

Ana Rita de Lemos Lopes

Métodos de biologia molecular aplicados à segurança alimentar:
identificação de espécies de bovino (*Bos taurus*) e
suíno (*Sus scrofa*) em produtos cárneos

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos
necessários à obtenção do grau de Mestre em Segurança Alimentar

Coimbra, 2013



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



Universidade de Coimbra

Faculdade de Farmácia

***Métodos de biologia molecular aplicados à
segurança alimentar: identificação de espécies de
bovino (*Bos taurus*) e suíno (*Sus scrofa*)
em produtos cárneos***

Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar apresentada à
Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Orientador interno: Doutora Celeste Matos Lino

Orientador externo: Mestre Ana Patrícia Henriques

Ana Rita de Lemos Lopes

Coimbra, Julho de 2013

*“Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
no mínimo que fazes.”*

Ricardo Reis

Agradecimentos

Durante o nosso crescimento vamos constatando que a vida é constituída por etapas que precedem sempre novas etapas e assim sucessivamente. Ao longo da nossa existência deparamo-nos com obstáculos e contrariedades que temos que superar para que este ciclo nunca pare. No meu processo de crescimento enquanto pessoa e estudante fui-me sempre apoiando num grupo de pessoas que permitiram que ultrapassasse todas as adversidades. Este trabalho constitui o fim de um ciclo muito marcante e como tal não poderia deixar passar a oportunidade de apresentar os meus mais sinceros agradecimentos a todos os que de algum modo me auxiliaram nesta jornada.

Primeiramente gostaria de apresentar os meus agradecimentos à Controlvet, em especial à Dra. Ana Martins, ao Dr. Rui Sereno e ao Dr. João Cotta por me proporcionarem a oportunidade de desenvolver o meu trabalho nesta empresa.

À minha orientadora interna, Doutora Celeste Lino, pela orientação e dedicação no decorrer do meu trabalho.

À minha orientadora externa, Mestre Ana Patrícia Henriques, pela paciência e constante disponibilidade para todas as questões, pela transmissão de conhecimentos que me permitiram levar a bom porto o atual trabalho, pelo profissionalismo e, não menos importante, pelo companheirismo, boa disposição e alegria constantes.

À Dra. Dina Loureiro pela amizade e simpatia, pela paciência para me responder às múltiplas questões que lhe colocava e pela constante boa disposição que permitiram que estes meses deixassem um certo sentimento de saudade.

À restante equipa Controlvet pela simpatia e boa convivência.

Ao meu namorado, Cédric, pela preocupação constante e apoio incondicional. Obrigada pelo carinho, amor e compreensão que sempre tiveste e em especial nestes últimos meses.

Aos meus amigos, em especial à Laura, Joana, Gil e Eva que, embora não estivessem tão presentes na última etapa deste ciclo, são uma parte fulcral da minha vida e constituem sem dúvida um dos meus pilares.

A todos os colegas e amigos da Licenciatura em Ciências Bioanalíticas e do Mestrado em Segurança alimentar que me proporcionaram uma excelente vida acadêmica.

Por último, mas sem dúvida o mais importante, à minha família, mãe, pai e Tiago, que me proporcionaram todas as condições para que pudesse prosseguir os meus estudos até onde desejei. São também o meu porto de abrigo a quem recorro em qualquer momento menos bom. Obrigada por fazerem de mim a pessoa que sou, prometo nunca vos desiludir.

A todos, e a cada um, o meu mais sincero muito obrigado!

Resumo

A autenticidade alimentar e a rotulagem incorreta dos alimentos são atualmente temas que preocupam as autoridades para a segurança alimentar de cada país. A técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) tem-se revelado uma técnica bastante útil na identificação de espécies animais. Dois kits comerciais de PCR em tempo real, baseados na pesquisa do DNA mitocondrial, utilizando *primers* específicos para suíno (*Sus scrofa*) e para bovino (*Bos taurus*), foram validados para a sua utilização em produtos cárneos. Os kits SureFood® ANIMAL ID Pork Sens Plus V e SureFood® ANIMAL ID Beef (R-Biopharm) revelaram-se bastante precisos, sensíveis, específicos e robustos, podendo ser aplicados em produtos alimentares processados. Utilizando estes dois kits analisaram-se 137 amostras comerciais tendo sido obtida uma percentagem de 5,11% de produtos alimentares à base de carne adulterados.

Palavras-chave: Autenticidade, PCR em tempo real, identificação de espécies, suíno, bovino.

Abstract

The authenticity of food and incorrect labeling of food is currently subject s of concern to the authorities for the food safety of each country. The use of polymerase chain reaction (PCR) has proven to be a useful technique for the identification of animal species. Two commercial kits for real time PCR with mitochondrial DNA-specific primers to pork (*Sus scrofa*) and beef (*Bos taurus*) has been validated for use in meat products. The kits SureFood® ANIMAL ID Pork Sens Plus V and SureFood® ANIMAL ID Beef (R-Biopharm) has been proved fairly accurate, sensitive, specific, robust and can be applied in processed food products. A hundred and thirty seven commercial samples of meat products were analyzed with the mentioned kits and 5,11% of analyzed foodstuffs presented incorrect labels.

Keywords: Authenticity, real time PCR, species identification, pork, beef

Índice

Agradecimentos	iv
Resumo	vi
Abstract	vii
Índice	viii
Índice de Figuras	x
Índice de Tabelas	xii
Lista de abreviaturas e símbolos	xiii
Capítulo I	I
Introdução	I
I.1 Introdução.....	2
I.2 Enquadramento da Empresa	3
Capítulo II	4
Fundamento Teórico	4
II.1 A segurança alimentar e a autenticidade.....	5
II.2 Métodos analíticos	6
II.2.1 Reação em cadeia da polimerase.....	7
II.2.2 PCR em Tempo Real.....	11
II.3 Infraestruturas num laboratório de PCR.....	15
II.3.1 Zona de preparação da reação de PCR.....	16
II.3.2 Zona de extração de ácidos nucleicos	16
II.3.3 Zona de amplificação	17
II.3.4 Zona de deteção de produtos de PCR.....	17
II.4 Controlos utilizados no PCR.....	18
II.5 Validação de métodos analíticos	18
II.5.1 Parâmetros de validação	20
II.6 Adulteração de produtos cárneos e sua deteção	22
II.6.1 Integridade do DNA e inibidores de PCR	23
II.6.2 Métodos analíticos	26
II.6.3 Estudos de autenticidade de produtos cárneos	28

Capítulo III.....	29
Parte Experimental	29
III.1 Materiais e Métodos	30
III.1.1 Amostragem	30
III.1.2 Materiais	30
III.1.3 Reagentes	31
III.1.4 Equipamentos	31
III.1.5 Extração do DNA	32
III.1.6 Qualidade e quantidade do DNA.....	35
III.1.7 Amplificação do DNA.....	35
III.1.8 Material de Referência	36
III.1.9 Validação.....	38
III.1.10 Aplicação do método a produtos comerciais à base de carne.....	39
III.2 Resultados.....	41
III.2.1 Material de Referência	41
III.2.2 Validação.....	42
III.2.3 Aplicação do método a produtos comerciais à base de carne.....	51
III.3 Discussão de Resultados	54
Conclusão	61
Referências Bibliográficas	63

Índice de Figuras

Figura 1: Esquema representativo de dois oligonucleótidos (<i>primer F</i> e <i>primer R</i>) desenhados para identificar o gene alvo	8
Figura 2: Representação esquemática de um ciclo de PCR.....	10
Figura 3: Princípio da sonda TaqMan®	13
Figura 4: Curva de amplificação de PCR em tempo real	15
Figura 5: Disposição recomendada de um laboratório de PCR.....	17
Figura 6: Representação esquemática de precisão e exatidão de um método.....	21
Figura 7: Protocolo de extração de DNA de amostras de sementes e de produtos comerciais à base de carne.....	33
Figura 8: Protocolo de extração de DNA de amostras de tecido animal	34
Figura 9: Deteção de produtos de PCR em gel de agarose a 3 %	41
Figura 10: Deteção de produtos de PCR purificados em gel de agarose a 3 %	42
Figura 11: Curvas de amplificação das alíquotas utilizadas no teste de repetibilidade do método de pesquisa de bovino.....	43
Figura 12: Curvas de amplificação das alíquotas utilizadas no teste de repetibilidade do método de pesquisa de suíno	43
Figura 13: Curvas de amplificação da série de diluições utilizada no teste do limite de deteção do método de pesquisa de suíno	45
Figura 14: Curvas de amplificação da série de diluições utilizada no teste do limite de deteção do método de pesquisa de bovino.....	46
Figura 15: Deteção de produtos de PCR em gel de agarose a 3 % das espécies para os testes de especificidade	47
Figura 16: Curvas de amplificação das várias espécies utilizadas no teste de especificidade do método de pesquisa de bovino.....	48
Figura 17: Curvas de amplificação das várias espécies utilizadas no teste de especificidade do método de pesquisa de suíno	48
Figura 18: Curvas de amplificação do controlo interno das várias espécies utilizadas no teste de especificidade do método de pesquisa de suíno.....	48
Figura 19: Curvas de amplificação das amostras A, B, C e D na pesquisa de suíno.....	49
Figura 20: Curvas de amplificação do controlo interno das amostras A, B, C e D na pesquisa de suíno	49
Figura 21: Curvas de amplificação das amostras E, F, G e H na pesquisa de suíno.....	49

Figura 22: Curvas de amplificação do controlo interno das amostras E, F, G e H na pesquisa de suíno.....	50
Figura 23: Curvas de amplificação das amostras I, J, K, L e M na pesquisa de suíno.....	50
Figura 24: Curvas de amplificação do controlo interno das amostras I, J, K, L e M na pesquisa de suíno	50
Figura 25: Curvas de amplificação das amostras N, O e P na pesquisa de bovino.....	51
Figura 26: Curvas de amplificação das amostras Q, R, S e T na pesquisa de bovino.....	51
Figura 27: Representação gráfica comparando o número de amostras analisadas e de adulterações com carne de suíno em diferentes países.....	59
Figura 28: Representação gráfica comparando o número de amostras analisadas e de adulterações com carne de bovino em diferentes países	60

Índice de Tabelas

Tabela 1: Sondas mais comuns utilizadas no PCR em tempo real.....	14
Tabela 2: Produtos alimentares à base de carne utilizados para determinar a robustez dos dois métodos	40
Tabela 3: Determinação da repetibilidade dos métodos de pesquisa de bovino e suíno.....	42
Tabela 4: Determinação da precisão intermédia inter-dia	44
Tabela 5: Determinação da precisão intermédia variando o operador.....	44
Tabela 6: Série de diluições utilizada para estabelecer o limite de deteção do método de pesquisa de DNA de suíno	45
Tabela 7: Série de diluições utilizada para estabelecer o limite de deteção do método de pesquisa de DNA de bovino	45
Tabela 8: Rácio A_{260}/A_{280} e concentração das amostras utilizadas nos testes de especificidade	46
Tabela 9: Resultados do estudo de autenticidade de produtos à base de carne comercializados em Portugal	52
Tabela 10: Resultados de adulterações obtidos em diferentes países.....	58

Lista de abreviaturas e símbolos

°C: graus Celsius

®: marca registrada

μL: microlitros

A₂₆₀: absorvância a 260 nm

A₂₈₀: absorvância a 280 nm

bp: pares de bases

CE: Comunidade Europeia

C_T: *threshold cycle*

DNA: ácido desoxirribonucleico

dATP: desoxiadenosina trifosfato

dCTP: desoxicitosina trifosfato

dGTP: desoxiguanina trifosfato

dNTP: desoxirribonucleótidos trifosfatados

dTTP: desoxitimina trifosfato

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

EUA: Estados Unidos da América

g: força de aceleração

h: horas

HCl: ácido clorídrico

HPLC: cromatografia líquida de alta *performance*

IEF: focagem isoelétrica

KCl: Cloreto de Potássio

mg: miligramas

Mg²⁺: íões de Magnésio

MgCl₂: Cloreto de Magnésio

min: minutos

mL: mililitro

mM: milimolar

MR: material de referência

mtDNA: DNA mitocondrial

NaCl: Cloreto de Sódio

NCBI: National Center for Biotechnology Information

nm: nanómetros

NP: norma portuguesa

nDNA: DNA nuclear

OGM: organismo geneticamente modificado

PCR: reação em cadeia da polimerase

PCR-RAPD: PCR- Random Amplification of Polymorphic DNA

PCR-RFLP: PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism

PCR-SSCP: PCR- Single-Strand Conformation Polymorphism

Primer F: primer forward

Primer R: primer reverse

RNA: ácido ribonucleico

SDS-PAGE: dodecil-sulfato de sódio-gel de eletroforese de poliacrilamida

seg: segundos

TBE: tampão Tris Borate EDTA

TE: Tris-EDTA

™: marca registada (do inglês *trademark*)

UE: união europeia

UV: ultravioleta

V: volt



Capítulo I
Introdução

I.1 Introdução

O conceito de segurança alimentar foi criado e tem vindo a impor-se de forma crescente ao consumidor e conseqüentemente à indústria, fruto de uma evolução dos hábitos alimentares e de um controlo cada vez mais rigoroso na qualidade dos alimentos. Com esta modificação de hábitos aumentou o número de produtos de elevada qualidade e conseqüentemente um aumento do preço comercial, o que determinou a exigência de certas características para que os mesmos possam ser considerados autênticos.

A questão da autenticidade dos alimentos coloca-se, 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 intencionais ou acidentais até à segurança e inocuidade dos alimentos. A autenticidade de um produto alimentar pode ser definida como a ausência de adulteração e/ou como a presença de um conjunto de componentes que lhe é característico. A substituição fraudulenta de espécies de elevado valor comercial por outras mais económicas em produtos cárneos é uma prática comum. A identificação de espécies em alimentos cárneos e seus derivados é importante devido a razões éticas, económicas, religiosas e de saúde dos consumidores (ILhak e Arslan, 2007).

A necessidade de verificação da autenticidade aliada ao progresso tecnológico tem constituído uma força impulsionadora para o desenvolvimento de métodos analíticos apropriados. Uma variedade de metodologias analíticas baseadas na análise de proteínas ou em ensaios imunológicos foi largamente publicada, mas estas técnicas têm aplicações limitadas. Por conseguinte, os investigadores recorrem atualmente a técnicas baseadas na amplificação de DNA, mais robustas, eficientes, versáteis e sensíveis (Rojas et al., 2011). A tecnologia de PCR permite uma amplificação de regiões específicas do DNA, facilitando a deteção de uma determinada espécie, mesmo numa matriz com várias espécies.

A deteção baseada no DNA mitocondrial (mtDNA) é bastante comum devido à sua especificidade que permite distinguir entre espécies relacionadas ou mesmo entre géneros. Há cerca de 104 cópias de mtDNA disponíveis por célula em comparação com apenas uma cópia de DNA genómico, sendo por isso um método mais eficiente (Sahilah et al., 2011). A utilização da técnica de PCR em tempo real permite a deteção de fragmentos mais pequenos de DNA o que constitui uma vantagem quando se trata de alimentos altamente processados (Jonker et al., 2008).

Este trabalho teve como objetivo a validação dos métodos de pesquisa de DNA de suíno e de bovino, de acordo com as necessidades do laboratório de Biologia Molecular da empresa Controlvet, utilizando os kits comerciais SureFood® ANIMAL ID Pork Sens PLUS V e SureFood® ANIMAL ID Beef (R-Biopharm) e a avaliação da sua aplicabilidade em produtos cárneos, como hambúrgueres, lasanhas, empadão, enchidos, entre outros, à venda no mercado português.

I.2 Enquadramento da Empresa

A Controlvet é uma marca de referência na prestação de serviços na área da segurança alimentar, com uma forte solidez empresarial (Controlvet, 2012). Este grupo é constituído por diversas empresas, como a Controlvet Segurança Alimentar, Controlvet Consultoria, Controlvet Técnica, Serviço Mais, AliControl, Controlvet Madeira, FullSense, Inogen, MindPower, Visafety, Braindea Designers, Betechin, Inlab, Controlvet Moçambique e mais recentemente Controlvet Food Safety Polska.

A Controlvet Segurança Alimentar é uma empresa que presta um serviço de excelência na área do controlo alimentar, tanto a nível biológico como químico. Em Janeiro de 2000 foi concluída a construção do laboratório e iniciou-se a prestação de serviços de ensaio no sector alimentar, no âmbito da microbiologia alimentar, diagnóstico e testes imunológicos (Controlvet, 2012). Desde então o grupo tem vindo a crescer sendo agora constituído por diversas empresas e por vários laboratórios espalhados por Portugal, Espanha, Cabo Verde, Moçambique e Polónia.

A par da expansão do grupo ocorreu também um aumento da oferta de análises realizadas pela Controlvet Segurança Alimentar. Da microbiologia à química passando pela biologia molecular e pela imunologia, este laboratório é então um centro tecnológico de referência, utilizando a técnica de PCR em tempo real, o que permite desenvolver serviços inovadores que são usados na pesquisa de patogénicos em microbiologia, autenticidade de espécies animais e pesquisa de organismos geneticamente modificados (OGM's) (Controlvet, 2012).



Capítulo II
Fundamento Teórico

II.1 A segurança alimentar e a autenticidade

É hoje consensual dizer que a alimentação influencia decisivamente a saúde dos indivíduos e das populações, desempenhando um papel crucial na manutenção e na prevenção de diversas doenças. A globalização do mundo atual e a industrialização das técnicas de processamento dos alimentos expõem os consumidores a um elevado número de perigos (Caporale et al., 2001). Simultaneamente tem sido crescente a atenção do consumidor para com a segurança e a qualidade dos produtos alimentares que adquire (Cunha e Moura, 2008).

O conceito de segurança alimentar tem evoluído ao longo dos tempos, acompanhando o desenvolvimento da sociedade e a modernização das técnicas utilizadas na indústria alimentar. Atualmente este conceito é transversal a toda a cadeia alimentar, iniciando-se na produção primária (pecuária e hortofrutícola) e atravessando todos os intervenientes até ao consumidor final (Oliveira e Martins, 2006). A indústria da transformação de alimentos acompanhou as necessidades cada vez mais exigentes dos consumidores, introduzindo uma enorme variedade de produtos no mercado (Quinta et al., 2008). Com a evolução da sociedade, houve um aumento da atenção dirigida à proteção e segurança dos consumidores em relação a todos os ramos da produção alimentar (Vesna, 2009). Nos últimos 50 anos a compreensão da segurança alimentar cresceu a tal ponto que o consumidor não aceita a possibilidade de contrair uma doença de origem alimentar ou de adquirir um produto que não corresponda às suas expectativas (Shaw, 2012).

O conceito de segurança alimentar é agora mais alargado, abarcando também as questões da autenticidade dos produtos alimentares. O problema da autenticidade está cada vez mais patente nas preocupações dos consumidores. Estes adquirem atualmente um maior número de produtos de elevada qualidade, dos quais exigem um maior rigor na sua preparação (Unajak et al., 2011; Ahmed et al., 2007; Calvo et al., 2001). A adulteração de um alimento pode ocorrer através da adição de substâncias estranhas e subtração ou substituição total ou parcial de constituintes.

Contudo, e apesar da crescente preocupação por parte de entidades e consumidores, a rotulagem errada, intencional ou não, surge em muitos produtos que são colocados no mercado, resultando numa diminuição da qualidade dos mesmos (Calvo et al., 2001). Uma incorreta rotulagem dos produtos representa uma fraude comercial e conduz a problemas

de concorrência desleal entre produtores (Santos et al., 2012). Para garantir a segurança e a total liberdade de escolha dos consumidores é necessário um controlo analítico rigoroso dos produtos alimentares, com recurso a laboratórios que ofereçam garantias da fiabilidade dos resultados, respostas em tempo útil e capacidade técnica para apoio à interpretação dos resultados obtidos (Oliveira e Martins, 2006).

II.2 Métodos analíticos

A fim de salvaguardar os consumidores, a União Europeia (UE) implementou legislação mais apertada no que respeita à rotulagem dos produtos alimentares (Chandrika et al., 2010; Sakalar e Abasiyanik, 2011). Consequentemente é necessário estabelecer métodos rápidos e fiáveis que possibilitem a deteção de adulterações fraudulentas (Tanabe et al., 2007a).

Para a identificação de espécies e autenticidade de produtos alimentares podem-se utilizar diversos métodos (Ong et al., 2007). A escolha fica dependente da matriz, da sensibilidade e especificidade pretendidas e da rapidez necessária. Os métodos biotecnológicos e todas as técnicas deles decorrentes têm-se mostrado ferramentas importantes e acompanhado o processo evolutivo com inovações que permitem dar respostas essenciais e de forma expedita (Quinta et al., 2008). Muitos dos métodos baseiam-se na análise de proteínas, incluindo ensaios imunológicos (testes enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), imunofluorescência, etc.), técnicas eletroforéticas e cromatográficas (Ong et al., 2007; Kesmen et al., 2012; Jorfi et al., 2012; Amjadi et al., 2012). No entanto, estes métodos dependem do estado de degradação destas biomoléculas. Em alimentos processados e que estiveram sujeitos a elevadas temperaturas as proteínas desnaturam, o que conduz à perda da especificidade destes métodos.

Por estas razões, os métodos baseados na amplificação de DNA têm sido utilizados para a identificação de espécies devido à elevada estabilidade desta molécula e ao facto de se encontrar presente em qualquer tipo de tecido biológico (Ong et al., 2007; Pascoal et al., 2004; Mafra et al., 2007; Yoshida et al., 2009). A técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) apresenta um elevado potencial neste tipo de análises devido à sua rapidez, simplicidade, elevada sensibilidade e especificidade (Mafra et al., 2007). No entanto, temperaturas extremamente elevadas e processos aplicados a produtos cárneos processados podem cau-

sar fragmentação da molécula de DNA, reduzindo a sensibilidade do método (Yoshida et al., 2009; Martín et al., 2007a). É portanto necessário utilizar um método de PCR que amplifique pequenos fragmentos da molécula de DNA (Martín et al., 2007a).

II.2.1 Reação em cadeia da polimerase

De todos os avanços tecnológicos que a biologia molecular moderna sofreu, a técnica de reação em cadeia da polimerase, ou PCR, é sem dúvida a mais útil. O PCR é então uma técnica rápida e poderosa que se baseia na amplificação *in vitro* da molécula de DNA (Hui, 2012). A metodologia foi desenvolvida nos anos 80 por Kary Mullis, investigador norte-americano, que recebeu em 1994 o prémio Nobel (Novais e Pires-Alves, 2004).

A técnica de PCR explora a função natural de enzimas designadas por polimerases. Estas enzimas estão presentes em todos os organismos vivos e o seu trabalho é copiar o material genético (Powledge, 2004). Esta técnica permite amplificar um fragmento de DNA específico presente numa mistura complexa. Utiliza-se então uma enzima que sintetiza uma nova cadeia de DNA, usando para tal uma cadeia pré-existente como molde. Esta cadeia recém-formada torna-se então um molde, permitindo a formação de uma nova cadeia, e assim sucessivamente (Clark e Pazdernik, 2012; Wilson e Walker, 2010).

II.2.1.1 **Componentes utilizados na reação de PCR**

Uma reação típica de PCR contém vários componentes essenciais, tais como iniciadores (ou *primers*), uma enzima DNA polimerase, $MgCl_2$, KCl, Tris-HCl, desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTP's), um molde de DNA e água estéril *DNA/RNA free* (Reece, 2004; Pelt-Verkuil et al., 2008; McPherson e Møller, 2006).

Atualmente existem no mercado *master mixes* que contêm todos os componentes necessários, exceto os *primers*, nas concentrações indicadas para o processo de PCR.

Primers

A especificidade do PCR reside na conceção dos dois oligonucleótidos iniciadores. Os *primers* são cadeias curtas de quatro componentes químicos que compõem o material

genético, adenina, timina, guanina e citosina (Powledge, 2004). Estes dois curtos segmentos de cadeia simples de DNA, designados *primer forward* e *primer reverse*, emparelham com as extremidades do segmento-alvo (figura 1). Os *primers* não só têm de ser complementares com a cadeia de DNA alvo como não devem ser complementares entre si. A formação de dímeros entre os *primers* evita a amplificação do fragmento de DNA, reduzindo a sensibilidade (Clark e Pazdernik, 2012; Wilson e Walker, 2010).

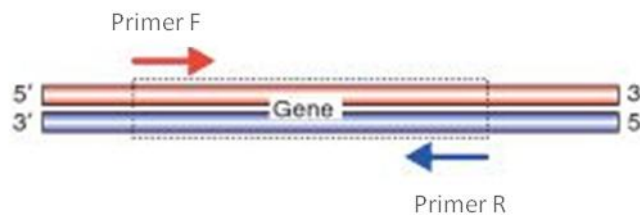


Figura 1: Esquema representativo de dois oligonucleotídeos (*primer F* e *primer R*) desenhados para identificar o gene alvo (adaptado de Reece, 2004).

DNA Polimerase

A enzima DNA polimerase é essencial para a síntese da nova cadeia de DNA. O procedimento da técnica de PCR envolve etapas com elevadas temperaturas, por isso é necessária uma enzima termoestável. Este tipo de enzimas são isoladas de bactérias que habitam em fontes de águas termais, com temperaturas até 90 °C (Clark e Pazdernik, 2012). A enzima mais utilizada, *Taq* DNA polimerase, é isolada da bactéria *Thermus aquaticus* descoberta pela primeira vez das fontes termais no Parque Nacional de Yellowstone, EUA.

Cloreto de Magnésio

O Magnésio é um dos componentes mais críticos na reação de PCR e a sua concentração pode afetar a especificidade e a eficiência da reação. Os iões Mg^{2+} são o cofator da *Taq* polimerase sendo necessários numa concentração entre 1,2 e 1,3 mM (Wilson, 1997; McPherson e Møller, 2006). Em baixas concentrações de Magnésio, a reação falha pois a polimerase não é suficientemente ativada. Em concentrações elevadas de Magnésio a reação perde especificidade o que conduz à amplificação de genes não desejáveis (Reece, 2004).

Cloreto de Potássio

O Cloreto de Potássio (KCl) auxilia no emparelhamento dos *primers* com a sequência alvo. No entanto, em concentrações elevadas pode levar ao seu emparelhamento noutros locais, conduzindo a produtos inespecíficos (McPherson e Møller, 2006).

Tris-Ácido Clorídrico

O tampão Tris-HCl é um tampão dipolar iónico e o seu pH varia com a temperatura. Durante a reação de PCR, tendo em conta as variações de temperatura, o pH pode variar entre 6,8 e 8,3 (McPherson e Møller, 2006).

Desoxirribonucleotidos trifosfatados

Os desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTP's) são os quatro nucleótidos do DNA, desoxiadenina trifosfato (dATP), desoxicitosina trifosfato (dCTP), desoxiguanina trifosfato (dGTP) e desoxitimina trifosfato (dTTP). Estes são utilizados na fase de extensão do PCR para criar uma cópia do DNA. É importante que os quatro nucleótidos se encontrem em concentrações iguais (McPherson e Møller, 2006).

II. 2.1.2 Etapas da técnica de PCR

Há três etapas essenciais, com temperaturas específicas, em cada ciclo da reação: desnaturação, hibridação e extensão (figura 2). Estas etapas são repetidas 30 a 40 vezes, consoante o método, o que permite um aumento extraordinário do número de cópias de DNA. Na fase de desnaturação, acima de 90 °C, a cadeia dupla é desnaturada, o que permite que o segmento-alvo fique acessível aos *primers*. Na fase de hibridização, entre 40 °C e 60 °C, os *primers* emparelham nas extremidades complementares da cadeia modelo. A temperatura desta etapa (designada temperatura de *annealing*) é específica para cada método e é essencial para a otimização do processo. Por último, a etapa de extensão, que ocorre a 72 °C, é promovida por uma enzima DNA polimerase termoestável, sendo a mais utilizada a *Taq* polimerase (Reece, 2004; Powledge, 2004). Este ciclo de etapas é repetido o número de vezes programado, o que permite um número de cópias na ordem dos 10⁹ cópias de DNA (Wilson e

Walker, 2010; McPherson e Møller, 2006).

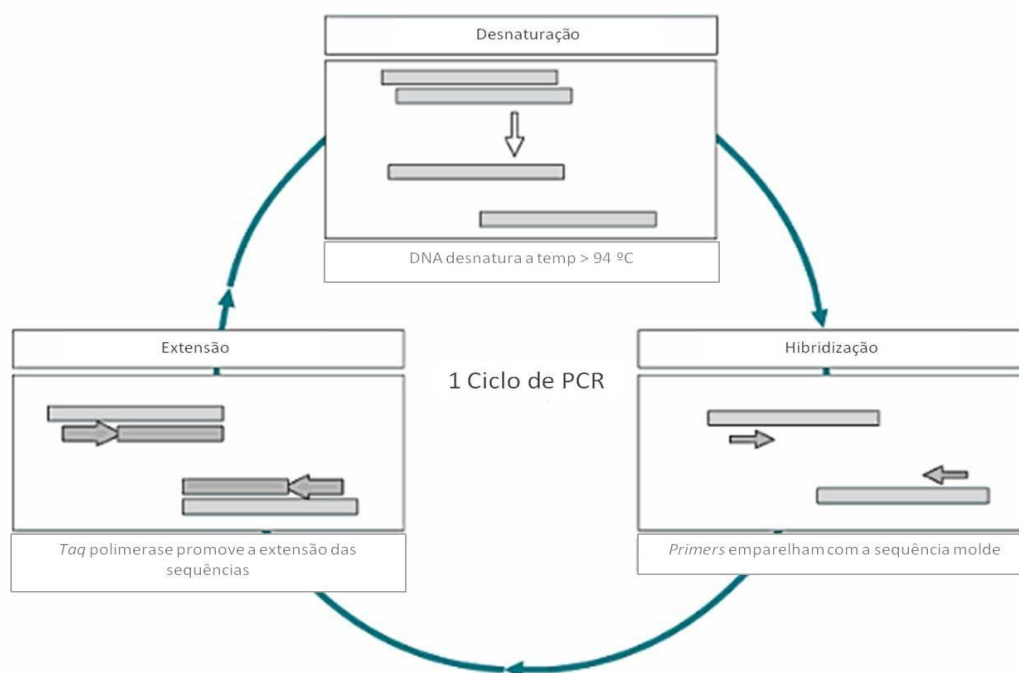


Figura 2: Representação esquemática de um ciclo de PCR (adaptado de Wilson e Walker, 2010).

A visualização dos produtos do PCR é tradicionalmente feita recorrendo ao uso de um gel de eletroforese, normalmente de agarose ou poliacrilamida, corado com brometo de etídio, um reagente químico que se intercala com as cadeias de DNA permitindo a sua visualização através da fluorescência emitida sob uma luz ultravioleta (UV) (Pelt-Verkuil et al., 2008). Esta visualização permite ao operador saber se o produto da amplificação corresponde à região pretendida ou se se obteve um produto não-específico (Mafra et al., 2007).

II. 2.1.3 Vantagens e limitações

O segredo do sucesso da técnica de PCR reside na sua capacidade de amplificar uma sequência específica de DNA, aliada à sua simplicidade, rigor e elevada sensibilidade. Não é necessário isolar o DNA que se pretende amplificar, mesmo que se encontre numa amostra com DNA de outras espécies, uma vez que a sua especificidade é dada pelos *primers* (McPherson e Møller, 2006; Logan et al., 2009).

No entanto apresenta algumas limitações visto que necessita de instrumentação dispendiosa, como os termocicladores, não estando por isso ao dispor de qualquer laboratório. Os laboratórios que dispõem desta técnica necessitam de três a quatro zonas distintas de trabalho a fim de prevenir contaminações cruzadas (Walker e Rapley, 2009). A exigência da manipulação dos produtos de PCR pós-amplificação aumenta o risco de contaminações e de resultados falsos-positivos (Rojas et al., 2010). É também necessário conhecer a sequência que se pretende amplificar para que possam ser sintetizados *primers* específicos. Outro inconveniente desta técnica reside no uso de brometo de etídio para a visualização da amplificação, visto que este químico possui propriedades mutagénicas (Mccann et al., 1975; Matselyukh et al., 2005; Saadoun et al., 1998).

II. 2.2 PCR em Tempo Real

Recentemente a técnica de PCR tem evoluído, tornando-se mais sofisticada, através da introdução do PCR em tempo real. O primeiro trabalho nesta área demonstrou que a amplificação e a deteção das sequências específicas de DNA em simultâneo era possível com a adição de brometo de etídio à reação de PCR. O brometo de etídio quando se encontra ligado à dupla cadeia de DNA, e excitado pelo luz UV, emite uma fluorescência que aumenta com o aumento da quantidade de DNA presente. Este passo permitia que o aumento do produto de PCR pudesse ser visualizado a cada ciclo (Logan et al., 2009; Valasek e Repa, 2005).

Esta ideia foi desenvolvida encontrando-se agora mais moderna e sofisticada. A reação de PCR em tempo real permite então a quantificação dos ácidos nucleicos de maneira precisa, com maior reprodutibilidade e rapidez, elevada sensibilidade e com possibilidade de automação (Santos et al., 2012). A emissão de compostos fluorescentes gera um sinal que aumenta na proporção direta da quantidade do produto de PCR. Sendo assim, os valores da fluorescência são gravados durante cada ciclo e representam a quantidade de produto amplificado (Logan et al., 2009; Reece, 2004).

O PCR em tempo real requer uma plataforma de instrumentação que contém um termociclador com sistema ótico para mensurar a emissão da fluorescência e um computador com um *software* para a aquisição dos dados (Logan et al., 2009).

II. 2.2.1 Vantagens e limitações

A técnica de PCR em tempo real, segundo Logan et al. (2009), oferece diversas vantagens que incluem:

- ✓ Amplificação e detecção dos produtos de PCR num sistema integrado.
- ✓ Monitorização constante da reação.
- ✓ Baixo tempo de reação (20 a 40 min para um método com 35 ciclos).
- ✓ Baixo risco de contaminação, visto que a reação e a análise pós-PCR ocorrem num tubo fechado e sem intervenção do operador.
- ✓ Elevada sensibilidade.
- ✓ Permite a quantificação de resultados.

A par de todas estas vantagens, esta técnica, de acordo com Logan et al. (2009), apresenta também algumas limitações:

- ✓ O desenvolvimento de protocolos requer um elevado nível de competência técnica.
- ✓ Elevado custo do equipamento.

II. 2.2.2 Fluoróforos

Os fluoróforos são moléculas que absorvem e emitem luz a um comprimento de onda específico. Estes permitem a monitorização do processo ao longo dos ciclos. Os compostos fluorescentes mais utilizados são SYBR® Green e TaqMan® (Logan et al., 2009; Reece, 2004).

SYBR® Green

A molécula de SYBR® Green liga-se à dupla cadeia de DNA e emite fluorescência verde. No início da amplificação as moléculas não se encontram ligadas, emitindo uma fluorescência fraca. Após o início da fase de extensão o número de cadeias duplas de DNA

começa a aumentar e o fluoróforo liga-se a estas, emitindo fluorescência. Esta fluorescência aumenta proporcionalmente ao aumento dos produtos da amplificação do PCR. A principal desvantagem da utilização desta molécula é o facto de se ligar inespecificamente a qualquer cadeia dupla presente na solução, incluindo *primers*, o que pode sobrestimar a concentração inicial da sequência-alvo (Novais e Pires-Alves, 2004; Reece, 2004; Walker e Rapley, 2009).

TaqMan®

A sonda TaqMan® é utilizada para sequências específicas nos fragmentos de DNA amplificados no PCR. Esta sonda apresenta numa extremidade o fluoróforo e na outra um *quencher*, que aceita a energia do fluoróforo. Durante o PCR a sonda liga-se à sequência alvo da cadeia simples de DNA. No processo de amplificação a sonda é degradada devido à atividade exonuclease 5'→3' da enzima *Taq* polimerase, separando o *quencher* do fluoróforo (figura 3). Esta separação resulta num aumento da intensidade da fluorescência (Novais e Pires-Alves, 2004; Reece, 2004).

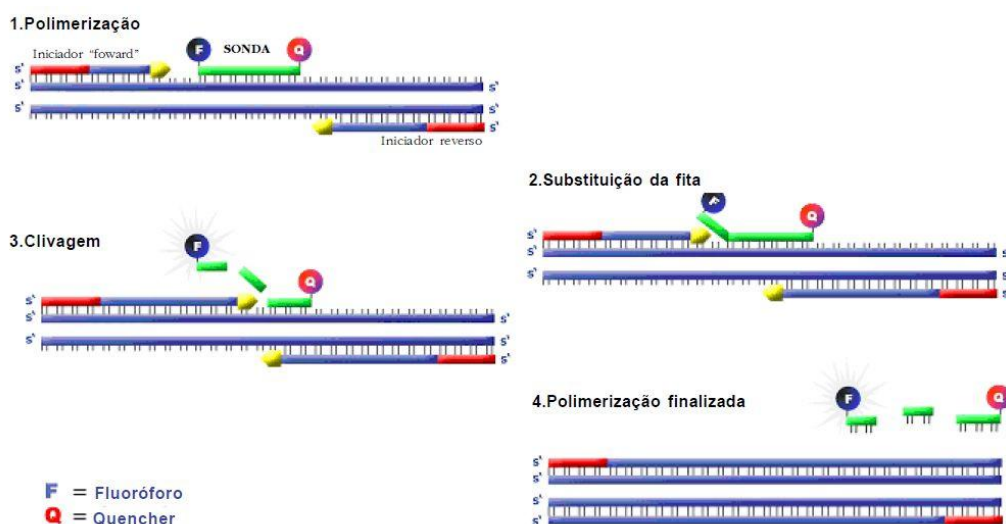


Figura 3: Princípio da sonda TaqMan® (adaptado de Novais e Pires-Alves, 2004).

No mercado existe uma grande variedade de sondas, sendo cada uma excitada a um comprimento de onda específico (tabela I). Para cada fragmento que se pretende amplificar é necessário sintetizar uma sonda específica (Whitcombe et al., 1998). É possível utilizar duas sondas no mesmo ensaio, que absorvam a comprimentos de onda distintos. Isto é o que se

acontece quando se utiliza um controlo interno de amplificação. A amostra utiliza uma sonda, por exemplo FAM, que foi sintetizada para amplificar um fragmento específico, e o controlo interno utiliza outra sonda, como a sonda VIC.

Tabela I: Sondas mais comuns utilizadas no PCR em tempo real (adaptado de Qiagen, 2010).

Sondas	Emissão máxima (nm)
FAM	518
Texas Red®	615
VIC®	552
HEX	553
NED	575

II. 2.2.3 Interpretação de resultados

As curvas de amplificação são representadas graficamente pelo *software* e apresentam uma forma sigmoide (Valasek e Repa, 2005; Pelt-Verkuil et al., 2008). Neste gráfico destacam-se duas fases, uma fase exponencial seguida de uma fase de plateau, não exponencial (figura 4). Durante a fase exponencial a quantidade de produto de PCR duplica a cada ciclo, aproximadamente. Quando os componentes da reação são consumidos um dos reagentes torna-se um reagente limitante. Neste momento a fase exponencial dá lugar à fase de plateau, normalmente por volta do 28º ciclo (Bio-Rad Laboratories, 2006).

A linha de base é definida pela fluorescência dos ciclos iniciais em que qualquer sinal de amplificação tende a situar-se dentro do “ruído de fundo” do sistema. A amplificação vai aumentando e atinge um valor crítico e o sinal produzido pela fluorescência cruza a linha de base. O número do ciclo em que isso ocorre é designado por *threshold cycle* (C_T). Este valor de C_T é inversamente proporcional à quantidade de DNA alvo na amostra. Se na amostra está presente uma grande quantidade de DNA alvo serão necessários menos ciclos para a reação entrar na fase exponencial, e o valor de C_T será menor. Em contrapartida, se o DNA alvo estiver presente numa baixa concentração o valor de C_T será maior. Esta relação é a base para a quantificação na técnica de PCR em tempo real (Bio-Rad Laboratories, 2006; Valasek e Repa, 2005; Pelt-Verkuil et al., 2008; Schefe et al., 2006).

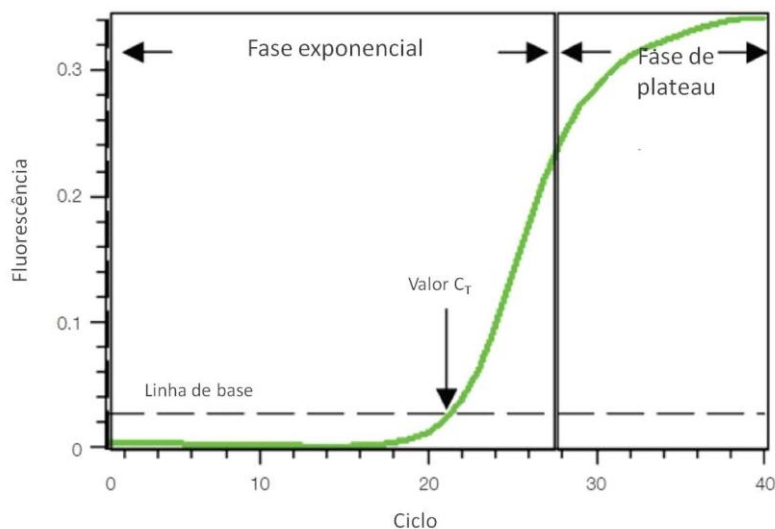


Figura 4: Curva de amplificação de PCR em tempo real (adaptado de Bio-Rad Laboratories, 2006).

II. 3 Infraestruturas num laboratório de PCR

Uma das principais características da técnica de PCR é a sua elevada sensibilidade. No entanto esta particularidade torna o ensaio propenso a falsos-positivos, visto que é altamente suscetível a contaminações cruzadas (Belák e Maráz, 2010). Resultados falsos-positivos podem surgir devido a questões relacionadas com o laboratório, como as contaminações cruzadas, ou relacionadas com o método, como ineficiente otimização do ensaio. A contaminação por produtos de PCR de ensaios anteriores é uma possível fonte de erro e existem várias ferramentas e técnicas que se podem utilizar para evitar estes falsos-positivos (World Organisation for Animal Health, 2008).

Durante todo o processo deve ser assegurado que a contaminação das amostras pelo ambiente não ocorre. Por esta razão deve-se proceder à separação das áreas de trabalho, contendo cada uma os seus próprios equipamentos, materiais e reagentes (figura 5). A principal fonte de contaminação são os produtos de PCR gerados em reações anteriores. Com a separação física das duas principais áreas de atividade (pré-PCR e pós-PCR) o potencial de contaminação é significativamente reduzido (Belák e Maráz, 2010). O fluxo de trabalho entre estas áreas deve ser unidirecional, isto é, de áreas limpas (pré-PCR) para áreas contaminadas (pós-PCR) e nunca na direção oposta. O vestuário de laboratório, luvas e qualquer outro equipamento de proteção dos trabalhadores devem ser trocados entre cada

área e as mãos lavadas frequentemente. Nenhum material de trabalho deve transitar de áreas contaminadas para áreas limpas, nem mesmo cadernos, canetas ou outros objetos (Health Protection Agency, 2010).

II.3.1 Zona de preparação da reação de PCR

Nesta sala são mantidos todos os reagentes necessários para a preparação da reação de PCR bem como pipetas, micropipetas e pontas com filtro, uma câmara de fluxo laminar, e batas específicas. A câmara de fluxo laminar deve estar equipada com um sistema de luz UV que permite a sua descontaminação, assegurando assim um ambiente seguro e livre de ácidos nucleicos (Belák e Maráz, 2010).

Os procedimentos realizados nesta área incluem a preparação e separação em alíquotas dos reagentes em stock e a mistura prévia dos reagentes para a amplificação dos ácidos nucleicos. A separação em alíquotas dos *primers* e outros reagentes minimiza as consequências de uma contaminação e reduz o tempo de ensaio (Health Protection Agency, 2010).

II.3.2 Zona de extração de ácidos nucleicos

A extração de ácidos nucleicos não pode ser realizada no mesmo local da visualização dos produtos de PCR. Esta área deve ter o seu próprio material, como pipetas, pontas com filtro, luvas e batas de laboratório. Nesta sala encontram-se também equipamentos como microcentrífuga, agitador, banhos de água, entre outros. Os reagentes do PCR são transferidos da área de pré-PCR diretamente para o laboratório de extração. O DNA da amostra é então adicionado à reação de PCR preparada na zona descrita anteriormente. As amostras nunca devem entrar nas áreas limpas nem na sala onde o DNA é amplificado (Belák e Maráz, 2010; Health Protection Agency, 2010).

II.3.3 Zona de amplificação

A zona de amplificação é a área onde se encontram os equipamentos de PCR (termocicladores). Quando os equipamentos são partilhados por vários operadores é necessário haver um sistema coeso para que não ocorram erros, como alteração ou eliminação acidental de métodos (Health Protection Agency, 2010).

II.3.4 Zona de deteção de produtos de PCR

Nesta sala, para a análise pós-PCR das amostras, encontra-se um sistema de eletroforese em gel de agarose, por exemplo. Esta área encontra-se muitas vezes no mesmo espaço físico da área de amplificação. Esta é considerada uma área contaminada, como tal, reagentes, equipamentos, batas, etc., não poderão ser utilizados em mais nenhuma área (Health Protection Agency, 2010). No caso de um sistema de PCR em tempo real esta zona não é necessária, visto que a deteção dos produtos de PCR é realizada simultaneamente com a amplificação.

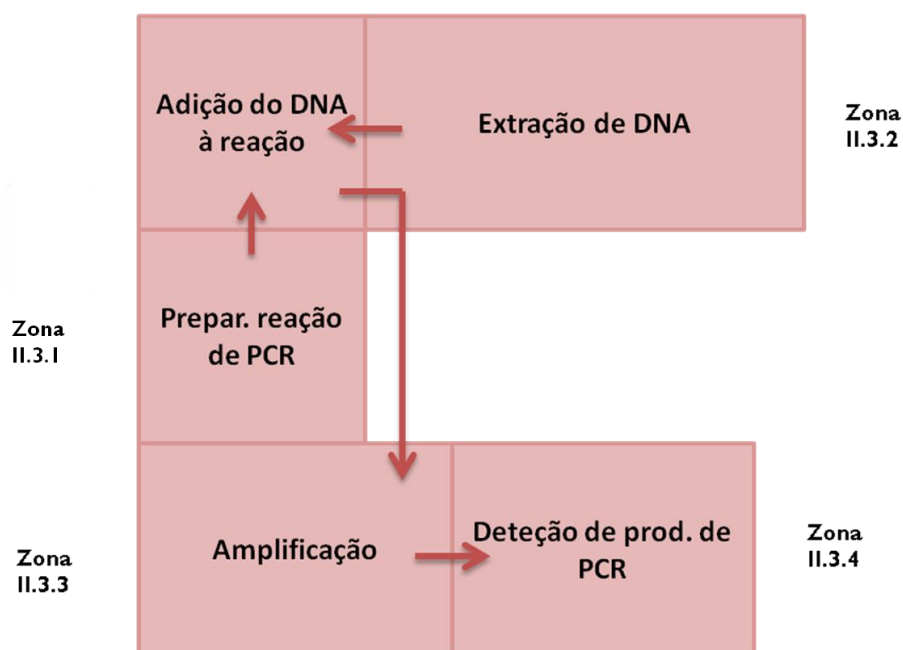


Figura 5: Disposição recomendada de um laboratório de PCR.

II.4 Controlos utilizados no PCR

A melhor maneira para monitorizar a contaminação cruzada numa análise de PCR é a introdução de um controlo negativo. Este controlo contém todos os reagentes utilizados na reação, *primers* e *master mix*, e uma quantidade de água estéril *DNA/RNA free* equivalente à quantidade de DNA da amostra. Após a amplificação, o controlo negativo não deve apresentar qualquer aumento de fluorescência (no caso do PCR em tempo real) demonstrando assim a ausência de contaminação durante o processo analítico (World Organisation for Animal Health, 2008; Belák e Maráz, 2010).

O controlo positivo constitui um molde de DNA que se pretende pesquisar na amostra em estudo. Permite monitorizar o processo de amplificação evitando assim falsos-negativos devido à degradação e/ou ineficiência dos *primers* (World Organisation for Animal Health, 2008; Health Protection Agency, 2010).

Os controlos internos podem ser utilizados como indicadores de eficiência de todo o processo de PCR. Consistem numa pequena quantidade de DNA que acompanha todo o processo de PCR, desde a extração até à visualização dos resultados. Este controlo possui DNA de outra espécie que não aquela que se pretende pesquisar, por isso utilizam-se *primers* diferentes dos utilizados na amostra. Numa técnica de PCR em tempo real a absorvância emitida é lida num comprimento de onda diferente do da amostra. Estes controlos permitem então verificar a presença de inibidores de PCR e/ou falhas no processo de extração, permitindo validar um resultado negativo (World Organisation for Animal Health, 2008; Health Protection Agency, 2010).

II.5 Validação de métodos analíticos

A validação de um método analítico é o processo pelo qual é estabelecida a adequação desse mesmo método para proporcionar resultados analíticos adequados à sua finalidade (Keer, 2008). Na Norma Portuguesa 17025:2005 (2005) o conceito de validação é definido como “*confirmação, através de exame e apresentação de evidência objetiva, de que os requisitos específicos relativos a uma dada utilização pretendida são satisfeitos*”.

Cada laboratório deverá proceder à validação dos métodos utilizados quando estes

não se encontram normalizados, quando são métodos concebidos ou desenvolvidos pelo próprio laboratório, quando se encontram normalizados mas são utilizados fora do âmbito de utilização previsto, e por fim, quando o laboratório procedeu a extensões ou modificações de métodos normalizados. Tal processo permite confirmar que os métodos são adequados à utilização prevista (NP 17025, 2005).

A validação de um método é específica para um dado número de fatores, como a matriz da amostra e o analito, o analista, os equipamentos utilizados e o laboratório. A extrapolação para outros tipos de amostras, equipamentos ou laboratórios implica uma nova validação ou verificação para assegurar que o método ainda é adequado sob as novas condições apresentadas (Keer, 2008).

No processo de validação de um método é essencial que os operadores sejam competentes, profissionais e que apresentem formação adequada para as tarefas que desempenham, que o ambiente no laboratório, como a temperatura e humidade, disposição dos equipamentos, etc., seja apropriado, e que os equipamentos e *softwares* utilizados sejam adequados para o método e se encontrem calibrados e bem conservados. Tais requisitos implicam uma grande preparação prévia por parte do laboratório, de modo a que todas as verificações e calibrações sejam feitas (Keer, 2008; NP 17025, 2005).

Para um laboratório analítico existem diversas razões para proceder à validação dos métodos utilizados. Para uma empresa que solicita os serviços do laboratório é importante que o método utilizado seja rigoroso e apresente resultados fiáveis. Sem ser validado, não há garantias que os resultados produzidos pelo método são fiáveis, prejudicando assim a relação laboratório-empresa (NP 17025, 2005).

Financeiramente faz sentido implementar e utilizar um método que funcione como o esperado, fornecendo resultados adequados. A validação evita o gasto desnecessário de fundos em métodos inadequados que não garantem a veracidade dos dados fornecidos. O controlo dos parâmetros do método auxiliam a identificar as etapas críticas do processo, permitindo que estas sejam controladas com maior rigor, o que assegura a fiabilidade dos resultados do método a longo prazo (NP 17025, 2005; Keer, 2008).

II.5.1 Parâmetros de validação

II.5.1.1 **Precisão**

Entende-se por precisão o grau de concordância entre os resultados individuais dos ensaios, quando o processo é aplicado a alíquotas múltiplas de uma amostra homogênea. Um método é considerado preciso quando há uma pequena, ou mesmo nenhuma variação entre os vários resultados (figura 6). É importante notar que a precisão nos resultados obtidos não reflete a veracidade dos mesmos, apenas indica que o método apresenta uma baixa variabilidade nos resultados (Keer, 2008; Saunders e Parkes, 1999; Singer, 2001). Na precisão deve-se considerar três parâmetros:

- ✓ A repetibilidade expressa a variação dos resultados quando as análises são efetuadas sob as mesmas condições, isto é, pelo mesmo analista, nas mesmas condições de análise, com o mesmo equipamento, num curto espaço de tempo (Keer, 2008; VIM, 2012). Para calcular a repetibilidade de um método de PCR utilizam-se réplicas de uma amostra que são tratadas como amostras diferentes. Três alíquotas da amostra são extraídas e amplificadas, e o seu resultado deverá ser concordante. É importante que o analito que se pretende detetar com o PCR se encontre na mesma matriz (World Organisation for Animal Health, 2008).
- ✓ A precisão intermédia expressa a precisão avaliada sobre a mesma amostra ou amostras idênticas, utilizando o mesmo método de ensaio, no mesmo laboratório, mas definindo exatamente as condições a variar, tais como analistas, equipamentos, dias, lotes de reagentes... (Keer, 2008; Singer, 2001).
- ✓ A reprodutibilidade expressa a precisão de um método de ensaio efetuada em condições de ensaio diferentes, utilizando o mesmo método de ensaio, sobre a mesma amostra, ou amostras idênticas, mas variando as condições de medição como diferentes laboratórios, diferentes analistas, diferentes equipamentos, diferentes dias, diferentes lotes de reagentes (Keer, 2008; Singer, 2001). Normalmente este parâmetro é avaliado sob a forma de ensaios interlaboratoriais que são realizados periodicamente e o resultado dos quais é fundamental para a validação de qualquer método analítico.

II.5.1.2. Exatidão

A exatidão é a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceite convencionalmente como verdadeiro (VIM, 2012).

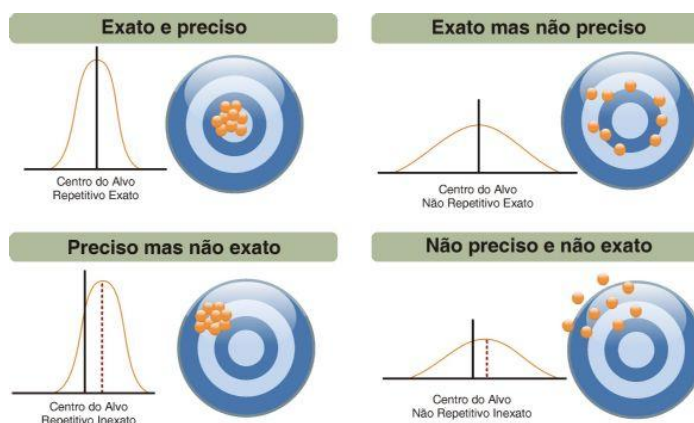


Figura 6: Representação esquemática de precisão e exatidão de um método (adaptado de <http://www.agroinfoti.com.br/portal/component/content/article/28-current-users/78-normastecnicas> [Acedido a: 09 de Janeiro de 2013]).

II.5.1.3. Sensibilidade/Limite de detecção

O limite de detecção é definido como a menor quantidade de analito que pode ser detetada na amostra com confiança estatística, mas não necessariamente quantificado como valor exato. Por outras palavras, é a quantidade mínima que é possível distinguir do branco. O limite de detecção pode ser representado pelo número de células por massa da matriz, percentagem de substância estranha na matriz, número de cópias de um gene ou genoma, etc. (Saunders e Parkes, 1999; World Organisation for Animal Health, 2008).

Para determinar o limite de detecção são utilizadas diluições sucessivas do analito até não ser possível detetá-lo (World Organisation for Animal Health, 2008).

II.5.1.4. Especificidade/Seletividade

Por especificidade entende-se como sendo a capacidade de um método analítico para discriminar o analito de outras substâncias presentes na amostra. A sua determinação é feita procedendo à pesquisa do analito em amostras que contenham outros agentes semelhantes, utilizando material de referência certificado (material de referência acompanhado de

uma documentação emitida por uma entidade reconhecida, a qual fornece um ou mais valores de propriedades especificadas com as incertezas e as rastreabilidades associadas, utilizando procedimentos válidos) (Singer, 2001; Saunders e Parkes, 1999; VIM, 2012).

II.5.1.5. Robustez

A robustez é a capacidade de um método para resistir a pequenas variações experimentais durante a sua execução. A robustez de um processo analítico fornece uma indicação sobre a confiança do método, definindo os parâmetros críticos que necessitam de ser controlados durante o uso normal, como os tempos de incubação, variações de temperatura, pH, etc. (Saunders e Parkes, 1999; Singer, 2001; Chan et al., 2004).

II.6 Adulteração de produtos cárneos e sua detecção

Nos dias de hoje, produtos à base de carne podem conter várias espécies misturadas, em diferentes proporções, e que não são detetáveis a olho nu. A adulteração de produtos cárneos tornou-se uma prática comum em muitos países, levando à necessidade de desenvolvimento de métodos analíticos, em especial na determinação das espécies presentes nos alimentos (Ong et al., 2007). Quando os consumidores compram carne fresca não têm qualquer problema na identificação da espécie, mas nos alimentos processados, como salsichas, alimentos enlatados, hambúrgueres, lasanhas e afins, não é possível identificar a olho nu as espécies de origem (Al-Tamimi e Ashhab, 2012).

Os produtores de alimentos processados à base de carne podem intencionalmente adicionar outros tipos de carnes, de menor valor comercial, a produtos à base de bovino, veado, ou outras, com um preço mais elevado. Outra possibilidade é a utilização indevida de proteínas vegetais, como a soja, visto que estas apresentam um custo de mercado inferior em relação às proteínas animais (Soares et al., 2010). Estes produtos adulterados, para além dos problemas económicos, constituem um risco para a saúde (Ong et al., 2007; Azmi et al., 2011). Muitos indivíduos, devido a problemas de saúde, evitam ingerir carnes vermelhas, preferindo carnes consideradas mais saudáveis (Ahmed et al., 2007). Para consumidores com alergias a determinadas proteínas a rotulagem errada de produtos alimentares constitui um perigo. Segundo Tanabe et al. (2007b) a prevalência de indivíduos que sofrem de reações

alérgicas a carne de vaca, porco e frango é de cerca de 73%, 58% e 41%, respetivamente, num total de 57 indivíduos com suspeita de sofrerem de alergia a carne, nos Estados Unidos da América (EUA).

Atualmente há um crescente número de consumidores que apreciam o sabor e valor nutricional de produtos alimentares regionais e tradicionais. Estes são entendidos como artigos alimentares cujas qualidades e singularidades derivam da aplicação de métodos de produção tradicionais, o que constitui um elemento de identidade de uma determinada região. A procura crescente por este género de produtos e do número de consumidores dispostos a pagar preços elevados por eles podem justificar tentativas de adulterações por parte dos produtores. A adulteração deste tipo de produtos constitui uma desonestidade em relação aos seus consumidores (Spychaj et al., 2009).

A autenticidade dos produtos cárneos é também importante por razões de ordem religiosa. De acordo com a lei islâmica, um fator importante para os consumidores muçulmanos é a condição halal (palavra árabe que significa “permitido para consumo”) ou haram (“ilícito para consumo”) dos alimentos que consomem. A procura por alimentos halal tem aumentado devido essencialmente ao crescimento da população muçulmana. Estima-se que em 2011 residiam em Portugal mais de 20 500 muçulmanos com 15 ou mais anos de idade (Instituto Nacional de Estatística, 2012). A deteção de carne de porco em vários produtos alimentares tem sido um importante tema de estudo em diversos países, especialmente onde as leis religiosas proíbem o consumo de produtos suínos (Jorfi et al., 2012; Erwanto et al., 2012; Demirhan et al., 2012; Azmi et al., 2011; Sahilah et al., 2011).

Pelas razões descritas, são necessários métodos analíticos fiáveis que permitam a identificação de espécies presentes numa amostra de alimento, a fim de proteger os consumidores de possíveis fraudes (Azmi et al., 2011). Estes terão também de ser sensíveis e robustos uma vez que é necessária a sua aplicação a matrizes alimentares complexas (Rojas et al., 2010).

II.6.1 Integridade do DNA e inibidores de PCR

Vários fatores ambientais podem comprometer a integridade do DNA ao longo do tempo. São de especial relevância a combinação entre elevada temperatura e humidade, condições em que os produtos à base de carne são preparados, armazenados e processados.

A temperatura interna a que as amostras são sujeitas apresenta um elevado potencial de afetar a integridade do DNA. Vários estudos que avaliam o efeito dos diferentes métodos de cocção dos alimentos e da elevada temperatura e pressão têm sido publicados nos últimos anos.

Hird et al. (2006) verificaram que o grau de fragmentação do DNA se correlaciona com a temperatura e a pressão do processamento. A fragmentação de DNA só foi observada quando as carnes se encontravam enlatadas ou sofreram um processo de autoclavagem. Ao contrário, quando as carnes foram preparadas na ausência de pressão pouca ou nenhuma fragmentação foi observada. O efeito da fragmentação do DNA em métodos baseados no PCR é duplamente problemático. Por um lado, quando a cadeia de DNA é clivada em vários fragmentos, o segmento alvo pode não se encontrar disponível para o emparelhamento com os *primers*. Por outro lado, os fragmentos de DNA de pequenas dimensões não são extraídos com a mesma eficiência que as moléculas de maiores dimensões (Hird et al., 2006). Hird et al. (2006) afirmam que o tamanho dos fragmentos de DNA, após sofrerem elevadas temperaturas e pressão, é de cerca de 300 bp. É, portanto, recomendável a amplificação de fragmentos mais curtos neste tipo de amostras (Musto, 2011).

No caso do estudo publicado por Pascoal et al. (2004) não foi possível amplificar o DNA de produtos que sofreram elevados processamentos. Demonstrou também que existe uma relação direta entre o tratamento térmico e a intensidade da fragmentação do DNA, afetando a qualidade do DNA extraído.

A utilização de DNA mitocondrial (mtDNA) neste tipo de amostras oferece diversas vantagens. Por um lado, estão presentes milhares de cópias por célula dos genes deste tipo de DNA. Este facto aumenta a probabilidade de obtenção de um resultado positivo, mesmo no caso de amostras que sofrem elevada fragmentação de DNA devido a condições de processamento intensas. Além disso, o mtDNA possui uma taxa de mutação relativamente elevada em comparação com o DNA nuclear (nDNA), o que permite a discriminação de espécies estreitamente relacionadas (Pascoal et al., 2004; Rojas et al., 2011). Musto (2011) demonstrou que a quantidade de DNA disponível para amplificação por PCR de uma amostra que sofreu cocção no micro-ondas foi menor do que a quantidade de DNA isolado a partir de amostras que não sofreram processamento. Outro resultado interessante foi que a intensidade da banda produzida em gel de agarose, após corrida de eletroforese, era inferior quando a sequência amplificada correspondia a nDNA, comparando com mtDNA, indicando que o nDNA sofre mais fragmentação que o mtDNA. Musto (2011) conclui que a amplifica-

ção de genes mitocondriais é um método mais fiável quando se trata de amostras de DNA degradadas, devido ao seu maior número de cópias.

Para além do problema da fragmentação do DNA, a amplificação dos produtos de PCR pode ficar comprometida pela presença de substâncias inibidoras em amostras biológicas complexas (Abu Al-Soud e Rådström, 2000). Os inibidores atuam geralmente num ou mais dos três pontos essenciais para a reação. Podem interferir com a lise das células, necessária para a extração do DNA, podem interferir com a degradação dos ácidos nucleicos e podem inibir a atividade da polimerase na amplificação do DNA alvo (Wilson, 1997; Davalieva e Efremov, 2010; Klančnik e Kovač, 2012). A lise inadequada pode resultar de condições de reação de lise desajustadas, inativação das enzimas ou enzimas líticas de má qualidade. A degradação dos ácidos nucleicos pode ocorrer por processos químicos, físicos ou enzimáticos. A estrutura primária do DNA é suscetível à instabilidade e decomposição, principalmente devido à hidrólise, metilação não enzimática, danos oxidativos e degradação enzimática (Wilson, 1997).

Outra razão para a inibição do PCR é a aplicação de condições de reação inadequadas. As principais causas são a utilização de *primers* inadequados, tempo ou condições de temperatura inadequadas, baixa qualidade da polimerase utilizada e concentração incorreta de Mg^{2+} (Wilson, 1997).

A utilidade dos métodos de deteção por PCR é limitada em parte pela presença de substâncias que inibem ou reduzem a eficiência da amplificação. A inibição pode ser total ou parcial, manifestando-se como uma completa falha da reação ou apresentando uma sensibilidade reduzida na deteção dos produtos de PCR. Em alguns casos a inibição pode ser a causa de resultados falsos-negativos (Wilson, 1997; Davalieva e Efremov, 2010). Vários métodos podem ser usados para avaliar a presença de inibidores em amostras biológicas. Os controlos internos que são extraídos e amplificados juntamente com o DNA permitem detetar a presença de inibidores e despistar falsos-negativos (Nolan et al., 2006).

Várias substâncias têm sido referidas como inibidores da reação de PCR. Davalieva e Efremov (2010) estudaram a influência de vários sais na capacidade de três DNA polimerases termoestáveis. A *Taq* polimerase, a DNA polimerase termoestável mais utilizada, pode ser inibida por diferentes substâncias biológicas ou orgânicas e por sais. Esta polimerase é inibida por concentrações de NaCl superiores a 40 mM. Em relação ao KCl e ao $MgCl_2$ é inibida por concentrações superiores a 80 mM e a 13,5 mM, respetivamente.

Outra importante fonte de inibidores de PCR são o material e os reagentes que entram em contacto com as amostras durante a extração do DNA. Estes incluem detergentes iónicos, como deoxicolato de sódio, dodecil sulfato de sódio, etanol, isopropanol, fenol, xileno, cianol e azul de bromofenol, entre outros (Klančnik e Kovač, 2012).

II.6.2 Métodos analíticos

Para a identificação de espécies de carne podem ser utilizados diversos métodos analíticos, tais como métodos baseados em proteínas, incluindo dodecil-sulfato de sódio-gel de eletroforese de poliacrilamida (SDS-PAGE), focagem isoelétrica (IEF) e cromatografia líquida de alta *performance* (HPLC). Outra possibilidade é o recurso a métodos imunológicos, como os testes ELISA, a análise sensorial, as diferenças anatómicas e histológicas, o nível de glicogénio presente no músculo e a análise das propriedades da gordura (Al-Tamimi e Ashhab, 2012; Sakalar e Abasiyanik, 2011). No entanto, a maioria destes métodos apresenta limitações devido à baixa especificidade, complexidade e morosidade e à ineficiência de alguns em produtos processados devido à desnaturação de proteínas (Ilhak e Arslan, 2007; Sakalar e Abasiyanik, 2011; Martín et al., 2007b). Além disso, estes métodos são inadequados para a discriminação entre espécies com uma elevada proximidade filogenética (Kesmen et al., 2010).

Em contraste, os métodos baseados na análise de DNA constituem uma alternativa promissora para a diferenciação de espécies relacionadas, mesmo em amostras altamente processadas, devido à elevada termoestabilidade da molécula de DNA (Rojas et al., 2011; Tsai et al., 2007). Um certo número de técnicas baseadas no PCR tem sido desenvolvido ao longo dos anos, revelando-se uma técnica bastante fiável (Schwägele, 2005). Vários métodos baseados na técnica de PCR são utilizados para detetar adulterações em alimentos. O PCR com *species-specific primers* é um dos métodos utilizados para a identificação de diferentes espécies, tanto em carnes cruas como em alimentos que sofreram processamento térmico. Neste método é necessário conhecer a sequência de nucleótidos do gene que se pretende amplificar para que os *primers* sejam desenhados tendo como base essa informação. PCR com *species-specific primers* requer a utilização de um controlo negativo e de um controlo positivo de modo a controlar a possibilidade de se obter falsos-positivos ou falsos-negativos (Spychaj et al., 2009).

Outros métodos também utilizados são PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), PCR-RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA), PCR-SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism), PCR em multiplex e PCR em tempo real (Altamimi e Ashhab, 2012; Chandrika et al., 2010; Szychaj et al., 2009).

II.6.2.1 PCR em tempo real

Produtos cárneos processados, como salsichas, almôndegas, hambúrgueres e lasanhas são expostos a elevadas temperaturas durante o seu processamento. Estas condições conduzem à degradação do DNA levando a falsos-negativos (Erwanto et al., 2012; Demirhan et al., 2012). No caso de amostras degradadas a técnica mais adequada é o PCR em tempo real, visto que esta permite amplificar e detetar pequenos fragmentos de DNA (Jonker et al., 2008). Outra vantagem prende-se com o facto das etapas de pós-PCR, como a corrida de eletroforese em gel de agarose, são dispensadas, economizando tempo de análise e diminuindo o risco de contaminações (Laube et al., 2003).

Vários estudos têm sido publicados recorrendo à técnica de PCR em tempo real (Laube et al., 2003; Kesmen et al., 2012; Demirhan et al., 2011; Jonker et al., 2008; Santos et al., 2012; Tanabe et al., 2007a; Sakai et al., 2011; Rojas et al., 2010). As principais razões apontadas prendem-se com a elevada especificidade e seletividade (Kesmen et al., 2012) e a possibilidade de amplificação de pequenos fragmentos em alimentos processados (Jonker et al., 2008).

Santos et al. (2012) utilizaram a técnica de PCR em tempo real para a identificação de carne de lebre. Concluíram que esta técnica é adequada para a quantificação e identificação de lebre em programas de controlo e regulação da rotulagem. Rojas et al. (Rojas et al., 2010) avaliaram a autenticidade de produtos cárneos à base de aves, recorrendo ao PCR em tempo real. Embora uma das vantagens desta técnica seja a possibilidade de quantificação de DNA presente na amostra, este autor afirma que utilização das equações padronizadas desenvolvidas no seu trabalho não são adequadas para a quantificação de carne em produtos comerciais. Uma das razões apontadas é o facto da composição dos produtos cárneos ser bastante variada podendo influenciar a reação de PCR em tempo real. Por outro lado não é possível saber as condições exatas dos tratamentos térmicos aplicados a alguns produtos. As condições dependem sempre do produtor e do produto em questão.

II.6.3 Estudos de autenticidade de produtos cárneos

Demirhan et al. (2012) no seu estudo sobre a deteção de DNA de suíno em gelatina e produtos e alimentos processados contendo gelatina, analisaram um total de 43 amostras de diversos produtos, 11 recolhidas na Alemanha e 32 na Turquia. No que se refere às amostras provenientes da Alemanha, em duas delas foi detetado DNA de suíno. Das amostras recolhidas na Turquia em uma foi detetado DNA de suíno.

Sakalar e Abasiyanik (2011) analisaram 93 amostras de produtos cárneos de vários tipos, recolhidos em diferentes partes de Istambul. Observaram que 19 das 42 amostras que estavam rotuladas como contendo apenas carne de ruminantes continham também carne de aves. Em duas destas amostras apenas foi detetado DNA de aves e não foi detetado DNA de ruminantes. No caso de produtos rotulados como contendo apenas carne de aves, 3 das 10 amostras continham também carne de ruminantes. No geral, 25 do total de 71 amostras apresentaram resultados não concordantes com a rotulagem e 22 amostras não apresentavam qualquer tipo de rotulagem.

Pascoal et al. (2004), por seu turno, analisaram 60 amostras recolhidas em supermercados regionais do Nordeste de Espanha. Neste estudo, apenas um dos nove produtos crus ou curados analisados continham a rotulagem incorreta. Em contraste, a rotulagem incorreta foi detetada em 14 dos 41 produtos submetidos a algum tipo de processamento térmico. No que toca aos patês analisados, apenas uma das seis amostras apresentava uma rotulagem incorreta visto que indicava a presença de corço mas, no entanto, não foi detetado qualquer vestígio de DNA desta espécie. Pascoal et al. (2004) verificaram também que a maioria das amostras a partir das quais não foi possível amplificar DNA correspondiam a produtos que foram submetidos a tratamentos intensos, como carnes enlatadas e patês.



Capítulo III
Parte Experimental

III.1 Materiais e Métodos

III.1.1 Amostragem

As amostras de bovino (*Bos taurus*), suíno (*Sus scrofa*), galinha (*Gallus gallus*), cabra (*Capra hircus*), ovelha (*Ovis aries*), peru (*Meleagris gallopavo*), veado (*Cervus elaphus*), pato (*Anas platyrhynchos*), coelho (*Oryctolagus cuniculus*), cavalo (*Equus caballus*) e soja (*Glycine max*) têm origem comercial e foram adquiridas em supermercados e hipermercados da região de Tondela e Viseu. Foram recolhidas também 20 amostras de produtos à base de carne com a finalidade de avaliar a robustez do método e 137 amostras de produtos à base de carne para verificação da respetiva autenticidade. Todas as amostras foram mantidas a uma temperatura de -20 °C até à sua utilização de modo a evitar a degradação enzimática do DNA.

III.1.2 Materiais

Os materiais utilizados neste trabalho foram:

- ✓ Pontas com filtro estéreis descartáveis de diferentes volumes
- ✓ Microtubos de 1,5 mL
- ✓ Microtubos de 0,2 mL
- ✓ Lâminas de bisturi estéreis
- ✓ Luvas latex
- ✓ Luvas 100 % nitrilo
- ✓ Pinças esterilizadas
- ✓ Kit NucleoSpin® Food (Macherey-Nagel, Alemanha)
- ✓ Kit NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel, Alemanha)
- ✓ Kit SureFood® ANIMAL ID Pork Sens PLUS V (R-Biopharm, Alemanha)
- ✓ Kit SureFood® ANIMAL ID Beef (R-Biopharm, Alemanha)
- ✓ Kit GeneJet PCR Purification (Thermo Scientific, Inglaterra)

III.1.3 Reagentes

Os reagentes utilizados foram:

- ✓ Água estéril *DNA/RNA free*
- ✓ Isopropanol a 99,5 %
- ✓ Etanol 100 %
- ✓ Agarose (Fisher Scientific, Reino Unido)
- ✓ Marcador molecular (GeneRuler™ 50 bp, Thermo Scientific, Reino Unido)
- ✓ Brometo de etídio (Q.BioGene, EUA)
- ✓ Corante molecular (Fermentas, Reino Unido)
- ✓ TBE 10x (MP Biomedicals, EUA)
- ✓ PCR Master Mix (DreamTaq™ PCR Master Mix, Fermentas, Reino Unido)
- ✓ TE (Fisher Scientific, Reino Unido)

III.1.4 Equipamentos

Os equipamentos utilizados neste trabalho foram:

- ✓ Banho termostático (Thermomixer compact, Eppendorf, Alemanha)
- ✓ Agitador vortex (V-I plus, Biosan, Letónia)
- ✓ Moinho (KM 300, Kenwood, Japão)
- ✓ Microcentrifuga (5415D, Eppendorf, Alemanha)
- ✓ Espectrofotómetro (Smart Sperc Plus, Bio-Rad, EUA)
- ✓ Câmara de fluxo laminar (Biocap RNA/DNA, Captair, Reino Unido)
- ✓ Termociclador (GeneAmp, Applied Biosystems, EUA)
- ✓ Transiluminador (Digidoc-it, UVP, EUA)

-
- ✓ Estufa (BD/Bed 53, WTB Binder, Alemanha)
 - ✓ Termociclador (Chromo4, Bio-Rad, EUA)
 - ✓ Balança (CENT 203, Gibertini, Itália)
 - ✓ Tina de electroforese (RunOne™, Embitet, EUA)

III.1.5 Extração do DNA

O DNA das amostras foi extraído recorrendo a dois kits comerciais: NucleoSpin® Food (Macherey-Nagel, 2012a), da Macherey-Nagel, para amostras de origem vegetal e alimentos processados (figura 7) e NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel, 2012b) para amostras de tecidos cárneos (figura 8).

Para a extração de DNA com o kit NucleoSpin® Food homogeneizaram-se as amostras e pesou-se aproximadamente 200 mg para um microtubo de 1,5 mL. Adicionou-se 550 µL de Buffer CF, pré-aquecido a 65 °C, e 10 µL de proteinase K incubando-se a 65 °C no banho termostático durante cerca de 30 min. Decorrido esse tempo a amostra foi centrifugada durante 10 min, a 11 000 g. Transferiu-se 300 µL do sobrenadante, adicionou-se o mesmo volume de etanol (96 – 100 %) e de Buffer C4 e agitou-se. A solução foi pipetada para uma coluna de NucleoSpin® Food e centrifugou-se a 11 000 g, durante 1 min. O sobrenadante foi recolhido num tubo de colheita e descartado. O DNA ligado à coluna foi lavado em duas etapas de centrifugação, de 1 min cada, usando 400 µL de Buffer CQW e 700 µL de Buffer C5 a fim de aumentar a pureza do DNA eluído. Procedeu-se a uma lavagem final da coluna com 200 µL de Buffer C5, e posterior secagem da mesma numa centrifugação adicional de 2 min a 11 000 g. Por fim, o DNA foi eluído da coluna com 100 µL de Elution Buffer CE, pré-aquecido a 70 °C, e mantido a 4 °C até à sua utilização.











1	Homogeneizar amostra		Homogeneizar 200 mg de amostra
2	Lise celular	 	550 μ L CF (65 °C) 10 μ L Proteinase K 65 °C, 30 min > 10,000 x g, 10 min Tomar 1 vol de sobrenadante e continuar para o passo 3
3	Ajuste das condições		1 vol C4 1 vol ethanol
4	Ligação do DNA	 	Eluir as amostras na coluna (máx capacidade 750 μ L) 11,000 x g, 1 min
5	Lavagem e secagem da membrana	 	1ª lavagem 400 μ L CQW 11,000 x g, 1 min 2ª lavagem 700 μ L C5 11,000 x g, 1 min 3ª lavagem 200 μ L C5 11,000 x g, 2 min
6	Eluição do DNA	 	100 μ L CE (70 °C) RT, 5 min 11,000 x g, 1 min

Figura 7: Protocolo de extração de DNA de amostras de sementes e de produtos comerciais à base de carne (adaptado de Macherey-Nagel, 2012a).

No caso das amostras cárneas cortou-se certa de 25 mg de tecido e incubou-se com 180 μ L de Buffer T1 e 25 μ L de Proteinase K a 56 °C no banho termostático até completa lise dos tecidos (certa de 1 h). Decorrido esse tempo agitaram-se as amostras, adicionou-se 200 μ L de Buffer B3 e incubou-se novamente a 70 °C, durante 10 min. As amostras foram agitadas vigorosamente e adicionou-se 210 μ L de etanol (96 - 100 %) agitando-se novamente a fim de homogeneizar a solução. Cada solução foi então pipetada para uma coluna de NucleoSpin® Tissue e centrifugou-se a 11 000 g, durante 1 min. O sobrenadante

foi recolhido num tubo de colheita e descartado. O DNA ligado à coluna foi lavado em duas etapas de centrifugação, de 1 min cada, usando 500 μL de Buffer BW e 600 μL de Buffer B5 a fim de aumentar a pureza do DNA eluído. Com o objetivo de secar a coluna procedeu-se a uma centrifugação adicional a 11 000 g, durante um 1 min, removendo assim qualquer resíduo de etanol. O etanol constitui um inibidor da reação de PCR, sendo por isso este passo crucial para o sucesso de todo o processo. Por fim, o DNA foi eluído da coluna com 100 μL de Buffer BE, pré-aquecido a 70 °C, e mantido a 4 °C até à sua utilização.











1	Preparar a amostra		Cortar 25 mg em pedaços
2	Pré-lise da amostra		180 μL T1 25 μL Proteinase K 56 °C, 1–3 h
3	Lise da amostra		200 μL B3 70 °C, 10 min
4	Ajuste das condições		210 μL 96–100% ethanol
5	Ligação do DNA	 	Eluir as amostras 11,000 x g, 1 min
6	Lavagem da membrana	 1ª e 2ª 	1ª lavagem 500 μL BW 2ª lavagem 600 μL B5 11,000 x g, 1 min
7	Secagem da membrana		11,000 x g, 1 min
8	Eluição do DNA	 	100 μL BE (70 °C) RT, 1 min 11,000 x g, 1 min

Figura 8: Protocolo de extração de DNA de amostras de tecido animal (adaptado de Macherey-Nagel, 2012b).

III.1.6 Qualidade e quantidade do DNA

A qualidade do DNA extraído foi verificada recorrendo à leitura da absorvância no espectrofotómetro. As amostras foram expostas à luz UV a 260 nm e 280 nm. O rácio A_{260}/A_{280} indica a pureza do DNA extraído. Para a amostra de soja as especificações indicam uma razão entre 1,6 e 1,9 (Macherey-Nagel, 2012a). No caso das amostras de tecido cárneo esta razão deve-se encontrar entre 1,7 e 1,9, como especificado no kit de extração (Macherey-Nagel, 2012b).

A concentração do DNA presente foi calculada segundo a seguinte equação (Sakalar e Abasiyanik, 2011):

$$[DNA] = A_{260} \times 50^{\mu L} /_{mL} \times \text{fator de diluição}$$

III.1.7 Amplificação do DNA

III.1.7.1 **Preparação da reação**

A preparação de todas as reações, excetuando a fase de adição do DNA, foram realizadas numa câmara de fluxo de ar laminar vertical.

Para a amplificação das amostras procedeu-se à preparação da reação adicionando-se 8,5 μL de água estéril *DNA/RNA free*, 0,5 μL do *primer F* e do *primer R* e por fim 12,5 μL de DreamTaq™ PCR Master Mix. Em cada corrida de amplificação é necessário um controlo negativo no qual é adicionado água estéril *DNA/RNA free* (3 μL) e é fechado ainda dentro da câmara de fluxo. Foram adicionados 3 μL de DNA da amostra no tubo respetivo perfazendo assim 25 μL de volume reacional.

III.1.7.2 **Amplificação do DNA**

A amplificação das amostras foi realizada no termociclador programado com uma desnaturação inicial a 94 °C, durante 5 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C durante 30 seg, *annealing* a 60 °C durante 30 seg e extensão a 72 °C durante 30 seg. Por fim foi realizada uma extensão final a 72 °C durante 7min.

III.1.7.3 Detecção dos produtos de PCR

Os produtos de PCR das amostras amplificadas foram sujeitos a eletroforese através de gel de agarose com concentração de 3 % em tampão TBE, a uma voltagem constante de 135 V, durante cerca de 20 min. O marcador molecular utilizado (GeneRuler™ 50 bp) permitiu a comparação com as bandas produzidas pelas amostras. O gel foi corado com 8 µL de brometo de etídio e o volume de amostra utilizado, 10 µL, foi misturado com 3,5 µL de corante molecular antes de ser aplicado no poço do gel. O gel foi visualizado e a sua fotografia obtida recorrendo a um transiluminador.

III.1.8 Material de Referência

Após a deteção dos produtos da amplificação de PCR correspondentes às amostras de bovino e suíno procedeu-se à sua purificação recorrendo ao kit comercial GeneJET PCR Purification Kit.

A purificação dos produtos de PCR foi realizada como descrito no protocolo fornecido. Ao volume restante da reação de PCR adicionou-se 50 µL de isopropanol e 50 µL de Binding Buffer e agitou-se. Transferiu-se 150 µL da solução anterior para uma coluna GeneJET Purification e centrifugou-se durante 30 seg, a 13 000 g. O sobrenadante recolhido no tubo de colheita foi descartado. A coluna foi lavada com 700 µL de Wash Buffer e centrifugou-se durante 30 seg, a 13 000 g. A secagem da coluna foi feita com uma centrifugação adicional de 1 min à mesma velocidade. Por fim, transferiu-se a coluna para um tubo de microcentrífuga e o produto de PCR purificado foi eluído com 50 µL de Elution Buffer. Deste volume retirou-se cerca de 45 µL para um microtubo de 0,2 mL e colocou-se numa estufa a 37 °C para evaporar. O restante volume foi corrido em eletroforese de gel de agarose com o objetivo de confirmar o sucesso da purificação.

Após a evaporação o produto de PCR purificado foi enviado para sequenciar para um laboratório externo juntamente com 15 µL de duas soluções 1:1 de TE e *primer* (uma com o *primer* F e outra com o *primer* R). Os fragmentos de DNA sequenciados foram tratados recorrendo ao *software* BioEdit e o fragmento obtido foi comparado com um banco de genes (base de dados do NCBI) para verificar a sua identificação.

III.1.8.1 Amplificação do DNA

Após a comprovação que as amostras de bovino e suíno adquiridas correspondiam às espécies esperadas, e portanto poderiam ser utilizadas como material de referência, iniciou-se a validação dos kits comerciais. Para a apreciação dos parâmetros de validação é necessário proceder à amplificação dos materiais de referência com esses mesmos kits.

Preparação da reação

Para a amplificação do DNA do MR de suíno utilizou-se o kit SureFood® ANIMAL ID Pork Sens PLUS V e a preparação da reação foi feita de acordo com o protocolo disponibilizado. Utilizaram-se 20 μL de *master mix*, que contém 19,9 μL de *reaction mix* e 0,1 μL de *Taq Polymerase*, aos quais foram adicionados 5 μL de DNA da amostra, obtendo-se um volume reacional de 25 μL .

No caso do MR de bovino foi utilizado o kit comercial SureFood® ANIMAL ID Beef e a preparação da reação foi feita de acordo com o protocolo fornecido, sendo igual ao utilizado na amostra de suíno.

Amplificação do DNA

A amplificação do DNA do MR no termociclador de tempo real foi programada com as condições de reação descritas nos protocolos fornecidos pelos kits. No caso do protocolo para suíno procedeu-se a uma desnaturação inicial de 5 min a 95 °C, seguindo-se 35 ciclos de desnaturação a 95 °C durante 15 seg e uma fase de *annealing* e extensão a 55 °C durante 30 seg. A leitura da absorvância foi feita recorrendo à sonda FAM. Este kit possui um controlo interno de amplificação e a leitura da sua absorvância é feita recorrendo à sonda VIC. Uma amostra é considerada positiva quando há amplificação do DNA da amostra (sonda FAM). No caso de ser negativa a amostra não apresenta amplificação do DNA da amostra (sonda FAM) mas apresenta amplificação no controlo interno (sonda VIC).

O protocolo para bovino apresentou algumas modificações. Procedeu-se a uma desnaturação inicial a 95 °C durante 5 min seguindo-se 35 ciclos de desnaturação a 95 °C durante 10 seg, *annealing* a 48 °C durante 15 seg e, por último, extensão a 55 °C durante 30 seg. Tal como para o protocolo de suíno, a leitura da absorvância foi também feita recorren-

do à sonda FAM. Este kit não possui controlo interno de amplificação.

III.1.9 Validação

III.1.9.1 **Precisão**

Repetibilidade

Após se ter estabelecido que as amostras de bovino e suíno adquiridas correspondiam às espécies pretendidas e poderiam ser utilizadas como material de referência, iniciaram-se os testes de validação dos kits. Na avaliação da precisão do método é importante determinar a repetibilidade do mesmo. Para tal foram amplificadas três alíquotas da mesma amostra e o valor de C_T das curvas obtidas permitiu o cálculo da média e do desvio-padrão para cada um dos métodos.

Precisão Intermédia

Para a avaliação deste parâmetro efetuou-se a amplificação dos MR por dois operadores diferentes no mesmo dia. Após este passo procedeu-se à amplificação do DNA em diferentes dias, mas pelo mesmo operador. Em cada curva de amplificação obtida foi retirado o valor de C_T e a sua média e o desvio-padrão calculados.

III.1.9.2 **Limite de deteção**

Para os testes de sensibilidade do método decidiu-se recorrer a uma série de diluições do DNA extraído do MR. Inicialmente foi lida a concentração do DNA presente na solução e procedeu-se a uma série de diluições com cinco níveis concentrações. De acordo com a Norma Francesa XP U47-600-2 (2011) que afirma que o limite de deteção de um método de PCR deve ser determinado utilizando uma série de diluições sucessivas, foram amplificadas diluições com as concentrações de 1 $\mu\text{g/mL}$, 0,1 $\mu\text{g/mL}$, 0,01 $\mu\text{g/mL}$, 0,001 $\mu\text{g/mL}$ e 0,0001 $\mu\text{g/mL}$. Esta última diluição apenas foi utilizada no método de pesquisa de suíno. A amplificação foi realizada como descrito anteriormente e o limite de deteção foi considerado como a concentração mais baixa que é possível amplificar.

III.1.9.3 Especificidade

Após a determinação da sensibilidade procedeu-se à verificação da especificidade do método. Para tal extraíram-se várias amostras de espécies diferentes e o seu DNA foi amplificado com o objetivo de verificar não só se a espécie estava correta como também se a extração do DNA foi bem sucedida. Posteriormente procedeu-se à pesquisa de DNA de suíno e bovino em cada uma destas amostras.

III.1.9.4 Robustez

Para finalizar variaram-se alguns parâmetros críticos do método, como o grau de processamento das amostras e a presença de potenciais inibidores da reação. Atualmente, muitos produtos alimentares são feitos com vários tipos de matéria orgânica de origem animal e vegetal e com vários compostos inorgânicos que podem interferir com a extração do DNA ou inibir o processo de PCR (Tanabe et al., 2007b).

Para verificar a robustez do método utilizaram-se 20 amostras de produtos alimentares bastante processados e que continham na sua constituição potenciais inibidores, consideradas por isso matrizes complicadas (tabela 2). As amostras sofreram um processo de extração de DNA como descrito anteriormente e foi pesquisada uma das espécies rotuladas, bovino ou suíno.

III.1.10 Aplicação do método a produtos comerciais à base de carne

Após a validação dos métodos de pesquisa de DNA suíno e bovino em foram analisadas várias amostras de produtos alimentares à base de carne disponíveis no mercado. Durante o período de outubro de 2012 a abril de 2013 foram recolhidas um total de 137 amostras de supermercados na zona de Tondela e Viseu. Todos os produtos recolhidos sofreram algum tipo de processamento e tinham na sua composição uma ou várias espécies cárneas, especiarias e outros ingredientes. A lista de ingredientes declarada na embalagem de cada produto foi registada e consultada durante a interpretação dos resultados. Todas as amostras foram armazenadas a -20 °C até à sua utilização.

O DNA de cada amostra foi extraído como descrito anteriormente e posteriormente amplificado com os kits de pesquisa de suíno e de bovino. Os resultados obtidos

foram então comparados com o rótulo de cada produto.

Tabela 2: Produtos alimentares à base de carne utilizados para determinar a robustez dos dois métodos.

Tipo de amostra	Amostra	Espécie rotulada a pesquisar	Outras espécies rotuladas	Outros ingredientes
Patê de porco e aves	A	Suíno (fígado)	Pato (gordura)	Pimenta verde; sal; especiarias
	B	Suíno (fígado)	Pato (gordura)	Sal; especiarias;
Chouriço de porco preto	C	Suíno (porco preto)		Sal; pimentão; pimenta
Farinheira	D	Suíno (gordura)		Sal; pimentão; noz-moscada; canela; pimenta
Salsichas tipo Frankfurt	E	Suíno	Peru; galinha	Sal; especiarias
	F	Suíno	Aves; soja	Sal; especiarias
Lasanha à bolonhesa	G	Suíno		Óleo vegetal; sal; especiarias
	H	Suíno		Óleo e margarina vegetal; sal; especiarias
Fiambre da perna extra	I	Suíno		Sal
Paio York da pá	J	Suíno		Sal; especiarias
Rissóis de carne	K	Suíno	Bovino	Sal; mistura de especiarias; óleo alimentar; pimenta
Folhados mistos	L	Suíno	Soja	Sal; especiarias
Croquetes de carne	M	Suíno	Bovino	Gordura vegetal; sal; pimenta; especiarias
Canelones	N	Bovino	Soja	Margarina vegetal; óleo vegetal; sal; especiarias
Hambúrguer de bovino	O	Bovino	Soja	Sal; especiarias; óleo de colza e palma
Lasanha à bolonhesa	P	Bovino		Óleo de girassol; sal;
Empadão de carne de vaca	Q	Bovino	Suíno (gordura)	Sal; noz-moscada; pimenta branca
	R	Bovino		Sal; noz-moscada; pimenta branca
Rissóis de carne	S	Bovino	Suíno (gordura)	Sal; óleo alimentar; especiarias; pimenta
	T	Bovino	Suíno (gordura)	Sal; óleo alimentar; especiarias; pimenta

III.2 Resultados

III.2.1 Material de Referência

Foram adquiridas duas amostras comerciais de suíno e bovino com objetivo de serem estabelecidas como material de referência. Procedeu-se então à extração de DNA, à sua amplificação e por fim à detecção dos produtos de PCR em gel de agarose. Conforme mostra a figura 9 foram obtidas bandas do tamanho esperado, 362 bp no caso do suíno e 216 bp no caso do bovino.

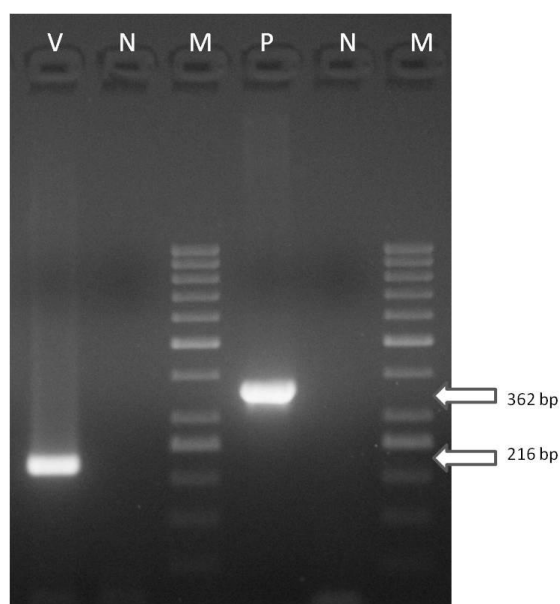


Figura 9: Detecção de produtos de PCR em gel de agarose a 3 %.

V: amostra de bovino; P: amostra de suíno; N: controle negativo; M: marcador molecular

Os produtos de PCR foram purificados antes de serem enviados para sequenciar. Após serem corridos em gel de agarose a sua fotografia foi obtida, observando-se apenas uma única banda com o tamanho esperado (figura 10).

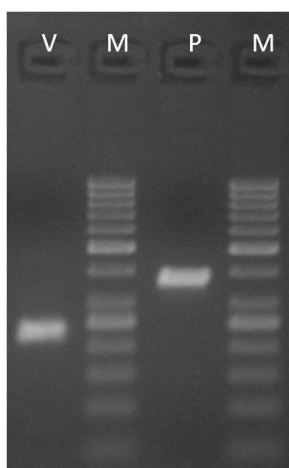


Figura 10: Detecção de produtos de PCR purificados em gel de agarose a 3 %.

V: amostra de bovino após purificação; P: amostra de suíno após purificação; M: marcador molecular

Os resultados da sequenciação foram tratados no *software* BioEdit. Comprovou-se que o fragmento de suíno e de bovino após serem sequenciados apresentavam 98 % e 99 % de similaridade com a espécie *Sus scrofa* e *Bos taurus*, respetivamente, quando comparado com a base de dados do banco de genes NCBI. Este resultado permitiu que estas amostras fossem utilizadas como material de referência das respetivas espécies.

III.2.2 Validação

III.2.2.1 **Precisão**

Repetibilidade

Na avaliação da repetibilidade amplificaram-se três alíquotas da mesma amostra. As curvas de amplificação encontram-se representadas nas figuras 11 e 12 e os C_T 's obtidos, a média e desvio padrão encontram-se na tabela 3.

Tabela 3: Determinação da repetibilidade dos métodos de pesquisa de bovino e suíno.

Amostra	Alíquotas	C_T	Amostra	Alíquotas	C_T
Bovino	1	17,09	Suíno	1	24,86
	2	17,77		2	25,34
	3	18,25		3	25,28
	Média	17,70		Média	25,16
	Desvio-padrão	0,583		Desvio-padrão	0,262

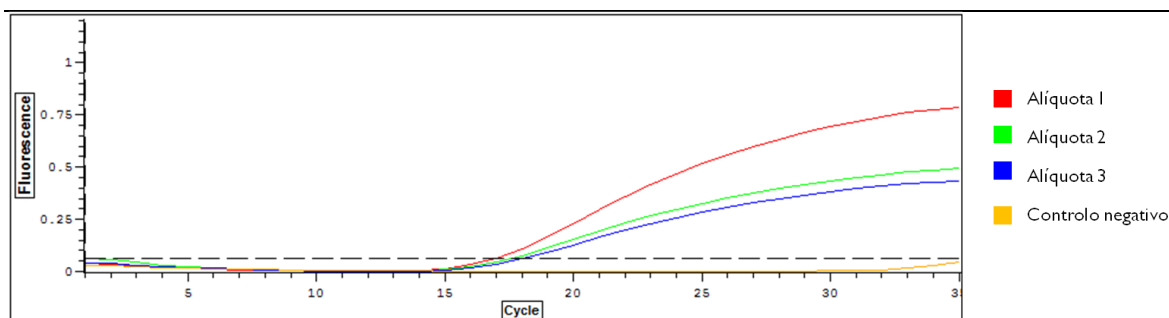


Figura 11: Curvas de amplificação das alíquotas utilizadas no teste de repetibilidade do método de pesquisa de bovino.

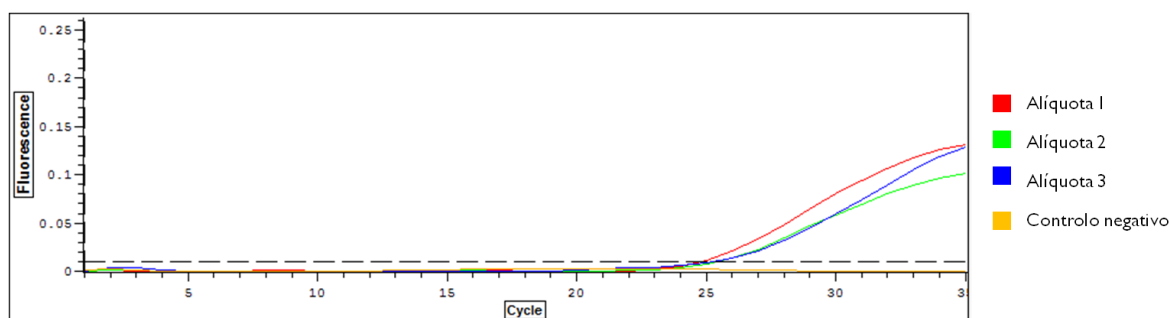


Figura 12: Curvas de amplificação das alíquotas utilizadas no teste de repetibilidade do método de pesquisa de suíno.

Precisão intermédia

Para a determinação da precisão intermédia dos kits foram amplificadas amostras em dias diferentes (tabela 4). Com os C_T 's obtidos calculou-se a média e o desvio-padrão para cada uma das amostras.

Posteriormente as amostras foram amplificadas as amostras por dois operadores diferentes sendo calculada também a média e o desvio-padrão dos C_T 's obtidos (tabela 5).

Tabela 4: Determinação da precisão intermédia inter-dia.

Amostra	Dia	C _T	Amostra	Dia	C _T
Bovino	1	16,29	Suíno	1	27,07
	2	16,04		2	25,61
	3	17,41		3	25,78
	4	15,95		4	26,97
	5	16,56		5	26,63
	6	16,12		6	26,42
	7	16,37		7	26,26
	8	16,72		8	26,32
	9	15,89		9	25,04
	10	16,48		10	25,05
	11	16,68		11	25,86
	12	16,13		12	26,97
	13	16,44		13	26,30
	14	16,31		14	26,61
	15	16,76		15	25,86
Média	16,41	Média	26,18		
Desvio-padrão	0,390	Desvio-padrão	0,643		

Tabela 5: Determinação da precisão intermédia variando o operador.

Amostra	Operador	C _T	Amostra	Operador	C _T
Bovino	A	16,04	Suíno	A	26,63
		15,95			25,67
		16,59			26,48
	B	15,97		B	24,03
		16,47			26,06
		16,19			25,94
	Média	16,20		Média	25,80
	Desvio-padrão	0,271		Desvio-padrão	0,937

III.2.2.2 Limite de deteção

O limite de deteção do método foi testado usando uma série de diluições do DNA obtido do MR com cinco níveis de concentração (1 µg/mL, 0,1 µg/mL, 0,01 µg/mL, 0,001 µg/mL e 0,0001 µg/mL) para DNA de suíno (tabela 6) e quatro níveis de concentração (1 µg/mL, 0,1 µg/mL, 0,01 µg/mL, 0,001 µg/mL) para DNA de bovino (tabela 7).

Tabela 6: Série de diluições utilizada para estabelecer o limite de detecção do método de pesquisa de DNA de suíno.

Diluições	Concentração de DNA ($\mu\text{g/mL}$)	Volume da solução anterior (μL)	Volume de água (μL)	Volume total (μL)
Solução inicial	58,16	-	-	-
Diluição 1	1	3,4	196,6	200
Diluição 2	0,1	20	180	200
Diluição 3	0,01	20	180	200
Diluição 4	0,001	20	180	200
Diluição 5	0,0001	20	180	200

Tabela 7: Série de diluições utilizada para estabelecer o limite de detecção do método de pesquisa de DNA de bovino.

Diluições	Concentração de DNA ($\mu\text{g/mL}$)	Volume da solução anterior (μL)	Volume de água (μL)	Volume total (μL)
Solução inicial	46,38	-	-	-
Diluição 1	1	4,3	195,7	200
Diluição 2	0,1	20	180	200
Diluição 3	0,01	20	180	200
Diluição 4	0,001	20	180	200

Depois de amplificadas as soluções o limite de detecção foi estabelecido em 0,01 $\mu\text{g/mL}$ para o bovino e 0,001 $\mu\text{g/mL}$ para o suíno. As curvas de amplificação estão representadas na figura 13 e 14, respectivamente.

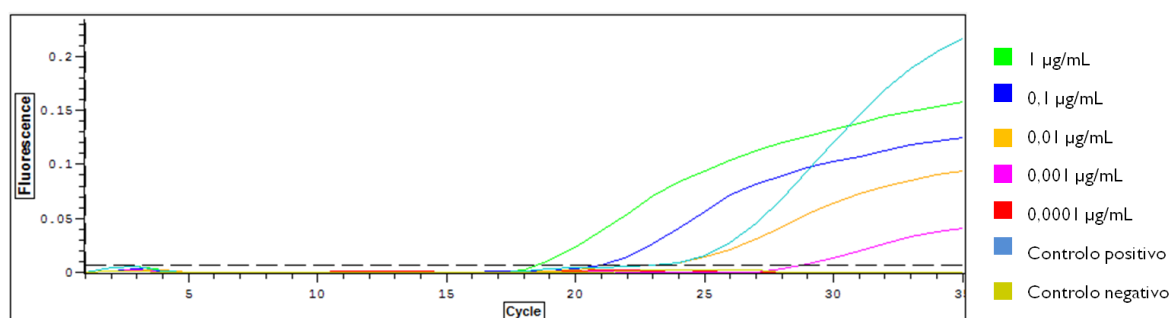


Figura 13: Curvas de amplificação da série de diluições utilizada no teste do limite de detecção do método de pesquisa de suíno.

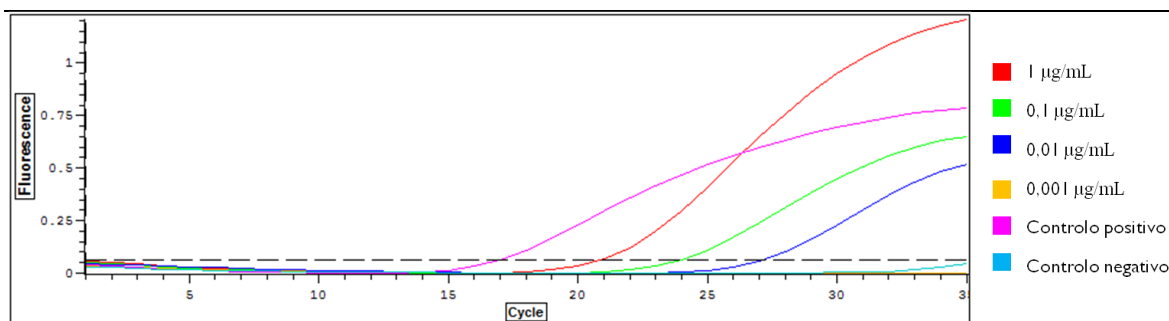


Figura 14: Curvas de amplificação da série de diluições utilizada no teste do limite de detecção do método de pesquisa de bovino.

III.2.2.3 Especificidade

A identificação de espécies é realizada em produtos complexos onde muitas vezes estão presentes várias espécies. A especificidade do método constitui portanto um parâmetro essencial para a sua validação. Utilizou-se um grande painel de espécies, como galinha, cabra, ovelha, peru, veado, pato, coelho, cavalo e soja. Após a extração do DNA a sua absorvância foi lida e o rácio A_{260}/A_{280} e a sua concentração calculadas (tabela 8). O rácio A_{260}/A_{280} indica que a qualidade do DNA extraído é adequada para a sua amplificação.

Tabela 8: Rácio A_{260}/A_{280} e concentração das amostras utilizadas nos testes de especificidade.

Amostra	A_{260}/A_{280}	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)
Galinha	1,8300	71,92
Cabra	1,7581	124,6416
Ovelha	1,6700	49,9683
Peru	1,8110	47,5759
Veado	1,6724	123,8527
Pato	1,8600	37,33
Coelho	1,6968	109,451
Cavalo	1,6968	27,7938
Soja	1,6402	19,8317

Todas as amostras foram então amplificadas e corridas em gel de agarose obtendo-se bandas do tamanho esperado (figura 15).

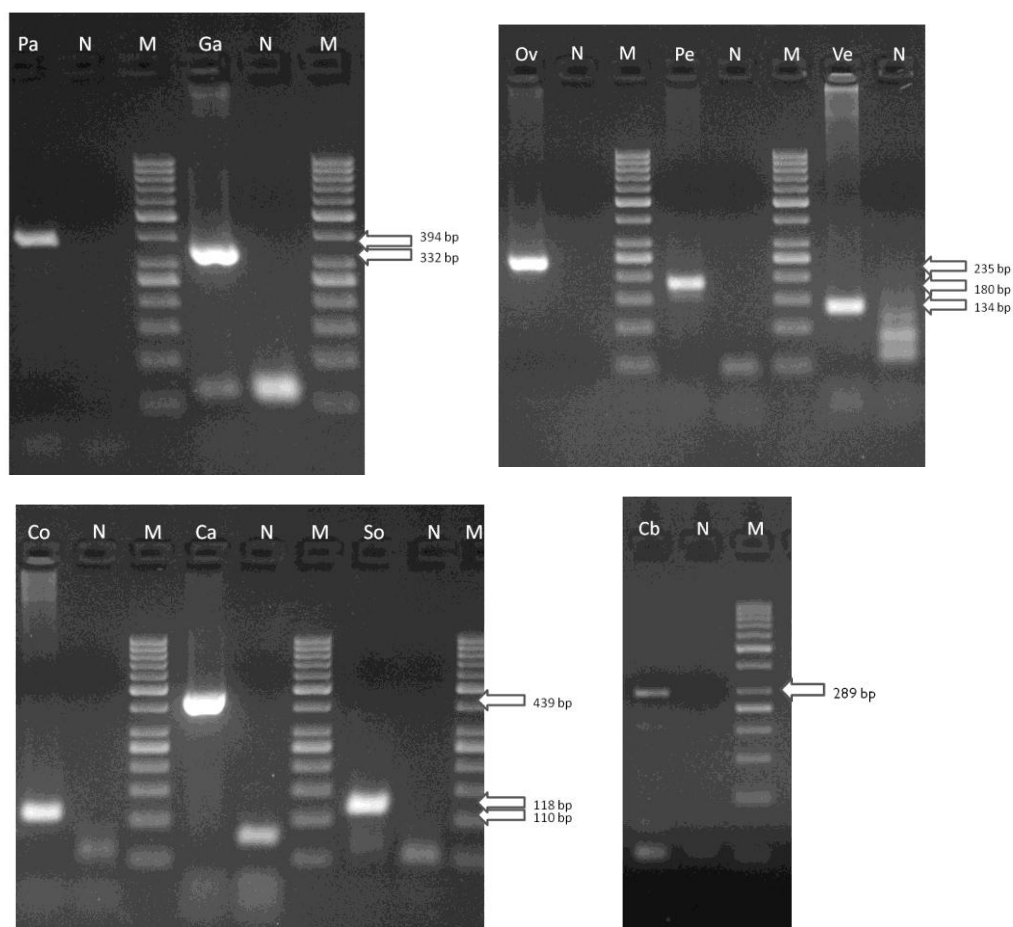


Figura 15: Detecção de produtos de PCR em gel de agarose a 3 % das espécies para os testes de especificidade.

Pa: amostra de pato; Ga: amostra de galinha; Ov: amostra de ovelha; Pe: amostra de peru; Ve: amostra de veado; Co: amostra de coelho; Ca: amostra de cavalo; So: amostra de soja; Cb: amostra de cabra N: controlo negativo; M: marcador molecular

Para se detetar a possibilidade de reações cruzadas, cada um dos kits foi utilizado na amplificação das espécies não-alvo. Através das curvas de amplificação representadas nas figuras 16 e 17 pode-se verificar que não houve amplificação de nenhuma das espécies que não as espécies-alvo. No caso do suíno também foi possível verificar que a amplificação correu como o esperado, visto que o controlo interno amplificou em todas as amostras (figura 18).

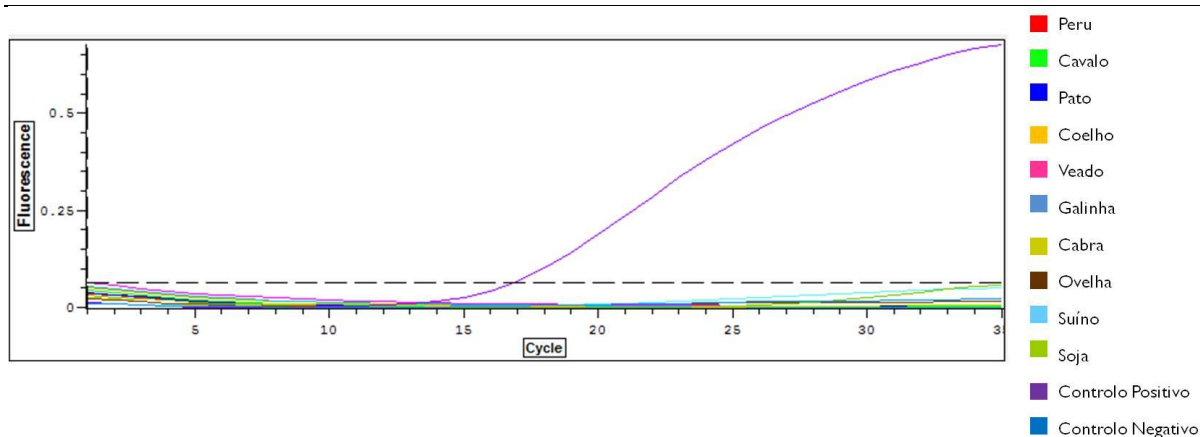


Figura 16: Curvas de amplificação das várias espécies utilizadas no teste de especificidade do método de pesquisa de bovino.

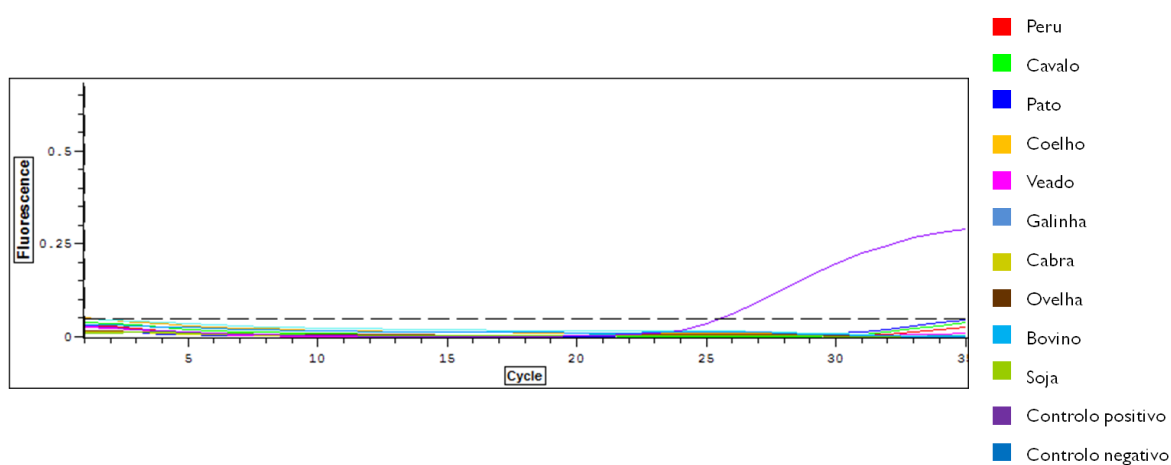


Figura 17: Curvas de amplificação das várias espécies utilizadas no teste de especificidade do método de pesquisa de suíno.

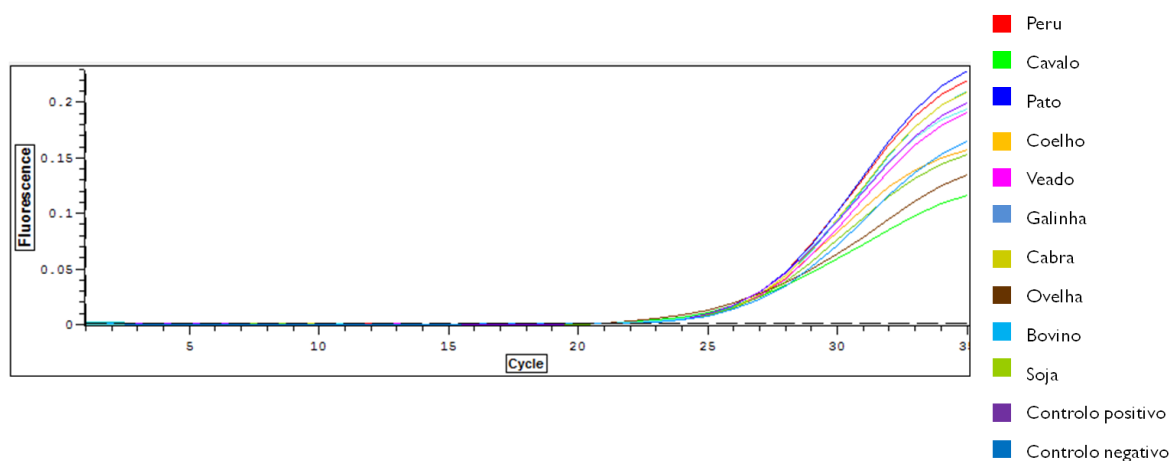


Figura 18: Curvas de amplificação do controlo interno das várias espécies utilizadas no teste de especificidade do método de pesquisa de suíno.

III.2.2.4 Robustez

Todas as amostras sofreram um processo de extração de DNA e uma das espécies rotuladas, suíno ou bovino, foi pesquisada. As curvas de amplificação, quer das amostras, quer do controlo interno de amplificação, encontram-se representadas nas figuras 19 a 24 na pesquisa de suíno e nas figuras 25 e 26 na pesquisa de bovino.

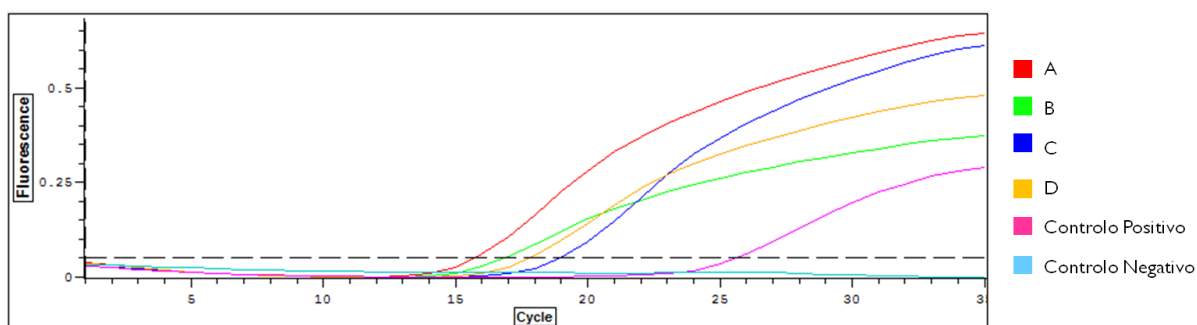


Figura 19: Curvas de amplificação das amostras A, B, C e D na pesquisa de suíno.

A: Patê de porco e aves; B: Patê de porco e aves; C: Chouriço de porco preto; D: Farinheira

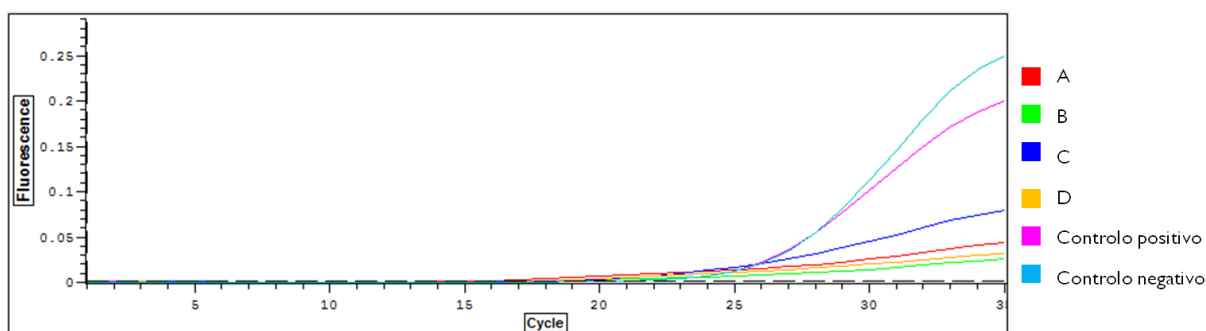


Figura 20: Curvas de amplificação do controlo interno das amostras A, B, C e D na pesquisa de suíno.

A: Patê de porco e aves; B: Patê de porco e aves; C: Chouriço de porco preto; D: Farinheira

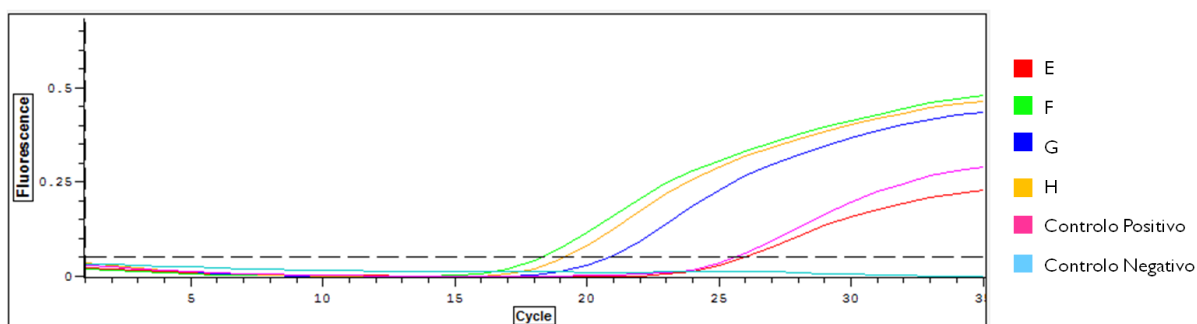


Figura 21: Curvas de amplificação das amostras E, F, G e H na pesquisa de suíno.

E: Salsichas tipo Frankfurt; F: Salsichas tipo Frankfurt; G: Lasanha à bolonhesa; H: Lasanha à bolonhesa

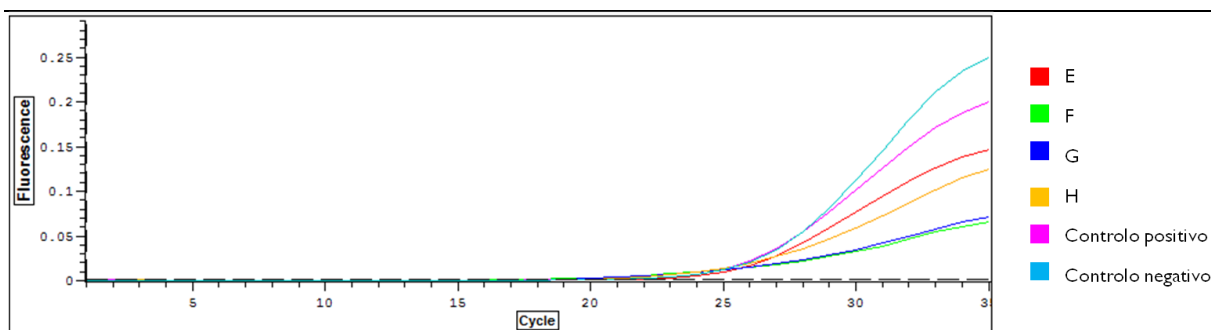


Figura 22: Curvas de amplificação do controlo interno das amostras E, F, G e H na pesquisa de suíno.

E: Salsichas tipo Frankfurt; F: Salsichas tipo Frankfurt; G: Lasanha à bolonhesa; H: Lasanha à bolonhesa

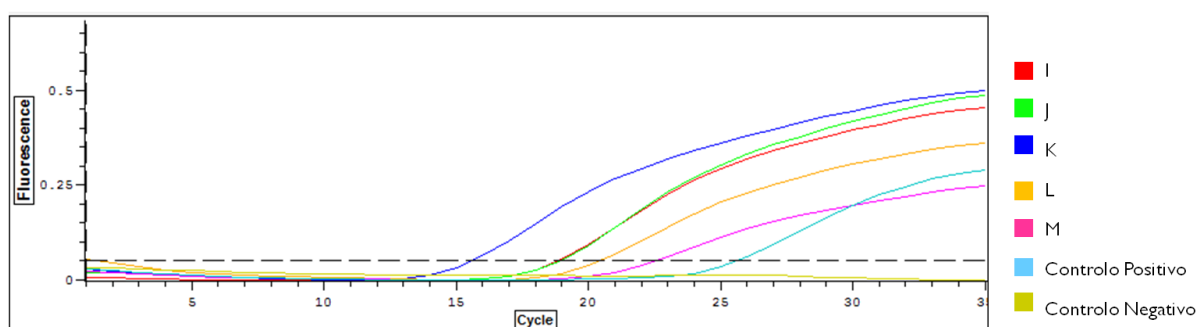


Figura 23: Curvas de amplificação das amostras I, J, K, L e M na pesquisa de suíno.

I: Fiambre da perna extra; J: Paio York da pá; K: Rissóis de carne; L: Folhados mistos; M: Croquetes de carne

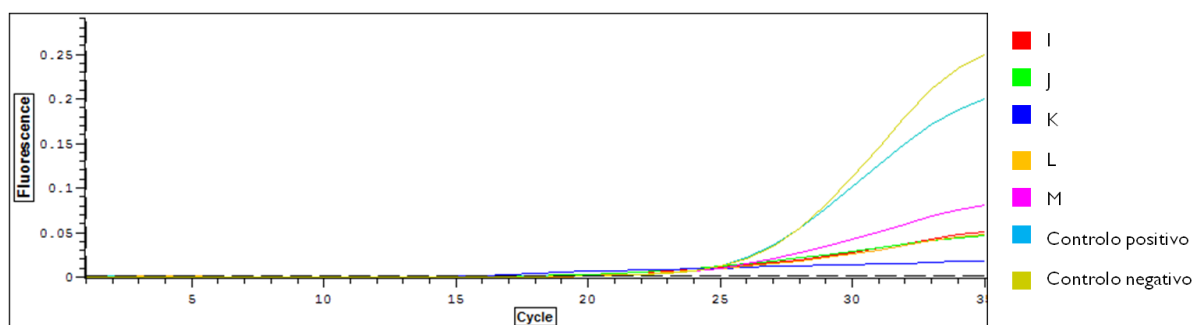


Figura 24: Curvas de amplificação do controlo interno das amostras I, J, K, L e M na pesquisa de suíno.

I: Fiambre da perna extra; J: Paio York da pá; K: Rissóis de carne; L: Folhados mistos; M: Croquetes de carne

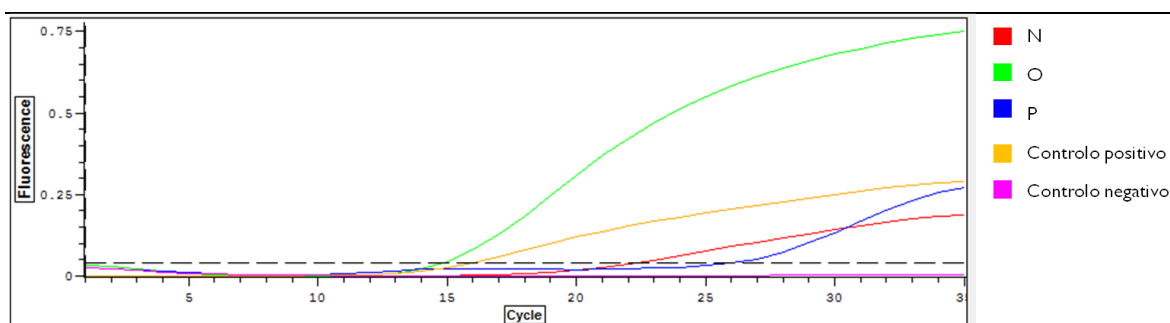


Figura 25: Curvas de amplificação das amostras N, O e P na pesquisa de bovino.

N: Canelones; O: Hambúrguer de bovino; P: Lasanha à bolonhesa

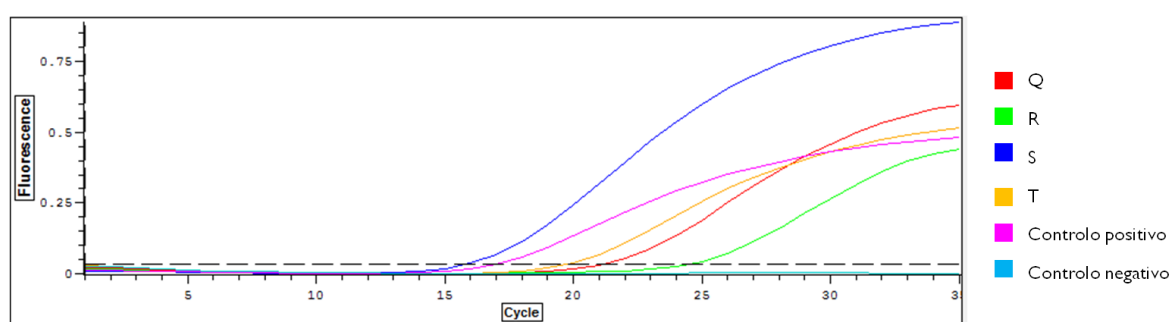


Figura 26: Curvas de amplificação das amostras Q, R, S e T na pesquisa de bovino.

Q: Empadão de carne de vaca; R: Empadão de carne de vaca; S: Rissóis de carne; T: Rissóis de carne

III.2.3 Aplicação do método a produtos comerciais à base de carne

Foram recolhidas 137 amostras presentes no mercado (tabela 9). Após a extração do DNA foi pesquisado em todas as amostras DNA de suíno e bovino. Os resultados obtidos desta pesquisa foram comparados com a rotulagem de cada produto e os resultados estão apresentados na tabela 9. Na rotulagem dos produtos apenas foi tida em conta a presença ou ausência de suíno e/ou bovino. Após o tratamento dos resultados concluiu-se que sete amostras (5,11 %) apresentavam a lista de ingredientes incorreta. A carne de suíno é a mais utilizada neste tipo de produtos alimentares, estando rotulada em 109 das 137 amostras analisadas. Das amostras rotuladas como contendo carne de suíno uma delas (0,92 %), um empadão de carne, não apresentava qualquer traço de DNA desta espécie. Por outro lado, cinco (17,86 %) das 28 amostras que não declaravam carne de suíno no rótulo apresentaram um resultado positivo na pesquisa desta espécie. Este grupo de amostras é constituído por chamuças de carne, mousse de pato, hambúrguer de peru e dois hambúrgueres de bovino.

No que diz respeito à espécie de bovino, foram testadas 25 amostras que apresentavam esta espécie na lista de ingredientes. No entanto, em uma amostra (4 %) não foi detetado DNA desta espécie. No caso das amostras que não continham carne de bovino declarada todas apresentaram resultado negativo quando foi pesquisado DNA desta espécie.

Tabela 9: Resultados do estudo de autenticidade de produtos à base de carne comercializados em Portugal.

Produto	N	Espécies declaradas	Espécies detetadas
Mortadela fatiada	1	P+V	P+V
Mortadela com azeitonas fatiada	1	P+V	P
Cheeseburger	1	P	P
Chickenburger	1	NR	ND
Hotdog	1	P	P
Chouriço de porco preto	1	P	P
Chouriço	13	P	P
Farinheira	8	P	P
Chouriço preto	3	P	P
Chouriço de vinho	2	P	P
Enchidos variados (morcela, farinheira, chouriço e alheira)	1	P	P
Fuet	1	P	P
Pizza fiambre e queijo	1	P	P
Pizza carbonara	1	P	P
Pizza romana	2	P	P
Pizza presunto	1	P	P
Paté de porco	3	P	P
Paté de pato	1	P	P
Paté de frango	1	P	P
Morcela	4	P	P
Rissóis de carne	3	P+V	P+V
Croquetes de carne	3	P+V	P+V
Chamuças de carne	1	V	P+V
Empadas de carne	1	P+V	P+V
Folhados de carne	2	P+V	P+V
Folhados mistos	1	P	P
Chamuças de carne	2	V	V
Folhado de salsicha	2	P	P
Empadas de galinha	2	NR	ND
Foudant de pato	2	NR	ND
Mousse de pato	2	NR	ND
Mousse de pato	1	NR	P
Paté porco e aves	3	P	P
Linguiça	1	P	P

Salsicha de churrasco	4	P	P
Alheira	1	P	P
Empadão de carne	1	P+V	P+V
Moira	1	P	P
Hambúrguer de frango	2	NR	ND
Lasanha à bolonhesa	3	P	P
Cannellone à bolonhesa	3	V	V
Pão com chouriço	1	P	P
Chouriço	5	P	P
Paio York	3	P	P
Torresmo	1	P	P
Fiambre de frango	2	NR	ND
Fiambre da perna de peru	1	NR	ND
<i>Cordon bleu</i>	1	NR	ND
Hambúrguer peru	1	NR	P
Nuggets peito de frango	2	NR	ND
Pizza <i>pepperoni</i>	1	P	P
Pizza quatro estações	1	P	P
Pizza havaiana	1	P	P
Lasanha à bolonhesa	1	V	V
Chili de carne com arroz	1	V	V
Salsicha alemã	12	P	P
Salame fatiado	2	P	P
Tagliatelle à carbonara	1	P	P
Esparguete à bolonhesa	1	V	V
Empadão de carne	1	P+V	V
Fiambre extra fumado	1	P	P
Fiambre da perna extra	3	P	P
Tortelini	1	P	P
Almondegas com puré	1	V	V
Rojões com migas	1	P	P
Hambúrguer	2	V	P+V

Amostras com rotulagem incorreta estão assinaladas com negrito

N: número de amostras | NR: não declarada nenhuma das espécies (suíno ou bovino) | ND: não detetada nenhuma das espécies pesquisadas (suíno ou bovino)

III.3 Discussão de Resultados

O maior desafio das agências de controlo alimentar de todo o mundo é a determinação das espécies de carne presentes nos produtos alimentares. Para a proteção da confiança e segurança do consumidor é importante assegurar a qualidade dos produtos, por isso a verificação das espécies declaradas é importante por vários motivos: por razões éticas certos grupos rejeitam o consumo de determinadas espécies, por razões de saúde certas pessoas evitam o consumo de determinadas carnes, e pela possível perda económica devido à substituição fraudulenta de espécies de carne mais caras por outras com menor valor económico (Iwobi et al., 2012).

A substituição de espécies cárneas ocorre mais regularmente em produtos alimentares processados, como por exemplo salsichas, carne picada, produtos curados e produtos de elevado valor. Uma das possíveis razões para a substituição deliberada de espécies por outras de menor valor comercial é a maior dificuldade para a sua deteção visual neste tipo de produtos. As técnicas de processamento utilizadas na indústria alimentar alteram a aparência, cor, textura e sabor da carne, o que dificulta a distinção entre as várias espécies presentes numa mistura. Outra razão para a presença de espécies não rotuladas nos produtos é a elevada probabilidade de ocorrência de contaminações cruzadas durante o processamento devido à incorreta lavagem dos equipamentos (Cawthorn et al., 2013).

A identificação de espécies animais representa um importante tópico no controlo alimentar e por isso são necessárias metodologias modernas, robustas e eficazes que permitam dar resposta aos atuais problemas de autenticidade (Azmi et al., 2011). O uso da técnica de PCR em tempo real na análise de produtos alimentar tem sido descrito por vários autores como sendo uma metodologia bastante eficiente e com elevada especificidade e sensibilidade (Demirhan et al., 2012; Jonker et al., 2008; Kesmen et al., 2012; Laube et al., 2003; Santos et al., 2012; Rojas et al., 2010). Em estudos já publicados, quando a técnica de PCR é utilizada em produtos cárneos, a região amplificada corresponde geralmente a um fragmento do DNA mitocondrial da espécie (Edris et al., 2012). No presente trabalho foi também utilizado o mtDNA visto que este apresenta um elevado número de cópias por célula, é mais resistente à fragmentação provocada pelo calor e permite uma maior diferenciação entre espécies estreitamente relacionadas (Kesmen et al., 2012). A sua utilização em produtos alimentares processados e onde estão presentes misturas de várias espécies constitui portanto uma vantagem.

Neste estudo foram utilizados dois kits comerciais, SureFood® ANIMAL ID Pork Sens PLUS V para a pesquisa de suíno e SureFood® ANIMAL ID Beef para a pesquisa de bovino. Procedeu-se à sua validação avaliando-se parâmetros como a sensibilidade, especificidade, precisão, robustez e aplicabilidade dos métodos. Iniciou-se a validação do método pela avaliação da sua precisão. Nos testes da repetibilidade obteve-se um desvio padrão de 0,583 e 0,262 para o bovino e para o suíno, respetivamente. Na avaliação da precisão inter-dias foi obtido um desvio padrão de 0,390 e 0,643 e no caso da variação do operador de 0,271 e 0,937, para o bovino e para o suíno, respetivamente. Sendo este um método qualitativo não é possível avaliar este parâmetro comparando com valores de referência. No entanto não foi obtida uma variação estatisticamente significativa dos C_T 's, sendo até inferior a um ciclo, o que permite concluir que ambos os métodos são precisos.

Nos resultados dos testes de sensibilidade foi utilizada uma série de diluições, com concentrações de 1 $\mu\text{g/mL}$, 0,1 $\mu\text{g/mL}$, 0,01 $\mu\text{g/mL}$, 0,001 $\mu\text{g/mL}$ e 0,0001 $\mu\text{g/mL}$. Esta última diluição apenas foi utilizada no método de pesquisa de suíno. A espécie de suíno foi detetada até uma concentração de 0,001 $\mu\text{g/mL}$ e o bovino até uma concentração de 0,01 $\mu\text{g/mL}$. Comparando com estudos já publicados é possível verificar que o limite de deteção varia consoante o método utilizado. Demirhan et al. (2012), utilizando a técnica de PCR em tempo real, obtiveram um limite de deteção de 1% no seu estudo de pesquisa de suíno em gelatinas halal. Branko et al. (2009) utilizando a técnica de PCR convencional determinaram que o seu método apresentava uma sensibilidade de 1%, tanto para a pesquisa de suíno como de bovino. Pascoal et al. (2004) descreveram um método que utiliza a técnica de PCR-RFLP cujo limite de deteção foi de 0,5%. Unajak et al. (2011) utilizaram a técnica de nested-PCR, tendo obtido um limite de deteção de 1 ng para a pesquisa de suíno e 0,001 ng para a pesquisa de bovino. De um modo, geral é possível constatar que a técnica de PCR em tempo real apresenta valores de limite de deteção mais baixos. Quando é necessário um nível de deteção inferior o número de ciclos do método pode ser aumentado (Jonker et al., 2008). Tal alteração permite a deteção de concentrações inferiores de DNA, no entanto aumenta também o tempo da análise. Na rotina do laboratório esta modificação apenas será vantajosa em casos pontuais, quando é necessário um limite de deteção muito baixo.

Os métodos de identificação de espécies são aplicados em produtos complexos, muitas vezes com várias espécies presentes. Consequentemente foram testadas dez espécies na avaliação da especificidade dos métodos, sendo elas suíno, ou bovino, galinha, cabra, ovelha, peru, veado, pato, coelho, cavalo e soja, não tendo sido detetada qualquer reação cruza-

da. Este resultado permite concluir que os *primers* e sondas presentes nos kits utilizados são bastante específicos, podendo ser utilizados com segurança em amostras complexas.

A pureza dos ácidos nucleicos é particularmente importante na técnica de PCR em tempo real visto que a presença de contaminantes pode interferir com a detecção da fluorescência (Kesmen et al., 2012). Este tipo de contaminantes, como sal, especiarias ou óleos, estão presentes em muitos produtos alimentares e podem inibir o processo e conduzir a resultados falsos-negativos (Laube et al., 2003). Para contornar este problema é recomendado o uso de um controlo interno de amplificação durante o processo, tendo sido utilizado um na pesquisa de DNA de suíno. Dependendo do grau de processamento dos produtos (tratamentos térmicos, pressão elevada, trituração, etc.), o DNA das espécies utilizadas pode encontrar-se fragmentado dificultando a sua detecção. É por isso importante desenvolver um método robusto para a pesquisa de espécies em misturas e nos produtos comerciais à base de carne. Nos gráficos obtidos na amplificação das amostras utilizadas na avaliação da robustez observa-se que, apesar dos processos de tratamento e dos possíveis inibidores presentes nas amostras, foi possível detetar a espécie que se pretendia. O controlo interno utilizado na pesquisa de suíno permite concluir que todas as amostras foram amplificadas corretamente, não havendo portanto nenhum resultado falso negativo. Estes resultados são concordantes com outros obtidos por vários autores. No estudo elaborado por Laube et al. (2003) foi possível detetar a espécie respetiva em todas as amostras de produtos alimentares que para além do elevado processamento que sofreram continham também especiarias, óleos e molhos na sua constituição. Arslan et al. (2006) concluíram que a identificação de espécies por PCR é afetada pela temperatura e tempo da cocção dos alimentos e também pelo tamanho do fragmento do DNA que se pretende amplificar. No entanto, foi possível identificar corretamente as espécies em todos os métodos de cozedura, à exceção das amostras que sofreram uma fritura excessiva (durante 80 min). Musto (2011) concluiu que os grandes fragmentos de mtDNA e nDNA foram amplificados com sucesso tanto em alimentos crus como cozinhados, indicando que pequenos procedimentos térmicos não danificam excessivamente o DNA.

Após a validação dos dois métodos procedeu-se à aplicação dos mesmos em produtos comerciais. Analisaram-se 137 amostras de produtos alimentares disponíveis em supermercados e hipermercados onde foi pesquisado DNA de suíno e de bovino. Após a avaliação dos resultados e sua comparação com a lista de ingredientes de cada produto foram detetados sete produtos (5,11%) com uma incorreta rotulagem. Das amostras analisadas a espécie

de suíno é a mais utilizada nas adulterações. Três dessas amostras estavam rotuladas como contendo apenas carne de bovino, no entanto foi também detetada carne de suíno. Tal ocorrência pode dever-se ao facto de a carne de bovino ter um valor comercial superior à carne de suíno, o que poderá levar os produtores a substituírem parcialmente a carne de bovino. O mesmo sucede com a amostra de hambúrguer de peru e com o mousse de pato onde foi detetada carne de suíno. Outra justificação poderá ser a utilização da mesma linha de fabrico para vários produtos que contenham espécies diferentes, o que pode levar a contaminações acidentais. Nenhum destes produtos está apresentado como dirigido para a comunidade muçulmana, no entanto não deixam de constituir um problema ético e religioso. Ainda relativamente à carne de suíno, um dos produtos apresentava no rótulo a presença de bovino e de suíno, no entanto apenas foi detetada carne de bovino. Tal acontecimento não é muito comum devido à diferença do valor comercial entre a carne das duas espécies.

No caso do bovino apenas um produto (0,73%), uma mortadela de azeitonas, se encontrava erradamente rotulado, visto que não foi detetada esta espécie no mesmo. Este facto pode dever-se às razões previamente apresentadas. No que respeita aos produtos que não apresentavam esta espécie declarada todos apresentaram um resultado negativo na pesquisa de bovino.

Os resultados obtidos nesta pesquisa podem ser comparados com vários estudos já publicados que apresentam dados de vários países. A tabela 10 resume os resultados obtidos em vários países, em que a percentagem de adulterações foi avaliada.

Os gráficos apresentados na figura 27 e 28 comparam o número de amostras analisadas e adulteradas em cada estudo provenientes de diferentes países. Analisando o gráfico referente à espécie de suíno é possível verificar que o maior número de adulterações corresponde a produtos que não declaravam esta espécie no rótulo mas que apresentaram um resultado positivo. O país com maior número de adulterações é a África do Sul, onde Cawthorn et al. (2013) analisaram um total de 125 amostras estando 46 delas (37%) erradamente rotuladas. O estudo realizado com amostras do Egipto (El-nasser et al., 2010) também apresenta uma percentagem elevada de adulterações. Dos 50 produtos analisados, 36% não apresentavam carne de suíno na lista de ingredientes e apresentaram um resultado positivo quando esta espécie foi pesquisada. No caso da Alemanha, que apresenta 18% de produtos erradamente rotulados, foi analisado um número reduzido de amostras, o que poderá levar a um resultado não realista. Nesse estudo, Demirhan et al. (2012) analisaram gelatinas

e produtos com gelatina, e no caso da amostra adulterada, recolhida na Turquia, a expectativa do consumidor era que este fosse um produto halal. Este resultado não deixa de ser alarmante visto que a comunidade muçulmana não consome produtos com carne ou derivados de suíno.

Tabela 10: Resultados de adulterações obtidos em diferentes países.

País	Espécies pesquisadas	Adulterações	Referência
Turquia	Suíno	3,13%	Demirhan et al. (2012)
Alemanha	Suíno	18,18%	
Holanda	Suíno	6,06%	Jonker et al. (2008)
	Bovino	13,51%	
Turquia	Bovino	9,23%	Sakalar e Abasiyanik (2011)
	Suíno	0%	
Malásia	Suíno	0%	Chandrika et al. (2010)
	Bovino	0%	
Espanha	Suíno	10,93%	Calvo et al. (2001)
Espanha	Suíno	6%	Pascoal et al. (2004)
	Bovino	4%	
Japão	Suíno	0%	Tanabe et al. (2007b)
China	Bovino	81,82%	Chen et al. (2010)
Taiwan	Suíno	0%	Hsieh et al. (2005)
	Bovino	25,58%	
África do Sul	Suíno	36,80	Cawthorn et al. (2013)
	Bovino	19,35%	
Egito	Suíno	36%	El-nasser et al. (2010)

Quatro dos estudos publicados apresentaram 0% de adulterações envolvendo carne de suíno, no entanto, três deles analisaram um número reduzido de amostras. Sakalar e Abasiyanik (2011) analisaram apenas uma amostra, Chandrika et al. (2010) avaliaram 13 amostras e Tanabe et al. (2007) analisaram sete amostras. A utilização de um número reduzido de amostras é desaconselhada visto que os resultados obtidos podem não transparecer a realidade. No estudo de Hsieh et al. (2005), realizado em Taiwan, foram analisadas 44 amostras e a percentagem de adulterações detetadas foi 0%. No presente estudo obteve-se uma percentagem de adulterações de 4% sendo inferior a cerca de metade dos estudos apresentados.

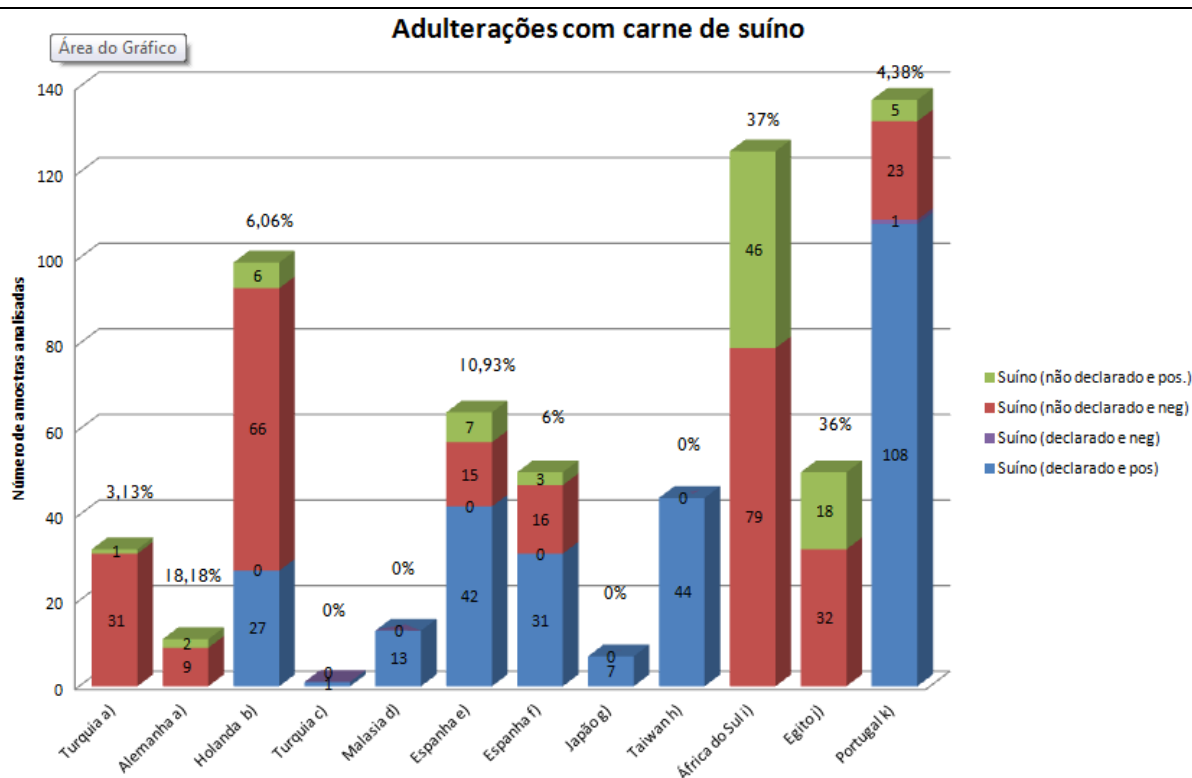


Figura 27: Representação gráfica comparando o número de amostras analisadas e de adultrações com carne de suíno em diferentes países.

Os valores percentuais apresentados ao cimo de cada coluna referem-se à percentagem de produtos em cada estudo que declaravam carne de suíno e apresentaram resultados negativos e que não declaravam essa mesma espécie e apresentaram resultados positivos.

a) Demirhan et al. (2012); b) Jonker et al. (2008); c) Sakalar e Abasiyanik (2011); d) Chandrika et al. (2010); e) Calvo et al. (2001); f) Pascoal et al. (2004); g) Tanabe et al. (2007b); h) Hsieh et al. (2005); i) Cawthorn et al. (2013); j) El-nasser et al. (2010); k) Este estudo

A análise do gráfico apresentado na figura 28 permite observar que as adultrações feitas com carne de bovino tanto se encontram em produtos que apresentam esta espécie rotulada mas que têm um resultado negativo, como em produtos que não possuem esta espécie rotulada mas apresentam um resultado positivo. Dos estudos analisados apenas um apresenta um resultado de 0%. O estudo realizado por Chandrika et al. (2010) poderá apresentar este resultado devido ao reduzido número de amostras analisadas. O país com maior percentagem de adultrações é a China (Chen et al., 2010), no entanto apenas foram analisadas 11 amostras. No caso do presente estudo apenas foi detetada 0,7% de adultrações com carne de bovino. Este resultado é bastante positivo comparado com outros países como Espanha, Turquia e Holanda. Nestes casos foi obtida uma percentagem de adultrações de 4%, 9% e 14%.

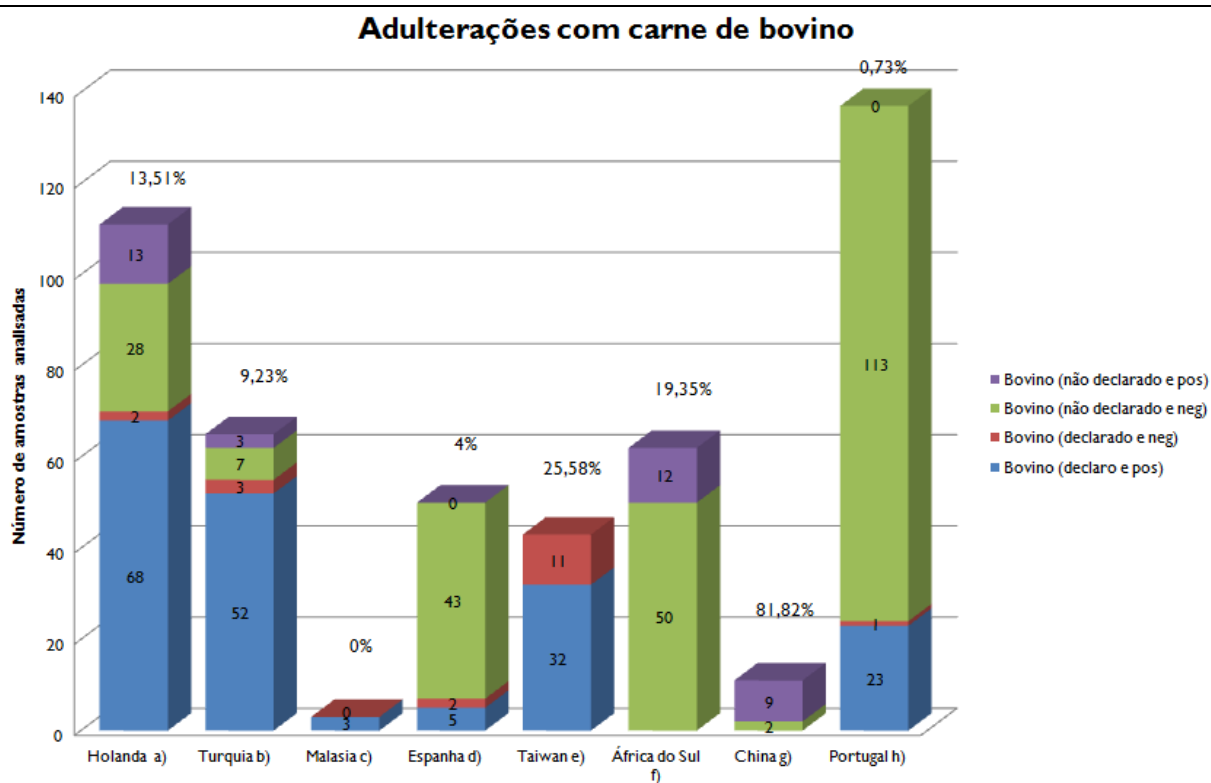


Figura 28: Representação gráfica comparando o número de amostras analisadas e de adultrações com carne de bovino em diferentes países.

Os valores percentuais apresentados ao cimo de cada coluna referem-se à percentagem de produtos em cada estudo que declaravam carne de suíno e apresentaram resultados negativos e que não declaravam essa mesma espécie e apresentaram resultados positivos.

a) Jonker et al. (2008); b) Sakalar e Abasiyanik (2011); c) Chandrika et al. (2010); d) Pascoal et al. (2004); e) Hsieh et al. (2005); f) Cawthorn et al. (2013); j) Chen et al. (2010); k) Este estudo

Conclusão

Os consumidores têm o direito de ter acesso a informação correta correspondente aos produtos que pretendem adquirir de forma a fazerem uma escolha em consciência. O Decreto-Lei n.º 183/2002, de 20 de agosto (Ministério da Agricultura Desenvolvimento Rural e Pescas, 2002), que transpõe para a ordem jurídica interna a Diretiva n.º 2001/101/CE, indica que a lista de ingredientes é uma das menções obrigatórias da rotulagem dos géneros alimentícios, devendo ser indicados pelo seu nome específico. Passa então a ser obrigatória a designação da espécie animal de que a carne utilizada nos produtos alimentares é proveniente. Posteriormente, a Diretiva 2002/86/CE da Comissão, de 6 de novembro (Comissão Europeia, 2002), proíbe o comércio de produtos não conforme.

A maior percentagem de adulterações acontece com carne de suíno e normalmente em produtos onde esta espécie não se encontra rotulada. As autoridades devem identificar pontos-chave da cadeia alimentar onde seja possível melhorar as práticas de processamento e rotulagem dos produtos alimentares, verificar a adequação dos métodos de monitorização da autenticidade e averiguar se as sanções emitidas em caso de incumprimento são suficientes para dissuadir práticas fraudulentas no nosso país.

A técnica de PCR, nomeadamente o PCR em tempo real, tem-se mostrado uma técnica rápida e sensível. Os kits comerciais utilizados neste trabalho revelaram-se uma importante ferramenta na rotina do laboratório devido à sua rapidez mas também à elevada robustez e aplicabilidade em produtos comerciais bastante processados. Em trabalhos futuros seria importante testar a aplicabilidade do método descrito a outras matrizes alimentares.

A percentagem de carne de cada espécie presente é difícil de determinar devido ao facto da quantidade de DNA presente nos tecidos não ser constante, à presença de inibidores no músculo e gordura, à composição e condições de processamento das amostras comerciais conhecidas, às diferenças na quantidade do DNA mitocondrial extraído de cada uma das espécies de carne, às diferenças na eficácia da extração, à idade do animal, ao corte da carne e à proporção entre músculo e gordura na amostra utilizada (Sakai et al., 2011; Jonker et al., 2008; Rojas et al., 2010). No entanto, este é um importante tópico para pesquisas futuras. Seria importante perceber se os resultados positivos em amostras que não apresentam essa espécie rotulada se devem à adição intencional da referida espécie ou se a uma

contaminação na linha de produção. Para tal é necessário aumentar a pesquisa na área do PCR em tempo real, desenvolvendo fórmulas robustas que tenham em conta todas as variáveis.

É possível concluir que os métodos utilizados neste trabalho são robustos e fiáveis, podendo ser utilizados com elevada confiança na rotina do laboratório na identificação de espécies. A sua aplicação em análises de rotina na indústria alimentar permite aumentar os níveis de excelência dos produtos e garantir a autenticidade dos mesmos. Aumentando a 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 mesmo nas exportações.

Referências Bibliográficas

ABU AL-SOUD, W., RÅDSTRÖM, P. - **Effects of amplification facilitators on diagnostic PCR in the presence of blood, feces, and meat.** *Journal of Clinical Microbiology.* 38, 12 (2000), 4463–70.

AHMED, M., ABDEL-RAHMAN, S., EL-HANAFY, A. - **Application of Species-Specific Polymerase Chain Reaction and Cytocrome b Gene for Different Meat Species Authentication.** *Biotechnology.* 6, 3 (2007), 426–430.

AL-TAMIMI, A., ASHHAB, Y. - **Identification of Meat Species and Meat Products by a Multiplex PCR Method.** *Biotechnology Research Center.* (2012), 5–7.

AMJADI, H., VARIDI, M.J., MARASHI, S.H. - **Development of rapid PCR-RFLP technique for identification of sheep, cattle and goat's species and fraud detection in Iranian commercial meat products.** *African Journal of Biotechnology.* 11, 34 (2012), 8594–8599.

ARSLAN, A., ILHAK, O.I., CALICIOGLU, M. - **Effect of method of cooking on identification of heat processed beef using polymerase chain reaction (PCR) technique.** *Meat Science.* 72, 2 (2006), 326–330.

AZMI, A. ET AL. - **Specific Polymerase Chain Reaction (PCR) Analysis of Raw Meats and Fats of Pigs for Halal Authentication.** *Middle-East Journal of Scientific Research.* 7, 6 (2011), 1008–1013.

BELÁK, Á., MARÁZ, A. - **Diagnostic PCR: organization and operation of PCR laboratories for food microbiological analysis.** *European Dairy Magazine.* 6, (2010), 4–10.

BIO-RAD LABORATORIES - **Real-Time PCR - Applications Guide.** (2006).

BRANKO, V. ET AL. - **Identification of animal species in heat treated muscle homogenates using the polymerase chain reaction.** *Acta Veterinaria.* 59, 2-3 (2009), 303–308.

CALVO, J.H., ZARAGOZA, P., OSTA, R. - **Technical note: A quick and more sensitive method to identify pork in processed and unprocessed food by PCR amplification of a new specific DNA fragment.** *Journal of Animal Science.* 79, (2001), 2108–2112.

CAPORALE, V. ET AL. - **Importance of the traceability of animals and animal products in epidemiology.** *Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties.* 20, 2 (2001), 372–378.

CAWTHORN, D., STEINMAN, H.A., HOFFMAN, L.C. - **A high incidence of species substitution and mislabelling detected in meat products sold in South Africa.** *Food Control.* 32, 2 (2013), 440–449.

CHAN, C.C. ET AL. - **Analytical Method Validation and Instrument Performance Verification**. 1st ed., John Wiley & Sons, 2004. ISBN 0-471-25953-5. [Disponível em: <http://books.google.pt/books?id=K0yptilS2kkC&lr=&hl=pt-PT>].

CHANDRIKA, M. ET AL. - **Identification of the species origin of commercially available processed food products by mitochondrial DNA analysis**. International Food Research Journal. 17, (2010), 867–875.

CHEN, S.-Y., LIU, Y.-P., YAO, Y.-G. - **Species authentication of commercial beef jerky based on PCR-RFLP analysis of the mitochondrial 12S rRNA gene**. Journal of Genetics and Genomics. 37, (2010), 763–9.

CLARK, D.P., PAZDERNIK, N.J. - **Molecular Biology**. 2nd ed., Elsevier, 2012. ISBN 978-0-12-378594-7. [Disponível em: <http://books.google.pt/books?id=Mhs-P94dIR8C&hl=pt-PT>].

COMISSÃO EUROPEIA - **Diretiva 2002/86/CE de 6 de novembro que altera a Diretiva 2001/101/CE, no que se refere à data a partir da qual são proibidas as trocas de produtos não conformes com a Diretiva 2000/13/CE do Parlamento Europeu e do Concelho**. Jornal Oficial das Comunidades Europeias. L 305/19, (2002).

CONTROLVET - Disponível em: <http://www.controlvet.pt/> [Acedido a 10/19/2012].

CUNHA, L., MOURA, A. - **Consumidor Português Face à Segurança Alimentar**. Segurança e Qualidade Alimentar. 4, (2008), 46–49.

DAVALIEVA, K., EFREMOV, G.D. - **Influence of salts and PCR inhibitors on the amplification capacity of three thermostable DNA polymerases**. Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering. 29, 1 (2010), 57–62.

DEMIRHAN, Y., ULCA, P., SENYUVA, H.Z. - **Detection of porcine DNA in gelatine and gelatine-containing processed food products - Halal/Kosher authentication**. Meat Science. 90, 3 (2012), 686–689.

EDRIS, S. ET AL. - **Convencional multiplex polymerase chain reaction (PCR) versus real-time PCR for species-specific meat authentication**. Life Science Journal. 9, 4 (2012), 5831–5837.

EL-NASSER, A., LABIEB, H.Y., EL-AZIZ, D.M.A. - **Identification of meat species in some meat products in Assiut city**. Assiut University Bulletin for Environmental Researches. 13, 2 (2010), 1–13.

ERWANTO, Y. ET AL. - **Pig species identification in meatballs using polymerase chain reaction- restriction fragment length polymorphism for Halal authentication**. International Food Research Journal. 19, 3 (2012), 901–906.

HEALTH PROTECTION AGENCY - **Good laboratory practice when performing molecular amplification assays**. National Standard Method. 4 (2010), 1–12.

HIRD, H. ET AL. - **The effect of heat and pressure on the fragmentation of DNA and implications for detection of meat using real-time PCR**. Food Additives and Contaminants. 23, 07 (2006), 645–650.

HSIEH, H. ET AL. - **Species identification of meat products using the cytochrome b gene**. Forensic Science Journal. 4, 1 (2005), 29–36.

<http://www.agroinfoti.com.br/portal/component/content/article/28-current-users/78-normastecnicas> [Acedido a 09/01/2013].

HUI, Y.H. - **Handbook of Meat and Meat Processing**. 2nd ed. Y. H. Hui, ed., CRC Press, 2012. ISBN 978-1-4398-3683-5. [Disponível em: <http://books.google.pt/books?id=IZRMRXbbwoC&lr=&hl=pt-PT>].

ILHAK, O., ARSLAN, A. - **Identification of Meat Species by Polymerase Chain Reaction (PCR) Technique**. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences. 31, 3 (2007), 159–163.

INSTITUTO NACIONAL DE ESTATÍSTICA - **Censos 2011 - Resultados Definitivos - Portugal**. Instituto Nacional de Estatística, ed., Lisboa, 2012. ISBN 978-989-25-0181-9.

IWOBI, A., HUBER, I., BUSCH, U. - **The Application of PCR-Based Methods in Food Control Agencies – A Review.**, In Tech, 2012. ISBN 978-953-51-0612-8.

JONKER, K. ET AL. - **Species identification in meat products using real-time PCR**. Food Additives and Contaminants. 25, 05 (2008), 527–533.

JORFI, R. ET AL. - **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 (2012), 8160–8166.

KEER, J.T. - **Essentials Of Nucleic Acid Analysis: A Robust Approach**. 1st ed. J. T. Keer & L. Birch, eds., Royal Society of Chemistry, 2008. ISBN 978-0-85404-367-5. [Disponível em: <http://books.google.pt/books?id=wAEkjiAElyUC&lr=&hl=pt-PT>].

KESMEN, Z. ET AL. - **Detection of chicken and turkey meat in meat mixtures by using real-time PCR assays**. Journal of Food Science. 77, 2 (2012), 167–173.

KESMEN, Z., YETIM, H., ŞAHIN, F. - **Identification of different meat species used in sucuk production by PCR assay**. GIDA. 35, 2 (2010), 81–87.

KLANČNIK, A., KOVAČ, M. - **PCR in Food Analysis**. 1st ed. P. Hernandez-Rodriguez, ed., In Tech, 2012. ISBN 978-953-51-0612-8.

LAUBE, I. ET AL. - **Methods for the detection of beef and pork in foods using real-time polymerase chain reaction**. International Journal of Food Science and Technology. 38, 2 (2003), 111–118.

LOGAN, J.M.J., EDWARDS, K.J., SAUNDERS, N.A. - **Real-Time PCR: Current Technology and Applications**. 1st ed., Horizon Scientific Press, 2009. ISBN 978-1-904455-39-4. [Disponível em: <http://books.google.pt/books?id=YxGKpOg8TuQC&lr=&hl=pt-PT>].

MACHEREY-NAGEL - **User manual - NuceoSpin(R) Food**. (2012a).

MACHEREY-NAGEL - **User manual - NucleoSpin (r) Tissue**. (2012b).

- MAFRA, I., FERREIRA, I., OLIVEIRA, M.B. - **Food authentication by PCR-based methods.** *European Food Research and Technology.* 227, 3 (2007), 649–665.
- MARTÍN, I. ET AL. - **Technical note: Detection of chicken, turkey, duck, and goose tissues in feedstuffs using species-specific polymerase chain reaction.** *Journal of Animal Science.* 85, 2 (2007a), 452–8.
- MARTÍN, I. ET AL. - **Technical note: Detection of cat, dog, and rat or mouse tissues in food and animal feed using species-specific polymerase chain reaction.** *Journal of Animal Science.* 85, 10 (2007b), 2734–9.
- MATSELYUKH, B.P. ET AL. - **Studies of mutagenic activity of fluorescent DNA-sensitive monomethinecyanine and carbocyanine dyes in Ames test.** *Ukrainica Bioorganica Acta.* 2, (2005), 27–34.
- MCCANN, J. ET AL. - **Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: Assay of 300 chemicals.** *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 72, 12 (1975), 5135–5139.
- MCPHERSON, M.J., MØLLER, S.G. - **PCR: The Basics.** 2nd ed. E. Owen, ed., Cornwall: Taylor & Francis, 2006. ISBN 0-4153-5547-8. [Disponível em: http://books.google.pt/books?id=NSSFjn2-SuUC&hl=pt-PT&authuser=0&source=gbs_navlinks_s].
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA DESENVOLVIMENTO RURAL E PESCAS - **Decreto-Lei n.º 183/2002 de 20 de agosto.** *Diário da República.* 191, (2002), 5850–5851.
- MUSTO, M. - **DNA Quality and Integrity of Nuclear and Mitochondrial Sequences from Beef Meat as Affected by Different Cooking Methods.** *Food Technology and Biotechnology.* 49, 4 (2011), 523–528.
- NOLAN, T. ET AL. - **SPUD: a quantitative PCR assay for the detection of inhibitors in nucleic acid preparations.** *Analytical biochemistry.* 351, 2 (2006), 308–10.
- NOVAIS, C.M., PIRES-ALVES, M. - **PCR em tempo real.** *Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento.* 33, (2004), 10–13.
- NP 17025 - 2005 - **Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração.** Lisboa: IPQ.
- NF XP U47-600-2 - 2011 - **Méthodes d'analyse en santé animale - PCR (Réaction de polymérisation en chaîne) - Partie 2: Exigences et recommandations pour le développement et la validation de la PCR en santé animale.** ISSN 0335-3931. França: AFNOR.
- OLIVEIRA, A., MARTINS, A. - **Garantia da Segurança Alimentar: O Papel dos Laboratórios.** *Segurança e Qualidade Alimentar.* 1, (2006), 50–51.
- ONG, S.B. ET AL. - **Meat Molecular Detection: Sensitivity of Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism in Species Differentiation of Meat From Animal Origin.** *ASEAN Food Journal.* 14, 1 (2007), 51–59.

PASCOAL, A. ET AL. - **Survey of authenticity of meat species in food products subjected to different technological processes, by means of PCR-RFLP analysis.** European Food Research and Technology. 218, 3 (2004), 306–312.

PELT-VERKUIL, E. VAN, BELKUM, A. VAN, HAYS, J.P. - **Principles and Technical Aspects of PCR Amplification.** 1st ed., Springer, 2008. ISBN 978-1-4020-6240-7. [Disponível em: <http://books.google.pt/books?id=-AMuhy2Nwb0C&lr=&hl=pt-PT>].

POWLEDGE, T.M. - **The polymerase chain reaction.** Advances in Physiology Education. 28, (2004), 44–50.

QIAGEN - **Critical Factors for Successful Real-Time PCR.** (2010).

QUINTA, R., OLIVEIRA, A., HENRIQUES, A. - **Biotecnologia no Apoio à Segurança Alimentar.** Segurança e Qualidade Alimentar. 4, (2008), 60–61.

REECE, R.J. - **Analysis of Genes and Genomes.**, John Wiley & Sons, 2004. ISBN 0-470-09157-6. [Disponível em: <http://books.google.pt/books?id=oEkBS77TuFcC&lr=&hl=pt-PT>].

ROJAS, M. ET AL. - **A 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. 27, 06 (2010), 749–763.

ROJAS, M. ET AL. - **Mitochondrial and nuclear markers for the authentication of partridge meat and the specific identification of red-legged partridge meat products by polymerase chain reaction.** Poultry Science. 90, 1 (2011), 211–22.

SAADOUN, I., ELBETIEHA, A., BLEVINS, W.T. - **Mutagenesis by ethidium bromide and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in off-flavour compound producing strains of Streptomyces.** Journal of Biosciences. 23, 5 (1998), 595–600.

SAHILAH, A.M. ET AL. - **Halal authentication of raw meats using PCR amplification of mitochondrial DNA.** International Food Research Journal. 18, 4 (2011), 1489–1491.

SAKAI, Y. ET AL. - **Quantification of Pork, Chicken and Beef by Using a Novel Reference Molecule.** Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 75, 9 (2011), 1639–1643.

SAKALAR, E., ABASIYANIK, M.F. - **Qualitative analysis of meat and meat products by multiplex polymerase chain reaction (PCR) technique.** African Journal of Biotechnology. 10, 46 (2011), 9379–9386.

SANTOS, C.G. ET AL. - **Identification of hare meat by a species-specific marker of mitochondrial origin.** Meat Science. 90, 3 (2012), 836–41.

SAUNDERS, G.C., PARKES, H.C. - **Analytical Molecular Biology: Quality and Validation.** 32nd ed. G. C. Saunder & H. C. Parkes, eds., Royal Society of Chemistry, 1999. ISBN 0-85404-472-8. [Disponível em: http://books.google.pt/books?id=_yU4J0v10WgC&lr=&hl=pt-PT].

SCHEFE, J.H. ET AL. - **Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel “gene expression’s CT difference” formula.** *Journal of Molecular Medicine.* 84, 11 (2006), 901–10.

SCHWÄGELE, F. - **Traceability from a European perspective.** *Meat Science.* 71, (2005), 164–173.

SHAW, I.C. - **Food Safety: The Science of Keeping Food Safe.** 1st ed., John Wiley & Sons, 2012. ISBN 978-1-4443-3722-8. [Disponível em: <http://books.google.pt/books?id=FTOTkRDtH70C&lr=&hl=pt-PT>].

SINGER, D.C. - **A Laboratory Quality Handbook of Best Practices.** D. C. Singer, ed., ASQ Quality Press, 2001. ISBN 0-87389-490-1. [Disponível em: http://books.google.pt/books?id=FQaOq7Tuc_cC&lr=&hl=pt-PT].

SOARES, S. ET AL. - **Quantitative Detection of Poultry Meat Adulteration With Pork by a Duplex PCR Assay.** *Meat Science.* 85, (2010), 531–536.

SPYCHAJ, A., MOZDZIAK, P.E., POSPIECH, E. - **PCR methods in meat species identification as tool for the verification of regional and traditional meat products.** *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria.* 8, 2 (2009), 5–20.

TANABE, S. ET AL. - **A Real-Time Quantitative PCR Detection Method for Pork, Chicken, Beef, Mutton, and Horseflesh in Foods.** *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry.* 71, 12 (2007a), 3131–3135.

TANABE, S. ET AL. - **PCR Method of Detecting Pork in Foods for Verifying Allergen Labeling and for Identifying Hidden Pork Ingredients in Processed Foods.** *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry.* 71, 7 (2007b), 1663–1667.

TSAI, L. ET AL. - **Species identification of animal specimens by cytochrome b gene.** *Forensic Science Journal.* 6, 1 (2007), 63–65.

UNAJAK, S., MEESAWAT, P., ANYAMANEERATCH, K. - **Identification of species (meat and blood samples) using nested-PCR analysis of mitochondrial DNA.** *African Journal of Biotechnology.* 10, 29 (2011), 5670–5676.

VALASEK, M.A., REPA, J.J. - **The power of real-time PCR.** *Advances in Physiology Education.* 29, (2005), 151–9.

VESNA, M. - **Procedures in Improvement of the Control of the Quality of Meat Products - Consumer Protection Strategy.** *Technologija Mesa.* 50, (2009), 31–36.

VIM - **Vocabulário Internacional de Metrologia: Conceitos fundamentais e gerais e termos associados.** 1st ed., Lisboa: IPQ, 2012. ISBN 978-972-763-00-6.

WALKER, J.M., RAPLEY, R. - **Molecular Biology And Biotechnology.** 5th ed. J. M. Walker & R. Rapley, eds., Royal Society of Chemistry, 2009. ISBN 978-0-85404-125-1. [Disponível em: http://books.google.pt/books?id=KRU_fy3J8u4C&lr=&hl=pt-PT].

WHITCOMBE, D. ET AL. - **A homogeneous fluorescence assay for PCR amplicons: its application to real-time, single-tube genotyping.** *Clinical Chemistry*. 44, 5 (1998), 918–23.

WILSON, I.G. - **Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification.** *Applied and Environmental Microbiology*. 63, 10 (1997), 3741–3751.

WILSON, K.M., WALKER, J.M. - **Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology.** 7th ed., Cambridge University Press, 2010. ISBN 978-0-521-51635-8. [Disponível em: <http://books.google.pt/books?id=lan8PqqnDacC&lr=&hl=pt-PT>].

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH - **Validation and Quality Control of Polymerase Chain Reaction Methods Used for the Diagnosis of Infectious Diseases.** 6th ed., 2008. ISBN 978-92-9044-718-4.

YOSHIDA, T. ET AL. - **Development of PCR primers for the detection of porcine DNA in feed using mtATP6 as the target sequence.** *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*. 50, 2 (2009), 89–92.