cy5	-

Table 6 - Data corresponding to the amplification curves of commercial samples (processed from beef) of lot 1. **A1, A2, A3, C1, E1, E2, L1, L2, L3** - commercial samples (processed beef) ; **A1, A2** - replicates; **L2** - lot 2; **NTC** – no template control.

Amplification Results			
Sample	Type	Fluorophore	Ct value
A1A1L2	Sample	ROX	29,62
A1A2L2	Sample	ROX	28,91
A2A1L2	Sample	ROX	28,09
A2A2L2	Sample	ROX	28,08
A3A1L2	Sample	ROX	28,03
A3A2L2	Sample	ROX	27,78
C1A1L2	Sample	ROX	31,23
C1A2L2	Sample	ROX	31,42
E1A1L2	Sample	ROX	28,09
E1A2L2	Sample	ROX	28,25
E2A1L2	Sample	ROX	28,17
E2A2L2	Sample	ROX	27,87
L1A1L2	Sample	ROX	28,52
L1A2L2	Sample	ROX	28,11
L2A1L2	Sample	ROX	30,11
L2A2L2	Sample	ROX	31,22
L3A1L2	Sample	ROX	30,18
L3A2L2	Sample	ROX	29,24
NTC	NTC	ROX, HEX. FAM, Cy5	-

4. Discussion

The elaboration of this dissertation was aimed to evaluate the authenticity of commercial samples of processed beef products. The methodologies used for this were based on DNA analysis, since all the commercial products to be analysed were processed.

After the DNA extraction and quantification steps were completed, the DNA extracted from the commercial beef samples was amplified with the Tetraplex AllHorse kit for the detection of the four species under study. Since the amplification protocol used in this work has been shown to be optimized for a large number of commercial samples of beef processed, we can conclude that it can be applied in routine analyses in the food industry.

All of the commercial samples analysed, none revealed the presence of any other species under study, in addition to the one mentioned in the label of each one, reason why it was not

necessary to be quantified later. Thus, through the use of molecular biology methodologies, we can conclude that the labelling is in conformity with the content of the food product.

5. References

- [1] Amaral, J. S., Santos, C. G., Melo, V. S., Oliveira, M. B. P. P., & Mafra, I. (2014). Authentication of a traditional game meat sausage (Alheira) by species-specific PCR assays to detect hare, rabbit, red deer, pork and cow meats. *Food Research International*, *60*, 140–145. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.11.003>
- [2] Caporale, V., Giovannini, a, Di Francesco, C., & Calistri, P. (2001). Importance of the traceability of animals and animal products in epidemiology. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, *20*(2), 372–378. <https://doi.org/10.20506/rst.20.2.1279>
- [3] Köppel, R., Ruf, J., & Rentsch, J. (2011). Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from beef, pork, horse and sheep. *European Food Research and Technology*, *232*(1), 151–155. <https://doi.org/10.1007/s00217-010-1371-y>
- [4] Mafra, I., Ferreira, I. M. P. L. V. O., & Oliveira, M. B. P. P. (2008). Food authentication by PCR-based methods. *European Food Research and Technology*, *227*(3), 649–665. <https://doi.org/10.1007/s00217-007-0782-x>
- [5] Montowska, M., & Pospiech, E. (2011). Authenticity determination of meat and meat products on the protein and DNA basis. *Food Reviews International*, *27*(1), 84–100. <https://doi.org/10.1080/87559129.2010.518297>
- [6] Ong, S. B., Zuraini, M. I., Jurin, W. G., Cheah, Y. K., Tunung, R., Chai, L. C., ... Son, R. (2007). Meat molecular detection: Sensitivity of polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism in species differentiation of meat from animal origin. *International Food Research Journal*, *14*(1), 51–59.
- [7] Stefanova, P., Taseva, M., Georgieva, T., Gotcheva, V., & Angelov, A. (2013). A modified CTAB method for dna extraction from soybean and meat products. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, *27*(3), 3803–3810. <https://doi.org/10.5504/BBEQ.2013.0026>