



**Faculdade de Farmácia
Universidade de Coimbra**

**Desenvolvimento de metodologias de biologia
molecular para a deteção de carne de cavalo (*Equus
caballus*) em produtos cárneos**

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

Orientador externo: Doutora Isabel Maria Sousa Gomes Mafra
Orientador interno: Professor Doutor Fernando Jorge dos Ramos

**Liliana de Castro Meira
Coimbra Julho de 2014**

Agradecimentos

Na recta final deste trabalho torna-se importante agradecer a todos que para ele contribuíram:

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer Doutora Isabel Mafra, pela orientação, por todos conhecimentos transmitidos que estimularam o meu interesse pelo conhecimento e pela vida académica. Obrigada pela disponibilidade e pela preocupação que sempre teve para comigo.

Ao Professor Doutor Fernando Ramos por ter aceitado o convite de co-orientação e pela disponibilidade demonstrada.

À Professora Doutora Beatriz Oliveira agradeço por me ter acolhido no laboratório de Bromatologia e Hidrologia e ter disponibilizado todos os recursos necessários para o desenvolvimento do meu trabalho.

À Joana pela ajuda indispensável na realização da parte prática deste trabalho. Obrigada pelos conhecimentos transmitidos e por estares sempre disposta a ajudar.

À Caterina, minha companheira ao longo deste ano, obrigada pelo apoio e ajuda constante, pela grande amizade e principalmente pelo ânimo e pensamento positivo nos momentos menos bons.

À Francisca pelos bons conselhos, pela amizade e pela ajuda na parte escrita.

À Begoña e Sónia pelo companheirismo no laboratório e pela ajuda em qualquer problema que surgisse.

À Ju por estar presente desde o 1º dia da “nossa” UTAD, por ter acompanhado e por ter contribuído de uma forma tão positiva no meu percurso académico e na minha vida.

Ao Diogo pela infinita paciência nos momentos menos bons.

Por fim, mas não menos importantes, agradeço aos meus pais, eternos melhores amigos, pelas oportunidades que me proporcionaram ao longo da minha vida, por me apoiarem desde de sempre e pelo enorme carinho.

Resumo

A identificação de espécies em alimentos é cada vez mais importante para avaliar a sua autenticidade, principalmente nos produtos cárneos. O consumidor tem direito a uma escolha informada, uma vez que esta pode ser um reflexo de um estilo de vida, práticas religiosas ou problemas de saúde. Assim, uma rotulagem correta e verdadeira é fundamental para manter o consumidor informado sobre a identidade e qualidade dos produtos alimentares que está a adquirir.

Recentemente, surgiu um escândalo de dimensões internacionais, relacionado com a adição de carne de cavalo não declarada em alimentos processados. Contudo, a presença desta espécie não representa um risco para a saúde do consumidor, a não ser que a carne de cavalo contenha fenilbutazona. Esta droga não é permitida para o consumo humano, uma vez que pode causar doenças sanguíneas, como a anemia aplástica. Animais que forem medicados com esta droga não podem ser utilizados para consumo, uma vez que não é possível definir um limite máximo de resíduo para este medicamento veterinário. Todavia, a presença não declarada desta espécie representa uma fraude alimentar. Assim, este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de técnicas de PCR específicas e sensíveis para a identificação de carne de cavalo em produtos alimentares.

Inicialmente foi desenvolvida a técnica de PCR qualitativa, onde foram estabelecidos limites de deteção (LOD) absolutos e relativos. A sensibilidade obtida para o LOD absoluto foi de 1pg e 10 pg para ADN de cavalo cruo e autoclavado, respetivamente. Relativamente ao LOD relativo também se alcançaram limites distintos para misturas binárias cruas e processadas, de 0,001% e 0,01%, respetivamente. Esta técnica foi aplicada a um conjunto de 77 amostras adquiridas antes e depois do “escândalo da carne de cavalo”, sendo que 2 revelaram a presença da espécie. Posteriormente, de forma a confirmar e quantificar a espécie de cavalo, recorreu-se à técnica de PCR em tempo real com o corante EvaGreen e análise de *melting*. Atingiu-se um limite de deteção absoluto de 0,1 pg de ADN de cavalo cruo e autoclavado, e um LOD relativo de 0,0001% de carne de cavalo em misturas cruas e processadas. Por fim, foi construído e validado o modelo normalizado de quantificação com base no método ΔC_t , tendo-se passado à sua aplicação nas amostras que amplificaram positivamente a espécie de cavalo na PCR qualitativa. O método permitiu confirmar a presença de ADN de cavalo, no entanto os valores baixos encontrados indicaram que a presença de cavalo deverá ser resultado de contaminação cruzada e não de possível fraude.

Pode-se concluir que neste trabalho foram desenvolvidas ferramentas úteis e eficazes para a deteção de adulterações em produtos cárneos com carne de cavalo.

Abstract

Nowadays, identification of species in food is of major importance to evaluate food authenticity, with special emphasis on meat products. The consumer has the right of an informed choice, which may be a reflection of lifestyles, religious practices or health problems. Therefore, a correct and truthful labelling is crucial to inform the consumer about the identity and quality of food products they are buying.

Recently, associated with the undeclared addition of horse meat to processed foods, an international scandal emerged. The presence of this species does not pose a health risk to the consumer, unless the horse meat contains phenylbutazone. This drug is not allowed for human consumption since it can cause blood diseases such as aplastic anaemia. Animals that are treated with this drug cannot be used for consumption since it is not possible to set a maximum residue limit for this veterinary medicine. However, the presence of non-declared horse-species is a food fraud. This work aimed at developing sensitive and specific PCR-based methods for the identification of horse meat in food products.

Initially qualitative PCR assay was developed, where absolute and relative limits of detection (LOD) were established. The sensitivity obtained for the absolute LOD was 1 pg of raw horse DNA and 10 pg of processed horse DNA. The relative sensitivity was achieved by means of raw and processed binary reference mixtures, showing LOD of 0.001 % and 0.1%, respectively. This technique has been successfully applied to a set of 77 samples, prior and after the “horse meat scandal”, which showed the presence of two positive samples to horse DNA.

Subsequently, in order to confirm and quantify the presence of horse, we resorted to the technique of real-time PCR with EvaGreen dye and melting curve analysis. The technique reached a absolute LOD of 0.1 pg in raw and autoclaved horse DNA and a relative LOD 0.0001% of horse meat in raw and processed mixtures. Finally, the standard model for quantification was built based on ΔC_t method, successfully validated and applied to the positive samples in qualitative PCR. However, this model can be only applied in one sample. Quantification revealed the presence of the specie at very low amount, which suggests the possibility of cross-contamination. The method allowed confirming the presence of horse DNA, though the low values indicate that its presence should have been the result of cross-contamination and not an eventual food fraud.

This work allowed concluding that useful and effective tools were developed for the adulteration detection in meat products with horse meat.

Índice

Agradecimentos	iii
Resumo	v
Abstract	vi
Índice	vii
Índice de figuras	ix
Índice de tabelas	xiii
Lista de abreviaturas	xiv
Componente Teórica	I
1 Importância da carne na alimentação	3
1.1 Consumo de carne de cavalo	4
1.2 “O escândalo da carne de cavalo”	6
2 Autenticidade dos produtos cárneos	7
3 Métodos utilizados para a identificação de espécies em produtos cárneos	9
3.1 Métodos baseados na análise de proteínas	9
3.2 Métodos baseados na análise de ADN.....	12
3.2.1 Extração e isolamento do ADN.....	13
3.2.2 ADN alvo a amplificar.....	14
3.2.3 A técnica de PCR.....	15
3.2.3.1 PCR com <i>primers</i> específicos.....	18
3.2.3.2 PCR em multiplex.....	19
3.2.3.3 PCR-RFLP e RFLP	19
3.2.3.4 RAPD.....	21
3.2.3.5 PCR em tempo real.....	21
3.2.3.6 Sequenciação de produtos PCR	26
3.3 Aplicação das técnicas de PCR na identificação da espécie <i>Equs caballus</i> em produtos cárneos	26
4 Objetivos e âmbito do trabalho	29

Componente Experimental.....	31
5 Material e Métodos.....	33
5.1 Padrões de Referência	33
5.2 Amostras Comerciais	34
5.3 Reagentes e Soluções.....	37
5.4 Extração do ADN – Método Wizard	37
5.5 Avaliação e quantificação do ADN extraído	38
5.6 Amplificação por PCR.....	39
5.6.1 Primers (Oligonuclueótidos)	39
5.6.2 PCR qualitativa	39
5.6.3 PCR em tempo Real	41
6 Resultados e Discussão.....	43
6.1 Avaliação do ADN das misturas de referência	43
6.2 Avaliação do ADN das amostras analisadas	45
6.3 Amplificação por PCR qualitativa	45
6.3.1 Otimização da técnica	45
6.3.2 Avaliação da especificidade.....	48
6.3.3 Análise qualitativa das amostras comerciais	50
6.4 Análise por PCR em tempo real	54
6.4.1 Determinação do limite de deteção absoluto.....	55
6.4.2 Determinação do limite de deteção relativo / Desenvolvimento da Técnica Quantitativa	58
6.4.3 Validação da técnica normalizada.....	63
6.4.4 Avaliação quantitativa das amostras comerciais	64
7 Conclusão	68
8 Referências Bibliográficas	70

Índice de figuras

Figura 1 – Representação esquemática do ensaio tiras de fluxo lateral (Adaptado de ((Mark, Haeberle et al. 2010)).....	10
Figura 2 – Representação esquemática de um ensaio ELISA (sandwich).....	11
Figura 3 - Representação esquemática do ensaio <i>Western blot</i> (imuno-blot).	11
Figura 4 – Representação esquemática das três etapas de amplificação por PCR (adaptado de (Broll 2010)).....	16
Figura 5 – Amplificação das cadeias de ADN na técnica de PCR. A quantidade de ADN deverá duplicar a cada ciclo resultado em 1000 bilhões de cópias no final de 40 ciclos de reação (adaptado de (Rodriguez-Lazaro and Hernandez 2013)).....	16
Figura 6- PCR em multiplex em produtos cárneos industriais. Linha 1 a 3: Controlo positivo com ADN de <i>Bos taurus</i> , controlo positivo com ADN de <i>Gallus gallus</i> e controlo positivo com ADN de <i>Sus scrofa</i> , respetivamente. Linha M: Mistura de ADN de <i>Bos taurus</i> , <i>Gallus gallus</i> e <i>Sus scrofa</i> ; C: Controlo negativo; Linhas 4-5: Amostras de carnes moídas; Linha 6-8: Amostras de salsichas; Linha 9-12: Amostras de charcutaria. M100: marcador de ADN (Ghovvati, Nassiri et al. 2009)...	20
Figura 7 – Representação esquemática de ADN <i>fingerprint</i> obtido após RFLP a partir de duas amostras de ADN (adaptado de (Mir and Mohanasrinivasan 2010)).....	20
Figura 8 – Princípio de deteção utilizando o corante SYBR Green I (adaptado de (Rodriguez-Lazaro and Hernandez 2013)).....	22
Figura 9 – Mecanismo de ação dos diferentes tipos de sondas utilizados na indução de fluorescência por PCR em tempo real. (a) Sondas Taqman™; (b) Primers scorpions™; (c) Molecular Beacons™ e (d) Tecnologia FRET (adaptado de (Mafrá and Oliveira 2005)).....	23
Figura 10 – Fases da curva de amplificação da PCR. Vermelho: curva de amplificação de uma amostra positiva. Azul: Threshold. Preto: linha de base dos ciclos (adaptado de (Rodriguez-Lazaro and Hernandez 2013)).....	24
Figura 11 – Exemplo de um eletroferograma obtido a partir da sequência de uma porção do ADN.	27
Figura 12 – Produtos alimentares adquiridos neste trabalho.....	34
Figura 13 - Região do citocromo b a ser amplificada (realçada pelo cinza) pelos primers Eq-F/Eq-R (sublinhados) (nº de acesso do GenBank DQ297663.1)	39
Figura 14 - Gel de eletroforese de ADN genómico das misturas binárias cruas. M: Marcador molecular Hyperlader i (Bioline, Londres, Reino Unido); Linha 0 a 18: Misturas binárias CV0 a CV18, respetivamente.....	44
Figura 15 - Gel de eletroforese de ADN genómico das misturas binárias autoclavadas. M: Marcador molecular Hyperlader i (Bioline, Londres, Reino Unido); Linha 0 a 18: Misturas binárias CV0 a CV18, respetivamente.....	45
Figura 16 - Gel de eletroforese de produtos de PCR de misturas de referência cruas de carne de cavalo em bovino (A) e autoclavadas (B) amplificadas com alvo no gene <i>cytb</i> de cavalo com os oligonucleótidos Eq-F/Eq-R. M: Marcador molecular 100 pb ADN (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha); linhas 1 a 5: 10%, 1%, 0,1%, 0,01%, 0,001% de carne de cavalo, em extratos na concentração de 50 ng/µl; CN: Controlo negativo.	47

- Figura 17- Gel de eletroforese de produtos de PCR de diluições seriadas a partir da amostra crua CV18 (A) e da amostra autoclavada CVA18 (B) amplificadas por PCR qualitativa utilizando os oligonucleótidos Eq-F/Eq-R. M: marcador molecular 100 pb ADN (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha); linhas 1 a 6: 100 ng, 10 ng, 1 ng, 0,1 ng, 10 pg, 1 pg; CN: Controlo negativo..... 47
- Figura 18 - Gel de eletroforese de produtos de PCR de várias espécies vegetais amplificadas com alvo num gene eucariota (18SRG-F/18SRG-R). M: Marcador molecular de ADN 100 pb (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha); Linhas 1 a 19: Pão de trigo, Pão de centeio, Cebola, Alho, Salsa, Pimenta branca, Louro, Pimentão-doce, Piri-piri, Noz de Macadâmia, Noz do Brasil, Pistácio, Amendoim, Fava, Caju, Pinhão, Castanha, Farinha de trigo e arroz, respetivamente; CN: Controlo negativo..... 48
- Figura 19 - Gel de eletroforese de produtos de PCR de várias espécies vegetais amplificadas a com alvo num gene eucariota (18SRG-F/18SRG-R). M: Marcador molecular de ADN 100 pb (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha); Linhas 20 a 32: Pevide de abóbora, Girassol, Tremoço, Amêndoa, Aveia em grão, Cevada em grão, Centeio em grão, Soja em grão, Milho em grão, Noz, Avelã, Tomate cereja e Noz pecan, respetivamente; CN: Controlo negativo..... 48
- Figura 20 - Gel de eletroforese de produtos de PCR de várias espécies animais amplificadas com alvo num gene eucariota (18SRG-F/18SRG-R). M: Marcador molecular de ADN 100 pb (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha); Linhas 1 a 16: Cavalo, Javali, Pato, Perdiz, Lebre, Codorniz, Coelho, Faisão, Veado, Vaca, Galinha, Peru, Borrego, Cabrito, Avestruz e Porco, respetivamente; CN: Controlo negativo..... 49
- Figura 21 – Gel de eletroforese de produtos de PCR de várias espécies vegetais amplificadas com alvo no gene *cytb* de cavalo (Eq-F/Eq-R). M: marcador molecular de ADN 100 pb (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha); CP: controlo positivo (cavalo - 100%); Linhas 1 a 18: Pão de trigo, Pão de centeio, Cebola, Alho, Salsa, Pimenta branca, Louro, Pimentão-doce, Piri-piri, Noz de macadâmia, Noz do brasil, Pistacho torrado e salgado, Amendoim torrado e salgado, Fava frita com sal, Caju torrado, Miolo de pinhão, Castanha e Farinha de trigo, respetivamente; Linhas 19 a 32: Arroz, Pevide, Girassol, Tremoço, Amêndoa, Aveia em grão, Cevada em grão, Centeio em grão, Soja em grão, Milho em grão, Noz, Avelã, Tomate cereja e Noz pecan, respetivamente; CN: Controlo negativo..... 49
- Figura 22 - Gel de eletroforese de produtos de PCR de várias espécies animais amplificadas com alvo no gene *cytb* de cavalo (Eq-F/Eq-R). M: Marcador molecular de ADN 100 pb (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha); CP: Controlo positivo (cavalo -100%); Linhas 1 a 16: Cavalo, Javali, Pato, Perdiz, Lebre, Codorniz, Coelho, Faisão, Veado, Vaca, Galinha, Peru, Borrego, Cabrito, Avestruz e Porco, respetivamente; CN: Controlo negativo..... 50
- Figura 23 - Gel de eletroforese de produtos de PCR das amostras comerciais amplificadas com alvo no gene *cytb* de bovino (Bos-F/Bos-R). M: Marcador molecular de ADN 100 pb (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha); CN: Controlo negativo; Linha 1 a 16: Amostras comerciais PF23, PF25, PF26, SF30, SF35, SF36, SF37, SF40, SF41, SF43, SF44, SF45, SF46, SF47, SF48 e SF50, respetivamente, na concentração de 50 ng/μL..... 50
- Figura 24 - Gel de eletroforese de produtos de PCR das amostras comerciais amplificadas com alvo no gene *cytb* de bovino (Bos-F/Bos-R). M: Marcador molecular de ADN 100 pb (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha); Linha 1 a 25: amostras comerciais PF21, PF22, PF24, SF28, SF34, SF39, SF42, SF49, SF51, SF77 a SF84 e HLI a HLI5, respetivamente, na concentração de 50 ng/μL; CN: Controlo negativo..... 51
- Figura 25 – Gel de eletroforese de produtos de PCR das amostras comerciais amplificadas com alvo no gene *cytb* de bovino (Bos-F/Bos-R). M: Marcador molecular de ADN 100 pb (Bioron,

Ludwigshafen, Alemanha); Linha 1 a 26: Amostras comerciais SF85 a SF110, respetivamente, na concentração de 50 ng/μL; CN: Controlo negativo.....	51
Figura 26 – Gel de eletroforese de produtos de PCR das amostras comerciais com alvo no gene eucariota (18SRG-F/18SRG-F). M: Marcador molecular de ADN 100 pb (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha); Linha 1 a 3: Amostras comerciais SF86, SF99, SF10, respetivamente, na concentração de 50 ng/μL; CN: Controlo negativo.....	52
Figura 27 - Gel de eletroforese de produtos de PCR das amostras comerciais amplificadas com alvo no gene <i>cytb</i> de cavalo (Eq-F/Eq-R). M: Marcador molecular de ADN 100 pb (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha); CP: Controlo positivo (cavalo – 100%); Linhas 1 a 23: Amostras comerciais PF21 a PF26 e SF28 a SF49, respetivamente, na concentração de 50 ng/μL; CN: Controlo negativo.....	52
Figura 28 - Gel de eletroforese de produtos de PCR das amostras comerciais amplificadas com alvo no gene <i>cytb</i> de cavalo (Eq-F/Eq-R). M: Marcador molecular de ADN 100 pb (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha); CP: Controlo positivo (cavalo – 100%); Linhas 1 a 18: Amostras comerciais SF50 a SF84 e HLI a HL15, respetivamente, na concentração de 50 ng/μL; CN: Controlo negativo.....	53
Figura 29 - Gel de eletroforese de produtos de PCR das amostras comerciais amplificadas com alvo no gene <i>cytb</i> de cavalo (Eq-F/Eq-R). M: Marcador molecular de ADN 100 pb (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha); CP: Controlo positivo (cavalo – 100%); Linhas 1 a 25: Amostras comerciais SF85 a SF110, respetivamente, na concentração de 50 ng/μL; CN: Controlo negativo.....	53
Figura 30 - Gel de eletroforese de produtos de PCR das amostras comerciais amplificadas com alvo no gene <i>cytb</i> de cavalo (Eq-F/Eq-R). M: Marcador molecular de ADN 100 pb (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha); CP: Controlo positivo (cavalo – 100%); Linhas 1 e 2: Amostras comerciais PF25 a HL5, respetivamente, na concentração de 50 ng/μL; CN: Controlo negativo..	53
Figura 31 – Gel de electroforese de produtos de PCR das amostras comerciais amplificadas com alvo no gene <i>cytb</i> de bovino (Bos-F/Bos-R) (A) e de cavalo (Eq-F/Eq-R) (B). M: Marcador molecular ADN 100 pb (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha); Linhas 1 a 2: Amostras comerciais PF25 e HL5, respetivamente, na concentração de 50 ng/μL; CP: Controlo positivo; CN: Controlo negativo. ..	54
Figura 32 - Curvas de amplificação (A), respetiva curva de calibração (B) e curvas de <i>melting</i> (C) obtidas por PCR em tempo real da diluição seriada do extrato de ADN de carne crua CV18 (100% carne de cavalo), para a determinação do limite de deteção absoluto.	56
Figura 33 - Curvas de amplificação (a), respetiva curva de calibração (b) e curvas de <i>melting</i> (c) obtidas por PCR em tempo real da diluição seriada do extrato de ADN de carne autoclavada CVA18 (100% carne de cavalo), para a determinação do limite de deteção absoluto.	57
Figura 34 – Comparação das curvas de calibração obtidas por PCR em tempo real com diluições seriadas a partir do extrato do ADN de cavalo, com e sem processamento (10000 pg, 1000 pg, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 0,1 pg), para a determinação do limite de deteção absoluto.....	59
Figura 35 - Curvas de amplificação (a), respetiva curva de calibração (b) e curvas de <i>melting</i> (c) obtidas por PCR em tempo real resultante da amplificação de misturas de referência cruas contendo 25%, 10%, 1%, 0,1%, 0,01%, 0,001%, 0,0005% e 0,0001% de carne de cavalo em bovino.	60
Figura 36 - Curvas de amplificação (a), respetiva curva de calibração (b) e curvas de <i>melting</i> (c) obtidas por PCR em tempo real resultante da amplificação de misturas de referência processadas	

contendo 25%, 10%, 1%, 0,1%, 0,01%, 0,001%, 0,0005% e 0,0001% de carne de cavalo em bovino.

..... 61

Figura 37 - Comparação das curvas de calibração normalizadas obtidas por PCR em tempo real com as misturas de referência com e sem processamento (25%, 10%, 1%, 0,1%, 0,01%, 0,001%, 0,0005%, 0,0001%) para a determinação de carne de cavalo. 63

Figura 38 – Exemplo das curvas de *melting* obtidas por PCR em tempo real resultante da amplificação do gene universal (18SRG-F/18SRG-R) da amostra comercial HL5 (vermelho) e mistura de referência de 10% de carne cavalo em vaca (verde)..... 65

Figura 39 - Curva de calibração não-normalizada obtida por PCR em tempo real (25%, 10%, 1%, 0,1%, 0,01%, 0,001%, 0,0005%, 0,0001%), para a quantificação da amostra HL5. 66

Figura 40 – Exemplo das curvas de *melting* obtidas por PCR em tempo real resultante da amplificação do gene universal (18SRG-F/18SRG-R) da amostra comercial PF25 (azul) e mistura de referência de 10% de carne cavalo em vaca (verde). 66

Índice de tabelas

Tabela 1 – Quantidade de carne (em milhares de toneladas) de cavalo produzida, exportada e importada nas diferentes regiões do mundo no ano 2001 (adaptado de Gill (2005)).	5
Tabela 2 – Quantidade de carne de cavalo (em milhares de toneladas) produzida, exportada e importada nos países com maior exportação desta espécie, no ano 2001 (adaptado de Gill (2005)).	6
Tabela 3 – Exemplos de métodos de extração de ADN aplicados a produtos cárneos.	14
Tabela 4 – Resumo dos trabalhos reportados na literatura baseados na análise de ADN para a identificação da espécie <i>Eqqus caballus</i> em produtos cárneos.	28
Tabela 5 – Misturas binárias utilizadas como material de referência para testar a presença de cavalo.	33
Tabela 6 – Lista das amostras de 2012/2013 (antes do escândalo) utilizadas e indicações relevantes mencionadas nos respectivos rótulos.	35
Tabela 7 – Lista das amostras de 2013/2014 (após do escândalo) utilizadas e indicações relevantes mencionadas nos respectivos rótulos.	36
Tabela 8 - Oligonucleótidos utilizados na identificação de espécies (cavalo e vaca) amplificação de gene universal.	40
Tabela 9 – Componentes e respectivas quantidades da mistura de PCR qualitativa para a identificação das diferentes espécies (volumes em μL).	40
Tabela 10 - Condições utilizadas na amplificação por PCR qualitativa convencional para todas as espécies alvo deste trabalho.	41
Tabela 11 – Componentes e respectivas quantidades (μL) da mistura de PCR em tempo real para a amplificação de ADN de cavalo e gene universal.	42
Tabela 12 – Concentração e pureza dos extratos de ADN obtidos a partir das misturas binárias não autoclavadas.	43
Tabela 13 – Concentração e pureza dos extratos de ADN obtidos a partir das misturas binárias autoclavadas.	44
Tabela 14 – Concentração e pureza dos extratos de ADN obtidos a partir de amostras comerciais.	46
Tabela 15 – Resultados obtidos para a determinação do LOD absoluto por PCR em tempo real de ADN de cavalo de carne crua e processada.	58
Tabela 16 – Resultados obtidos para a determinação do LOD relativo para misturas de referência cruas e processadas.	62
Tabela 17 – Estimativa das percentagens de carne de cavalo adicionadas em amostras cegas não processadas.	64
Tabela 18 – Estimativa das percentagens de carne de cavalo adicionadas em amostras cegas não processadas.	64

Lista de abreviaturas

2-DE – Eletroforese Bidimensional

A260 – Absorvência a 260 nm

A280 – Absorvência a 280 nm

CN – Controlo Negativo

CP – Controlo Positivo

Ct – Cycle Threshold

CTAB – Cloreto de cetiltrimetilamónio

dNTP - Desoxirribonucleótido trifosfato

EFSA – Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (European Food Safety Authority)

ELISA – *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

EMA – Agência Europeia do Medicamento (European Medicines Agency)

FRET - Fluorescence Resonance Energy Transfer

GC - Gas Chromatography (Cromatografia Gasosa)

HPLC - *High Performance Liquid Chromatography* (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)

IEF – Focagem isoeétrica

LOD – Limite de deteção

MUFA – Ácidos gordos monoinsaturados

mtADN – ADN mitocondrial

pb – Pares de bases

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

RAPD - *Random Amplified Polymorphic DNA*

RFLP - *Restriction fragment length polymorphism*

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de Sódio

T_m - Temperatura de desnaturação (*melting*)

Componente Teórica

I Importância da carne na alimentação

A carne tem exercido um papel crucial na evolução humana, sendo um componente importante de uma dieta saudável e equilibrada devido à sua riqueza nutricional (Pereira et al., 2013b). Segundo o Codex Alimentarius (CAC/RCP 58, 2005), a carne é definida como “Todas as partes de um animal que se destinam a ser, ou ter sido ponderadas como seguras e adequadas para o consumo humano”. Da sua composição fazem parte água, proteínas de elevado valor biológico, ferro, vitamina B12, assim como outras vitaminas do complexo B, zinco, selênio, fósforo e pequenas quantidades de hidratos de carbono. O teor em gordura e perfil de ácidos gordos é dependente da espécie, sistema de alimentação e corte utilizado (Heinz et al., 2007, Pereira et al., 2013b).

O papel da carne, especialmente da carne vermelha, como uma fonte de proteína é indiscutível. Os teores de proteína podem variar substancialmente. Os valores médios rondam os 22%, no entanto, podem ser atingidos teores de 34,5% (peito de frango) ou teores mais baixos, como os 12,3% (carne de pato). É importante referir que esta proteína tem elevada digestibilidade (0,92), enquanto o feijão, lentilha, ervilhas e grão-de-bico, que são considerados fontes de proteína importantes para dietas vegetarianas, apresentam valores entre 0,57-0,71, já o glúten e o trigo foram classificados com uma pontuação de 0,25. Para, além disso, as proteínas da carne foram distinguidas pelo seu conteúdo em aminoácidos essenciais. Os aminoácidos são as unidades primárias da proteína, sendo necessários 20 aminoácidos para as sintetizar. Existem oito que não podem ser produzidos pelo homem, por isso são considerados essenciais e têm que ser adquiridos através da dieta. Os vegetarianos têm que combinar cereais e legumes para obter todos os aminoácidos essenciais (Pereira et al., 2013b)

A carne contém uma mistura de ácidos gordos saturados, ácidos gordos polinsaturados e ácidos gordos monoinsaturados (MUFA), sendo estes últimos os responsáveis por cerca de 40% da gordura total da carne. Os ácidos gordos monoinsaturados são considerados como neutros em relação aos níveis de colesterol no sangue, sendo o ácido oleico o principal MUFA presente na carne. Por sua vez, os ácidos gordos saturados, predominantes na carne, são os ácidos esteárico e palmítico, sendo estes considerados os prejudiciais para a saúde humana. Os ácidos gordos polinsaturados são também relevantes na carne, a qual é responsável pelo fornecimento de ácidos gordos do tipo n-3 e n-6, entre os quais se destacam os essenciais – ácido linoleico e ácido α -linolénico (Higgs et al., 2002).

O ferro tem um papel fundamental na saúde do homem. A sua ausência leva a uma deficiência em várias funções biológicas, sendo a dieta alimentar essencial para manter o

equilíbrio da sua quantidade. Este equilíbrio pode ser alcançado através do consumo de carne que é, provavelmente, a melhor fonte de ferro heme (elevada biodisponibilidade), principalmente as carnes vermelhas que possuem maior teor relativamente às carnes brancas. É também através da carne que o Homem pode adquirir vitaminas do complexo B, especialmente B12, a vitamina maior e mais complexa, que em quantidades insuficientes pode ser a principal causa de anemia megaloblástica e também está fortemente associada com níveis elevados de homocisteína no sangue, que é um fator de risco para doenças cardiovasculares.

A carne e derivados são importantes fontes de outros micronutrientes, que são vitais para a saúde humana. É o caso da vitamina A, essencial para o crescimento e desenvolvimento, que pode ser encontrada nas carnes de miudezas. O mesmo acontece com o ácido fólico, que pode ser encontrado no fígado. Este, juntamente com a vitamina B12, é um importante doador de metilo, sendo crucial para o desenvolvimento fetal. Também o zinco e o selénio se encontram presentes na carne. O zinco tem um papel funcional em sistemas enzimáticos, divisão celular e crescimento, funções imunes e reprodutivas. Por sua vez, o selénio exerce um papel importante na atividade da enzima glutatona peroxidase, a qual é crucial para processos de descontaminação (Pereira et al., 2013b).

1.1 Consumo de carne de cavalo

O consumo de carne de cavalo depende, principalmente, dos hábitos alimentares das populações que habitam em algumas regiões. Regra geral, este animal é mais consumido nos países onde é produzido (Litwinczuk et al., 2008). Ao longo dos tempos, o consumo de carne de cavalo tem variado amplamente, de acordo com as diferenças culturais e económicas da sociedade (Gill, 2005).

O consumo e/ou sacrifício do cavalo na Europa era um hábito cultural indo-europeu, ignorado como alimento pela cultura grega e mesmo repugnado pela cultura romana. Foi no decorrer do século VIII, por influência da Igreja Católica, que este animal se considerou impuro. Na Idade Média o cavalo tornou-se um companheiro de trabalho, pois os hábitos alimentares levaram ao desenvolvimento das práticas agrícolas sendo, portanto, estabelecida uma ligação emocional, impedindo que este fosse visto como um potencial animal para consumo. Porém, no século XVIII, o cavalo voltou a ser consumido nas classes mais carenciadas da população francesa, quando o alimento era escasso e também lhe foi atribuído poder curativo durante a época da Revolução Francesa.

Em 1841, o comércio de carne de cavalo foi legalizado nos países germânicos, e em 1866, na França, generalizando-se, três anos depois, a partir do cerco de Paris. Visto como um hábito alimentar das classes de menor estatuto social, alastrou-se posteriormente, à pequena burguesia francesa e às classes trabalhadoras. Nos Estados Unidos da América, foi comercializada no decorrer da II Guerra Mundial, quando a carne de bovino encareceu e era mais destinada aos militares. Em Portugal, os primeiros registos de consumo de carne de equinos surgem em 1934, aumentando significativamente entre os anos 1936 e 1945, período marcado pela Guerra Civil Espanhola e pela II Guerra Mundial. Apesar da ingestão da carne de cavalo estar associada a épocas de escassez de alimentos, o consumo deste animal é relativamente popular nos países nórdicos e asiáticos, bem como na Itália (Mateus, 2009). Nos países membros da UE, o consumo médio por habitante é de 0,4 kg por ano. Contudo, devido a uma produção insuficiente, a importação abrange 66,7% das necessidades do mercado (Dobranic' et al., 2009).

Tabela I – Quantidade de carne (em milhares de toneladas) de cavalo produzida, exportada e importada nas diferentes regiões do mundo no ano 2001 (adaptado de Gill (2005)).

Região	Produzida	Exportada	Importada
Ásia	281	-	10
Europa Oriental	12	10	8
Europa Ocidental	64	42	113
América do Norte	39	25	-
América Central	79	2	3
América do Sul	84	54	-
Australásia	21	4	-
Não Identificado	114	15	6
Total Mundial	694	152	140

Os principais países exportadores de carne de cavalo situam-se na América do Sul, na América do Norte e na Europa Ocidental (Tabela I). A carne exportada das Américas é, regra geral, enviada para países de outros continentes, contrariamente ao que acontece com países da Europa Ocidental que exportam o produto para a sua própria região. Contudo, como os cavalos de trabalho não são comuns na Europa Ocidental, há necessidade de importar cavalos da Europa Ocidental para, posteriormente, serem abatidos e exportados.

Tabela 2 – Quantidade de carne de cavalo (em milhares de toneladas) produzida, exportada e importada nos países com maior exportação desta espécie, no ano 2001 (adaptado de Gill (2005)).

País	Produzida	Exportada	Importada
Itália	51	-	23
Bélgica	-	29	37
França	13	6	30
Holanda	-	5	13
Japão	-	-	10

Este animal fornece uma fonte, relativamente barata, de proteína em países onde os cavalos são extensivamente utilizados como animais de trabalho e transporte humano (Gill, 2005). A textura da carne de cavalo é relativamente firme, e o seu sabor adocicado é-lhe atribuído pelo seu elevado teor em glicogénio, em comparação com outras espécies (Litwinczuk et al., 2008). Esta carne contém um elevado teor em água, proteínas, ferro e vitaminas, que são solúveis em água. O seu menor teor em lípidos e elevado em fibras musculares e vitaminas insolúveis em água, torna-a diferente, em comparação com a carne bovina e suína (Dobranic et al., 2009).

1.2 “O escândalo da carne de cavalo”

O consumo de carne de cavalo é uma prática comum em muitas regiões do globo. Contudo, a deteção desta espécie em produtos alimentares gerou um escândalo internacional, uma vez que a sua presença não estava mencionada na rotulagem. A não indicação desta espécie resulta numa fraude alimentar uma vez que o consumidor não pode optar pela ingestão deste tipo de animal. Para além disso, pode pôr em risco a saúde do consumidor quando as carcaças utilizadas contêm fenilbutazona. Esta substância é usada num medicamento anti-inflamatório não esteroide, que foi introduzido em 1949 para tratamento humano de artrites reumatoide e gota. Atualmente, é apenas utilizada sob supervisão de um especialista em pacientes que sofram de artrites graves, em que outros tratamentos não resultaram. A fenilbutazona é considerada tóxica para a medula óssea e a exposição a esta substância tem sido associada à anemia aplástica. Existem também incertezas quanto ao seu potencial de genotoxicidade e carcinogenicidade.

Como medicamento veterinário, a fenilbutazona, é utilizada para o tratamento de dores e febres em cavalos e cães. Em alguns Estados-Membros é permitida a sua utilização para problemas de articulações em cavalos de corrida e cavalos de companhia que não

estejam destinados ao consumo alimentar. Assim, uma vez que estes animais sejam tratados com este medicamento serão excluídos para o consumo humano, sendo a sua entrada na cadeia alimentar uma prática ilegal.

A Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA) e a Agência Europeia do Medicamento (EMA) concluíram que a presença de resíduos deste medicamento veterinário não é de grande preocupação para os consumidores, pois a probabilidade de exposição e de efeitos tóxicos é muito baixa. A probabilidade de um indivíduo contrair anemia aplástica após ter consumido carne de cavalo com este medicamento é 1 em 100 milhões. Para além disso, concluíram que embora a genotoxicidade da fenilbutazona não possa ser excluída, esta é considerada improvável, sendo o risco de carcinogenicidade também muito reduzido, dada a raridade do consumo carne de cavalo contendo estes resíduos, considerando já os produtos adulterados. Contudo, a avaliação feita por estas entidades não permite definir níveis seguros de fenilbutazona em produtos alimentares, mantendo-se a proibição da utilização desta substância em animais destinados ao consumo humano.

Apesar de ter sido concluído que a probabilidade desta substância causar doença é muito baixa, é de interesse geral que esta não entre na cadeia alimentar, uma vez que não foram estabelecidos limites máximos de resíduos para este medicamento veterinário continuando a ser ilegal a introdução na cadeia alimentar de animais tratados com esta droga (EFSA/EMA, 2013).

As incidências globais de alimentos adulterados são cada vez mais comuns e acabam por perturbar o comércio internacional de alimentos devido a disputas frequentes sobre requisitos de segurança e qualidade dos alimentos. As recentes controvérsias à volta do escândalo carne de cavalo obrigam as autoridades a cumprir regulamentos rigorosos sobre adulterações de alimentos (Premanandh, 2013).

2 Autenticidade dos produtos cárneos

A palavra “autêntico” é, geralmente, definida como “confiável, honesto, genuíno, de origem indiscutível” (Lüthy, 1999). Nos últimos anos, verifica-se uma crescente preocupação pela avaliação da autenticidade dos produtos cárneos (Ballin, 2010). Estes representam uma grande parte da alimentação humana (Ballin et al., 2008), portanto uma rotulagem honesta e precisa é essencial para que o consumidor possa escolher um produto em detrimento de outro (Woolfe et al., 2004). Contudo, ainda se pratica uma rotulagem inadequada, quer

fraudulenta quer involuntária (Ballin et al., 2012), principalmente nos produtos cárneos, onde o tratamento térmico dificulta a distinção dos diferentes componentes (Martín et al., 2007).

A avaliação da autenticidade dos produtos cárneos engloba várias questões, incluindo a deteção da substituição de espécies de maior valor comercial por espécies de menor valor, a presença de espécies não declaradas e a substituição por proteínas de origem vegetal (Amaral et al., 2014). Ballin (2010) categoriza as áreas onde a fraude é mais provável de ocorrer, da seguinte forma: origem da carne, substituição da carne, tratamento e processamento da carne e adição de outros ingredientes não cárneos. As fraudes associadas à origem são, por exemplo, a sua origem geográfica, idade de abate e sexo. No caso da substituição, esta poderá ocorrer com gordura ou proteínas, como anteriormente foi referido. A prática de congelação/descongelação poderá ser uma das fraudes cometidas no processamento da carne e, por fim, no caso de adição de outros ingredientes não cárneos temos o exemplo da adição de água e aditivos.

A identificação de espécies tem como objetivo evitar fraudes alimentares relacionadas com a substituição de uma espécie similar mais barata, proteger espécies em vias de extinção e garantir aos consumidores que as suas escolhas correspondem aos seus estilos de vida, religião ou saúde (Bottero et al., 2011). É um importante meio para verificar a rotulagem dos alimentos, conforme o exigido pela Diretiva 2002/86/CE, os produtos cárneos devem conter nos seus rótulos a indicação de cada uma das espécies animais utilizadas e as respetivas quantidades.

Deste modo, tornou-se necessário o desenvolvimento de ferramentas analíticas confiáveis e sensíveis, a fim de facilitar a identificação de espécies em diferentes alimentos (Kesmen et al., 2009), especialmente em alimentos processados onde a discriminação dos diferentes ingredientes é mais difícil (Bottero et al., 2011). A identidade das espécies pode ser conseguida utilizando métodos baseados na análise de proteínas e métodos que passam pela análise de ADN (Martinez et al., 1998).

Os métodos baseados na análise proteica incluem eletroforese, cromatografia e técnicas imunológicas (Kesmen et al., 2007). Contudo, estes métodos têm provado ser inadequados e menos sensíveis para a identificação de espécies em produtos cárneos que foram expostos a temperaturas elevadas, causando a desnaturação das proteínas. Por outro lado, os métodos de análise do ADN com base na reação em cadeia da polimerase (PCR) permitem a deteção precisa das espécies animais, mesmo que os produtos tenham sido submetidos a tratamento térmico e a sua composição seja complexa (Kesmen et al., 2009). Assim, a maior estabilidade térmica do ADN em relação às proteínas, e o facto de estar presente na maior parte dos tecidos biológicos faz com que os métodos baseados na análise

de ADN sejam os escolhidos para diferenciar e identificar os diferentes componentes dos alimentos, sendo, portanto uma alternativa à análise proteica (Mafra et al., 2008a).

3 Métodos utilizados para a identificação de espécies em produtos cárneos

3.1 Métodos baseados na análise de proteínas

Como anteriormente foi referido, os métodos baseados na análise de proteínas para identificação de espécies e avaliação da autenticidade dos alimentos incluem ensaios imunológicos, técnicas eletroforéticas e cromatográficas (Asensio et al., 2008, Mafra et al., 2008a).

As técnicas eletroforéticas podem ser utilizadas na identificação de espécies uma vez que os produtos cárneos são uma mistura de tecidos, principalmente constituídos por proteínas. A composição proteica pode variar de acordo com o tipo de tecido, armazenamento do produto e processos tecnológicos utilizados no fabrico (Montowska et al., 2010). Na eletroforese, a separação das moléculas ocorre pela migração de partículas sob a influência de um campo elétrico, sendo que a carga destas depende do pH do meio. O método eletroforético mais utilizado para a análise qualitativa de misturas de proteínas é o SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida e dodecilsulfato de sódio). Este baseia-se na separação das proteínas, de acordo com o seu tamanho. Para além deste, outros métodos são utilizados, tais como: método de focagem isoelétrica (IEF), onde a separação das moléculas ocorre de acordo com os seus pontos isoelétricos, e o método eletroforese bidimensional (2-DE), onde há combinação do método IEF com o método SDS-PAGE (Wilson et al., 2010).

Os métodos cromatográficos funcionam com base na separação de uma mistura de substâncias em constituintes individuais, através da determinação das propriedades de cada um. Após a separação, é feita a quantificação, permitindo assim identificar os componentes do alimento (Montowska et al., 2010). Através da cromatografia líquida e gasosa é possível separar e, por sua vez, identificar quase todo o tipo de moléculas presentes num alimento. A cromatografia líquida, em particular a HPLC, é capaz de detetar compostos como proteínas, aminoácidos, compostos fenólicos e hidratos de carbono. Já a cromatografia gasosa (GC) é mais adequada para a análise de moléculas voláteis ou semivoláteis (Reid et al., 2006). Estes dois tipos de técnicas têm provado ser úteis na identificação dos constituintes do alimento.

Contudo, as técnicas cromatográficas são dispendiosas, demoradas e de complexa execução, o que as torna inconvenientes para análises de rotina. (Asensio et al., 2008).

Os métodos imunológicos são ideais para deteção qualitativa e quantitativa de vários tipos de proteínas. São rápidos, económicos, sensíveis e específicos quando o analito alvo é conhecido (Mafra et al., 2005, Puchades et al., 2013). Os mais utilizados na identificação de espécies são os ensaios em tiras de fluxo lateral, ELISA e a técnica de *Western blot* (imunoblot), embora que esta última seja mais apropriada para investigação do que para análises de rotina.

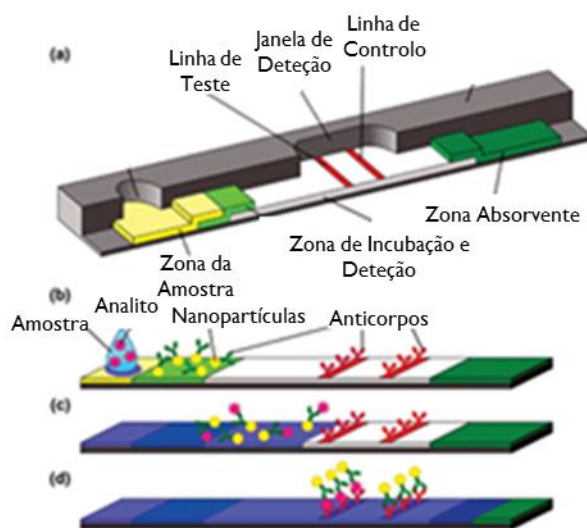


Figura 1 – Representação esquemática do ensaio tiras de fluxo lateral (Adaptado de ((Mark et al., 2010))).

As tiras de fluxo lateral utilizam dois tipos de anticorpos imobilizados e específicos para a proteína alvo, fazendo a ligação da proteína com o anticorpo através de um reagente corado numa tira de nitrocelulose (Figura 1). Estes ensaios, indicam apenas a presença/ausência do analito alvo ou estabelecem um limite (semiquantitativo) do resultado (Mafra et al., 2005). O método ELISA tem como base a imobilização de um antígeno ou anticorpo a uma superfície sólida (Montowska et al., 2010) (Figura 2). Esta técnica, que pode ser direta ou indireta, envolve uma enzima (uma proteína que catalisa uma reação bioquímica) para detetar a presença de um anticorpo ou um antígeno numa amostra. Tanto os anticorpos como as proteínas que não se ligam são eliminados, ficando apenas retidos na superfície sólida os complexos anticorpo-proteína. O anticorpo marcado está, geralmente, ligado a uma enzima, que em presença do substrato origina um produto corado (Asensio et al., 2008). Por fim, a técnica *Western blot*, consiste na separação eletroforética de proteínas,

através de SDS-PAGE, transferência dos componentes do gel para uma membrana (Nitrocelulose), bloqueio dos locais de ligação das imunoglobulinas na membrana e adição de anticorpos como sonda (Figura 3) (Mafra et al., 2005).

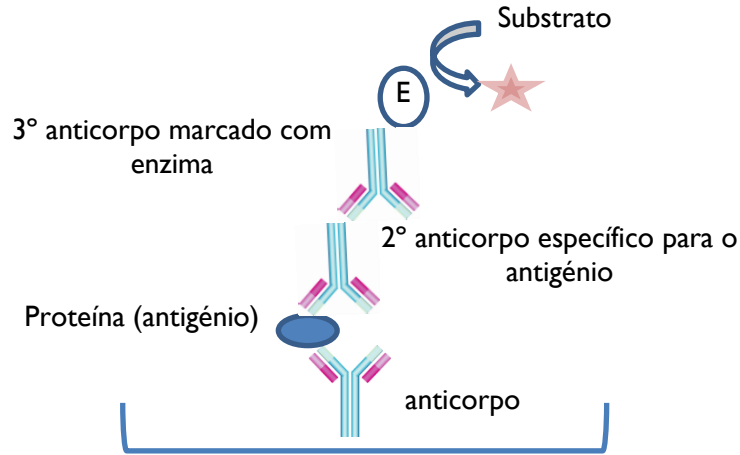


Figura 2 – Representação esquemática de um ensaio ELISA (sandwich).

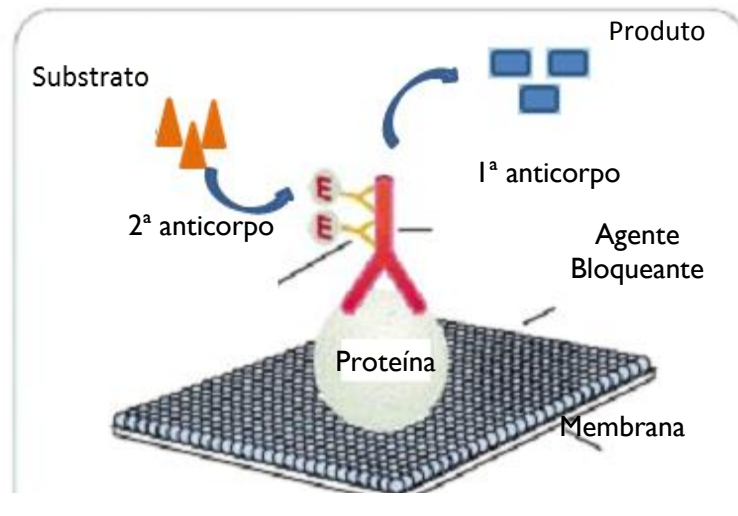


Figura 3 - Representação esquemática do ensaio Western blot (imuno-blot).

Os ensaios imunológicos têm sido amplamente utilizados para fins de verificação da autenticidade dos alimentos devido ao seu baixo custo e ao curto período de realização (Asensio et al., 2008). Contudo, esta técnica também é caracterizada pela falta de precisão e pela possibilidade de falha na detecção de espécies em produtos processados, onde as proteínas são desnaturadas (alteração dos epítomos) durante o tratamento térmico,

tornando a sua deteção mais difícil (Chisholm et al., 2005, Di Pinto et al., 2005, Soares et al., 2010). É também importante referir que a presença e as características das proteínas não são homogêneas nos diferentes tecidos (Pfeiffer et al., 2004). Esta técnica também apresenta dificuldades iniciais na produção de um anticorpo específico para uma proteína em particular (Reid et al., 2006) quando não existem kits comerciais, tornando-a bastante dispendiosa. Para além disso, há possibilidade de ocorrer reatividade cruzada com proteínas estreitamente relacionadas e de não ser possível detetar diferenças na composição dos aminoácidos entre proteínas (Di Pinto et al., 2005; Diaz-Amigo, 2010).

3.2 Métodos baseados na análise de ADN

Recentemente, os métodos baseados na análise de ADN têm sido considerados ferramentas essenciais para a identificação de espécies em alimentos (Amaral et al., 2014, Bottero et al., 2011, Santos et al., 2012). A escolha destes métodos tem sido atribuída à sua elevada sensibilidade e especificidade, permitindo a deteção de quantidades muito pequenas de ADN em matérias-primas e alimentos processados (Mafra et al., 2008). Em comparação com as técnicas baseadas na análise de proteínas, este método apresenta várias vantagens, tais como a ubiquidade de ácidos nucleicos em todos os tipos de células e o facto de o ADN apresentar maior estabilidade, permitindo identificação de espécies em alimentos complexos e processados (Amaral et al., 2014; Cheng et al., 2014).

A análise de ADN, acoplada com a reação em cadeia da polimerase (PCR) apresenta-se como uma alternativa rápida, simples, sensível e altamente específica, relativamente aos métodos baseados na análise de proteínas (Soares et al., 2010) possibilitando a deteção de quantidades vestigiais de tecidos animais. Uma vantagem adicional das técnicas baseadas em PCR reside na sua versatilidade, que permite o isolamento do ADN a partir de diferentes materiais de origem, ou seja, tanto se pode aplicar este método a amostras de levada rígidez (produtos do osso), como a amostras líquidas (Natonek-Wiśniewska et al., 2013).

O elevado conteúdo de informação torna a análise de ADN particularmente adequada para alimentos. Na última década, com o objetivo de identificar espécies, foram muitos os protocolos desenvolvidos para análise do ADN. O conhecimento atual, parcial ou completo, de sequências de ADN num grande número de espécies já permite o desenvolvimento de novos métodos com elevada sensibilidade e especificidade para o alvo genético em análise. As técnicas biomoleculares têm sido amplamente aplicadas no controlo de alimentos para consumo humano e animal (Bottero et al., 2011; Pereira et al., 2013a).

Atualmente, a técnica de PCR em tempo real é considerada como a mais útil, uma vez que permite a quantificação, sendo muito eficaz na determinação de ADN fortemente degradado. Por outro lado, o elevado custo do equipamento e os reagentes necessários para a análise são uma barreira significativa para a utilização desta técnica em muitos laboratórios (Natonek-Wiśniewska et al., 2013).

Torna-se importante referir que a análise por PCR está dependente da qualidade e pureza do material genético extraído. A extração é um passo prévio importante, de modo a se obter ADN integro e com qualidade e quantidade suficientes (Mafra et al., 2008b)

3.2.1 Extração e isolamento do ADN

O sucesso da amplificação do ADN está dependente dos métodos de extração. Estes devem fornecer material genético em quantidade e qualidade. Nos últimos anos foram desenvolvidos vários métodos para o isolamento do ADN. Os produtos alimentares são matrizes complexas e a escolha do método está dependente da origem do material biológico, do processamento a que eles foram submetidos (químico, térmico, enzimático, etc.) e da presença de potenciais inibidores de PCR, tais como polissacarídeos, proteínas e polifenóis (Mafra et al., 2008b; Schubbert, 2010).

A extração de ácidos nucleicos a partir de material biológico requer a lise celular, a inativação de nucleases celulares e a separação do ácido nucleico desejado a partir de detritos celulares. Muitas vezes, o procedimento de lise ideal é um compromisso de técnicas que deve ser suficientemente rigorosos de forma a fragmentar o material de partida complexo, mas suficientemente suave para preservar o ácido nucleico alvo. Os procedimentos mais comuns para a lise celular incluem a rutura mecânica, o tratamento químico e a digestão enzimática. Depois de efetuada a inativação das nucleases através de sais, removem-se os resíduos celulares por centrifugação ou precipitação (Reid et al., 2006).

Mais recentemente, para a extração do ADN de diferentes alimentos, foram introduzidos um número de kits comerciais, que funcionam com uma variedade de tampões, solventes e/ou de colunas especializadas, contendo substâncias de ligação de ADN (Cawthorn et al., 2011). Dos métodos utilizados na extração de ADN de produtos cárneos, destaca-se o uso total ou parcial dos kits de extração Wizard (Promega), os quais se baseiam na ligação do ADN a uma resina de sílica, podendo depois ser eluído e separado de outros compostos sem interesse. Na Tabela 3 apresentam-se métodos de extração utilizados em alguns trabalhos.

Tabela 3 – Exemplos de métodos de extração de ADN aplicados a produtos cárneos

Espécie Alvo	Método de extração/purificação do ADN	Referências
Vaca; Porco; Frango; Peru Cavalo; Carneiro; Cabra	Wizard	Köppel et al. (2009)
Lebre	Wizard	Santos et al. (2012)
Porco; Peru	Wizard	Soares et al. (2010, 2013)
Vaca, Frango, Cordeiro	CTAB	Zhang et al. (2007)
Peru; Frango	CTAB	Hernández-Chávez et al. (2011)
Cavalo, Burro, Porco	Dneasy Tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany)	Kesmen et al. (2009)
Porco, Vaca, Búfalo, Frango, Cabra, Coelho, Coderniz	Dneasy Tissue kit (Qiagen, Germany)	Murugaiah et al. (2009)

3.2.2 ADN alvo a amplificar

A escolha do marcador de ADN é extremamente importante. Muitas técnicas de biologia molecular aplicadas a produtos de origem alimentar utilizam ADN mitocondrial. Este apresenta diversas vantagens em relação ao ADN nuclear e está presente em todas as espécies eucariotas, salvo raras exceções (Bottero et al., 2011; Pereira et al., 2008). O ADN mitocondrial está presente nas células em elevado número de cópias, o que aumenta a probabilidade de deteção de uma sequência específica, mesmo quando está presente em pequenas quantidades. Para além disso, aumenta a possibilidade de amplificação de fragmentos ADN degradado, mesmo após tratamentos de desnaturação. (Bottero et al., 2011; Lockley et al., 2000). Outra vantagem está associada ao facto de este ser herdado apenas da mãe, sem qualquer tipo de recombinação, permitindo estabelecer ligações genéticas (Murugaiah et al., 2009). Por fim, a taxa de mutação relativamente elevada em comparação com os genes nucleares, permiti a distinção de espécies intimamente relacionadas (Lockley et al., 2000). Contudo, como há variação do número de cópias de genes mitocondriais por célula, entre as diferentes espécies, diferentes indivíduos da mesma espécie e diferentes tecidos do mesmo indivíduo, surgem limitações na utilização do ADN mitocondrial para a deteção e quantificação de espécies específicas (Lopparelli et al., 2007).

Entre os genes mitocondriais, o gene do citocromo b (*cytb*), *D-loop*, o gene de 12S rARN e o gene 16S rARN têm sido utilizados para a identificação da espécie. O gene

mitocondrial 12S rARN tem sido utilizado na identificação de espécies, tais como vaca, búfalo e carneiro (Girish et al., 2005). Cammà et al. (2012) desenvolveu um ensaio de PCR em tempo real para a identificação simultânea de espécies através dos genes *cytb* e 16S rARN. A sequência mitocondrial *D-loop* permitiu o desenho de oligonucleótidos (*primers*) específicos para detetar várias espécies animais, nomeadamente cabra, porco, ovelha, veado, entre outras (Fajardo et al., 2007).

3.2.3 A técnica de PCR

Em 1985, Kary B. Mullis, criou a técnica da reação em cadeia da polimerase, e desde então tem sido utilizada em mais de 300 mil publicações científicas, sendo aplicada em diferentes áreas devido à sua versatilidade, especificidade e sensibilidade. A PCR tem sido utilizada com sucesso na identificação de microrganismos, na deteção de componentes em produtos alimentares e na identificação de espécies de vários animais e plantas (Rodriguez-Lazaro et al., 2013).

Esta técnica consiste numa amplificação exponencial de um fragmento de ADN, tendo como princípio a hibridação de oligonucleótidos específicos (*primers*) a esse fragmento e a sua síntese em milhões de cópias (Mafra et al., 2008^a; Rodriguez-Lazaro et al., 2013). A PCR é realizada em múltiplos ciclos, que se dividem em três etapas: desnaturação, hibridação e extensão (Figura 4). Estas etapas possuem tempos e temperaturas diferentes e a cada ciclo o número de sequências alvo cresce exponencialmente (Broll, 2010).

Na primeira etapa, **desnaturação**, ocorre a quebra das pontes de hidrogénio da cadeia dupla de ADN, aumentando o número de bases desemparelhadas. Nesta fase, todas as reações enzimáticas param e a temperatura para que esta ocorra tem de rondar os 95°C (Rodriguez-Lazaro et al., 2013). Segue-se a segunda etapa, **hibridação**, onde a temperatura baixa para 40-60°C e os *primers* hibridam, ligando-se às regiões complementares. Esta ligação é feita através de pontes de hidrogénio e a etapa tem a duração de aproximadamente 14-60 s (Broll, 2010). Na última fase, **extensão**, os *primers* são prolongados ao longo da sequência alvo por ação de uma polimerase do ADN termoestável (frequentemente polimerase de ADN da Taq), na presença de bases nucleotídicas (dNTP), originando uma nova molécula de ADN de cadeia dupla. A temperatura ideal para o funcionamento da polimerase de ADN da Taq é de 72°C (Somma et al., 2006b).

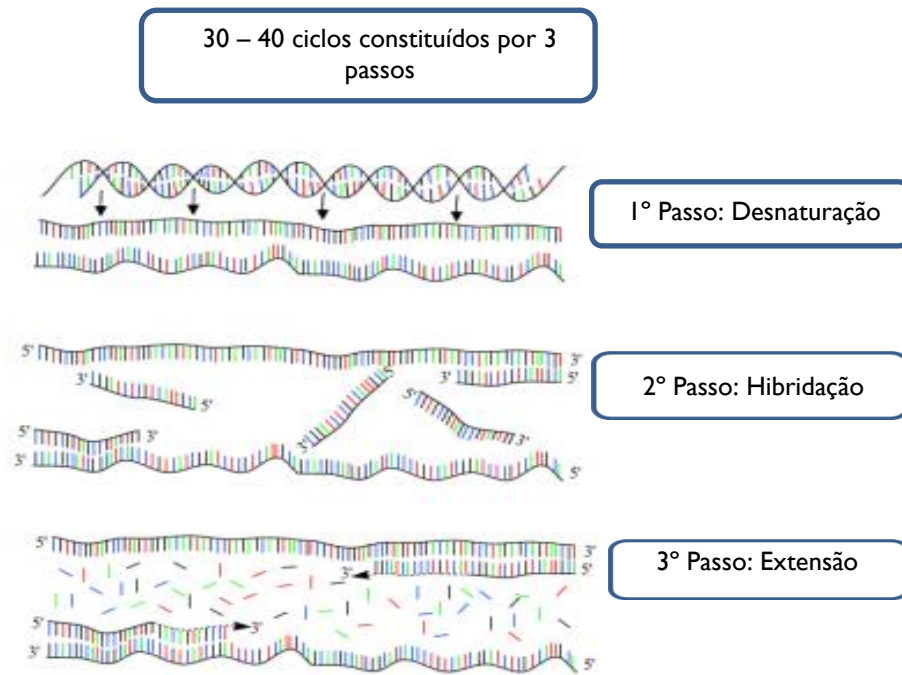


Figura 4 – Representação esquemática das três etapas de amplificação por PCR (adaptado de Broll (2010)).

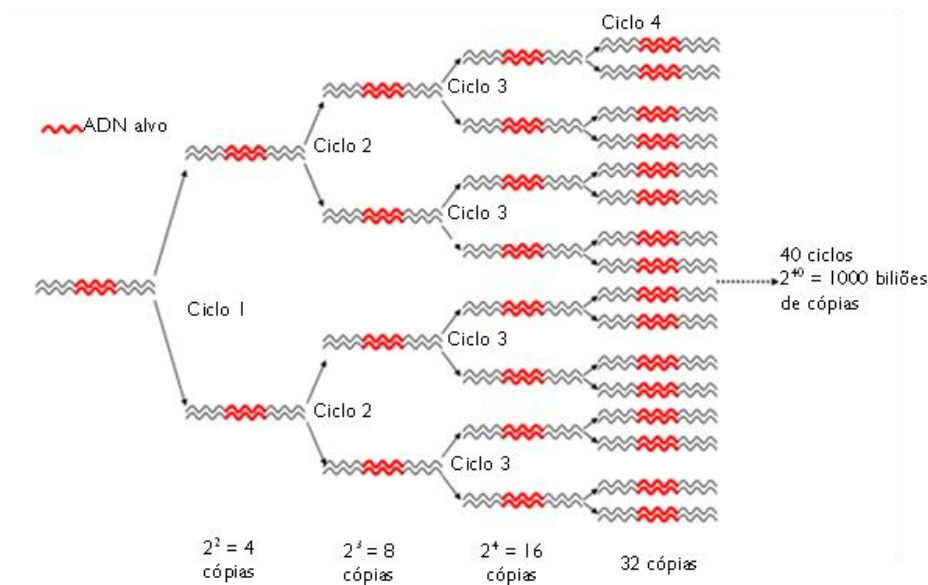


Figura 5 – Amplificação das cadeias de ADN na técnica de PCR. A quantidade de ADN deverá duplicar a cada ciclo resultando em 1000 bilhões de cópias no final de 40 ciclos de reação (adaptado de Rodriguez-Lazaro et al. (2013)).

Este ciclo, composto por três etapas, é geralmente repetido 25 a 45 vezes, dependendo da quantidade inicial de ADN, para que se obtenha uma quantidade detetável de cópias do fragmento de ADN escolhido (Figura 5) (Mafra et al., 2005).

Para a implementação da técnica PCR é necessário um conhecimento prévio da sequência alvo a detetar, para que se possam desenhar os *primers* específicos para essa sequência. Para além disso, são necessários outros componentes para a reação, tais como o extrato contendo o fragmento alvo, as bases de nucleótidos para a síntese de ADN (dNTP), Mg^{2+} (cofator da enzima), a enzima Taq polimerase e o respetivo tampão (Mafra et al., 2005):

- **Extrato de ADN** – A amplificação por PCR, em princípio, pode ser realizada se, pelo menos, estiver presente uma cópia intacta do gene alvo. Quanto maior for número de cópias do gene alvo, maior é a probabilidade do sucesso da amplificação. O extrato deve estar o mais puro possível, de forma a evitar inibição enzimática no processo de amplificação.
- **Oligonucleótidos (Primers)** – Os *primers* são desenhados para hibridarem na região de interesse do ADN alvo. O seu comprimento, geralmente, varia entre os 18 e 25 nucleótidos e deverão conter 40 a 60% de GC (Guanina e Citosina). Para que a produção de dímeros seja evitada, as extremidades 3' dos *primers* não devem ser complementares. Para além disso, a presença de três bases Guanina (GGG) e Citosina (CCC) também deve ser evitada nas extremidades 3' dos *primers*, por promover a amplificação não específica, o que leva à formação de produtos da PCR indesejáveis.
- **Concentração de Mg^{2+}** – O magnésio é um cofator da enzima, sendo, portanto, fundamental para o sucesso da amplificação. Para além disso, forma um complexo solúvel com os dNTP, que é essencial para sua incorporação na cadeia sintetizada. Uma baixa concentração de Mg^{2+} origina rendimentos baixos de amplificação. Uma elevada concentração, pelo contrário, leva a uma acumulação de produtos não específicos. A concentração do magnésio deve ser calculada/otimizada empiricamente para cada reação.
- **Tampão** – Este regula o pH da reação e a sua composição depende das características da enzima. Uma maior atividade da polimerase de ADN é observada com tampões de pH acima de 8.
- **dNTP** – Os desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP) livres são necessários para a síntese do ADN. A concentração dos 4 dNTP (Adenosina (A), Guanina (G), Citosina (C) e Timina (T)) deve ser equivalente de modo a evitar erros de incorporação.
- **Polimerase do ADN** – É uma enzima que sintetiza as moléculas de ADN de cadeia dupla, atuando sempre no sentido 5'-3'. Esta deve ser resistente a temperaturas elevadas, uma vez que os ciclos utilizam temperaturas entre os 60 e 95°C. A enzima

mais utilizada é a polimerase da Taq, com pH ótimo próximo de 8 e atividade a 95°C (Broll, 2010; Somma et al., 2006b).

Apesar das diversas vantagens da técnica PCR, a sua elevada sensibilidade torna-a suscetível de sofrer contaminações, o que leva a resultados falsos positivos. Para tal, é necessário incluir um controlo positivo (analito presente) e um controlo negativo (analito ausente) com o objetivo de contornar ou identificar possíveis contaminações (Broll, 2010).

No final da amplificação é necessário proceder-se a uma análise dos fragmentos. A eletroforese em gel de agarose é a estratégia mais simples para esse efeito (Mafra et al., 2005). Este método separa macromoléculas com base no tamanho, carga elétrica e outras propriedades físicas. O termo eletroforese descreve a migração de partículas carregadas sob a influência de um campo elétrico (Somma et al., 2006a). Para além da eletroforese em gel de agarose, outros métodos de confirmação adicional e/ou análise de fragmentos podem ser usados posteriormente, tais como digestão com enzimas de restrição (PCR-RFLP) e sequenciação de fragmentos (Mafra et al., 2008a).

A técnica de PCR apresenta maior sensibilidade e melhor especificidade em relação a outras técnicas já utilizadas. Este método tornou-se muito comum em laboratórios de biologia molecular, pois é uma ferramenta particularmente útil para identificação de espécies em amostras de ADN de qualidade inferior. As principais desvantagens são o risco de contaminação e a exigência de informações prévias sobre a sequência a analisar. No entanto, a PCR tem evoluído muito além da fácil amplificação e deteção, e muitos outros métodos já foram desenvolvidos a partir desta técnica (Broll, 2010; Pereira et al., 2008).

3.2.3.1 PCR com *primers* específicos

Esta técnica consiste no desenho de oligonucleótidos para a identificação direta e específica de fragmentos de ADN. Assim, é possível avaliar a autenticidade dos alimentos de forma simples e rápida uma vez que este método amplifica uma dada sequência alvo a partir de uma matriz complexa contendo muitas outras sequências (Fajardo et al., 2010).

A PCR com *primers* específicos de espécie é bastante útil como um método rotineiro, já que é simples, rápido, altamente sensível, robusto e barato. Um fator limitante para esta técnica está associado ao desenho dos *primers*, e posteriormente, a sua avaliação para testar a possibilidade de reação cruzada (Nau et al., 2009). Para além disso, o desenvolvimento da PCR com *primers* específicos permitiu a identificação de espécies, sem recorrer à sequenciação ou à digestão dos produtos da PCR com enzimas de restrição (Martín et al., 2007).

Na literatura é possível encontrar vários trabalhos que utilizaram *primers* específicos para a identificação de espécies em produtos cárneos (Amaral et al., 2014; Haunshi et al., 2009; Kesmen et al., 2007; Santos et al., 2012).

3.2.3.2 PCR em multiplex

A PCR em multiplex tem o mesmo princípio da PCR com *primers* específicos. A diferença reside no facto de poder amplificar múltiplas sequências em simultâneo, conferida pela presença de mais do que um par de *primers* específicos na reação. Assim, a técnica torna-se vantajosa quando o objetivo do estudo é a identificação de várias espécies (Figura 6). Esta técnica, utilizada para autenticação, é executada mais rapidamente, uma vez que todas as análises são feitas em simultâneo, sendo menos dispendiosa, produzindo menos erros e permitindo uma melhor análise de resultados, pois, ao contrário do sistema individual de PCR (com *primers* específicos), não é necessário compilar os resultados (Cheng et al., 2014; Köppel et al., 2009, 2011; Zha et al., 2011).

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

Em suma, é possível afirmar que esta técnica é uma ferramenta bastante útil para a identificação de espécies em produtos cárneos e que são vários os trabalhos desenvolvidos com a PCR em multiplex (Cheng et al., 2014; Köppel et al., 2011; Soares et al., 2010).

3.2.3.3 PCR-RFLP e RFLP

A técnica de PCR-RFLP é uma extensão da técnica de PCR utilizada para diferenciar espécies (Hsieh et al., 2007). Esta envolve a amplificação de uma região comum das espécies em estudo, seguida de uma digestão por enzimas de restrição, de modo a gerar fragmentos de tamanho variável com a espécie. O padrão de bandas obtido é geralmente visualizado através de eletroforese em gel de agarose, de modo a analisar os polimorfismos obtidos.

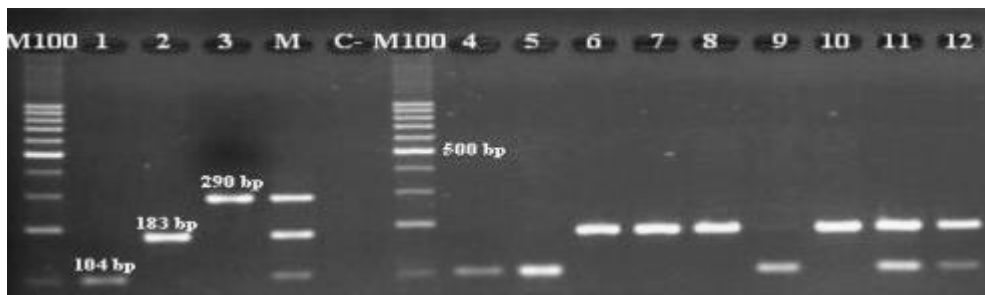


Figura 6- PCR em multiplex em produtos cárneos industriais. Linha 1 a 3: Controlo positivo com ADN de *Bos taurus*, controlo positivo com ADN de *Gallus gallus* e controlo positivo com ADN de *Sus scrofa*, respetivamente. Linha M: Mistura de ADN de *Bos taurus*, *Gallus gallus* e *Sus scrofa*; C: Controlo negativo; Linhas 4-5: Amostras de carnes moídas; Linha 6-8: Amostras de salsichas; Linha 9-12: Amostras de charcutaria. M100: marcador de ADN (Ghovvati et al., 2009).

Baseada nas variações dos locais de restrição, a técnica de RFLP, permite uma determinação rápida do genótipo. A figura 7 ilustra este método, onde a primeira amostra possui dois locais de restrição e a segunda amostra possui três locais, originando fragmentos de tamanhos diferentes (Mir et al., 2010).

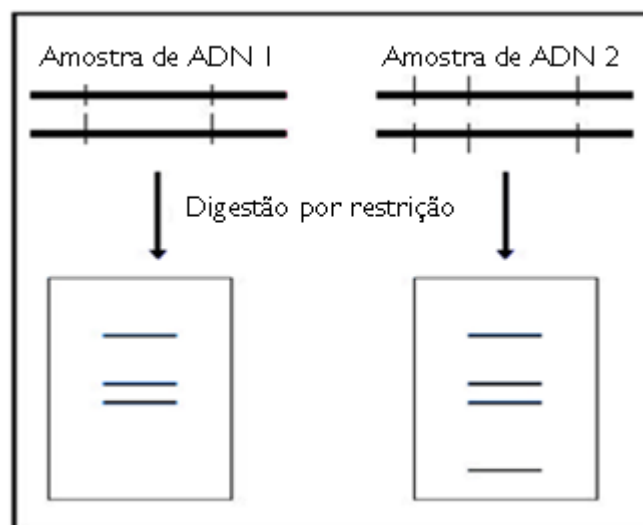


Figura 7 – Representação esquemática de ADN *fingerprint* obtido após RFLP a partir de duas amostras de ADN (adaptado de Mir et al. (2010)).

Este método tem provado ser prático, altamente reprodutível e fiável. Para além disso, os equipamentos utilizados fazem parte da maior parte dos laboratórios de biotecnologia, não tornando a técnica muito dispendiosa. A técnica RFLP produz marcadores genéticos codominantes e requer menor quantidade de ADN, sendo que a sua qualidade não tem mostrado ser essencial para a amplificação de PCR (Haider et al., 2012). Contudo, esta

técnica apresenta desvantagens, tais como o facto de, por vezes, ser necessária uma combinação de várias enzimas, de modo a se distinguirem espécies estreitamente relacionadas e a possível existência de mutações intraespecíficas em locais de restrição que podem levar a resultados erróneos, devido ao ganho ou perda de fragmentos de restrição (Pereira et al., 2008).

3.2.3.4 RAPD

A técnica de RAPD (Amplificação aleatória de polimorfismos de ADN) consiste na amplificação por utilização de um *primer* arbitrário de tamanho reduzido. O *primer* arbitrário, após amplificação, irá ligar-se a várias regiões do ADN genómico que serão identificadas pelas diferenças dos fragmentos de PCR (várias bandas visualizadas no gel), originando um perfil ou *fingerprint* de um indivíduo (Fajardo et al., 2010).

Comparativamente a outros métodos de identificação de espécies, a técnica RAPD é mais rápida e mais barata. Contudo, tem como desvantagem a baixa reprodutibilidade dos resultados obtidos, tornando-se pouco útil para a identificação de espécies em alimentos processados ou alimentos que contenham várias espécies (Rastogi et al., 2007).

3.2.3.5 PCR em tempo real

A técnica de PCR em tempo real, em contraste com a de PCR convencional, permite a discriminação e medição de vestígios de diferentes espécies animais em alimentos de composição complexa, sendo portanto uma técnica mais precisa. A PCR em tempo real, como técnica quantitativa, representa uma evolução considerável em relação às técnicas anteriores, sendo amplamente aceite como um ensaio robusto, devido à sua maior sensibilidade e especificidade, maior gama de deteção, menor risco de contaminação, fácil execução e rapidez. Esta metodologia, cuja amplificação do gene alvo é monitorizada por um aumento de sinal de fluorescência, permite a avaliação direta dos resultados após aplicação da PCR. A utilização de fluorescência para fins de deteção elimina a necessidade de eletroforese em gel de agarose, reduzindo assim o risco de contaminação e facilitando a análise de amostras em grande escala (Fajardo et al., 2008; Kesmen et al., 2009; Rodriguez-Lazaro et al., 2013; Rojas et al., 2012). Para além disso, a PCR em tempo real possibilita a utilização de pequenas sequências de ADN alvo (60 a 70 pb), facilitando a análise de alimentos processados (Levin, 2005).

Atualmente existem dois formatos para correlacionar a quantidade dos produtos da PCR com o sinal de fluorescência: sondas e corantes fluorescentes (Fajardo et al., 2008;

Kesmen et al., 2009; López-Andreo et al., 2006). As sondas poderão ser de hidrólise (TaqMan™), de hibridação ou FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) e de interação específica (Molecular Beacons™) (Mafra et al., 2005). Relativamente ao corante, o mais comum é o fluoróforo SYBR Green I (Figura 8) não sendo tão dispendioso como o uso das sondas (Şakalar et al., 2012).

A utilização do corante SYBR Green I é a forma mais simples e direta de efetuar a PCR em tempo real. Este corante, durante a extensão dos *primers*, intercala-se na cadeia dupla de ADN que se está a sintetizar, emitindo fluorescência a cada ciclo de extensão (Levin, 2005; Weighardt, 2006). A especificidade dos produtos obtidos é avaliada através do cálculo da temperatura de *melting* (T_m) do fragmento alvo. A partir do traçado da curva de desnaturação do ADN é possível identificar o fragmento alvo pelo tamanho e diferenciação de outros fragmentos de ADN de cadeia dupla, como, por exemplo, os dímeros de *primers*, que também apresentam fluorescência, mas que terão uma T_m geralmente, bastante inferior (Mafra et al., 2005).

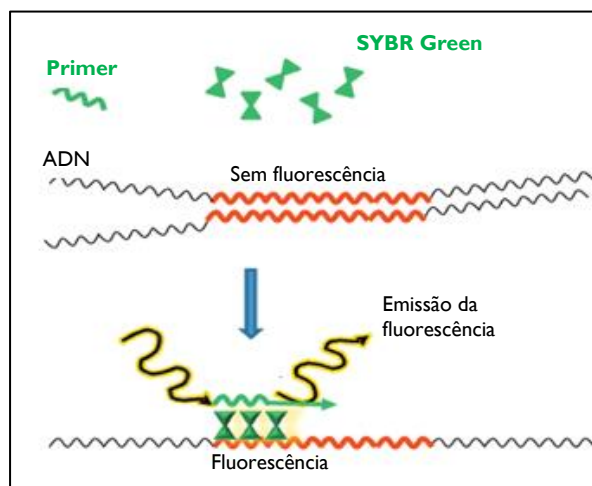


Figura 8 – Princípio de deteção utilizando o corante SYBR Green I (adaptado de Rodriguez-Lazaro et al. (2013))

Contudo, foi relatado que este corante pode interferir na amplificação por PCR. Para ultrapassar este problema diminui-se a concentração de corante utilizado, o que acabou por gerar dificuldades de redistribuição durante a análise das curvas de desnaturação do ADN. Estes obstáculos foram contornados com a utilização de corantes de nova geração tal como o novo corante EvaGreen. Este corante permite a sua utilização em concentrações mais elevadas sem provocar inibição enzimática, aumentando o nível de fluorescência e tornando-

o mais estável do que o SYBR Green I. Para além disso, também é mais sensível por apresentar um perfil de ligação superior ao ADN (Mohamad et al., 2013).

As sondas são utilizadas quando se pretende obter resultados mais fiáveis e exatos de quantificação por PCR em tempo real. No geral, uma sonda consiste num oligonucleótido que contém simultaneamente um fluoróforo, que imite fluorescência quando excitado, e um elemento neutralizador (*quencher*), que anula esta emissão quando está perto do fluoróforo. Consequentemente, através da atividade exonuclease da Taq polimerase ou interação específica entre a sonda e o amplicão, ocorre a separação física do fluoróforo e do neutralizador, sendo possível detetar um aumento da intensidade da fluorescência (Figura 9) (Kesmen et al., 2009; Mafra et al., 2005).

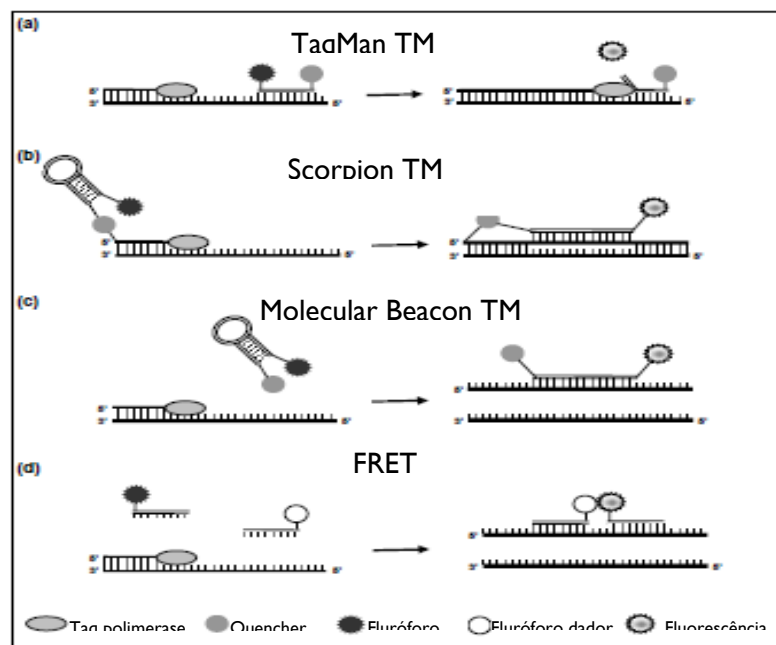


Figura 9 – Mecanismo de ação dos diferentes tipos de sondas utilizados na indução de fluorescência por PCR em tempo real. (a) Sondas Taqman™; (b) Primers scorpions™; (c) Molecular Beacons™ e (d) Tecnologia FRET (adaptado de Mafra et al. (2005)).

A emissão de fluorescência, no decorrer da amplificação, é proporcional ao ADN sintetizado. Na Figura 9 encontra-se representada uma curva de amplificação obtida durante a reação. Esta é composta por três fases:

- **Fase inicial** – ocorre durante os primeiros ciclos da PCR em que a fluorescência emitida pode ser distinguida pela linha de base;
- **Fase exponencial ou Fase “log”** – há um aumento exponencial da fluorescência antes da fase “plateau” e é nesta fase que a quantificação ocorre;

- **Fase “plateau”** – nesta fase os reagentes estão esgotados e não se observa aumento da fluorescência.

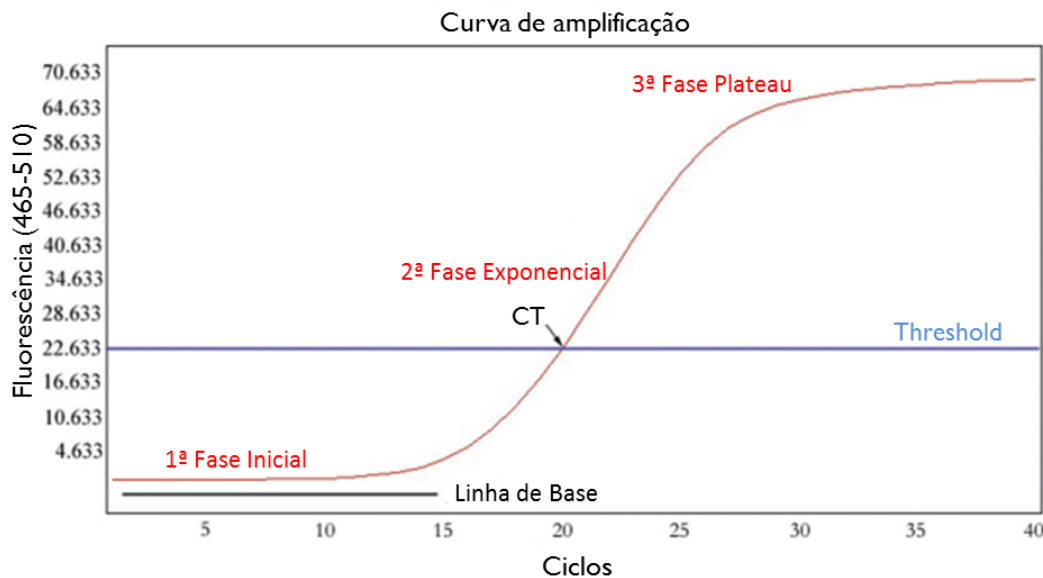


Figura 10 – Fases da curva de amplificação da PCR. Vermelho: curva de amplificação de uma amostra positiva. Azul: Threshold. Preto: linha de base dos ciclos (adaptado de Rodriguez-Lazaro et al. (2013)).

O valor de Ct corresponde ao número de ciclos necessários para que seja detetado pela primeira vez o sinal de fluorescência e o seu valor é inversamente proporcional ao logaritmo da quantidade de ADN alvo no início da reação. Este valor é sempre detetado na fase exponencial da amplificação, quando esta é mais eficiente e, portanto, a quantificação é menos afetada por condições limitantes da reação. (Rodriguez-Lazaro et al., 2013). À medida que o número de ciclos aumenta, a eficiência da amplificação diminui, resultando no efeito plateau (fase plateau) (Figura 10).

Para a quantificação de uma amostra desconhecida é possível recorrer ao método de quantificação relativa e quantificação absoluta (Hermann, 2010). A quantificação absoluta é realizada a partir de um conjunto de diluições de uma concentração conhecida de ADN que será amplificado através do sistema PCR desenvolvido. Posteriormente uma curva de calibração é construída através dos valores de Ct obtidos para cada diluição em função do logaritmo da quantidade de ADN, ou seja, a quantificação é feita por interpolação dos valores de Ct obtidos nas diferentes diluições (Mohamad et al., 2013).

No entanto, para se desenvolver uma metodologia quantitativa mais robusta deve-se recorrer a um gene endógeno como referência. O uso de um controlo endógeno é

extremamente importante para quantificações, especialmente quando se tratam de produtos processados de composição complexa (López-Calleja et al., 2007; Soares et al., 2013). É o caso dos produtos cárneos, que podem conter vários compostos químicos, incluindo produtos de reação de Maillard, proteínas de leite, gordura, glicogénio, colagénio, ácidos fúlvico e ferro. Todas estas substâncias podem inibir a amplificação do ADN alvo (Cammà et al., 2012). A utilização de um controlo endógeno durante a amplificação pode revelar falsos negativos. Na quantificação relativa que pode ser feita através do método da dupla curva de calibração e do método do ΔCt utiliza-se um gene endógeno como controlo.

O primeiro método utiliza duas curvas de calibração: uma curva para quantificar a sequência alvo e outra para quantificar o gene de referência. A percentagem da amostra de ADN desconhecida é calculada por interpolação dos valores de Ct nas duas curvas padrão, dividindo o número de cópias calculadas para a sequência alvo pelo número de cópias calculado para o gene de referência e multiplicando por 100.

No método do ΔCt as duas curvas padrão não precisam de ser feitas em placas diferentes, ao contrário da dupla calibração. Este facto resulta numa menor utilização de reagente, o que torna o ensaio menos dispendioso. Neste sistema de quantificação relativa, utilizam-se padrões com concentrações conhecidas e compara-se a amplificação relativa da sequência alvo com a amplificação da sequência do gene de referência. O resultado traduz-se numa curva de valores de ΔCt ($\Delta Ct = Ct$ gene de referência – Ct gene alvo) em função do logaritmo da quantidade ou concentração do alvo a analisar. A quantidade do alvo presente na amostra é obtida calculando o valor ΔCt da amostra e por interpolação com a curva padrão (Hermann, 2010; Mohamad et al., 2013).

Após a realização da PCR é necessário calcular a sua eficiência, pois é o cálculo que permite avaliar o desempenho da PCR em tempo real. A eficiência é calculada a partir do declive da curva padrão utilizando a seguinte expressão (Soares et al., 2014):

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

Nos últimos anos, têm sido descritos ensaios para a deteção de um grande número de espécies animais, tais como, vaca, porco, carneiro, cavalo, galinha e pato. A técnica de PCR em tempo real permite detetar quantidades mínimas de diferentes espécies animais em produtos de composição complexa, tornando-se numa ferramenta promissora para a autenticação de produtos cárneos (Fajardo et al., 2010).

3.2.3.6 Sequenciação de produtos PCR

A PCR seguida de sequenciação é uma técnica que permite determinar a ordem das bases nucleotídicas ao longo da cadeia de ADN, possibilitando uma análise completa da molécula.

O método de Sanger é o método de sequenciação mais utilizado. Este consiste no uso de uma cadeia simples de ADN e de um oligonucleótido que híbrida com essa mesma cadeia, formando uma cadeia dupla. A reação é feita em quatro tubos, separadamente, para que ocorra a reação de terminação. Cada um dos tubos contém os componentes essenciais para a reação de PCR e um dos quatro dNTP marcado radioativamente de modo a marcar a nova cadeia. Os didesoxiribonucleótidos trifosfato estão desprovidos de um grupo químico essencial (grupo OH na posição 3' da desoxirribose) impedindo a síntese de ADN após a sua adição, uma vez que não ocorre a ligação fosfodiéster. Os diferentes fragmentos sintetizados nas quatro misturas reacionais são separados de acordo com a sua dimensão por eletroforese em gel de poliacrilamida e analisados por autorradiografia.

Nos últimos tempos, a sequenciação tem sido realizada de uma forma automática, onde, durante a extensão, se utilizam *primers* (na extremidade 5') ou dNTP (na extremidade 3') marcados com diferentes moléculas fluorescentes (Figura 11). Assim, torna-se possível realizar a eletroforese da mistura de todos os fragmentos sintetizados das quatro misturas reacionais. A informação obtida é compilada em sistemas informatizados, sendo possível encontrar inúmeras sequências nucleotídicas. Após introdução da sequência, o programa irá identificar a espécie ou a espécie mais estreitamente relacionada com a sequência disponível na base de dados (Girish et al., 2004; Rapley, 2010; Schubbert, 2010).

3.3 Aplicação das técnicas de PCR na identificação da espécie *Equus caballus* em produtos cárneos

Nos últimos anos têm sido desenvolvidos muitos trabalhos que utilizam técnicas de PCR para a identificação de espécies animais. A grande maioria das aplicações de PCR tem como objetivo a identificação de animais domésticos, tais como: bovino, ovino, caprino, suíno, peru ou frango. Por outro lado, as carnes de caça, também têm sido alvo de identificação em produtos cárneos, uma vez que possuem maior valor económico e como tal são mais propícias a adulterações (Amaral et al., 2014).

A aplicação da biologia molecular para a identificação da espécie *Equus caballus* não é tão vasta como os animais domésticos e de caça. Contudo, já existem trabalhos, na literatura, desenvolvidos para a identificação de carne de cavalo, os quais se apresentam

resumidos na Tabela 4. Esta encontra-se organizada pelas espécies testadas, uma vez que alguns trabalhos identificam mais do que uma espécie, tipo de amostra, técnica de PCR utilizada, o gene alvo, o respetivo limite de deteção atingido e, por fim, a referência da publicação.

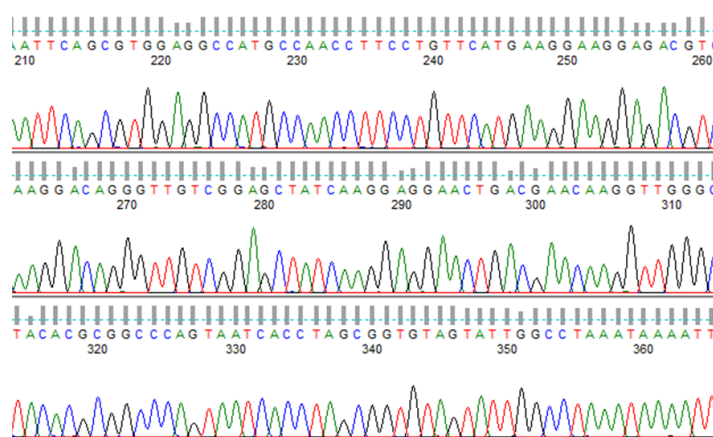


Figura 11 – Exemplo de um eletroferograma obtido a partir da sequenciação de uma porção do ADN.

Chisholm et al. (2005), utilizando a técnica de PCR em tempo real com alvo no gene *cytb*, detetaram as espécies de cavalo e burro com um limite de 25 pg de ADN. Em 2007, Kesmen et al., detetou suíno, cavalo e burro em salsichas cozinhadas com um limite de deteção de 0,1%. O método utilizado foi a PCR com *primers* específicos com alvo nos genes ATPase8/ ATPase6 e ND5. No mesmo ano, através da PCR em tempo real e dos genes *cytb* e Satellite IV, identificaram-se as espécies de suíno, galinha, peru, bovino, cavalo e ovino em misturas de carne, alcançando-se um limite de deteção relativo 0,1% e um limite de deteção absoluto de 125 pg de ADN (Jonker et al., 2007). Para a deteção de cavalo, burro e suíno, em produtos cárneos processados e não processados, utilizou-se novamente a PCR em tempo real com alvo nos genes ATPase6/ATPase8, ND2 e ND5, obtendo-se valores de LOD absoluto de 0,1 pg de ADN e um LOD relativo de 0,0001% (Kesmen et al., 2009). A técnica PCR em multiplex com alvo nos genes *cytb* e β -*actin* foi utilizada para a deteção de suíno, galinha, peru, bovino, cavalo, ovino e caprino, em salsichas processadas e cruas. O limite de deteção relativo alcançado foi de 2% para a espécie de peru, ovino e caprino e de 1% para as restantes espécies (Köppel et al., 2009). Utilizando a mesma técnica, foram identificadas as espécies de bovino, suíno, cavalo e caprino na mesma matriz do estudo anterior. O gene alvo foi o gene da β -actin e o LOD absoluto atingido foi 320 pg de ADN

Tabela 4 – Resumo dos trabalhos reportados na literatura baseados na análise de ADN para a de identificação da espécie *Eqqus caballus* em produtos cárneos

Espécies	Amostras	Técnica utilizada	Gene Alvo	Limite de detecção	Referência
Cavalo, burro	Produtos comerciais com cavalo	PCR em tempo real	<i>cytb</i>	25 pg de ADN	Chisholm et al. (2005)
Suíno, cavalo, burro	Salsichas cozinhadas	PCR com <i>primers</i> específicos	<i>ATPase8/ATPase6</i> <i>ND5</i>	0,1%	Kesmen et al. (2007)
Suíno, galinha, peru, bovino, cavalo e ovino	Misturas de carne	PCR em tempo real	<i>cytb</i> Satellite IV	125 pg de ADN 0,1 %	Jonker et al. (2007)
Cavalo, burro, suíno,	Produtos cárneos crus e processados	PCR em tempo real	<i>ATPase6/ATPase8</i> <i>ND2</i> <i>ND5</i>	0,1 pg de ADN 0,0001%	Kesmen et al. (2009)
Suíno, galinha, peru, bovino, cavalo, ovino e caprino	Salsichas cruas e processadas	PCR em multiplex	<i>cytb</i> <i>β-actin</i>	2% para o peru, ovino e caprino e 1% para os restantes	Köppel et al. (2009)
Bovino, suíno, cavalo e caprino	Salsichas cruas e Processadas	PCR em multiplex	<i>β-actin</i>	320 pg de ADN	Köppel et al. (2011)
Suíno, caprino, galinha, avestruz, cavalo, bovino	Carnes comerciais e produtos cárneos	Deteção direta em multiplex	<i>cytb</i> , <i>I2s rARN</i> , <i>t-Glu-cytb</i> , COI	12,500 cópias de mtADN em suíno, cordeiro, galinha e bovino; 25,000 e 50,000 cópias de mtADN em cavalo e avestruz, respetivamente	Kitpipit et al. (2014)

(Köppel et al., 2011). Por fim, com a técnica de PCR em multiplex direta, onde não há extração do ADN, foram detetadas seis espécies: suíno, cavalo, avestruz, bovino, caprino e galinha em amostras de carnes comerciais e produtos cárneos. Utilizaram-se os genes *cytb*, COI, t-Glu-*cytb* e 12s rARN. A sensibilidade alcançada foi 12,500 cópias de ADN de suíno, cordeiro e galinhas, 25,000 e 50,000 cópias de ADN em cavalo e avestruz, respetivamente (Kitpipit et al., 2014).

4 Objetivos e âmbito do trabalho

Efetuada o enquadramento teórico deste trabalho passou-se à fase experimental, que teve como principal objetivo a deteção da espécie *Equus caballus* em produtos cárneos. Como foi referido aquando do escândalo internacional, detetou-se a presença de cavalo em produtos cárneos onde não constava essa informação na rotulagem. Por esse motivo, torna-se importante desenvolver técnicas que permitam detetar a presença desta espécie, assim como outras utilizadas para adulteração, de forma a salvaguardar os consumidores. Estes têm direito de escolher um produto alimentar em detrimento de outro, baseando-se para isso na informação da rotulagem, que deve, portanto, estar verdadeiramente de acordo com composição dos produtos alimentares.

A primeira etapa deste trabalho passou pela preparação de misturas binárias de referência, contendo carne de vaca e de cavalo, e das amostras comerciais que iriam ser posteriormente analisadas. Seguidamente extraiu-se o ADN e desenvolveram-se os métodos de biologia molecular com base em duas técnicas escolhidas: PCR com *primers* específicos e PCR em tempo real. Para o desenvolvimento de tais métodos foi necessário desenhar um conjunto *primers* com alvo num gene mitocondrial e só posteriormente se passou à etapa de otimização das condições experimentais de modo a se obter a sensibilidade e especificidade adequadas.

Por fim, procedeu-se à aplicação das técnicas qualitativa (PCR com *primers* específicos) e quantitativa (PCR em tempo real) com alvo na deteção da espécie de cavalo (*Equus caballus*) nas amostras comerciais adquiridas. As amostras utilizadas foram divididas em dois conjuntos: pré “escândalo de cavalo” e pós “escândalo de cavalo”.

Componente Experimental

5 Material e Métodos

5.1 Padrões de Referência

Para que o método fosse desenvolvido e otimizado, foi necessário preparar uma série de padrões de referência, que consistiram em misturas binárias de carne de cavalo com carne de vaca. Inicialmente, as carnes foram trituradas separadamente num moinho de lâmina dupla (Grindomix GM200, Alemanha), pesadas e misturadas de acordo com a tabela 5. Nesta fase foi crucial evitar contaminações que poderiam vir a comprometer resultados futuros. Por isso, todos os materiais utilizados foram devidamente esterilizados.

As misturas foram acondicionadas em frascos em duplicado e posteriormente armazenadas a -20°C. Um dos conjuntos de misturas foi autoclavado a 121°C durante 15 minutos, com o objetivo de obter padrões de referência que representassem o tratamento térmico que os produtos sofrem industrialmente. As misturas autoclavadas foram denominadas de CVA, já às misturas cruas foram designadas de CV (Tabela 5).

Tabela 5 – Misturas binárias utilizadas como material de referência para testar a presença de cavalo.

Mistura Binária	Carne de Cavalo	Composição
CV18 / CVA18	100%	100g de carne de cavalo
CV17 / CVA17	25%	100g de carne de cavalo + 300g carne de vaca
CV16 / CVA16	15%	150g de CV17 + 100g de carne de vaca
CV15 / CVA15	10%	150g de CV16 + 75g de carne de vaca
CV14 / CVA14	8%	150g de CV15 + 37,5g de carne de vaca
CV13 / CVA13	5%	125g de CV14 + 75g de carne de vaca
CV12 / CVA12	4%	150g de CV13 + 37,5g de carne de vaca
CV11 / CVA11	2,5%	125g de CV12 + 75g de carne de vaca
CV10 / CVA10	1%	100g de CV11 + 150g de carne de vaca
CV9 / CVA9	0,5%	125g de CV10 + 125g de carne de vaca
CV8 / CVA8	0,25%	125g de CV9 + 125g de carne de vaca
CV7 / CVA7	0,1%	100g de CV8 + 150g de carne de vaca
CV6 / CVA6	0,05%	100g de CV7 + 100g de carne de vaca
CV5 / CVA5	0,01%	50g de CV6 + 200g de carne de vaca
CV4 / CVA4	0,005%	125g de CV5 + 125g de carne de vaca
CV3 / CVA3	0,001%	50g de CV4 + 200g de carne de vaca
CV2 / CVA2	0,0005%	125g de CV3 + 125g de carne de vaca
CV1 / CVA1	0,0001%	25g de CV2 + 100g de carne de vaca
CV0 / CVA0	0%	100g de Carne de Bovino

5.2 Amostras Comerciais

As amostras comerciais totalizaram 67 alimentos contendo carne de vaca na rotulagem por se considerarem ser as mais propícias de serem adulteradas com adição de carne de cavalo (Tabelas 6 e 7). Das amostras testadas, 33 foram adquiridas em 2012, ou seja, antes do escândalo da carne de cavalo, sendo denominadas de HL, PF e SF<33. As restantes 34, nomeadas de SF77 a SF110, foram adquiridas em grandes superfícies no decorrer deste trabalho durante 2013/2014, ou seja, posteriores ao escândalo (Figura 12). Todas as amostras analisadas não estavam rotuladas com a presença de carne de cavalo.

A preparação das amostras constou na sua trituração de forma independente, utilizando material descontaminado entre cada amostra, sendo seguidamente armazenadas em recipientes esterilizados, rotuladas e acondicionadas a -20°C até posterior extração de ADN.



Figura 12 – Produtos alimentares adquiridos neste trabalho.

Tabela 6 – Lista das amostras de 2012/2013 (antes do escândalo) utilizadas e indicações relevantes mencionadas nos respectivos rótulos.

Código	Tipo de Amostras	Espécies Rotuladas
PF21	Hambúrguer 100% Carne de Vaca	Vaca (100%)
PF22	Hambúrguer Gourmet 100% Carne de Vaca	Vaca (100%)
PF23	Hambúrguer 100% Carne de Vaca	Vaca (100%)
PF24	Hambúrguer Gourmet 100% Carne de Vaca Gourmet	Vaca (100%)
PF25	Hambúrguer 100% Carne de Vaca	Vaca (100%)
PF26	Hambúrguer 100% Carne de Vaca	Vaca (100%)
HL1	Mortadela de Vaca com Carne de Frango	Vaca (49%), Frango (43%)
HL2	Mortadela com Carne de Vaca com Frango	Vaca (32%), Frango
HL5	Salsicha de Alho	Vaca, Peru, Frango
HL6	Salsicha Frankfurt de Vaca	Vaca (44%), Frango
HL7	Salsicha de Vaca	Vaca (70%)
HL13	Salsichas cozinhadas	Frango e peru (50%), Gordura de Frango, Gordura de Vaca (9%)
HL14	Salsichas de Frango	Frango (54%), Vaca (10%), Gordura de Vaca
HL15	Salsichas de Frango	Frango (60%), Gordura de Frango, Vaca (3%), Gordura de Vaca, Colagénio de Frango
SF28	Hambúrguer de Carne de Vaca Ultracongelado	Bovino (60%), Gordura de Bovino
SF30	Hambúrguer Bovino de Agricultura Biológica Ultracongelados	Bovino
SF34	Hambúrguer Ultracongelado	Bovino
SF35	Hambúrguer de Bovino Ultracongelado	Bovino (80%), Gordura de Porco
SF36	Hambúrguer de Bovino Ultracongelado	Bovino (80%), Gordura de Porco
SF37	Hambúrguer de Mistura Ultracongelado	Bovino, Porco
SF39	Almôndegas à Bolonhesa Ultracongeladas	Bovino (67%), Gordura de Bovino
SF40	Almôndegas de Carne de Vaca Ultracongeladas	Bovino (65%)
SF41	Almôndegas de Bovino Ultracongelados	Bovino (80%), Gordura de Porco
SF42	Almôndegas com puré Ultracongelados	Bovino (13,3%), Porco
SF43	Canelones à Italiana Ultracongelados	Porco e Bovino (16,6%)
SF44	Canelones de Pavo Ultracongelados	Peru (8,3%), Frango (8,3%)
SF45	Canelones à Bolonhesa Ultracongelados	Bovino (83,2%)
SF46	Canelones de Pavo Ultracongelados	Peru (10%), Frango (10%)
SF47	Canelones com molho Bechamel Ultracongelados	Porco (7,5%), Aves (6,2%)
SF48	Lasanha Bolonhesa Ultracongelada	Bovino (14%),
SF49	Lasanha com molho Bechamel Ultracongelada	Porco (5,1%)
SF50	Lasanha Ultracongelada	Vaca (10%)
SF51	Lasanha Bolonhesa Ultracongelada	Bovino (22%)

Tabela 7 – Lista das amostras de 2013/2014 (após do escândalo) utilizadas e indicações relevantes mencionadas nos respetivos rótulos

Código	Tipo de Amostras	Espécies Rotuladas
SF77	Molho à Bolonhesa	Porco (25%), Vaca (14%)
SF78	Almôndegas	Porco (43%), Bovino (21%)
SF79	Almôndegas com molho de cogumelos	Porco (43%), Bovino (21%), Gordura de Porco
SF80	Tagliatelle Bolonhesa	Bovino (23,3%), Porco (10%), Gordura de Porco
SF81	Carne à Bolonhesa	Bovino (26,6%), Porco (11,7%), Gordura de Porco
SF82	Lasanha Bolonhesa com Carne de Bovino	Bovino (26,58%), Porco (11,69%), Gordura de Porco
SF83	Lasanha Bolonhesa sem lactose, isento de glúten	Bovino e Porco (7%)
SF84	Chile de Carne	Vaca (15%),
SF85	Mini Hambúrguer de Vaca	Bovino (51%), Gordura de Bovino
SF86	Lasanha de Alce Ultracongelada	Alce (12%)
SF87	Almôndegas com molho Bolonhesa	Vaca (65%)
SF88	Croquetes de Carne	Bovino (25%), Porco e Gordura de Porco
SF89	Rissóis de Carne	Bovino (44%)
SF90	Rissóis de Carne	Bovino (44%), Gordura de Porco
SF91	Chamuças de Carne Ultracongeladas	Bovino (12%)
SF92	Lasanha Bolonhesa	Bovino (14%)
SF93	Empadas de Carne	Bovino (34%)
SF94	Empadão de Carne	Novilho (34%), Porco e Gordura de Porco
SF95	Ravioli de Carne	Bovino (33%)
SF96	Almôndegas	Vaca, Porco
SF97	Salsichas Pequenas Ultracongeladas	Porco, Vaca, Gordura de Porco
SF98	Rissóis de Carne Ultracongelados	Bovino (40%)
SF99	Lasanha à Bolonhesa	Porco (17,5%)
SF100	Fusilli com Carne	Bovino e Porco (17%)
SF101	Esparguete Bolonhesa	Porco (5,1%), Bovino (2%), Gordura de Frango
SF102	Lasanha Bolonhesa	Bovino (10%), Porco (4%)
SF103	Hambúrguer de Vaca	Bovino (65%)
SF104	Croquetes de Carne	Bovino (24%), Frango (6%)
SF105	Croquetes de Carne Ultracongelados	Bovino (30%)
SF106	Hambúrguer de Bovino Ultracongelado	Bovino (98%)
SF107	Hambúrguer de Vaca	Vaca (85%)
SF108	Almôndegas com molho de natas	Vaca e Porco (84%), Gordura de Frango
SF109	Salsichas de Carne de Porco e Vaca Ultracongeladas	Porco (47%), Vaca (9%)
SF110	Rissóis de Carne	Bovino (20%), Frango (10%), Gordura de Porco

5.3 Reagentes e Soluções

Tampão de extração TNE

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

Hidrocloreto de guanidina (Gu-HCl)

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

Solução de Proteinase K (20mg/mL)

Pesaram-se 20 mg de proteinase K, adicionaram-se 1000 µL de água ultra pura e armazenou-se a solução a -20°C.

Tampão TE 0,1x

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

Solução de dNTP (10mM)

Juntaram-se 50 µL de cada dNTP com 1800 µL de água ultra pura. De seguida armazenou-se a solução a -20°C.

Tampão de carregamento 6x

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

5.4 Extração do ADN – Método Wizard

A extração de ADN foi realizada pelo método *Wizard* descrito em Mafra et al. com pequenas modificações (Mafra et al., 2008b). Inicialmente, pesaram-se cerca de 200 mg de

cada uma das amostras para um tubo de reação esterilizado de 2 mL. De seguida adicionou-se 860 μ L de tampão de extração TNE, 100 μ L de Gu-HCl, 40 μ L de solução proteinase K, procedeu-se a uma agitação no vórtex e incubou-se a mistura durante 3 horas a 60°C, com uma agitação a cada 30 minutos no vórtex. Centrifugou-se a mistura durante 15 minutos a 4°C e a uma velocidade 17.000 x g. Após a centrifugação, pipitou-se o máximo de sobrenadante, cerca de 700 μ L, para um novo tubo de 1,5ml para se realizar uma segunda centrifugação nas mesmas condições, mas apenas por 5 minutos. Pipitou-se novamente o máximo de sobrenadante para novo tubo esterilizado de 2 mL, adicionou-se 1 mL de resina de purificação de *DNA Wizard*[®] (Promega, Madison, WI, Estados Unidos da América) e misturou-se por inversão. A mistura, de resina e amostra, foi eluída recorrendo às colunas do Kit *Wizard*[®] Plus Minipreps ADN Purification System e usando um êmbolo de uma seringa de 2 mL. Sendo lavada, logo após, com 2 mL de solução de isopropanol (80%, v/v). Para a eliminação do isopropanol, a coluna foi centrifugada (2 min, 10.000 x g) e incubada, durante 5 minutos, à temperatura ambiente para a sua secagem. Seguidamente, as colunas foram colocadas num novo tubo esterilizado de 1,5 mL para a eluição do ADN retido na coluna, através de 100 μ L de tampão TE 0,1x, previamente aquecido a 70°C. Por fim, após a eluição, as colunas foram incubadas à temperatura ambiente durante 1 min e centrifugadas (1m, 10.000 x g) obtendo-se, assim, o extrato final de ADN. Para todas as extrações foi efetuado um branco de forma a controlar eventuais contaminações durante a extração. Todos os extratos de ADN foram armazenados a -20°C até posterior amplificação por PCR.

5.5 Avaliação e quantificação do ADN extraído

Para quantificar e avaliar a pureza dos extratos de ADN recorreu-se ao leitor de microplacas Multidetecção SynergyTM HT (Biotek Instruments, Winooski, EUA) e ao seu software de análise de dados Gen5TM a partir das leituras de absorvência a 260 nm e 280 nm. A leitura efetua-se a estes comprimentos de onda pelo facto de serem as absorvências máximas dos ácidos nucleicos e das proteínas a 260 nm e 280 nm, respetivamente. A pureza dos extratos de ADN foi avaliada através da razão entre as leituras a 260 nm e 280 nm (A_{260}/A_{280}), pois tanto ácidos nucleicos como as proteínas absorvem parcialmente a 260 nm e a 280 nm, respetivamente, sendo que valores de razões próximos de 1,8 indicam que os extratos são puros.

Para a quantificação, que é também obtida pelo leitor, recorreu-se à expressão $C=A_{260}/0,02$ em que C é a concentração de ADN e A_{260} é a absorvência a 260 nm

(Somma, 2006). Por fim, diluíram-se os extratos a uma concentração de 50 ng/μL para amplificação por PCR.

5.6 Amplificação por PCR

5.6.1 Primers (Oligonuclueótidos)

Os *primers* utilizados para este trabalho foram desenhados através do programa Primer3 Output designing tool (<http://frodo.wi.mit.edu>) e ajustados manualmente, caso fosse necessário. Na figura 13 está representada parte do citocromo b, que foi amplificada pelos novos *primers* desenhados da espécie *Equus caballus*. O software Oligo Calc (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>) foi também utilizado para estudar a propriedade dos *primers*, e verificar a não formação de *hairspins* ou auto-hibridação. Recorreu-se ainda à ferramenta Primer-Blast para verificar a especificidade dos *primers*, pois através do Primer-Blast é possível identificar homologias de um par de primers relativamente a todas as sequências presentes na base de dados Genbank. Por fim, a síntese dos novos *primers* efetuou-se pela empresa Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Alemanha).

```
1 atgacaaaca tccggaatc tcaccacta attaaatca tcaatcactc ttttattgac
61 ctaccagccc cctcaaacat ttcacatga tgaaacttcg gctccctcct aggaatctgc
121 ctaatcctcc aaatcttaac aggcctatc ctagccatac actacacatc agacacgaca
181 actgctctct catccgtcac tcacatctgc cgagacgta actacggatg aattattogc
241 tacctccatg ccaacggagc atcaatattt tttatctgcc tcttcattca cgtaggacgc
301 ggcctctact acggetotta cacattccta gagacatgaa acattggaat catcctactt
361 ttcacagtta tagctacagc attcatgggc tatgtcctac catgaggcca aatatacctt
421 tgaggagcaa cagtcacac gaacctccta tcagcaattc cctacatcgg tactaccctc
```

Figura 13 - Região do citocromo b a ser amplificada (realçada pelo cinza) pelos primers Eq-F/Eq-R (sublinhados) (nº de acesso do GenBank DQ297663.1)

5.6.2 PCR qualitativa

Para esta técnica de amplificação foi necessária a preparação de uma mistura reacional que teve como volume final 25 μL, com os seguintes componentes: água ultra pura, tampão (67 mM Tris-HCL, pH 8,8, 16 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween 20), MgCl₂, dNTP (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha), *primers* (Tabela 8), enzima SuperHot Taq Polymerase® (Genaxxon

Bioscience GmbH, Alemanha) e extrato de ADN. As quantidades de cada componente encontram-se descritas na Tabela 9. As reações foram efetuadas no termociclador Mj Mini™ Gradient Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, EUA), segundo determinadas condições de tempo e temperatura, conforme descrito na Tabela 10.

Tabela 8 - Oligonucleótidos utilizados na identificação de espécies (cavalo e vaca) amplificação de gene universal

Espécie	Primer	Sequência	Gene Alvo	Amplicação	Referência
Cavalo	Eq-F Eq-R	tctcatccgtcactcacatctgc ggaatgtgtaagagccgtagtaga	<i>cytb</i> gene	141 pb	GenBank: DQ297663.1
Vaca	Bos-F Bos-R	ctgccgagacgtgaactacg aagcctcgtcctacgtgcatat	<i>cytb</i> gene	99 pb	Santos et al. (2014)
Eucariotas	I8SRG-F I8SRG-R	ctgccctatcaactttcgtggta ttggatgtgtagccgtttctca	18S rARN	113 pb	Costa et al. (2013)

Tabela 9 – Componentes e respectivas quantidades da mistura de PCR qualitativa para a identificação das diferentes espécies (volumes em µL)

Componente	Cavalo	Vaca	Eucariotas
	Eq-F/Eq-R	Bos-F/Bos-R	I8SRG-F/I8SRG-R
Água Ultrapura	15,5	16,0	15,6
Tampão (10x)	2,5	2,5	2,5
MgCl ₂ (25 mM)	2,0	1,5	1,5
dNTP (2,5 mM cada)	2,0	2,0	2,0
Primer Forward (10 µM)	0,4	0,4	0,6
Primer Reverse (10 µM)	0,4	0,4	0,6
Taq Polimarese (5 U/µL)	0,2	0,2	0,2
Extrato de ADN	2,0	2,0	2,0
Volume Total	25,0	25,0	25,0

A eletroforese, após a reação, é indispensável para se analisar os resultados obtidos pela PCR qualitativa, onde todos os fragmentos são visualizados através de um gel de agarose 1,5% em tampão SGTB 1x, corado com Gel Red 1x, durante 20 minutos a 200 V. Para cada eletroforese adicionaram-se 20 µL de cada produto da reação com 4 µL de corante de carregamento azul de bromofenol e 2 µL de marcador ADN 100 pb (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha) com 4 µL de corante, que foram, de seguida, carregados no gel.

No final de cada eletroforese, procedeu-se à visualização do gel de agarose através de um transluminador com luz UV. A imagem digital foi captada através de um sistema fotográfico Kodak Digital Science™ DCI20 e analisada a partir do software Kodak Digital Science™ ID.

Tabela 10 - Condições utilizadas na amplificação por PCR qualitativa convencional para todas as espécies alvo deste trabalho

Passos	Cavalo Eq-F/Eq-R		Vaca Bos-F/Bos-R		Eucariotas	
	Temperatura	Duração	Temperatura	Duração	Temperatura	Duração
Desnaturação	94°C	5 min	94°C	5 min	95°C	5 min
Amplificação	94°C	30 s	94°C	30 s	95°C	30 s
	65°C	30 s	65°C	30 s	65°C	30 s
	72°C	30 s	72°C	30 s	72°C	30 s
Nº de ciclos de amplificação	35		32		33	
Extensão final	72°C	5 min	72°C	5 min	72°C	5 min

5.6.3 PCR em tempo Real

Para a técnica da PCR em tempo real, o volume final da reação foi de 20 µL contendo 1x SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad Laboratories, EUA), extrato de ADN e *primers* para a deteção de cavalo e eucariotas (Tabela 11). Nesta reação, usaram-se as seguintes condições de tempo e temperatura: 5 min a 95°C, 44 ciclos a 95°C durante 15 s e 65°C, durante 45 s, com a deteção do sinal ao fim de cada ciclo; 1 min a 95°C e 5 min a 65°C. Logo depois, para a obtenção das curvas de *melting*, efetuaram-se aumentos contínuos da temperatura em 0,2°C a cada 10 segundos até alcançar 95°C, adquirindo-se um sinal de fluorescência no final de cada aumento de temperatura. A obtenção dos dados foi feita através de um termociclador CFX96 Real-Time System (Bio-Rad Laboratories, EUA) e do software Bio-Rad CFX Manager 3.0 (Bio-Rad, Laboratories, EUA).

Tabela II – Componentes e respectivas quantidades (μL) da mistura de PCR em tempo real para a amplificação de ADN de cavalo e gene universal

Componente	Cavalo	Eucariotas
	Eq-F/Eq-R	I8SRG-F/I8SRG-R
Água Ultrapura	7,0	7,2
Primer Forward (10 μM)	0,5	0,4
Primer Reverse (10 μM)	0,5	0,4
EvaGreen® Supermix (2x)	10,0	10,0
Extrato de ADN	2,0	2,0
Volume Total	20,0	20,0

6 Resultados e Discussão

6.1 Avaliação do ADN das misturas de referência

Os resultados obtidos na extração das misturas binárias encontram-se nas Tabelas 12 e 13. Nas misturas binárias cruas (Tabela 12) podemos observar que as concentrações variaram entre 42,5 e 245,4 ng/ μ L e que os valores de razão A260/A280 se situaram entre 1,7 e 1,9, indicando que os extratos apresentaram pureza elevada. Relativamente às misturas autoclavadas, podemos também afirmar que os extratos foram puros, pois a razão (A260/A280) obtida foi de 1,9 em todas as amostras (Tabela 13). As concentrações de ADN variaram entre 352,5 ng/ μ L e 623,5 ng/ μ L, sendo estas concentrações mais elevadas do que as concentrações das misturas cruas e que podem ser justificadas pelo facto destas amostras de referência terem perdido água quando foram submetidas ao processo de autoclavagem.

Tabela 12 – Concentração e pureza dos extratos de ADN obtidos a partir das misturas binárias não autoclavadas

Mistura Binária	Concentração (ng/ μ L)	Pureza (A260/A280)
CV0	208,3	1,9
CV1	42,5	1,9
CV2	62,5	1,8
CV3	106,3	1,9
CV4	82,1	1,9
CV5	85,6	1,9
CV6	67,4	1,9
CV7	61,5	1,8
CV8	58,7	1,9
CV9	52,8	1,9
CV10	268,6	1,9
CV11	245,4	1,9
CV12	220,2	1,9
CV13	173,6	1,9
CV14	98,8	1,8
CV15	233,7	1,9
CV16	221,6	1,9
CV17	186,2	1,8
CV18	111,8	1,7

Para avaliar a integridade do ADN extraído, recorreu-se à eletroforese em gel de agarose do ADN genómico das misturas binárias cruas (Figura 14) e autoclavadas (Figura 15). É possível observar bandas de grande intensidade e elevado peso molecular na Figura 14, misturas cruas, indicando elevado concentração e integridade do ADN extraído. Por outro lado, na Figura 15, denota-se um grande arrastamento em todas as bandas e um peso

molecular muito menor, evidenciando a degradação do ADN devido ao processo térmico a que as misturas foram submetidas.

Tabela 13 – Concentração e pureza dos extratos de ADN obtidos a partir das misturas binárias autoclavadas

Mistura Binária	Concentração(ng/μL)	Pureza (A260/A280)
CVA0	489,6	1,9
CVA1	623,5	1,9
CVA2	523,4	1,9
CVA3	392,0	1,9
CVA4	381,6	1,9
CVA5	484,0	1,9
CVA6	522,3	1,9
CVA7	382,5	1,9
CVA8	367,5	1,9
CVA9	357,1	1,9
CVA10	298,0	1,9
CVA11	390,0	1,9
CVA12	383,1	1,9
CVA13	352,5	1,9
CVA14	412,2	1,9
CVA15	392,4	1,9
CVA16	423,0	1,9
CVA17	406,3	1,9
CVA18	376,3	1,9

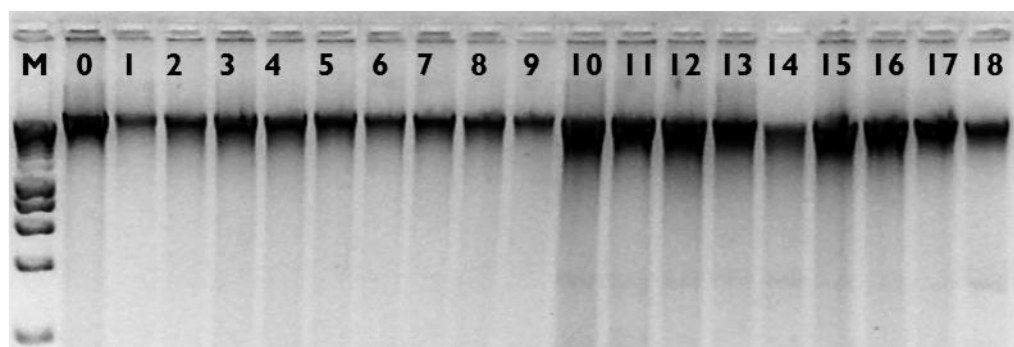


Figura 14 - Gel de eletroforese de ADN genómico das misturas binárias cruas. M: Marcador molecular Hyperlader I (Bioline, Londres, Reino Unido); Linha 0 a 18: Misturas binárias CV0 a CV18, respetivamente.

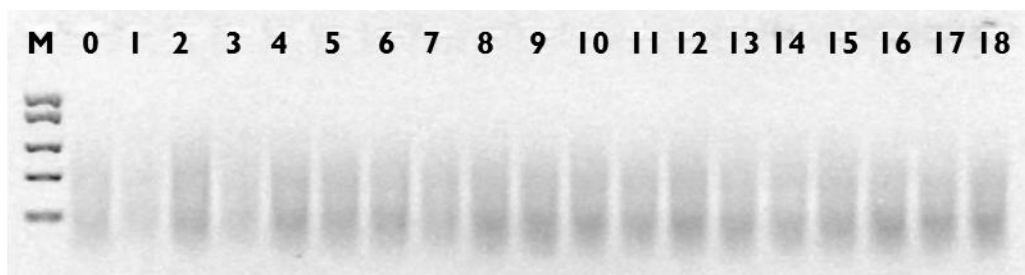


Figura 15 - Gel de eletroforese de ADN genómico das misturas binárias autoclavadas. M: Marcador molecular Hyperlader I (Bioline, Londres, Reino Unido); Linha 0 a 18: Misturas binárias CV0 a CV18, respetivamente

6.2 Avaliação do ADN das amostras analisadas

As amostras comerciais adquiridas para posterior análise também foram submetidas ao método extração *Wizard*. Na Tabela 14 podemos observar todas as concentrações e purezas obtidas nas 67 amostras. As concentrações variaram entre 78,7 e 1060,9 ng/ μ L. Os valores de concentração mais baixos podem ser justificados pelo facto de algumas amostras serem muito processadas e, portanto, o ADN ter sido degradado. Relativamente à pureza destas amostras, é possível afirmar que são extratos puros, pois os valores de pureza variaram entre 1,8 e 2,2.

6.3 Amplificação por PCR qualitativa

6.3.1 Otimização da técnica

O trabalho desenvolvido tinha como principal objetivo a deteção de adulterações de amostras comerciais com carne de cavalo. Para tal e como referido anteriormente, foram escolhidas amostras cujo ingrediente principal fosse carne de bovino, por se considerarem as mais propícias de serem adulteradas de acordo com o que provocou o recente da “escândalo da carne de cavalo”.

No entanto, foi necessário desenvolver e otimizar a técnica de PCR para se proceder à aplicação nas amostras comerciais. A amplificação da espécie *Equus caballus* (cavalo) foi feita através do par de oligonucleótidos Eq-F/Eq-R (Tabela 8) e as condições, após otimização, encontram-se descritas nas Tabelas 9 e 10. Foram determinados dois tipos limites de deteção: limite de deteção relativo e limite de deteção absoluto. O limite de deteção absoluto consistiu em efetuar cinco diluições sucessivas de 1/10 de um extrato de ADN, resultante da preparação com a referência CV18 (100% carne de cavalo) com concentração

inicial de 50 ng/μL, enquanto o limite de detecção relativo se baseou em testar cinco amostras de percentagens diferentes de carne de cavalo em carne de vaca.

Tabela 14 – Concentração e pureza dos extratos de ADN obtidos a partir de amostras comerciais.

Amostra	Concentração (ng/μL)	Pureza (A260/A280)	Amostra	Concentração (ng/μL)	Pureza (A260/A280)
PF21	172,4	1,86	SF78	168,4	1,83
PF22	143,3	1,89	SF79	166,8	1,88
PF23	167,8	1,97	SF80	233,0	1,96
PF24	165,1	1,91	SF81	223,2	1,95
PF25	119,8	1,92	SF82	166,9	1,93
PF26	136,4	1,90	SF83	181,8	2,04
HL1	1060,9	1,95	SF84	78,7	1,95
HL2	680,9	1,93	SF85	285,8	1,97
HL5	305,7	1,91	SF86	186,8	1,90
HL6	702,6	1,95	SF87	189,4	1,92
HL7	290,6	1,94	SF88	213,2	1,91
HL13	276,9	1,90	SF89	92,1	1,83
HL14	302,5	1,90	SF90	141,6	1,87
HL15	335,8	1,93	SF91	550,0	2,10
SF28	197,7	1,98	SF92	190,0	1,96
SF30	122,2	1,88	SF93	233,0	1,93
SF34	123,0	1,84	SF94	494,9	1,95
SF35	239,2	1,95	SF95	697,3	1,96
SF36	139,0	1,88	SF96	156,3	1,88
SF37	224,6	1,92	SF97	117,5	1,89
SF39	193,7	1,95	SF98	136,8	1,91
SF40	280,6	2,00	SF99	202,4	1,97
SF41	169,3	1,90	SF100	347,8	1,95
SF42	293,1	1,93	SF101	132,3	1,94
SF43	115,8	1,91	SF102	202,4	2,00
SF44	147,4	1,88	SF103	171,1	1,87
SF45	131,1	1,88	SF104	211,2	1,89
SF46	160,3	1,89	SF105	224,6	1,91
SF47	206,9	1,92	SF106	94,5	1,88
SF48	110,7	1,89	SF107	116,1	1,85
SF49	187,1	1,92	SF108	123,6	1,86
SF50	140,1	1,92	SF109	136,8	1,87
SF51	131,5	1,95	SF110	162,6	1,90
SF77	156,8	1,95			

As percentagens alcançadas no limite de detecção relativo foram 0,001% nas misturas binárias cruas e 0,01% nas misturas autoclavadas (Figura 16). Relativamente ao limite de detecção absoluto, alcançou-se uma sensibilidade 1 pg e 10 pg para ADN de carne de cavalo crua e processada, respetivamente (Figura 17). Em ambos os limites, as misturas

autoclavadas atingiram valores superiores, o que seria de esperar, pois, como anteriormente referido, o tratamento térmico degradou o ADN, sendo por isso mais difícil de detetá-lo. Contudo, apesar da diminuição dos limites testados, podemos afirmar que o método se manteve sensível, podendo ser aplicado na deteção de carne de cavalo.

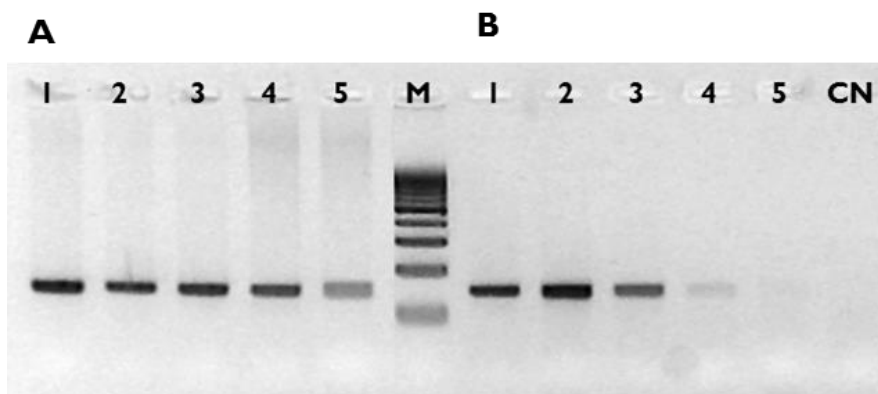


Figura 16 - Gel de eletroforese de produtos de PCR de misturas de referência cruas de carne de cavalo em bovino (A) e autoclavadas (B) amplificadas com alvo no gene *cytb* de cavalo com os oligonucleótidos Eq-F/Eq-R. M: Marcador molecular 100 pb ADN (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha); linhas 1 a 5: 10%, 1%, 0,1%, 0,01%, 0,001% de carne de cavalo, em extratos na concentração de 50 ng/ μ l; CN: Controlo negativo.

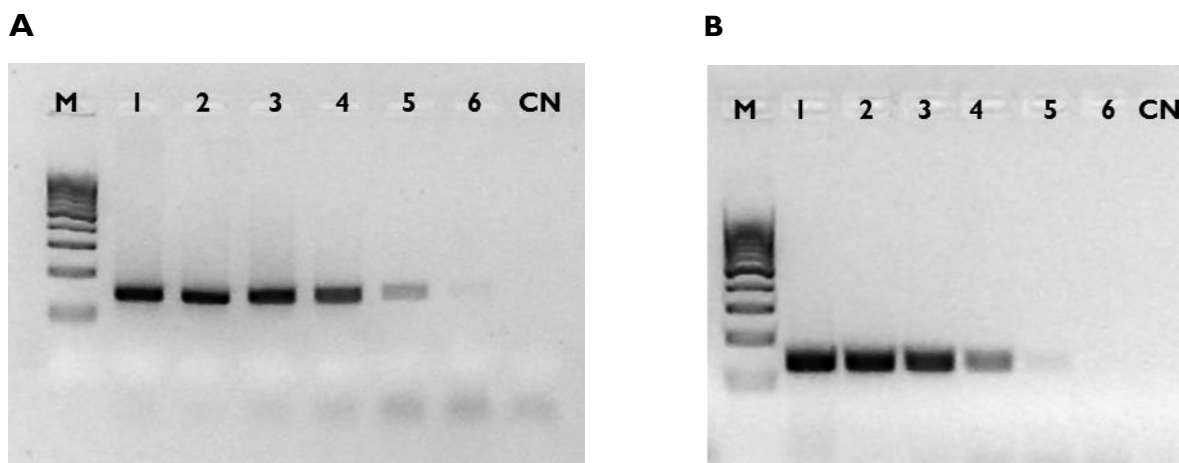


Figura 17- Gel de eletroforese de produtos de PCR de diluições seriadas a partir da amostra crua CV18 (A) e da amostra autoclavada CVA18 (B) amplificadas por PCR qualitativa utilizando os oligonucleótidos Eq-F/Eq-R. M: marcador molecular 100 pb ADN (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha); linhas 1 a 6: 100 ng, 10 ng, 1 ng, 0,1 ng, 10 pg, 1 pg; CN: Controlo negativo.

6.3.2 Avaliação da especificidade

Após o desenvolvimento e otimização do método qualitativo, passou-se à avaliação da especificidade do par de oligonucleótidos, ou seja, estes foram submetidos a testes de reatividade em espécies com forte probabilidade de surgirem em produtos alimentares. Os extratos, de origem animal e vegetal, tinham sido previamente extraídos no laboratório.

Inicialmente, estes foram submetidos a uma PCR qualitativa com o par de *primers* desenhados para amplificação de um gene universal para eucariotas (18SRG-F/18-SRG-R) (Tabela 8), de maneira a comprovar que os extratos possuíam ADN e estavam aptos a ser amplificados. Os géis correspondentes a essa PCR qualitativa podem ser observados nas Figuras 18, 19 e 20, e, como tal, é possível concluir que todos os extratos apresentavam qualidade e quantidade de ADN suficiente para a amplificação.

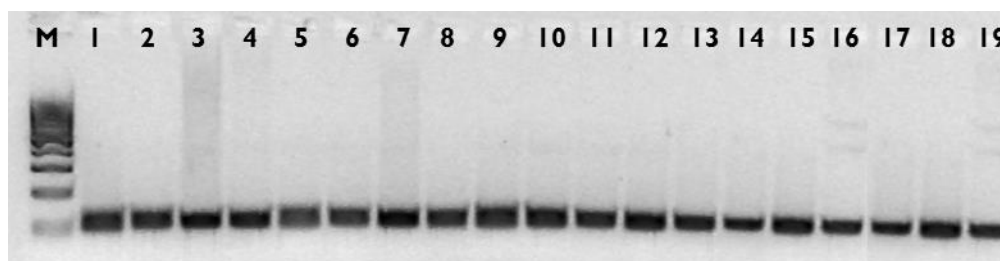


Figura 18 - Gel de eletroforese de produtos de PCR de várias espécies vegetais amplificadas com alvo num gene eucariota (18SRG-F/18SRG-R). M: Marcador molecular de ADN 100 pb (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha); Linhas 1 a 19: Pão de trigo, Pão de centeio, Cebola, Alho, Salsa, Pimenta branca, Louro, Pimentão-doce, Piri-piri, Noz de Macadâmia, Noz do Brasil, Pistácio, Amendoim, Fava, Caju, Pinhão, Castanha, Farinha de trigo e arroz, respetivamente; CN: Controlo negativo.

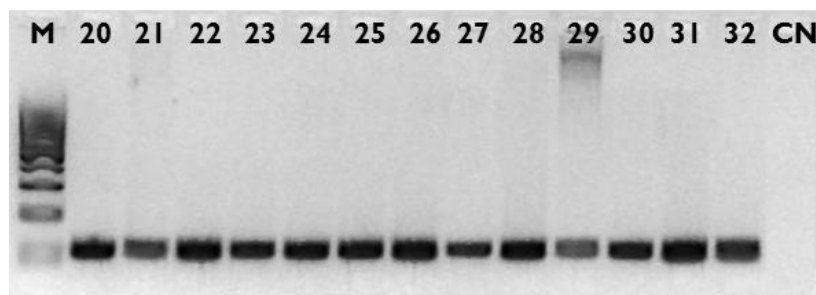


Figura 19 - Gel de eletroforese de produtos de PCR de várias espécies vegetais amplificadas com alvo num gene eucariota (18SRG-F/18SRG-R). M: Marcador molecular de ADN 100 pb (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha); Linhas 20 a 32: Pevide de abóbora, Girassol, Tremoço, Amêndoa, Aveia em grão, Cevada em grão, Centeio em grão, Soja em grão, Milho em grão, Noz, Avelã, Tomate cereja e Noz pecan, respetivamente; CN: Controlo negativo.

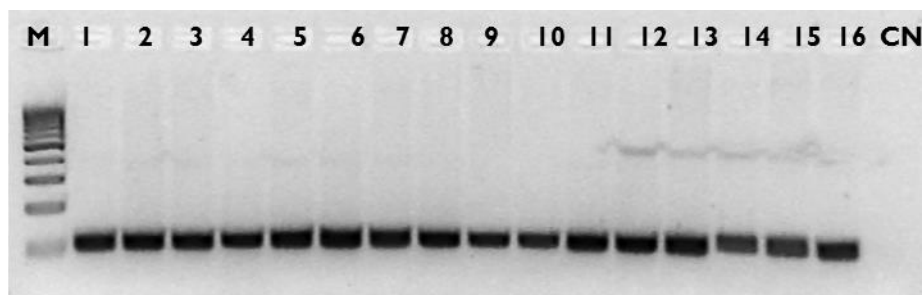


Figura 20 - Gel de eletroforese de produtos de PCR de várias espécies animais amplificadas com alvo num gene eucariota (18SRG-F/18SRG-R). M: Marcador molecular de ADN 100 pb (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha); Linhas 1 a 16: Cavalo, Javali, Pato, Perdiz, Lebre, Codorniz, Coelho, Faisão, Veado, Vaca, Galinha, Peru, Borrego, Cabrito, Avestruz e Porco, respetivamente; CN: Controlo negativo.

Após a amplificação com o par de oligonucleótidos 18SRG-F/18SRG-R, passou-se à realização da PCR qualitativa com o par de *primers* Eq-F/Eq-R. Das 48 espécies testadas, sendo 32 de origem vegetal e as restantes de origem animal, nenhuma amplificou com este par de *primers* (Figura 21 e 22), podendo-se concluir que estes são específicos para a espécie *Eqqus caballus* e que podem ser aplicados a amostras comerciais.

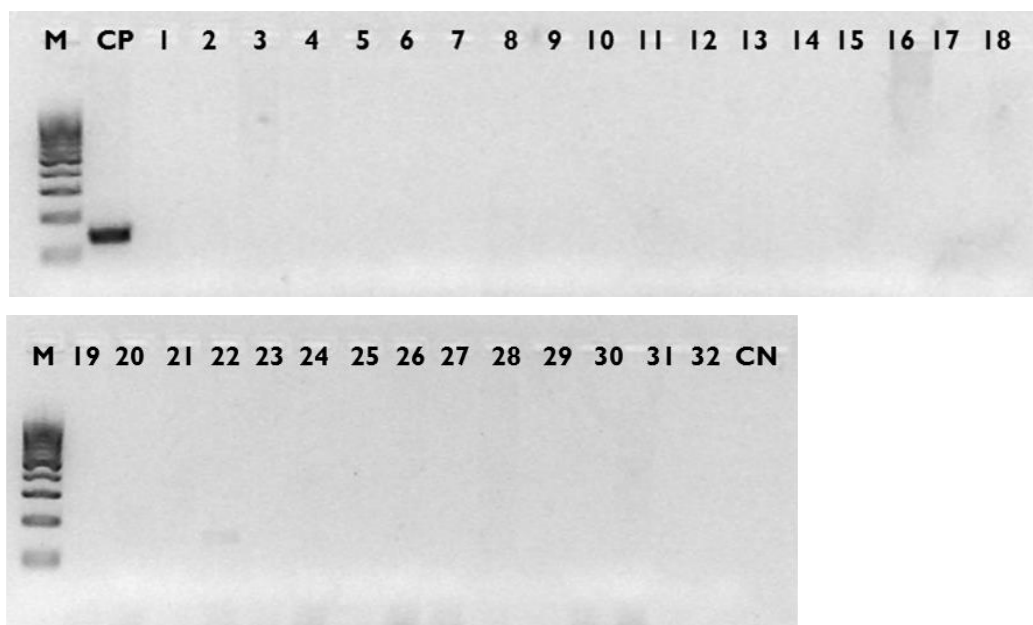


Figura 21 – Gel de eletroforese de produtos de PCR de várias espécies vegetais amplificadas com alvo no gene *cytb* de cavalo (Eq-F/Eq-R). M: marcador molecular de ADN 100 pb (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha); CP: controlo positivo (cavalo - 100%); Linhas 1 a 18: Pão de trigo, Pão de centeio, Cebola, Alho, Salsa, Pimenta branca, Louro, Pimentão-doce, Piripiri, Noz de macadâmia, Noz do brasil, Pistacho torrado e salgado, Amendoim torrado e salgado, Fava frita com sal, Caju torrado, Miolo de pinhão, Castanha e Farinha de trigo, respetivamente; Linhas 19 a 32: Arroz, Pevide, Girassol, Tremoço, Amêndoa, Aveia em grão, Cevada em grão, Centeio em grão, Soja em grão, Milho em grão, Noz, Avelã, Tomate cereja e Noz pecan, respetivamente; CN: Controlo negativo.

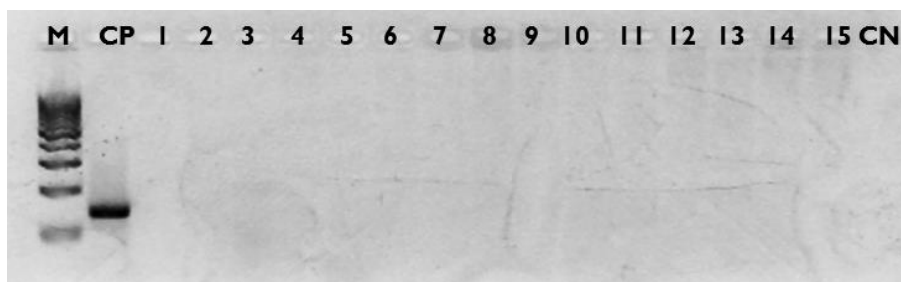


Figura 22 - Gel de eletroforese de produtos de PCR de várias espécies animais amplificadas com alvo no gene *cytb* de cavalo (Eq-F/Eq-R). M: Marcador molecular de ADN 100 pb (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha); CP: Controlo positivo (cavalo -100%); Linhas 1 a 16: Cavalo, Javali, Pato, Perdiz, Lebre, Codorniz, Coelho, Faisão, Veado, Vaca, Galinha, Peru, Borrego, Cabrito, Avestruz e Porco, respetivamente; CN: Controlo negativo.

6.3.3 Análise qualitativa das amostras comerciais

Verificada a especificidade da técnica de PCR com os *primers* Eq-F/Eq-R, passou-se à análise qualitativa, ou seja, aplicação da técnica nas amostras comerciais. Nesta etapa, foi novamente necessário verificar se os extratos estavam aptos a amplificar. Assim, todas as amostras comerciais foram submetidas a uma amplificação com os *primers* de bovino (Bos-F/Bos-R) (Tabela 8), pois todas as amostras possuíam esta espécie ou derivados da mesma na rotulagem. Em todas as amostras observou-se o fragmento alvo esperado de 99 pb do gene *cytb* de bovino, com bandas de elevada intensidade para todas as amostras (Figuras 23, 24 e 25), exceto linhas 13 e 14 da Figura 23, e linhas 2, 15 e 17 da Figura 25. Como tal, estas amostras comerciais foram submetidas a uma segunda reação com os *primers* 18SRG-R/18SRG-F com alvo em eucariotas, onde se comprovou a presença de ADN amplificável como indica a Figura 26. Tal facto significa que a ausência de fragmentos alvo de bovino se deveu à ausência ou quantidade reduzida de ADN desta espécie e não a baixa qualidade dos extratos.

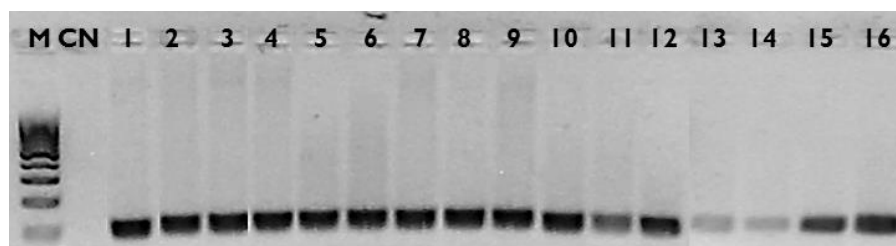


Figura 23 - Gel de eletroforese de produtos de PCR das amostras comerciais amplificadas com alvo no gene *cytb* de bovino (Bos-F/Bos-R). M: Marcador molecular de ADN 100 pb (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha); CN: Controlo negativo; Linha 1 a 16: Amostras comerciais PF23, PF25,

PF26, SF30, SF35, SF36, SF37, SF40, SF41, SF43, SF44, SF45, SF46, SF47, SF48 e SF50, respectivamente, na concentração de 50 ng/μL.

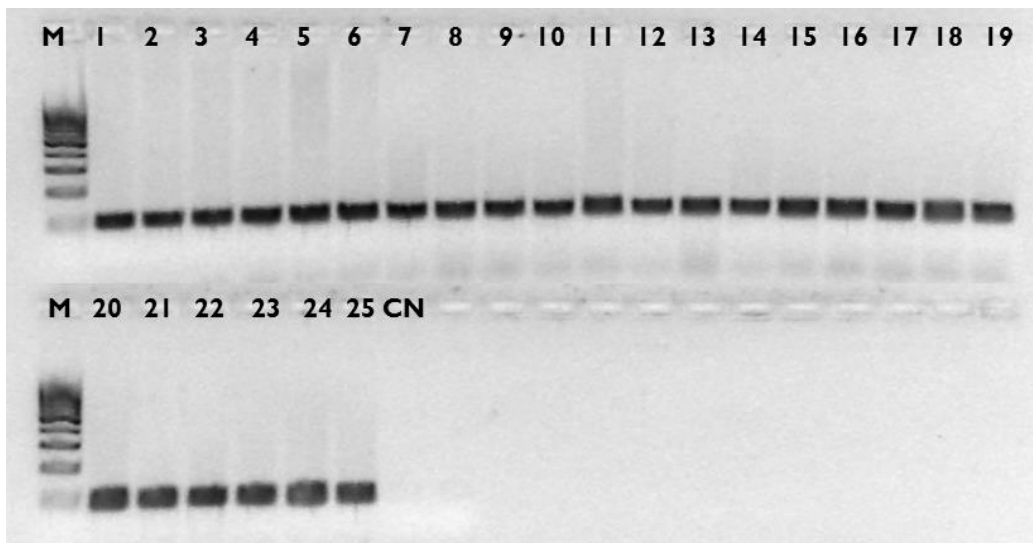


Figura 24 - Gel de eletroforese de produtos de PCR das amostras comerciais amplificadas com alvo no gene *cytb* de bovino (Bos-F/Bos-R). M: Marcador molecular de ADN 100 pb (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha); Linha 1 a 25: amostras comerciais PF21, PF22, PF24, SF28, SF34, SF39, SF42, SF49, SF51, SF77 a SF84 e HLI a HLI5, respectivamente, na concentração de 50 ng/μL; CN: Controle negativo.

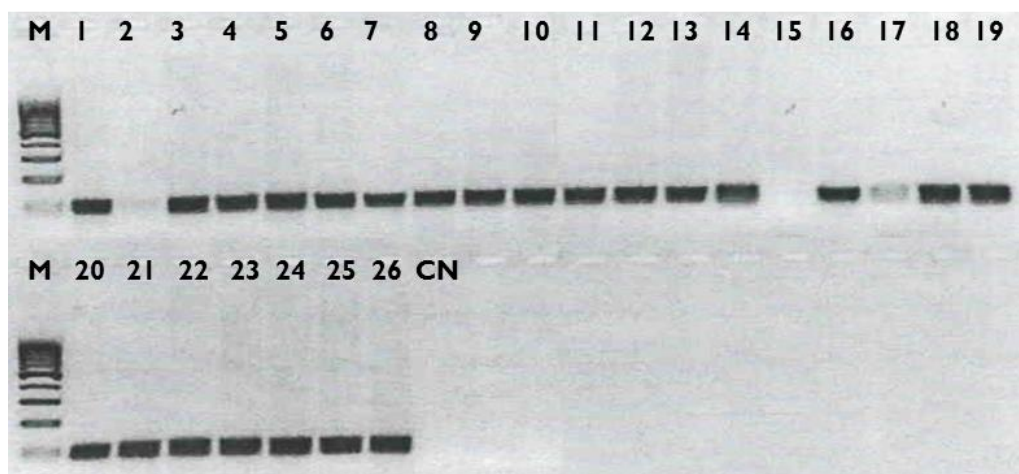


Figura 25 – Gel de eletroforese de produtos de PCR das amostras comerciais amplificadas com alvo no gene *cytb* de bovino (Bos-F/Bos-R). M: Marcador molecular de ADN 100 pb (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha); Linha 1 a 26: Amostras comerciais SF85 a SF110, respectivamente, na concentração de 50 ng/μL; CN: Controle negativo.

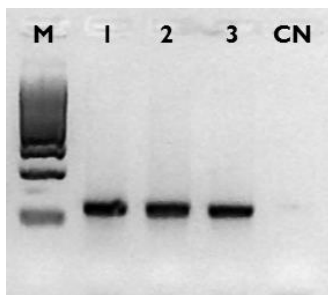


Figura 26 – Gel de eletroforese de produtos de PCR das amostras comerciais com alvo no gene eucariota (18SRG-F/18SRG-F). M: Marcador molecular de ADN 100 pb (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha); Linha 1 a 3: Amostras comerciais SF86, SF99, SF10, respetivamente, na concentração de 50 ng/μL; CN: Controlo negativo.

Confirmada a existência de ADN amplificável, testou-se a presença da espécie *Equus caballus* nas amostras comerciais. Através dos resultados obtidos nas Figuras 27, 28 e 29 é possível verificar a presença do fragmento esperado de 141 pb em todos os controlos positivos e em duas amostras, nomeadamente uma de hambúrguer (Figura 27, linha 5 - PF25) e uma de salsichas Halal (Figura 28, linha 13 - HL5). Tais resultados demonstram a presença de ADN de cavalo, sugerindo a adição de carne de cavalo não rotulada nesses produtos alimentares. O mesmo não ocorreu nas restantes amostras comerciais, confirmando a ausência desta espécie de acordo com a rotulagem.

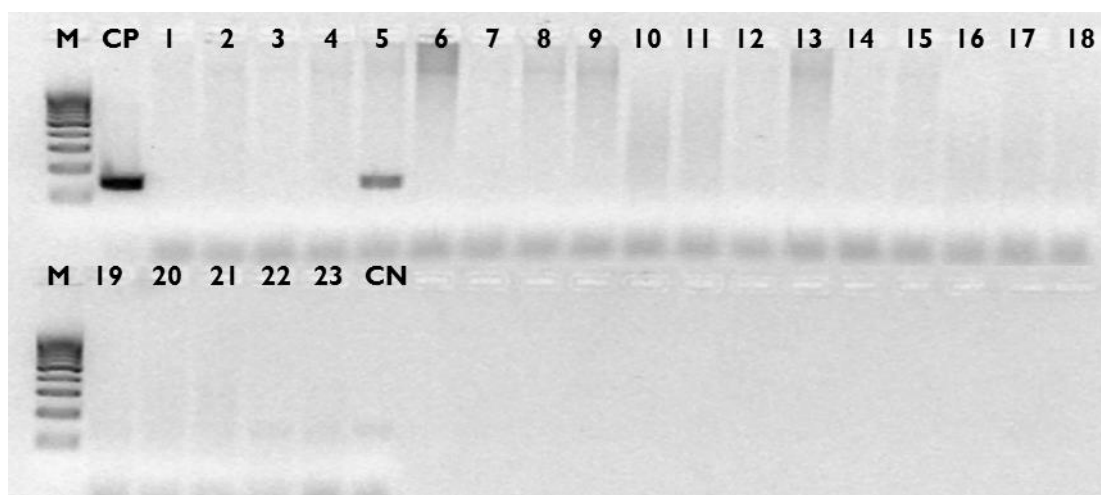


Figura 27 - Gel de eletroforese de produtos de PCR das amostras comerciais amplificadas com alvo no gene *cytb* de cavalo (Eq-F/Eq-R). M: Marcador molecular de ADN 100 pb (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha); CP: Controlo positivo (cavalo – 100%); Linhas 1 a 23: Amostras comerciais PF21 a PF26 e SF28 a SF49, respetivamente, na concentração de 50 ng/μL; CN: Controlo negativo.

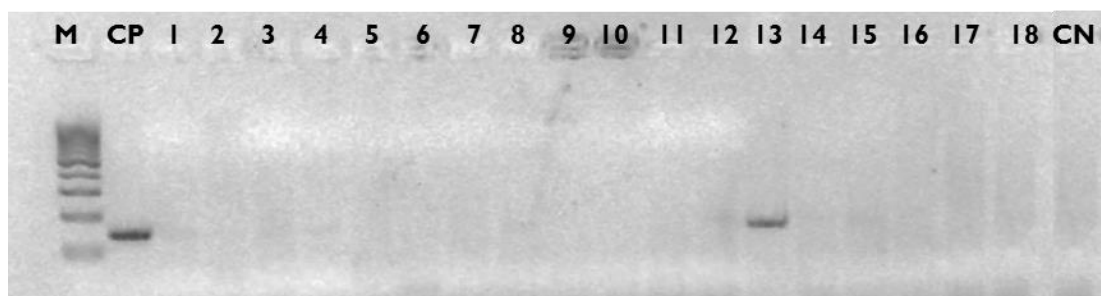


Figura 28 - Gel de eletroforese de produtos de PCR das amostras comerciais amplificadas com alvo no gene *cytb* de cavalo (Eq-F/Eq-R). M: Marcador molecular de ADN 100 pb (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha); CP: Controlo positivo (cavalo – 100%); Linhas 1 a 18: Amostras comerciais SF50 a SF84 e HLI a HLI5, respetivamente, na concentração de 50 ng/μL; CN: Controlo negativo.

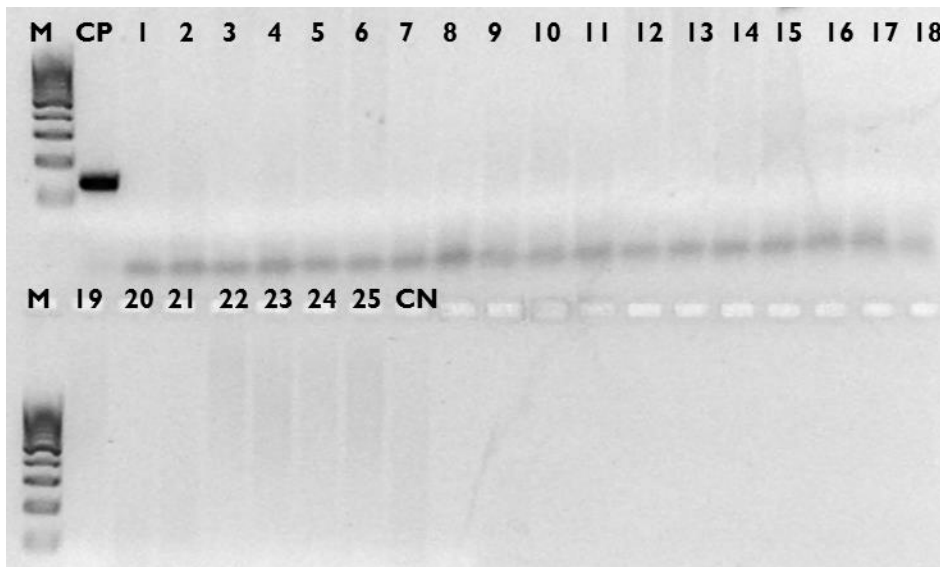


Figura 29 - Gel de eletroforese de produtos de PCR das amostras comerciais amplificadas com alvo no gene *cytb* de cavalo (Eq-F/Eq-R). M: Marcador molecular de ADN 100 pb (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha); CP: Controlo positivo (cavalo – 100%); Linhas 19 a 25: Amostras comerciais SF85 a SF110, respetivamente, na concentração de 50 ng/μL; CN: Controlo negativo.

A Figura 30 é relativa a uma nova amplificação das amostras PF25 e HL5, que foi realizada com o objetivo de confirmar os resultados positivos anteriormente referidos. Através desta, foi possível validar a presença de carne de cavalo e verificar que a intensidade da banda da amostra HL5 é superior à PF25. Uma vez que a amostra HL5 corresponde a salsichas enlatadas e que, portanto, deverão ter sido sujeitas a autoclavagem, o que leva a uma degradação substancial do ADN, sugere-se que esta amostra tenha a adição de carne de cavalo numa proporção relativamente elevada. Contudo, no sentido de confirmar e quantificar a proporção de carne de cavalo as amostras foram amplificadas por PCR em tempo real.

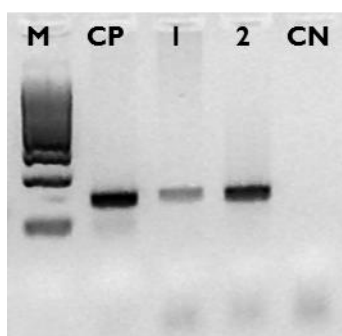


Figura 30 - Gel de eletroforese de produtos de PCR das amostras comerciais amplificadas com alvo no gene *cytb* de cavalo (Eq-F/Eq-R). M: Marcador molecular de ADN 100 pb (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha); CP: Controlo positivo (cavalo – 100%); Linhas 1 e 2: Amostras comerciais PF25 a HL5, respetivamente, na concentração de 50 ng/μL; CN: Controlo negativo.

Posteriormente, as amostras comerciais cujos resultados foram positivos voltaram a ser adquiridas, com o intuito de perceber se após o escândalo da carne de cavalo a eventual fraude continuaria a ser cometida nesses produtos alimentares. Essas amostras foram obtidas nos mesmos estabelecimentos comerciais e a análise efetuada seguiu os mesmos parâmetros. Primeiramente, foi efetuada uma amplificação com *primers* de bovino (Bos-F/Bos-R), onde ocorreu a amplificação do fragmento alvo esperado de 99 pb do gene *cytb* com bandas intensas. Logo após, analisou-se a presença da espécie *Equus caballus*, onde se pode verificar na Figura 31, que não houve amplificação, à exceção do controlo positivo com a banda esperada de 141 pb. Desta forma, pode-se inferir que após o escândalo da carne de cavalo, a eventual contaminação ou adição fraudulenta, nestas duas amostras, não continuou a ser praticada, estando a rotulagem conforme.

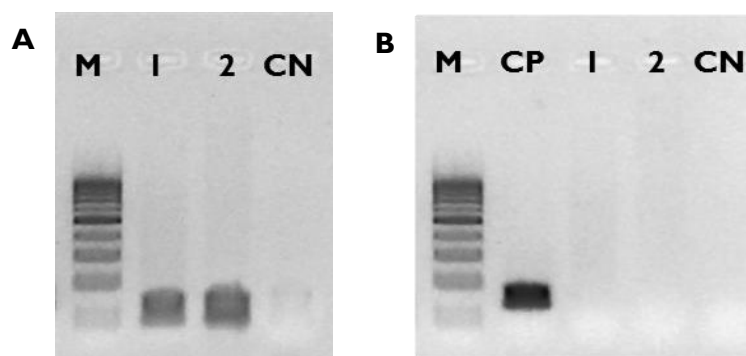


Figura 31 – Gel de electroforese de produtos de PCR das amostras comerciais amplificadas com alvo no gene *cytb* de bovino (Bos-F/Bos-R) (A) e de cavalo (Eq-F/Eq-R) (B). M: Marcador molecular ADN 100 pb (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha); Linhas 1 a 2: Amostras comerciais PF25 e HL5, respetivamente, na concentração de 50 ng/ μ L; CP: Controlo positivo; CN: Controlo negativo.

6.4 Análise por PCR em tempo real

O objetivo principal deste trabalho foi identificar e quantificar adulterações com carne de cavalo. Assim, após a realização de técnica qualitativa, onde se detetou a presença de carne de cavalo em duas amostras comerciais, aplicou-se uma técnica de PCR quantitativa, a PCR em tempo real. Para tal, otimizou-se esta técnica através de misturas binárias, anteriormente descritas, para a realização de curvas de calibração. A comparação e avaliação deste método foi feita através dos pré-requisitos exigidos nas linhas de orientação MIQE (Bustin et al., 2009) e através do documento de *Definition of Minimum Performance Requirements for Analytical Methods of GMO Testing* (Mazzara et al., 2008). Nestes

documentos, os critérios de aceitação exigem que o coeficiente de correlação (R^2) seja igual ou superior 0,98, que a eficiência da PCR varie entre os 90% e os 100% e que o declive da curva de calibração varie entre -3,6 e -3,1.

O método de deteção utilizado neste trabalho foi através do corante EvaGreen, permitindo avaliar a especificidade através das curvas de *melting* construídas a cada ensaio. Os produtos formados deveriam apresentar a mesma temperatura de *melting*, de maneira a comprovar que a amplificação resultava de um único tipo de fragmento sendo por isso uma reação específica.

6.4.1 Determinação do limite de deteção absoluto

O limite de deteção absoluto foi calculado para os dois tipos de misturas binárias de referência: processadas e não processadas. Este foi obtido através da amplificação de um extrato de ADN de cavalo, na concentração de 50 ng/ μ L, que foi submetido a 6 diluições seriada de 10000 pg até 0,01 pg. A sensibilidade alcançada foi de 0,1 pg, quer para o ADN de material processado, quer para o não processado. Tal resultado permitiu concluir que o tratamento térmico não afetou a sensibilidade do método, ou seja, a degradação que ocorreu no ADN pelo processo de autoclavagem não teve influência no limite de deteção.

Foram efetuados 2 ensaios com 5 réplicas de cada nível para a determinação do LOD do extrato de material cru e 3 ensaios com 4 réplicas para cada nível para obter o LOD do extrato processado. As Figura 32 (A, B e C) e Figura 33 (A, B e C) representam um dos ensaios realizados para a determinação do LOD absoluto para cada tipo de extratos de ADN. As figuras 32A 3 33A representam as curvas de amplificação para cada nível de diluição, as figuras 32B e 33B as respetivas curvas de calibração e, por fim, através das figuras 32C 3 33C, podemos observar as curvas de *melting*. Estas últimas, provam que a amplificação foi específica, uma vez que foi registada uma temperatura de *melting* de 81°C para todos os produtos formados. Na Tabela 15 apresentam-se as médias dos valores de Ct e os respetivos desvios padrão para cada nível de concentração de todos os ensaios. Em ambos extratos de ADN, entre níveis de diluições, obtiveram-se diferenças de 3 valores Ct. Esta diferença constante de Ct afetou as curvas de calibração (Figura 34) de uma forma positiva, uma vez que lhe atribuí linearidade. Também, na Tabela 15, pode-se confirmar um critério exigido pelo documento *Definition of Minimum Performance Requirements for Analytical Methods of GMO Testing*, em que para que o valor de sensibilidade seja considerado de LOD é necessário que pelo menos 95% das réplicas amplifiquem (Mazzara et al., 2008). Em ambos

os casos, as réplicas amplificaram em 100%, 10 em 10 no LOD do extrato cru e 12 em 12 no LOD do extrato processado (Tabela 15).

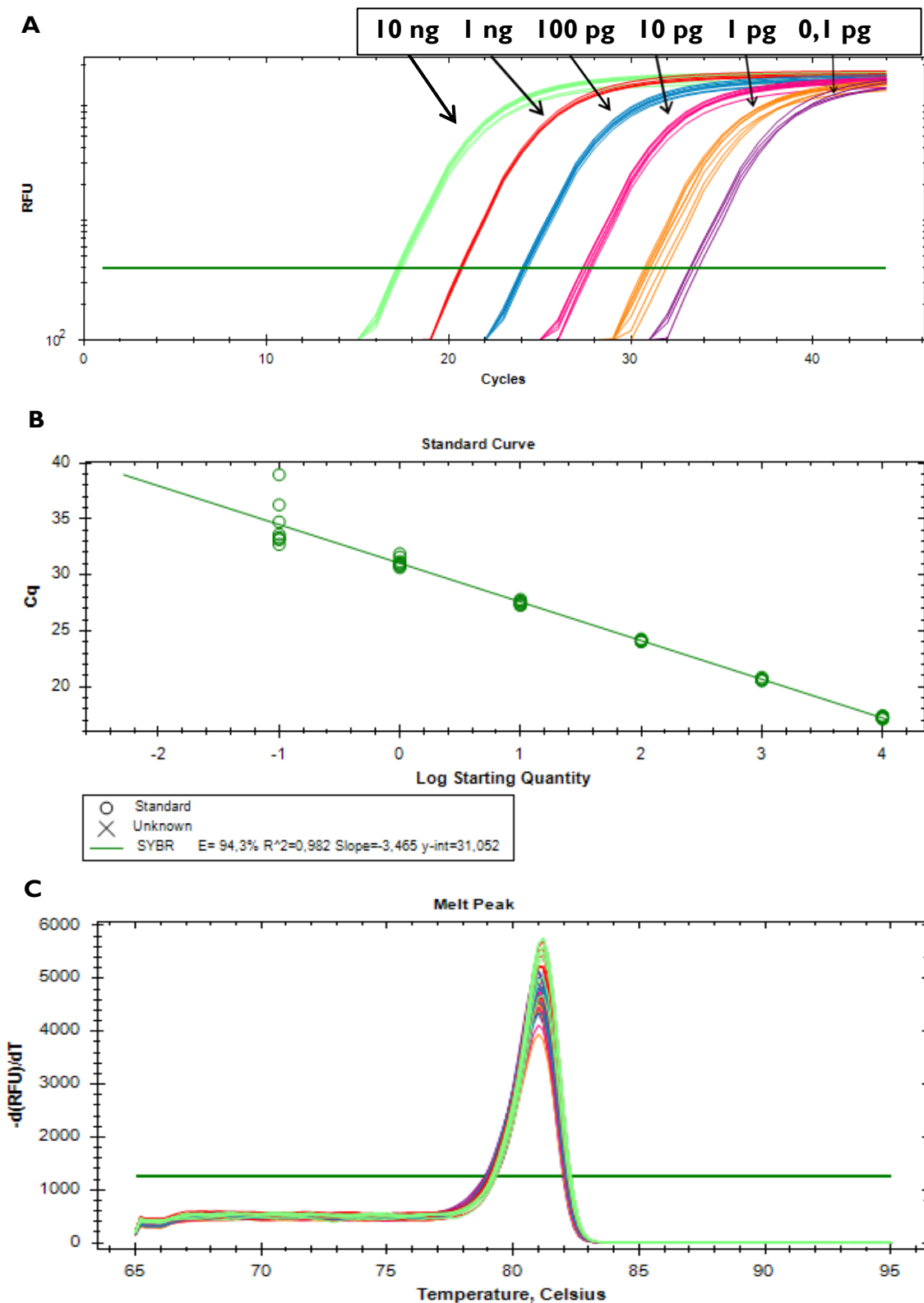


Figura 32 - Curvas de amplificação (A), respectiva curva de calibração (B) e curvas de *melting* (C) obtidas por PCR em tempo real da diluição seriada do extrato de ADN de carne crua CV18 (100% carne de cavalo), para a determinação do limite de detecção absoluto.

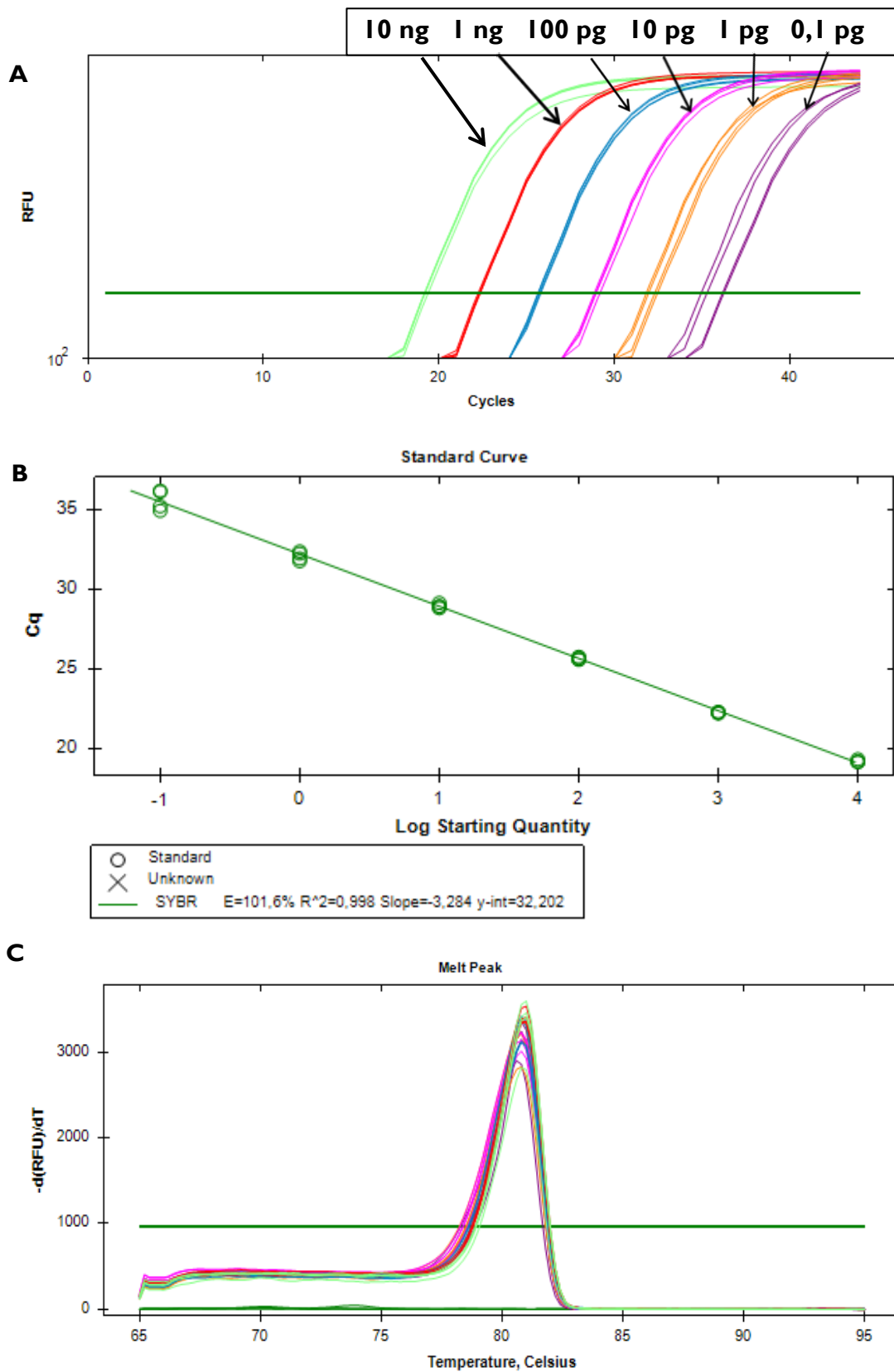


Figura 33 - Curvas de amplificação (a), respectiva curva de calibração (b) e curvas de *melting* (c) obtidas por PCR em tempo real da diluição seriada do extrato de ADN de carne autoclavada CVA18 (100% carne de cavalo), para a determinação do limite de deteção absoluto.

Por último, na Figura 34, podemos visualizar a comparação das duas curvas de calibração construídas a partir da média de todos os valores Ct em função do logaritmo da quantidade de cada padrão. As curvas construídas originaram coeficientes de correlação e declives concordantes com os critérios de aceitação anteriormente referidos. Em ambos, o declive da curva do extrato cru foi de -3,4052, enquanto para o extrato processado foi de -3,2794. Através das curvas de calibração, calcularam-se as respectivas eficiências de PCR (Tabela 15), que também estiveram de acordo com os valores recomendados, ou seja, 96,6% para o extrato de carne crua e 101,8% para o extrato de carne processada.

Tabela 15 – Resultados obtidos para a determinação do LOD absoluto por PCR em tempo real de ADN de cavalo de carne crua e processada

Quantidade de Cavalo	Amostras Auto-Clavadas	Amostras Cruas
	Ct ± SD ^a	Ct ± SD ^a
10000 pg	19,47 ± 0,13 (12/12)	17,25 ± 0,11 (10/10)
1000 pg	22,57 ± 0,17 (12/12)	20,61 ± 0,10 (10/10)
100 pg	25,94 ± 0,22 (12/12)	24,11 ± 0,07 (10/10)
10 pg	29,23 ± 0,15 (12/12)	27,48 ± 0,18 (10/10)
1 pg	32,53 ± 0,40 (12/12)	31,09 ± 0,39 (10/10)
0,1 pg	35,79 ± 0,62 (12/12)	34,10 ± 1,40 (10/10)
Coeficiente de correlação (R ²)	0,9999	0,9997
Declive	-3,2794	-3,4052
Eficiência do PCR (%)	101,8	96,6

a Média do Número de ciclos (Ct) ± desvio padrão (SD) (n=12) e (n=10)

6.4.2 Determinação do limite de deteção relativo / Desenvolvimento da Técnica Quantitativa

Seguidamente, passou-se à etapa de determinação do limite de deteção relativo, onde se utilizaram misturas de referência com e sem processamento. Foram efetuados 3 ensaios com 4 réplicas para cada nível de concentração, onde se atingiu uma sensibilidade de 0,0001% para ambas as misturas de referência. Tal sensibilidade leva-nos novamente a concluir que a degradação do ADN, através do efeito do processamento, não afetou o limite de deteção relativo, o que torna o método mais robusto, pois a maior parte dos produtos comerciais já sofreu tratamento térmico.

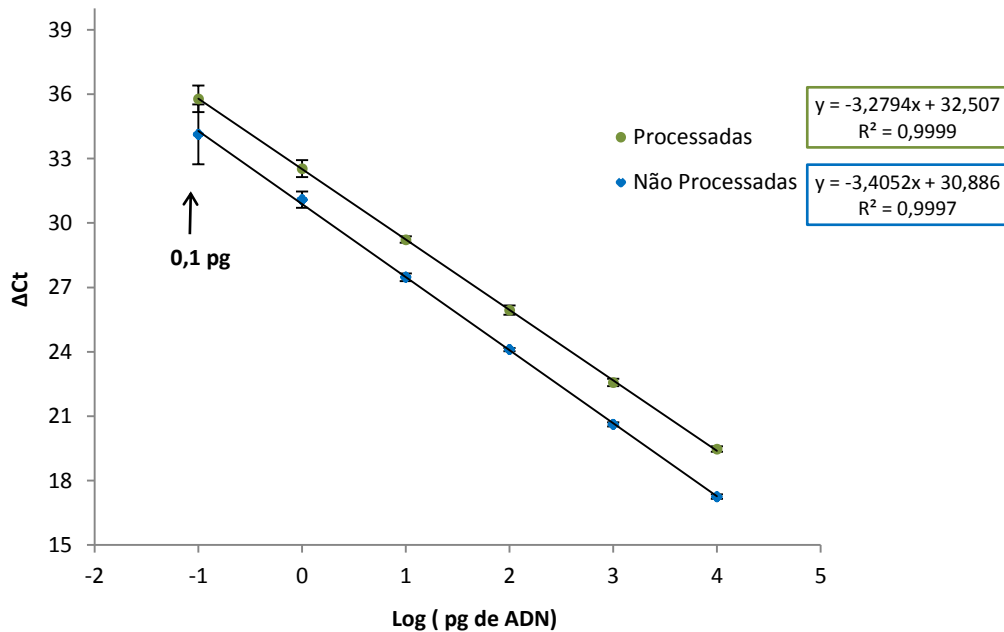


Figura 34 – Comparação das curvas de calibração obtidas por PCR em tempo real com diluições seriadas a partir do extrato do ADN de cavalo, com e sem processamento (10000 pg, 1000 pg, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 0,1 pg), para a determinação do limite de detecção absoluto.

Os ensaios realizados para a determinação do LOD relativo foram também utilizados para desenvolvimento da técnica quantitativa. Como anteriormente foi referido, nesta análise quantitativa é necessária a amplificação de um gene endógeno, como controlo que irá normalizar as diferenças entre os extratos de ADN a analisar, nomeadamente variações relativas à eventual presença de inibidores ou degradação do ADN. O gene utilizado foi o 18S rARN, gene eucariota capaz de amplificar ADN de origem vegetal e animal, ou seja, ADN proveniente de ingredientes suscetíveis de estarem presentes em alimentos. Em relação ao método para desenvolver esta técnica, utilizou-se o ΔC_t com alvo nos genes 18S rARN e do *cytb* de cavalo. A amplificação dos extratos das misturas de referência, com e sem processamento em reações paralelas, permitiu a construção de curvas de calibração normalizadas partir dos valores ΔC_t em função do logaritmo da percentagem de cada padrão.

As figuras 35 (A, B e C) e 36 (A, B e C) representam um dos ensaios realizados para a determinação do LOD relativo para misturas de carnes cruas e processadas, respetivamente. Em ambas as figuras 35C e 36C, podemos observar as respetivas curvas de *melting*, que nos provam que a amplificação foi específica, pois foram registadas temperaturas de *melting* bem distintas para o gene eucariota e para o gene de cavalo, 83,60°C e 81°C, respetivamente.

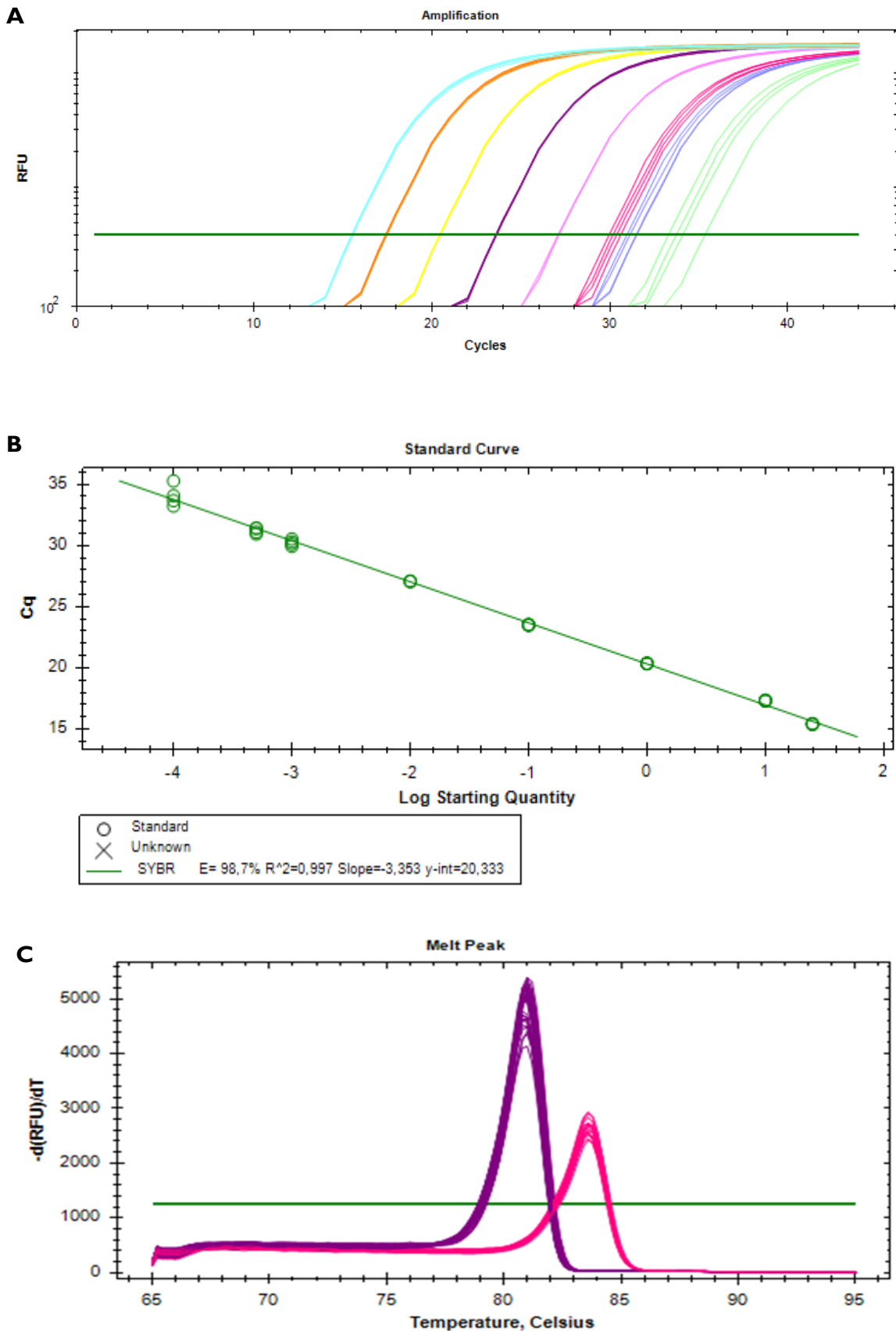


Figura 35 - Curvas de amplificação (a), respetiva curva de calibração (b) e curvas de *melting* (c) obtidas por PCR em tempo real resultante da amplificação de misturas de referência cruas contendo 25%, 10%, 1%, 0,1%, 0,01%, 0,001%, 0,0005% e 0,0001% de carne de cavalo em bovino.

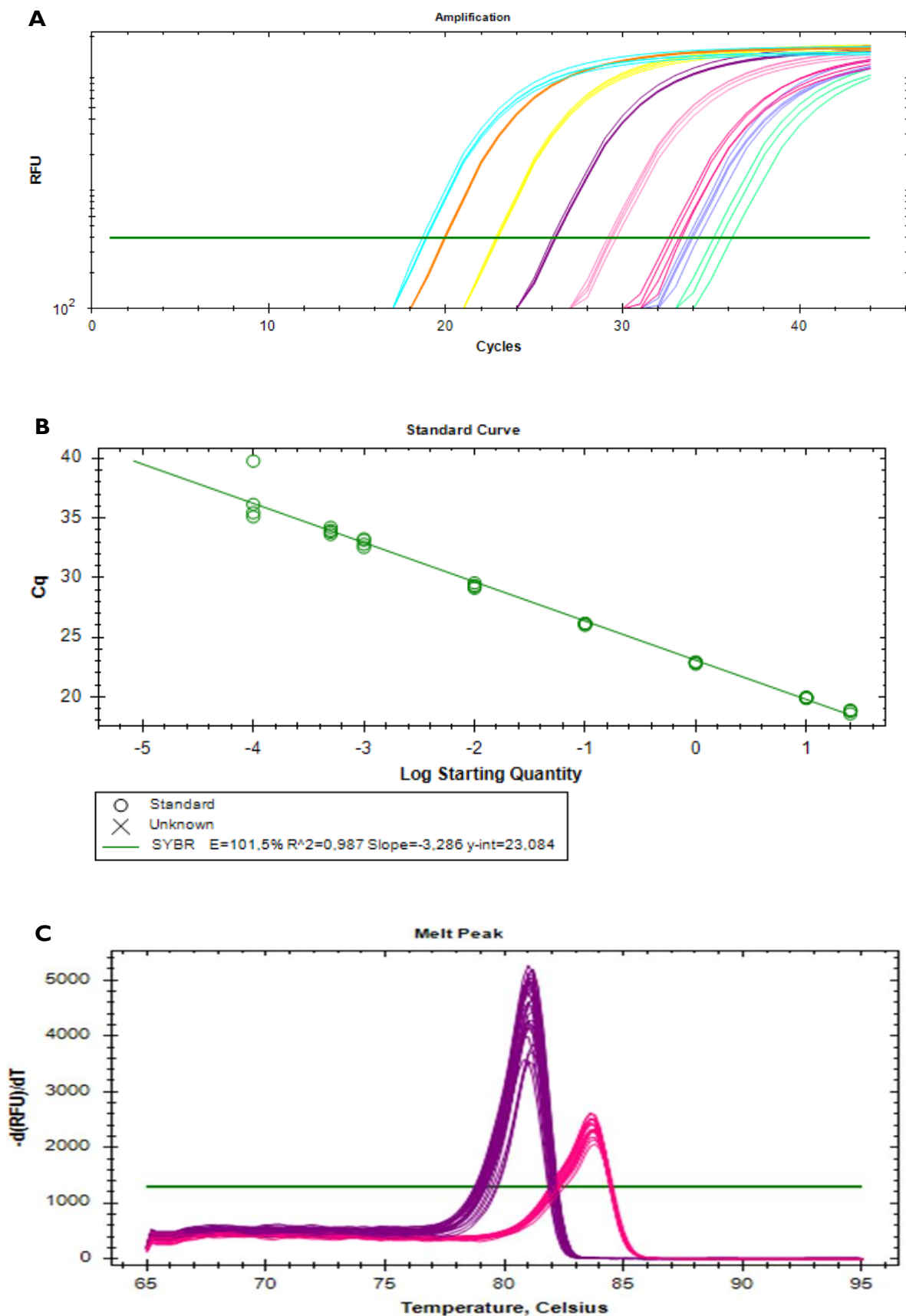


Figura 36 - Curvas de amplificação (a), respectiva curva de calibração (b) e curvas de *melting* (c) obtidas por PCR em tempo real resultante da amplificação de misturas de referência processadas contendo 25%, 10%, 1%, 0,1%, 0,01%, 0,001%, 0,0005% e 0,0001% de carne de cavalo em bovino.

A figura 37 é representativa da comparação das curvas de calibração normalizadas, para quantificação de carne de cavalo em misturas com e sem processamento. Os parâmetros de aceitação obtidos através destas mostram que, tanto nas misturas processadas como nas misturas cruas, o coeficiente de correlação, a eficiência da PCR e o declive estão de acordo com os valores recomendados para este tipo de técnica. Sendo que, nas misturas processadas e cruas, os valores de eficiência da PCR foram de 97,3% e 101,2% (Tabela 16), os coeficiente de correlação foram de 0,9995 e 0,9979, e os declives foram de -3,3878 e .3,2705, respetivamente. Relativamente à sensibilidade, com a amplificação do número total de réplicas (12) para o nível de concentração mais baixo de 0,0001% nas misturas com e sem processamento, pode-se concluir que o LOD relativo não foi afetado com o processamento, tal como verificado anteriormente para o mesmo valor absoluto (Tabela 16).

Tabela 16 – Resultados obtidos para a determinação do LOD relativo para misturas de referência cruas e processadas

Carne de cavalo (%)	Misturas autoclavadas	Misturas cruas
	$\Delta Ct \pm SD^*$	$\Delta Ct \pm SD^*$
25%	0,71 \pm 0,39 (12/12)	0,25 \pm 0,15 (12/12)
10%	0,59 \pm 0,33 (12/12)	2,44 \pm 0,10 (12/12)
1%	3,68 \pm 0,56 (12/12)	5,56 \pm 0,15 (12/12)
0,10%	7,19 \pm 0,47 (12/12)	8,65 \pm 0,13 (12/12)
0,01%	10,64 \pm 0,71 (12/12)	12,21 \pm 0,23 (12/12)
0,001%	14,33 \pm 0,75 (12/12)	15,14 \pm 0,30 (12/12)
0,0005%	15,16 \pm 0,83 (12/12)	16,28 \pm 0,41 (12/12)
0,0001%	17,31 \pm 1,94 (12/12)	18,15 \pm 1,05 (12/12)
Coefficiente de correlação (R ²)	0,9995	0,9979
Declive	-3,3878	-3,2705
Eficiência do PCR (%)	97,3	101,2

* Média dos valores de ΔCt (Ct) \pm desvio padrão (SD) (n=12).

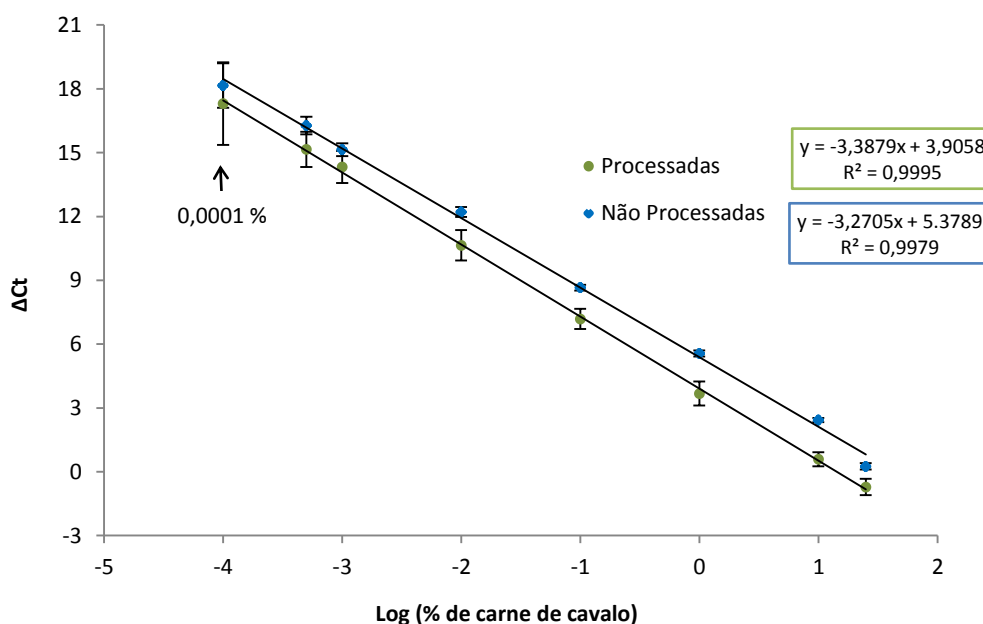


Figura 37 - Comparação das curvas de calibração normalizadas obtidas por PCR em tempo real com as misturas de referência com e sem processamento (25%, 10%, 1%, 0,1%, 0,01%, 0,001%, 0,0005%, 0,0001%) para a determinação de carne de cavalo.

6.4.3 Validação da técnica normalizada

Após o desenvolvimento da técnica quantitativa para misturas de carnes com e sem processamento, foi necessário efectuar uma validação do método, utilizando amostras cegas. Utilizaram-se misturas processadas e não processadas com 0,25%, 2,5%, 4%, 8% e 15% de carne de cavalo em carne de vaca, com 8 réplicas para cada percentagem. Os resultados das tabela 17 e 18 representam os parâmetros validação obtidos das amostras cegas cruas e autoclavadas, respetivamente. Através do cálculo do erro relativo, podemos verificar se os valores reais estão próximos dos valores estimados. Os valores de erro foram inferiores a 20%, em ambas as misturas, com excepção da amostra CVA8, representativa da mistura autoclavada com 0,25% de carne de cavalo. Contudo, como esta amostra representa o nível de concentração mais baixo, a probabilidade de erro é maior. Por isso pode-se concluir que os modelos quantitativos construídos apresentam exactidão. Por fim, todos valores de coeficiente de variação (Tabela 17 e 18) são inferiores a 20%, indicando-nos uma elevada precisão do método.

Tabela 17 – Estimativa das percentagens de carne de cavalo adicionadas em amostras cegas não processadas

Amostras cegas	Valor real (%)	Valor médio estimado (%)*	Desvio padrão (%)	Coefficiente de variação (%)	Erro (%)**
CV16	15	15,8	2,4	8,4	5,0
CV14	8	6,7	0,2	7,1	-16,2
CV12	4	3,8	0,5	12,6	-4,1
CV11	2,5	2,2	0,2	2,9	-12,5
CV8	0,25	0,17	0,01	15,1	-33,0

*Os valores são a média de ensaios (n=8); ** Erro=(valor estimado-valor real)/valor realx100

Tabela 18 – Estimativa das percentagens de carne de cavalo adicionadas em amostras cegas não processadas

Amostras Cegas	Valor real (%)	Valor médio estimado (%)*	Desvio padrão (%)	Coefficiente de variação (%)	Erro (%)**
CVA16	15	12,2	1,02	8,4	18,9
CVA14	8	7,1	0,34	4,8	11,6
CVA12	4	4,2	0,23	5,5	-5,5
CVA11	2,5	2,1	2,08	10,7	16,9
CVA8	0,25	0,26	0,26	15,5	-3,7

*Os valores são a média de ensaios (n=8); ** Erro=(valor estimado-valor real)/valor realx100

6.4.4 Avaliação quantitativa das amostras comerciais

Construídos e validados os modelos quantitativos, passou-se à quantificação das amostras comerciais que foram positivas nos ensaios de PCR qualitativa para a presença de cavalo. O modelo quantitativo utilizado foi o das amostras processadas, uma vez que as amostras positivas foram salsichas, que sofrem um processo de autoclavagem semelhante ao efetuado nas misturas de referência, e um hambúrguer, que também foi submetido a um tratamento térmico. Contudo, após amplificação das amostras, foi observado que as curvas de *melting* da amostra HL5 (salsichas) (Figura 38) do gene eucariota não possuía a temperatura de *melting* esperada (83,60°C). A amplificação do gene eucariota na amostra de salsicha decorreu a cerca de 4 ciclos mais cedo do que os padrões e evidenciou uma temperatura de *melting* de 82,60°C. Tal facto pode ser justificado pela matriz de este produto alimentar ser diferente da matriz (carne de vaca) das misturas de referência. Para além de ingredientes de origem animal, a salsicha poderá possuir uma grande componente de origem vegetal, podendo este fator ser a causa da diferença das respetivas temperaturas de

melting. Apesar do tamanho da sequência alvo ser aparentemente igual, a região de ADN vegetal deverá conter algumas diferenças na sua composição.

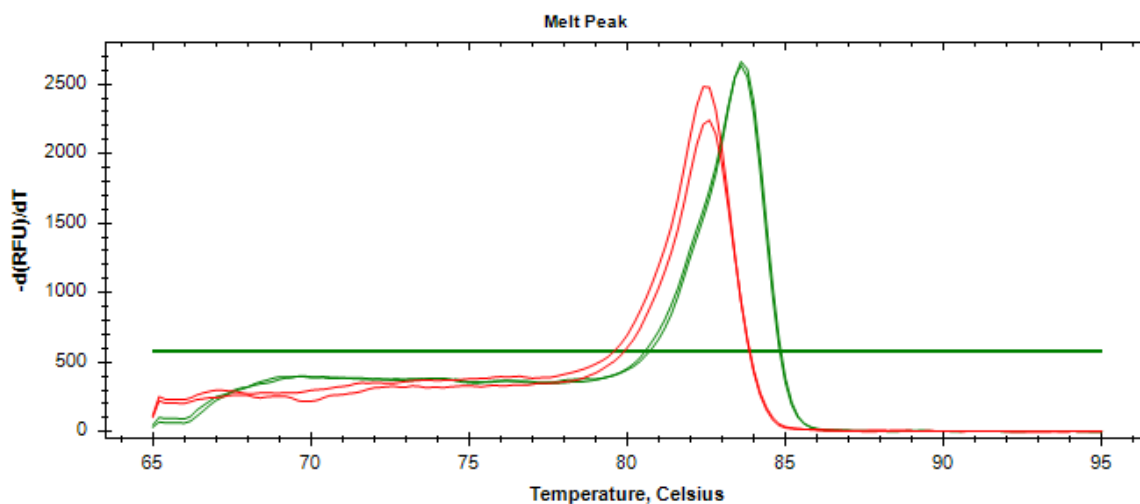


Figura 38 – Exemplo das curvas de *melting* obtidas por PCR em tempo real resultante da amplificação do gene universal (18SRG-F/18SRG-R) da amostra comercial HL5 (vermelho) e mistura de referência de 10% de carne cavalo em vaca (verde).

Perante tal diferença, foi decidido que este modelo quantitativo não era o mais apropriado para a quantificação desta amostra comercial, pelo que a salsicha foi quantificada pelo método de PCR em tempo real não normalizado. Dos dados dos ensaios realizados para o modelo quantitativo com as misturas processadas, construiu-se uma nova curva de calibração não normalizada (Figura 39) a partir da média total de Ct em função do logaritmo da percentagem de cada padrão. Procedeu-se então à quantificação da salsicha que teve como média de valores 0,19%.

A segunda amostra positiva, PF25 (hambúrguer), foi analisada através do primeiro modelo construído inicialmente. Contudo, não foi possível quantificá-la, uma vez que se encontrava abaixo do limite de deteção (0,0001%). Todas as curvas tiveram como a temperatura de *melting* 81,00°C (Figura 40), indicando que a amplificação foi específica para a espécie.

Os resultados quantitativos foram valores baixos, o que nos leva a concluir que a presença desta espécie poderá ter resultado de uma contaminação cruzada e não de possível adulteração.

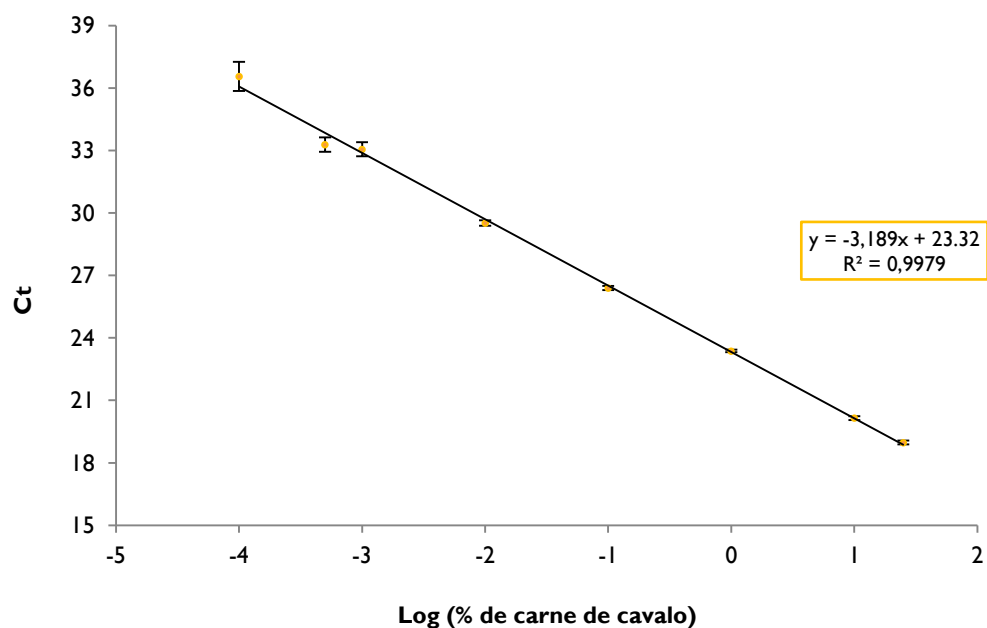


Figura 39 - Curva de calibração não-normalizada obtida por PCR em tempo real (25%, 10%, 1%, 0,1%, 0,01%, 0,001%, 0,0005%, 0,0001%), para a quantificação da amostra HL5.

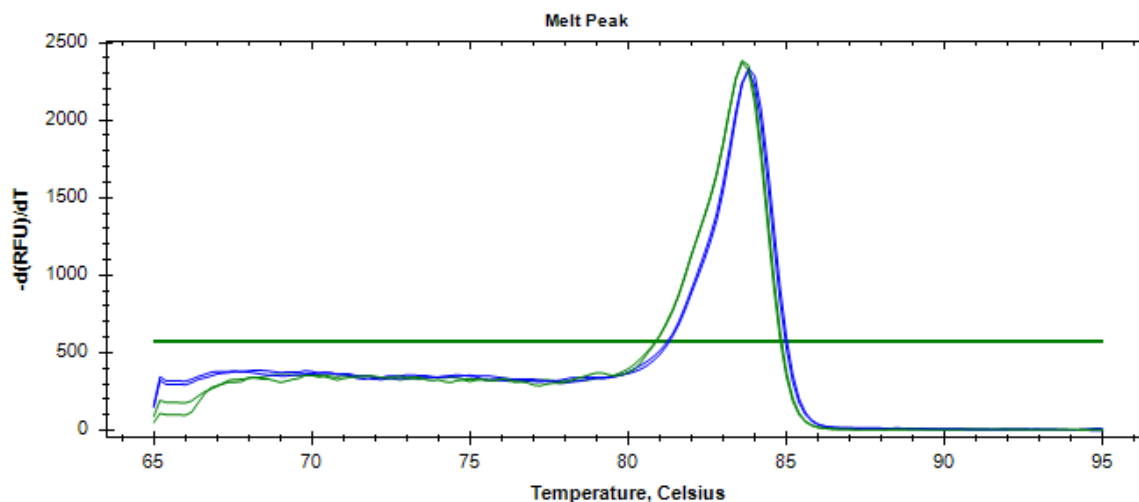


Figura 40 – Exemplo das curvas de *melting* obtidas por PCR em tempo real resultante da amplificação do gene universal (18SRG-F/18SRG-R) da amostra comercial PF25 (azul) e mistura de referência de 10% de carne cavalo em vaca (verde).

Analisando os resultados da literatura, é possível encontrar alguns trabalhos desenvolvidos para a detecção de carne de cavalo. Em 2005, Chisholm e os seus investigadores alcançaram um LOD absoluto de 25 pg utilizando o método PCR em tempo real com sondas fluorescentes. Jonker et al., em 2007, atingiram uma sensibilidade de 125 pg para o LOD absoluto e 0,1% para o LOD relativo numa mistura de carnes (frango, peru,

porco, cavalo e ovelha), também com recurso ao PCR em tempo real com sondas fluorescentes. No ano 2009, através de uma PCR real time multiplex utilizando sondas Taqman, Koppel et al. (2009) obtiveram uma sensibilidade de 1% de carne de cavalo para um limite de deteção relativo em misturas constituídas por ovelha, porco, peru, cavalo, frango e cabra. Também nesse mesmo ano, Kesmen et al. (2009), utilizando o mesmo método quantitativo e o mesmo tipo de sondas, alcançaram um LOD absoluto de 0,1 pg e o LOD relativo de 0,0001% em misturas contendo porco, cavalo e burro. Por fim, em 2010, a equipa de Koppel (2011) atingiu uma sensibilidade de 320 pg para o LOD absoluto, com o uso do PCR em tempo real multiplex e sondas Taqman.

Verificou-se que, em toda a literatura revista, se atingiram limites de quantificação superiores aos alcançados neste trabalho, à excepção do estudo realizado por Kesmen et al. (2009), cujos limites atingidos foram os mesmos. Porém, neste trabalho foi utilizado o corante Evagreen, um método mais económico do que o uso de sondas e que se revelou específico e eficaz. Como tal, é possível concluir que o método desenvolvido é bastante vantajoso e acrescenta avanços na deteção de carne de cavalo, uma vez que atinge valores de sensibilidade, em geral, mais baixos comparando com a literatura reportada, recorrendo a técnicas mais económicas.

7 Conclusão

Este trabalho teve como objetivo detetar eventuais adulterações com a espécie *Equus caballus* em produtos cárneos. Depois do escândalo internacional ocorrido no ano 2013, em que milhares de produtos cárneos foram retirados do mercado pela sua adulteração com esta espécie, tornou-se importante desenvolver metodologias para verificar a conformidade da rotulagem. As metodologias utilizadas basearam-se na análise de ADN, uma vez que a maior parte dos produtos comerciais que iriam ser analisados tinham sido processados. Como tal, métodos baseados na análise de proteínas não iriam ser tão eficazes, uma vez que ocorre a desnaturação das mesmas quando se submete os produtos a um tratamento térmico.

O primeiro passo para o desenvolvimento de todo este trabalho foi a preparação de misturas binárias de referência, contendo carne de cavalo e vaca. Tais misturas foram preparadas em duplicado e um dos lotes foi submetido ao processo de autoclavagem, de modo a simular o processamento e a avaliar o seu efeito no desempenho dos métodos desenvolvidos.

As metodologias utilizadas requerem o passo prévio de extração do ADN. Neste trabalho utilizou-se o método *Wizard* para se obter os extratos de ADN, o qual demonstrou ser adequado tanto para as misturas de referência e amostras comerciais, pois de uma maneira geral, os extratos apresentaram elevada pureza e concentração. Após extração desenhou-se um par de *primers* (Eq-F/Eq-R) de forma a amplificar a espécie *Equus caballus*, os quais permitiram o desenvolvimento efetivo de dois métodos de deteção baseados em dois tipos de técnicas: PCR qualitativa e PCR em tempo real. A técnica de PCR com *primers* específicos para cavalo demonstrou ter elevada especificidade e sensibilidade. Alcançou-se um limite de deteção absoluto de 1 pg e 10 pg para extratos de ADN de cavalo crus e processados, respetivamente. Relativamente ao limite de deteção relativo, obtiveram-se valores de 0,001% e 0,01% para misturas binárias cruas e processadas, respetivamente. A aplicação da técnica qualitativa foi efetiva em amostras comerciais, revelando a presença de cavalo em duas amostras (antes do “escândalo de cavalo”).

Efetuada a análise qualitativa passou-se à análise quantitativa, através do método de PCR em tempo real. Nesta etapa utilizou-se o mesmo conjunto de *primers* e corante EvaGreen com posterior análise de *melting*. O limite de deteção absoluto alcançado foi de 0,1 pg para ambos os extratos, crus e processados. Em relação ao LOD relativo obtiveram-se sensibilidades de 0,0001% para as misturas de binárias cruas e processadas. Para quantificar as amostras foi necessário desenvolver um modelo quantitativo para normalizar a técnica de PCR em tempo real, uma vez que elimina diferenças entre os extratos. Assim,

procedeu-se à construção de um modelo de calibração baseado no método ΔC_t utilizando um gene eucariota como referência endógena. O modelo desenvolvido revelou elevada performance uma vez que os resultados obtidos estavam de acordo com os critérios de aceitação para as técnicas de PCR em tempo real.

Posteriormente, utilizando amostra cegas, procedeu-se à validação do modelo de calibração. A quantificação das amostras cegas revelou que o modelo era exato, uma vez que os valores estimados foram próximos dos valores reais, e preciso, devido aos coeficientes de variação entre os ensaios.

Construído e validada a técnica quantitativa foi então possível passar à quantificação das amostras positivas na técnica qualitativa. Contudo, só foi possível aplicá-lo a uma das amostras. A amplificação do gene eucariota da amostra HL5 evidenciou uma temperatura de *melting* diferente dos padrões, como tal o modelo quantitativo construído não era o mais apropriado para a quantificação. A amostra HL5 foi quantificada pelo método de PCR em tempo real não normalizado, tendo como média de valores 0,19%. A segunda amostra positiva, PF25 (hambúrguer), foi analisada pelo modelo inicialmente construído. Porém, não foi possível quantificá-la, uma vez que a quantidade de carne de cavalo presente estava abaixo do limite de deteção (0,0001%). Os resultados quantitativos revelaram valores muito baixos, o que nos leva a concluir que a presença desta espécie poderá ter resultado de uma contaminação cruzada.

As técnicas de PCR desenvolvidas, para a identificação da espécie *Eqqus caballus*, apresentaram elevada sensibilidade e especificidade tornando-se possível concluir que, através do desenvolvimento deste trabalho, foram desenvolvidas ferramentas úteis e eficazes para a deteção de adulterações em produtos cárneos.

8 Referências Bibliográficas

- AMARAL, J.S., SANTOS, C.G., MELO, V.S., OLIVEIRA, M.B.P.P.,MAFRA, I. - **Authentication of a traditional game meat sausage (Alheira) by species-specific PCR assays to detect hare, rabbit, red deer, pork and cow meats.** Food Research International. 60, (2014), 140-145.
- ASENSIO, L., GONZÁLEZ, I., GARCÍA, T.,MARTÍN, R. - **Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).** Food Control. 19, 1 (2008), 1-8.
- BALLIN, N.Z. - **Authentication of meat and meat products.** Meat Science. 86, 3 (2010), 577-587.
- BALLIN, N.Z.,LAMETSCH, R. - **Analytical methods for authentication of fresh vs. thawed meat – A review.** Meat Science. 80, 2 (2008), 151-158.
- BALLIN, N.Z., VOGENSEN, F.K.,KARLSSON, A.H. - **PCR amplification of repetitive sequences as a possible approach in relative species quantification.** Meat Science. 90, 2 (2012), 438-443.
- BOTTERO, M.T.,DALMASSO, A. - **Animal species identification in food products: Evolution of biomolecular methods.** The Veterinary Journal. 190, 1 (2011), 34-38.
- BROLL, H. - **Polymerase Chain Reaction.** In: POPPING, B., DIAZ-AMIGO, C. & HOENICKE, K. Molecular biological and immunological techniques and applications for food chemists. Place: John Wiley & Sons, 2010. ISBN: 978-0-470-06809-0, 41-58.
- BUSTIN, S.A., BENES, V., GARSON, J.A., HELLEMANS, J., HUGGETT, J., KUBISTA, M., MUELLER, R., NOLAN, T., PFAFFL, M.W.,SHIPLEY, G.L. - **The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments.** Clinical chemistry. 55, 4 (2009), 611-622.
- CAC/RCP 58 - **Code of hygienic practice for meat.** Disponível em: <http://www.codexalimentarius.org/standards/list-of-standards/>, Codex Alimentarius, FAO/WHO, (2005).
- CAMMÀ, C., DI DOMENICO, M.,MONACO, F. - **Development and validation of fast real-time PCR assays for species identification in raw and cooked meat mixtures.** Food Control. 23, 2 (2012), 400-404.
- CAWTHORN, D., STEINMAN, H.,WITTHUHN, R. - **Comparative study of different methods for the extraction of DNA from fish species commercially available in South Africa.** Food Control. 22, 2 (2011), 231-244.
- CHENG, X., HE, W., HUANG, F., HUANG, M.,ZHOU, G. - **Multiplex real-time PCR for the identification and quantification of DNA from duck, pig and chicken in Chinese blood curds.** Food Research International. 60 (2014), 30-37.
- CHISHOLM, J., CONYERS, C., BOOTH, C., LAWLEY, W.,HIRD, H. - **The detection of horse and donkey using real-time PCR.** Meat Science. 70, 4 (2005), 727-732.
- COSTA, J., OLIVEIRA, M.B.P.P., MAFRA, I. - **Effect of thermal processing on the performance of the novel single-tube nested real-time PCR for the detection of walnut allergens in sponge cakes.** Food Research International. 54 (2013), 1722–1729.

- DI PINTO, A., FORTE, V.T., CONVERSANO, M.C., TANTILLO, G.M. - **Duplex polymerase chain reaction for detection of pork meat in horse meat fresh sausages from Italian retail sources.** Food Control. 16, 5 (2005), 391-394.
- DIAZ-AMIGO, C. - **Antibody-Based Detection Methods: From Theory to Practice.** In: POPPING, B., DIAZ-AMIGO, C. & HOENICKE, K. Molecular biological and immunological techniques and applications for food chemists. Place: John Wiley & Sons, 2010. ISBN: 978-0-470-06809-0, 223-245.
- DIRECTIVA 2002/86/CE - **que altera a Directiva 2001/101/CE, no que se refere à data a partir da qual são proibidas as trocas de produtos não conformes com a Directiva 2000/13/CE do Parlamento Europeu e do Conselho.** Bruxelas, Jornal oficial da Comunidades Europeias (2002).
- DOBRANIC, V., NJARI, B., MIOKOVIC, B., FLECK, Z.C., KADIVC, M. - **Chemical composition of horse meat.** Meso 11, 1 (2009), 32-36, 62-97.
- EFSA - **Scientific Opinion on the evaluation of molecular typing methods for major food-borne microbiological hazards and their use for attribution modelling, outbreak investigation and scanning surveillance.** EFSA Journal. 11, 12 (2013), 3502.
- EFSA/EMA - **Joint Statement of EFSA and EMA on the presence of residues of phenylbutazone in horse meat.** EFSA Journal, (2013).
- FAJARDO, V., GONZÁLEZ, I., LÓPEZ-CALLEJA, I., MARTÍN, I., ROJAS, M., GARCÍA, T., HERNANDEZ, P., MARTÍN, R. - **PCR identification of meats from chamois (*Rupicapra rupicapra*), pyrenean ibex (*Capra pyrenaica*), and mouflon (*Ovis ammon*) targeting specific sequences from the mitochondrial D-loop region.** Meat science. 76, 4 (2007), 644-652.
- FAJARDO, V., GONZÁLEZ, I., MARTÍN, I., ROJAS, M., HERNÁNDEZ, P.E., GARCÍA, T., MARTÍN, R. - **Real-time PCR for detection and quantification of red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), and roe deer (*Capreolus capreolus*) in meat mixtures.** Meat science. 79, 2 (2008), 289-298.
- FAJARDO, V., GONZÁLEZ, I., ROJAS, M., GARCÍA, T., MARTÍN, R. - **A review of current PCR-based methodologies for the authentication of meats from game animal species.** Trends in Food Science & Technology. 21, 8 (2010), 408-421.
- GHOVVATI, S., NASSIRI, M.R., MIRHOSEINI, S.Z., MOUSSAVI, A.H., JAVADMANESH, A. - **Fraud identification in industrial meat products by multiplex PCR assay.** Food Control. 20, 8 (2009), 696-699.
- GILL, C.O. - **Safety and storage stability of horse meat for human consumption.** Meat Science. 71, 3 (2005), 506-513.
- GIRISH, P., ANJANEYULU, A., VISWAS, K., SHIVAKUMAR, B., ANAND, M., PATEL, M., SHARMA, B. - **Meat species identification by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) of mitochondrial 12S rRNA gene.** Meat science. 70, 1 (2005), 107-112.
- GIRISH, P.S., ANJANEYULU, A.S.R., VISWAS, K.N., ANAND, M., RAJKUMAR, N., SHIVAKUMAR, B.M., BHASKAR, S. - **Sequence analysis of mitochondrial 12S rRNA gene can identify meat species.** Meat Science. 66, 3 (2004), 551-556.
- HAIDER, N., NABULSI, I., AL-SAFADI, B. - **Identification of meat species by PCR-RFLP of the mitochondrial COI gene.** Meat Science. 90, 2 (2012), 490-493.

- HAUNSHI, S., BASUMATARY, R., GIRISH, P.S., DOLEY, S., BARDOLOI, R.K., KUMAR, A. - **Identification of chicken, duck, pigeon and pig meat by species-specific markers of mitochondrial origin.** *Meat Science.* 83, 3 (2009), 454-459.
- HEINZ, G., HAUTZINGER, P. - **Meat Processing Technology for small to medium scale producers** Bangkok, Food and Agriculture Organization of the United Nations, (2007).
- HERMANN, B. - **Quantitative Real-Time PCR.** In: POPPING B, DIAZ-AMIGO C & K, H. *Molecular Biological and Immunological Techniques and Applications for Food Chemists.* Place: John Wiley & Sons, 2010. ISBN: 978-0-470-06809-0, 59-84.
- HERNÁNDEZ-CHÁVEZ, J.F., GONZÁLEZ-CÓRDOVA, A.F., RODRÍGUEZ-RAMÍREZ, R., VALLEJO-CORDOBA, B. - **Development of a polymerase chain reaction and capillary gel electrophoresis method for the detection of chicken or turkey meat in heat-treated pork meat mixtures.** *Analytica Chimica Acta.* 708, 1-2 (2011), 149-154.
- HIGGS, J., MULVIHILL, B. - **The Nutritional Quality of Meat.** In: KERRY, J. & LEDWARD, D. E. *Meat Processing: Improving Quality.* Place: CRC Press, 2002. ISBN: 0849315395, 171-192.
- HSIEH, H.-S., CHAI, T.-J., HWANG, D.-F. - **Using the PCR-RFLP method to identify the species of different processed products of billfish meats.** *Food Control.* 18, 4 (2007), 369-374.
- JONKER, K.M., TILBURG, J.J., HAGELE, G.H., DE BOER, E. - **Species identification in meat products using real-time PCR.** *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 25, 5 (2007), 527-33.
- KESMEN, Z., GULLUCE, A., SAHIN, F., YETIM, H. - **Identification of meat species by TaqMan-based real-time PCR assay.** *Meat Science.* 82, 4 (2009), 444-449.
- KESMEN, Z., SAHIN, F., YETIM, H. - **PCR assay for the identification of animal species in cooked sausages.** *Meat Science.* 77, 4 (2007), 649-53.
- KITPIPIT, T., SITTICHAN, K., THANAKIATKRAI, P. - **Direct-multiplex PCR assay for meat species identification in food products.** *Food Chemistry.* 163, 0 (2014), 77-82.
- KÖPPEL, R., RUF, J., RENTSCH, J. - **Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from beef, pork, horse and sheep.** *European Food Research and Technology.* 232, 1 (2011), 151-155.
- KÖPPEL, R., ZIMMERLI, F., BREITENMOSER, A. - **Heptaplex real-time PCR for the identification and quantification of DNA from beef, pork, chicken, turkey, horse meat, sheep (mutton) and goat.** *European Food Research and Technology.* 230, 1 (2009), 125-133.
- LEVIN, R.E. - **The application of real-time PCR to food and agricultural systems. A review.** *Food biotechnology.* 18, 1 (2005), 97-133.
- LITWINCZUK, A., FLOREK, M., SKAŁECKI, P., LITWIŃCZUK, Z. - **Chemical composition and physicochemical properties of horse meat from the longissimus lumborum and semitendinosus muscle.** *Journal of Muscle Foods.* 19, 3 (2008), 223-236.
- LOCKLEY, A., BARDSLEY, R. - **DNA-based methods for food authentication.** *Trends in Food Science & Technology.* 11, 2 (2000), 67-77.
- LÓPEZ-ANDREO, M., GARRIDO-PERTIERRA, A., PUYET, A. - **Evaluation of post-polymerase chain reaction melting temperature analysis for meat species identification in mixed DNA samples.** *Journal of agricultural and food chemistry.* 54, 21 (2006), 7973-7978.

- LÓPEZ-CALLEJA, I., GONZÁLEZ, I., FAJARDO, V., MARTÍN, I., HERNÁNDEZ, P.E., GARCÍA, T., MARTÍN, R. - **Quantitative detection of goats' milk in sheep's milk by real-time PCR.** Food Control. 18, 11 (2007), 1466-1473.
- LOPPARELLI, R.M., CARDAZZO, B., BALZAN, S., GIACCONE, V., NOVELLI, E. - **Real-time TaqMan polymerase chain reaction detection and quantification of cow DNA in pure water buffalo mozzarella cheese: method validation and its application on commercial samples.** Journal of agricultural and food chemistry. 55, 9 (2007), 3429-3434.
- LÜTHY, J. - **Detection strategies for food authenticity and genetically modified foods.** Food Control. 10, 6 (1999), 359-361.
- MAFRA, I., FERREIRA, I.M.P.L.V.O., OLIVEIRA, M.B.P.P. - **Food authentication by PCR-based methods.** European Food Research and Technology. 227, 3 (2008a), 649-665.
- MAFRA, I., OLIVEIRA, M.B.P.P. - **Organismos geneticamente modificados e alimentos derivados: II. Métodos de detecção e quantificação.** Alimentação Humana. 11, (2005), 71-89.
- MAFRA, I., SILVA, S.A., MOREIRA, E.J.M.O., SILVA, C.S.F., OLIVEIRA, M.B.P.P. - **Comparative study of DNA extraction methods for soybean derived food products.** Food Control. 19, 12 (2008b), 1183-1190.
- MARK, D., HAEBERLE, S., ROTH, G., VON STETTEN, F., ZENGERLE, R. - **Microfluidic lab-on-a-chip platforms: requirements, characteristics and applications.** Chemical Society Reviews. 39, 3 (2010), 1153-1182.
- MARTÍN, I., GARCÍA, T., FAJARDO, V., LÓPEZ-CALLEJA, I., ROJAS, M., HERNÁNDEZ, P.E., GONZÁLEZ, I., MARTÍN, R. - **Mitochondrial markers for the detection of four duck species and the specific identification of Muscovy duck in meat mixtures using the polymerase chain reaction.** Meat Science. 76, 4 (2007), 721-729.
- MARTINEZ, I., YMAN, I.M. - **Species identification in meat products by RAPD analysis.** Food Research International. 31, 6-7 (1998), 459-466.
- MATEUS, E. - **Animais à Mesa. Zoonoses e Estratégias no Consumo de Carne.** Mestrado em Antropologia Social e Cultural Lisboa, Universidade de Lisboa, (2009).
- MAZZARA, M., SAVINI, C., CHARLES DE DELOBEL, C., BROLL, H., DAMANT, A., PAOLETTI, C., VAN DEN EEDE, G. - **Definition of Minimum Performance Requirements for Analytical Methods of GMO Testing.** (2008), Disponível na internet: <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/guidancedocs.htm>.
- MIR, S.M., MOHANASRINIVASAN, V. - **Methods of Genomic fingerprinting of Foods-A Molecular Perspective.** Journal of Pharmacy Research. 3, 8 (2010),
- MOHAMAD, N.A., EL SHEIKHA, A.F., MUSTAFA, S., MOKHTAR, N.F.K. - **Comparison of gene nature used in real-time PCR for porcine identification and quantification: A review.** Food Research International. 50, 1 (2013), 330-338.
- MONTOWSKA, M., POSPIECH, E. - **Authenticity Determination of Meat and Meat Products on the Protein and DNA Basis.** Food Reviews International. 27, 1 (2010), 84-100.
- MURUGAIAH, C., NOOR, Z.M., MASTAKIM, M., BILUNG, L.M., SELAMAT, J., RADU, S. - **Meat species identification and Halal authentication analysis using mitochondrial DNA.** Meat science. 83, 1 (2009), 57-61.

- NATONEK-WIŚNIEWSKA, M., KRZYŚCIN, P.,PIESTRZYŃSKA-KAJTOCH, A. - **The species identification of bovine, porcine, ovine and chicken components in animal meals, feeds and their ingredients, based on COX I analysis and ribosomal DNA sequences.** Food Control. 34, 1 (2013), 69-78.
- NAU, F., DÉSSERT, C., COCHET, M., PASCO, M., JAN, S., BARON, F., LAGARRIGUE, S.,GUÉRIN-DUBIARD, C. - **Detection of turkey, duck, and guinea fowl egg in hen egg products by species-specific PCR.** Food analytical methods. 2, 3 (2009), 231-238.
- PEREIRA, F., AMORIM, A.,VAN ASCH, B. - **Genetic and DNA-Based Techniques.** In: GUARDIA, A. & GONZÁLVEZ, A. Comprehensive Analytical Chemistry. Place: Elsevier, 2013a. ISBN: 0166-526X, 195-220.
- PEREIRA, F., CARNEIRO, J.,AMORIM, A. - **Identification of species with DNA-based technology: current progress and challenges.** Recent patents on DNA & gene sequences. 2, 3 (2008), 187-200.
- PEREIRA, P.,VICENTE, A. - **Meat nutritional composition and nutritive role in the human diet.** Meat Science. 93, 3 (2013b), 586-592.
- PFEIFFER, I., BURGER, J.,BRENIG, B. - **Diagnostic polymorphisms in the mitochondrial cytochrome b gene allow discrimination between cattle, sheep, goat, roe buck and deer by PCR-RFLP.** BMC genetics. 5, 1 (2004), 30.
- PREMANANDH, J. - **Horse meat scandal – A wake-up call for regulatory authorities.** Food Control. 34, 2 (2013), 568-569.
- PUCHADES, R.,MAQUIEIRA, Á. - **ELISA Tools for Food PDO Authentication.** In: GUARDIA, M. & GONZÁLVEZ, A. Comprehensive Analytical Chemistry. Place: Elsevier Science & Technology 2013. ISBN: 0166-526X, 145-193.
- RAPLEY, R. - **Molecular biology, bioinformatics and basic techniques.** In: WILSON, K. & WALKER, J. Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology. Place: Cambridge University Press, 2010. ISBN: 9780521731676,
- RASTOGI, G., DHARNE, M.S., WALUJKAR, S., KUMAR, A., PATOLE, M.S.,SHOUCHE, Y.S. - **Species identification and authentication of tissues of animal origin using mitochondrial and nuclear markers.** Meat Science. 76, 4 (2007), 666-674.
- REID, M., O'DONNELL, P.,DOWNEY, G. - **Recent technological advances for the determination of food authenticity.** Trends in Food Science & Technology. 17, 7 (2006), 344-353.
- RODRIGUEZ-LAZARO, D.,HERNANDEZ, M. - **Real-time PCR in Food Science: Introduction.** Curr Issues Mol Biol. 15, 2 (2013), 25-38.
- ROJAS, M., GONZÁLVEZ, I., GARCÍA, T., HERNÁNDEZ, P.E.,MARTÍN, R. - **Authentication of meat and commercial meat products from common pigeon (*Columba livia*) woodpigeon (*Columba palumbus*) and stock pigeon (*Columba oenas*) using a TaqMan® real-time PCR assay.** Food Control. 23, 2 (2012), 369-376.
- ŞAKALAR, E.,ABASIYANIK, M.F. - **The development of duplex real-time PCR based on SYBR Green fluorescence for rapid identification of ruminant and poultry origins in foodstuff.** Food Chemistry. 130, 4 (2012), 1050-1054.
- SANTOS, C.G., MELO, V.S., AMARAL, J.S., ESTEVINHO, L., OLIVEIRA, M.B.P.P.,MAFRA, I. - **Identification of hare meat by a species-specific marker of mitochondrial origin.** Meat Science. 90, 3 (2012), 836-41.

- SCHUBBERT, R. - **Molecular Biology Laboratory Layout**. In: POPPING, B., DIAZ-AMIGO, C. & HOENICKE, K. Molecular biological and immunological techniques and applications for food chemists. Place: John Wiley & Sons, 2010. ISBN: 978-0-470-06809-0, 3-40.
- SOARES, S., AMARAL, J.S., MAFRA, I., OLIVEIRA, M.B.P.P. - **Quantitative detection of poultry meat adulteration with pork by a duplex PCR assay**. Meat Sci. 85, 3 (2010), 531-6.
- SOARES, S., AMARAL, J.S., OLIVEIRA, M.B.P.P., MAFRA, I. - **A SYBR Green real-time PCR assay to detect and quantify pork meat in processed poultry meat products**. Meat Science. 94, 1 (2013), 115-120.
- SOARES, S., AMARAL, J.S., OLIVEIRA, M.B.P.P., MAFRA, I. - **Quantitative detection of soybean in meat products by a TaqMan real-time PCR assay**. Meat Science. 98, 1 (2014), 41-46.
- SOMMA, M., QUERCI, M. - **Agarose Gel Electrophoresis**. The Analysis of Food Samples for the Presence of Genetically Modified Organisms, Luxembourg World Health Organization-Joint Research Centre, European Commission Directorate General (2006a).
- SOMMA, M., QUERCI, M. - **The Polymerase Chain Reaction (PCR)**. The Analysis of Food Samples for the Presence of Genetically Modified Organisms, Luxembourg World Health Organization-Joint Research Centre, European Commission Directorate General (2006b).
- WEIGHARDT, F. - **Quantitative PCR for the Detection of GMOs**. The Analysis of Food Samples for the Presence of Genetically Modified Organisms, Luxembourg World Health Organization-Joint Research Centre, European Commission Directorate General (2006).
- WILSON, K., WALKER, J.M. - **Principles and techniques of biochemistry and molecular biology**. Cambridge University Press, 2010.
- WOOLFE, M., PRIMROSE, S. - **Food forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud**. Trends in Biotechnology. 22, 5 (2004), 222-226.
- ZHA, D., XING, X., YANG, F. - **Rapid identification of deer products by multiplex PCR assay**. Food Chemistry. 129, 4 (2011), 1904-1908.
- ZHANG, C., FOWLER, M.R., SCOTT, N.W., LAWSON, G., SLATER, A. - **A TaqMan real-time PCR system for the identification and quantification of bovine DNA in meats, milks and cheeses**. Food Control. 18, 9 (2007), 1149-1158.