



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA



Catarina Isabel Barreto do Vale

**QUEIJOS *MOZZARELLA* E *BURRATA*  
NO MERCADO PORTUGUÊS, SÓ COM  
ORIGEM EM LEITE DE BÚFALA?**

Dissertação no âmbito do Mestrado em Segurança Alimentar orientada pelo Professor Doutor Fernando Jorge dos Ramos e pela Doutora Maria Manuela Sol, apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Junho de 2019



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

---

A stylized, thick, brown letter 'U' shape that serves as a logo for the University of Coimbra.

Catarina Isabel Barreto do Vale

**QUEIJOS *MOZZARELLA* E *BURRATA* NO MERCADO  
PORTUGUÊS SÓ COM ORIGEM EM LEITE DE  
BÚFALA?**

**Dissertação no âmbito do Mestrado em Segurança Alimentar orientada pelo Professor  
Doutor Fernando Jorge dos Ramos e pela Doutora Maria Manuela Sol, apresentado à  
Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra**

Junho de 2019

## **Agradecimentos**

Na reta final deste meu percurso acadêmico seria ingrato não agradecer a todas as pessoas que contribuíram para chegar direta ou indiretamente até aqui:

Começaria por agradecer ao Professor Doutor Fernando Ramos por ter aceitado ser meu orientador e por toda a disponibilidade demonstrada durante todo este percurso.

À Doutora Maria Manuela Sol pela orientação, pela disponibilização de todos os recursos necessários para a execução deste trabalho e pela amabilidade.

À Engenheira Ana Rita Alberty pela partilha de conhecimentos. Obrigada pela preocupação e amabilidade.

A todos os trabalhadores do laboratório de Segurança Alimentar da ASAE por me terem recebido tão bem.

A todas as minhas amigas por todo o apoio e paciência. Obrigada pela vossa amizade.

À Sofia por todos os conselhos e pelo apoio nesta etapa da minha vida. Obrigada pelas conversas longas e por toda a paciência.

Ao meu namorado pela força transmitida, por sempre me ter apoiado e acreditado em mim. Obrigada por estares sempre ao meu lado.

Por fim quero agradecer à minha família e em especial aos meus pais por todo o apoio, não só nesta etapa, mas durante toda a minha vida. Obrigada por tudo.

## **Resumo**

A fraude alimentar não é um conceito novo, existindo registos desta atividade referentes à Grécia antiga e ao império Romano. Contudo, com os escândalos alimentares ocorridos na Europa na última década, a credibilidade da indústria alimentar diminuiu e a população tornou-se mais alerta. Comprovar a autenticidade dos produtos alimentares existentes no mercado, torna-se crucial para garantir o fornecimento de informações corretas aos consumidores e a possibilidade de que os mesmos possam fazer escolhas conscientes no ato de compra.

A identificação das espécies que estão na origem dos alimentos é bastante importante para demonstrar que se trata de produtos autênticos uma vez que pode haver substituição total ou parcial da(s) espécie(s) indicada(s) no rótulo por outra(s) com um valor económico inferior.

Nos últimos anos a popularidade dos produtos derivados de leite de búfala tem vindo a aumentar. Este fator conjugado com o seu elevado valor de comercialização, faz com que se tornem alvo de possíveis fraudes alimentares.

Este trabalho tem como objetivo verificar a autenticidade de diversos queijos de leite de búfala presentes no mercado nacional, tendo sido realizadas 4 fases experimentais: preparação das amostras, extração, quantificação e amplificação do ADN por PCR em tempo real. Para fazer este último passo experimental e verificar a presença de leite de búfala nas amostras, foi utilizado um *kit* comercial de deteção de ADN de búfalo que continha as sondas fluorescentes e também a *mastermix* com todos os reagentes necessários para que pudesse ocorrer a reação.

Foram analisadas 23 amostras que foram recolhidas em supermercados de grandes superfícies, numa queijaria regional e em restaurantes. Destas amostras, 13 eram produzidas a partir de leite de búfala e estas foram analisadas quanto à presença de leite de vaca e de búfala. Nas amostras muito processadas e condensadas (*ravioli* e queijo de leite de búfala em *pizza*) obteve-se ADN em pouca quantidade e baixa qualidade, pelo que os resultados para estas matrizes foram inconclusivos. Os resultados obtidos nas restantes amostras evidenciaram que estas não tinham sido adulteradas com a adição de leite de vaca.

**Palavras-chave:** fraude; rotulagem; autenticidade; búfala; PCR em tempo real.

## **Abstract**

Food fraud is not a new concept, with records of this activity referring to ancient Greece and the Roman Empire. However, with food scandals occurring in Europe over the last decade, the credibility of the food industry has declined and the population has become more aware. Verifying the authenticity of food products on the market becomes crucial to ensure the provision of correct information to consumers and the possibility that they can make conscious choices in the act of purchasing.

The identification of the species which originate food are very important to demonstrate that it is authentic products, as there may be total or partial substitution of the species indicated on the label by another with a lower economic value.

In recent years, the popularity of products derived from buffalo milk has been increasing. This factor, coupled with its high commercialization value, makes it likely to become the target of potential food fraud.

This work aims to verify the authenticity of several buffalo milk cheeses present in the national market, having been carried out 4 experimental phases: Cutting tissue samples, DNA extraction, quantification and amplification by real-time PCR. To make this last experimental step and verify the presence of buffalo milk in the samples, was used a commercial *kit* of buffalo DNA detection, that contained the fluorescent probes and the *mastermix* with all the necessary reagents so that the reaction can occur.

There were analyzed 23 samples gathered in supermarkets of large surfaces, in a regional cheese shop and in restaurants. Of these samples, thirteen were produced from buffalo milk and were analyzed for the presence of cow's milk and buffalo. In the very processed and condensed samples (*ravioli* and buffalo milk cheese in *pizza*) we obtained DNA in low quantity and poor quality, so the results for these matrices were inconclusive. The results obtained in the remaining samples showed that they had not been tamed with the addition of cow's milk.

**Keywords:** fraud; labeling; authenticity; buffalo; real time PCR.

# Índice

Agradecimentos .....	ii
Resumo .....	iii
Abstract.....	iv
Índice de figuras .....	viii
Índice de tabelas .....	x
Lista de abreviaturas .....	xii
1- Componente Teórica .....	1
1.1- Segurança alimentar .....	2
1.2- Perigos na cadeia alimentar .....	3
1.2.1- Perigos biológicos.....	3
1.2.2- Perigos químicos.....	4
1.2.3- Perigos físicos .....	4
1.2.4- Perigos nutricionais.....	4
1.4- Enquadramento da fraude alimentar.....	6
1.4.1- “Food safety” .....	7
1.4.2- “Food security” .....	8
1.4.3- “Food defense” .....	8
1.5- “Food fraud” .....	9
1.5.1- Tipos de fraudes alimentares.....	10
1.5.2- Os géneros alimentícios com maior risco de fraude na Europa .....	12
1.5.2.1- Azeite .....	13
1.5.2.2- Peixe.....	13
1.5.2.3- Géneros alimentícios biológicos .....	14
1.5.2.4- Leite .....	14
1.5.2.5- Cereais.....	14

1.5.2.6- Mel e xarope de ácer .....	15
1.5.2.7- Chá e café.....	15
1.5.2.8- Especiarias .....	16
1.5.2.9- Vinho .....	16
1.5.2.10- Sumos de fruta .....	16
1.6- Rotulagem.....	16
1.7- Rastreabilidade e acreditação .....	18
1.8- Búfalo asiático ( <i>Bubalus bubalis</i> ) .....	20
1.8.1- Produção de leite.....	21
1.8.2- Leite de búfala e os seus derivados.....	22
1.8.3- Autenticidade do leite e derivados de búfala .....	22
1.9- Métodos de identificação de espécies.....	23
1.10- PCR em tempo real.....	23
1.11- Objetivos e âmbito do trabalho.....	28
2- Componente Experimental.....	29
2.1- Implementação do método de deteção da espécie <i>Bubalus bubalis</i> por PCR em tempo real .....	30
2.2- Amostragem .....	30
2.3- Procedimento para a deteção de organismos eucariotas através do método de PCR em tempo real .....	33
2.3.1- Preparação das amostras .....	33
2.3.2- Extração do ADN.....	34
2.3.3- Quantificação do ADN .....	35
2.3.4- PCR em tempo real .....	36
2.3.5- Interpretação dos resultados.....	38
2.4- Resultados e discussão .....	39
2.4.1- Amplificação por PCR em tempo real para a implementação do método de deteção da espécie <i>Bubalus bubalis</i> .....	39
2.4.2- Quantificação do ADN nas amostras utilizadas.....	43

2.4.3- Análise por PCR em tempo real.....	45
2.4.3.1- Amostras de lasanha de vaca e hambúrguer de porco.....	45
2.4.3.2- Amostra do ensaio de competência externa.....	48
2.4.3.3- Amostras de queijos de leite de vaca .....	54
2.4.3.4- Amostras de queijos de leite de búfala.....	57
2.5- Conclusão .....	75
3- Referências Bibliográficas .....	78

## Índice de figuras

Figura 1- Esquema da relação entre os diversos conceitos que se encontram adjacentes à proteção dos alimentos. ....	7
Figura 2- Os vários tipos de fraudes alimentares. ....	11
Figura 3- Os 10 géneros alimentícios com maior risco de sofrerem fraude.....	13
Figura 4- Plano de ensaios de controlo de qualidade no Laboratório de Segurança Alimentar na área de biologia molecular de eucariotas. ....	20
Figura 5- Representação gráfica das 3 etapas da técnica de PCR. ....	24
Figura 6- Representação gráfica da curva de amplificação do PCR em tempo real (adaptado de Wong e Medrano (2005)). ....	27
Figura 7- Etapas para a deteção das várias espécies analisadas por PCR em tempo real. ....	33
Figura 8- As moléculas <i>reporter</i> e as moléculas <i>quencher</i> do kit da <i>Generon</i> <sup>®</sup> para a amplificação de ADN da espécie <i>Bubalus bubalis</i> e do controlo interno. ....	37
Figura 9- Representação gráfica da fluorescência em função do número de ciclos, obtida por PCR em tempo real para calcular o limite de deteção.....	39
Figura 10- Representação gráfica da fluorescência em função do número de ciclos, obtida por PCR em tempo real para validar o limite de deteção anteriormente encontrado. ....	41
Figura 11- Representação gráfica da fluorescência em função do número de ciclos, obtida por PCR em tempo real para analisar o hambúrguer 1 e a lasanha quanto à presença de galinha. ....	45
Figura 12- Representação gráfica da fluorescência em função do número de ciclos, obtida por PCR em tempo real para analisar o hambúrguer 1 e a lasanha quanto à presença de cavalo... ..	47
Figura 13- Representação gráfica da fluorescência em função do número de ciclos, obtida por PCR em tempo real, para analisar a amostra de ensaio de competência externa quanto à presença de ovelha.....	49
Figura 14- Representação gráfica da fluorescência em função do número de ciclos, obtida por PCR em tempo real, para analisar a amostra de ensaio de competência externa quanto à presença de cabra.....	51
Figura 15- Representação gráfica da fluorescência em função do número de ciclos, obtida por PCR em tempo real, para analisar a amostra de ensaio de competência externa quanto à presença de vaca. ....	52
Figura 16- Representação gráfica da fluorescência em função do número de ciclos, obtida por PCR em tempo real, para analisar os queijos derivados de leite de vaca e os leites quanto à presença de leite de vaca. ....	55
Figura 17- Representação gráfica da fluorescência em função do número de ciclos, obtida por PCR em tempo real, para analisar as amostras de queijos derivados de leite de búfala (com exceção do <i>ravioli</i> e do queijo <i>burrata</i> 4) quanto à presença de leite de vaca. ....	58

Figura 18-Representação gráfica da fluorescência em função do número de ciclos, obtida por PCR em tempo real, para analisar as amostras de <i>ravioli</i> quanto à presença de leite de vaca.	61
Figura 19- Representação gráfica da fluorescência em função do número de ciclos, obtida por PCR em tempo real, para analisar as amostras de queijos derivados de leite de búfala (com exceção do duplicado do queijo <i>mozzarella</i> 5, de queijo de búfala da <i>pizza</i> e <i>ravioli</i> e dos respectivos duplicados destas últimas duas amostras) quanto à presença de leite de búfala. ....	63
Figura 20- Representação gráfica da fluorescência em função do número de ciclos, obtida por PCR em tempo real, para analisar as amostras de queijo derivados de leite de búfala em <i>pizza</i> e <i>ravioli</i> (e dos seus respectivos duplicados) e do duplicado da amostra de queijo <i>mozzarella</i> 5 quanto à presença de leite de búfala. ....	66
Figura 21- Representação gráfica da fluorescência em função do número de ciclos, obtida por PCR em tempo real, para analisar o queijo derivado de leite de búfala em <i>pizza</i> , o <i>ravioli</i> e os respectivos duplicados de ambas as amostras quanto à presença de leite de búfala, após nova extração de ADN. ....	69
Figura 22- Representação gráfica da fluorescência em função do número de ciclos, obtida por PCR em tempo real, para analisar o queijo <i>burrata</i> 4 e o seu duplicado quanto à presença de leite de vaca. ....	71
Figura 23- Representação gráfica da fluorescência em função do número de ciclos, obtida por PCR em tempo real, para analisar o queijo <i>burrata</i> 4 e o seu duplicado quanto à presença de leite de búfala.....	73

## Índice de tabelas

Tabela 1- Os pré-requisitos e os princípios do sistema HAACP.....	6
Tabela 2- Lista das amostras utilizadas e a respetiva espécie declarada no rótulo. ....	31
Tabela 3- Lista das amostras que foram realizadas em duplicado e das amostras que foram realizadas em paralelo. ....	32
Tabela 4- Programa de amplificação do <i>kit</i> da Generon <sup>®</sup> de deteção de <i>Bubalus bubalis</i> por PCR em tempo real.....	37
Tabela 5- Valores do Ct das várias amostras necessárias para calcular o limite de deteção. ....	40
Tabela 6- Valores do Ct das várias amostras necessárias para validar o limite de deteção anteriormente encontrado. ....	41
Tabela 7- Valores obtidos através da quantificação de 1 µL de amostra. ....	43
Tabela 8- Valores do Ct do hambúrguer 1 e da lasanha, necessários para os analisar quanto à presença de galinha.....	46
Tabela 9 - Valores do Ct do hambúrguer 1 e da lasanha, necessários para os analisar quanto à presença de cavalo. ....	48
Tabela 10- Valores do Ct da amostra de ensaio de competência externa, necessários para a analisar quanto à presença de ovelha.....	50
Tabela 11- Valores do Ct da amostra de ensaio de competência externa, necessários para a analisar quanto à presença de cabra.....	51
Tabela 12- Valores do Ct da amostra de ensaio de competência externa, necessários para a analisar quanto à presença de vaca. ....	53
Tabela 13- Valores do Ct das amostras de queijo derivadas de leite de vaca e dos leites, necessários para os analisar quanto à presença de leite de vaca.....	55
Tabela 14- Valores do Ct das amostras de queijos derivados de leite de búfala (com exceção do <i>ravioli</i> ), necessários para analisar quanto à presença de leite de vaca. ....	59
Tabela 15- Valores do Ct das amostras de <i>ravioli</i> , necessários para as analisar quanto à presença de leite de vaca. ....	62
Tabela 16- Valores do Ct das amostras de queijos derivados de leite de búfala (com exceção do duplicado do queijo <i>mozzarella</i> 5, de queijo de búfala da <i>pizza</i> , <i>ravioli</i> e dos respetivos duplicados destas últimas duas amostras), necessários para as analisar quanto à presença de leite de búfala.....	64
Tabela 17-Valores do Ct das amostras de queijo de búfala em <i>pizza</i> e <i>ravioli</i> (e dos seus respetivos duplicados) e do duplicado da amostra de queijo <i>mozzarella</i> 5, necessários para as analisar quanto à presença de leite de búfala.....	67

Tabela 18-Valores obtidos através da quantificação de 1µL de amostra para os <i>raviolis</i> , queijos de búfala em <i>pizza</i> e os respectivos duplicados de ambas as amostras. ....	68
Tabela 19- Valores do Ct das amostras do queijo derivado de leite de búfala em <i>pizza</i> , do ravioli e dos respectivos duplicados de ambas as amostras, necessários para as analisar quanto à presença de leite de búfala, após nova extração de ADN.....	70
Tabela 20- Valores do Ct da amostra de queijo <i>burrata</i> 4 e do seu duplicado, necessários para as analisar quanto à presença de leite de vaca. ....	72
Tabela 21- Valores do Ct da amostra de queijo <i>burrata</i> 4 e do seu duplicado, necessários para as analisar quanto à presença de leite de búfala. ....	74

## **Lista de abreviaturas**

**ADN** - Ácido desoxirribonucleico

**ASAE** - Autoridade de Segurança Alimentar e Económica

**Ct** - “Cycle threshold”

**dNTP's** - Desoxirribonucleótidos trifosfatados

**DOP** - Denominação de Origem Protegida

**EUA** - Estados Unidos da América

**FAO** - “Food and Agriculture Organization of the United Nations” (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação)

**g** - Gravidade

**HACCP** - “Hazard Analysis and Critical Control Point” (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controlo)

**IPAC** - Instituto Português de Acreditação

**ISO** - “International Organization for Standardization” (Organização Internacional de Normalização)

**Mg** - Magnésio

**min** - Minutos

**N/A** - Não amplificou

**NASA** - “National Aeronautics and Space Administration” (Administração Americana da Aeronáutica e Espaço)

**OMS** - Organização Mundial de Saúde

**ONU** - Organização das Nações Unidas

**pb** - Pares de bases

**PCR** - “Polymerase Chain Reaction” (Reação em cadeia da polimerase)

**RFU** - “Relative Fluorescence Units” (Unidades de fluorescência relativa)

**s.d.** - Sem data

**seg** - Segundos

**T.L.**- “To Low” (Demasiado Baixo)

**UE**- União Europeia

# **1- Componente Teórica**

## **1.1- Segurança alimentar**

Cada vez mais “segurança alimentar” é um conceito que não é indiferente à população em geral, tendo vindo a evoluir significativamente ao longo dos tempos. Se outrora os consumidores não demonstravam grandes preocupações com estas questões, a verdade é que isso mudou. Com o tempo os hábitos alimentares da sociedade foram-se modificando. Atualmente ter uma grande variedade de produtos ao longo de todo o ano, faz parte do nosso quotidiano e, para que isso aconteça, os alimentos têm de vir de toda a parte do mundo, aumentando desta forma a probabilidade de possíveis contaminações (Afonso, 2008).

Preocupações com a falta de segurança alimentar existente já remontam ao século XVIII, algo que é evidenciado na obra “An Essay on the Principle of Population”, escrita por Thomas Malthus onde o escritor afirma que a produção de alimentos não acompanhava o crescimento populacional da altura (Brissos, 2016; Burchi e Muro, 2016). Contudo, o aparecimento do conceito moderno de “segurança alimentar” ocorreu no início do século XX com as grandes guerras mundiais. Nesta altura grande parte população europeia não tinha condições para produzir alimentos pois a guerra tinha devastado vários países fazendo com que a fome perdurasse entre as populações. Foi este o impulsionador para o estabelecimento das denominadas políticas alimentares, que tinham como objetivo assegurar que todas as pessoas tinham acesso a refeições diárias, mesmo em situações difíceis como por exemplo a existência de uma guerra. Só na década de 40 do século passado, primeiro com a criação da ONU e da FAO em 1945 e depois com a criação da OMS em 1948, é que “segurança alimentar” se torna um conceito mais internacional e a luta contra a fome e a escassez de alimentos, ganha maiores proporções. Mais tarde, em 1974, com a Conferência Mundial da Alimentação, realizada com o intuito de examinar a situação de redução global de alimentos que se vivia na altura, é que se constatou que segurança alimentar era algo relevante para todos os países, tendo as políticas nutricionais ganhado expressão (Graça e Gregório, 2012; Brissos, 2016).

Em qualquer área da cadeia alimentar é necessário que exista segurança alimentar e, ao analisar mais particularmente a cadeia alimentar, é necessário esmiuçar dois termos que lhe são adjacentes: perigo e risco. Contudo estes conceitos têm significados diferentes daqueles usados diariamente, sendo importante saber distingui-los para ter uma visão mais abrangente do conceito de segurança alimentar e assim desenvolver sistemas cujo principal objetivo seja proteger a população de possíveis danos de origem alimentar. O termo perigo é associado a uma propriedade inerente a uma substância para causar um efeito adverso. Já o risco é a probabilidade de ocorrência de um perigo e é baseado na exposição ao perigo (European Food

Information Council, 2017). Por exemplo se cozinarmos massa e posteriormente não a guardarmos no frio, estamos perante um perigo, pois pode ocorrer crescimento microbiano. O risco será maior caso a temperatura exterior seja elevada (nomeadamente no Verão).

## **1.2- Perigos na cadeia alimentar**

O incumprimento de boas práticas e procedimentos que têm como objetivo manter a segurança alimentar nas diversas fases da cadeia de produção dos géneros alimentícios, é um dos fatores que pode contribuir para a ocorrência de danos na saúde dos consumidores. Cada etapa da cadeia alimentar tem diversos perigos que lhes são associados. Assim, para garantir uma qualidade higieno-sanitária, a identificação e controlo dos mesmos torna-se essencial. As origens dos diversos perigos na cadeia de produção dos géneros alimentícios são variadas, entre as quais se podem destacar:

- Contaminação pelos manipuladores, por exemplo devido à utilização de fardas de trabalho mal higienizadas, má lavagem das mãos após o contacto com alimentos crus ou até mesmo espirros;
- Contaminação através de uma má higienização dos utensílios e das superfícies de trabalho;
- Pragas.

Os perigos podem causar efeitos graves na saúde dos consumidores e, conforme a sua natureza, eles podem ser divididos em biológicos, químicos e físicos (sendo os primeiros os mais frequentes). Nos últimos anos apareceu um outro grupo denominado de perigos nutricionais (Baptista e Linhares, 2005).

### **1.2.1- Perigos biológicos**

Os perigos biológicos são os que representam um maior risco para a população. Estes referem-se a microorganismos como bactérias, vírus, parasitas (vermes e protozoários) e príões que se encontram em praticamente todos os alimentos. Apesar de existirem mais de 200 destes agentes capazes de provocar doenças de natureza alimentar, tal só acontece quando os alimentos não são devidamente distribuídos, armazenados e/ ou confeccionados. Entre os vários organismos com potencial para causar intoxicações alimentares à população, pode-se tomar como exemplo as bactérias do género *Salmonella*, capazes de provocar salmoneloses

aos consumidores. Estes organismos podem estar presentes em vários alimentos, nomeadamente nos ovos, leite cru e carne de aves (ASAE, [s.d.]<sup>a</sup>).

### **1.2.2- Perigos químicos**

Substâncias químicas tóxicas podem estar presentes nos alimentos que a população consome diariamente. Estes perigos químicos são de difícil deteção e podem surgir como consequência de más práticas dos manipuladores ou então ser provenientes das matérias-primas e ingredientes utilizados na cadeia alimentar, do acondicionamento, da distribuição e/ou da conservação dos géneros alimentícios (ASAE, [s.d.]<sup>a</sup>). Estas podem ter uma origem natural, como as toxinas produzidas por diversos organismos (nomeadamente as micotoxinas que são metabolitos tóxicos produzidos por fungos), ou podem ser por exemplo pesticidas, fungicidas, inseticidas, medicamentos veterinários (etc.) que são introduzidas durante o processo de produção e ou transformação dos géneros alimentícios. Quando estas substâncias são ingeridas em grandes quantidades, trazem riscos para a saúde do consumidor. São variados os efeitos que estas substâncias podem ter, não só nos consumidores mas também no meio ambiente (Baptista e Linhares, 2005).

### **1.2.3- Perigos físicos**

Os perigos físicos são causados por qualquer partícula estranha que normalmente não está presente no género alimentício em questão. Estes podem causar danos na saúde dos consumidores, como por exemplo lesões em órgãos do sistema digestivo (Baptista e Linhares, 2005). São variadíssimos os materiais que podem constituir um perigo físico, assim como a sua origem. Entre eles estão plásticos, ossos, vidros, pedras, matérias de uso pessoal, etc. que podem ser introduzidos na cadeia de produção dos alimentos de diversas formas. Pode-se tomar como exemplo da sua origem os manipuladores, os equipamentos, os utensílios e as embalagens dos produtos alimentares (Baptista e Venâncio, 2003).

### **1.2.4- Perigos nutricionais**

Uma má alimentação é um precursor de diversos problemas para a saúde da população. Sal, açúcar e gordura em excesso podem causar problemas como diabetes, doenças cardiovasculares, hipertensão, obesidade, etc. (ASAE, [s.d.]<sup>a</sup>). É crucial que o rótulo dos alimentos esteja correto, de maneira a que todos os consumidores possam fazer escolhas

conscientes e informadas no momento da compra. Um grupo mais restrito da população sofre de alergias alimentares causadas por reações adversas a substâncias que se encontram presentes em alguns alimentos. A contaminação acidental neste grupo populacional pode provocar danos sérios na sua saúde. Como tal, torna-se importante ter alguns cuidados ao longo da cadeia de produção dos géneros alimentícios, como por exemplo a separação das salas onde ocorre a manipulação das matérias-primas. O fornecimento de informação fidedigna e completa também é fulcral para evitar possíveis danos nos consumidores que padecem de alergias alimentares, não só no rótulo dos alimentos, mas também nos estabelecimentos de restauração (Baptista e Linhares, 2005).

### **1.3- Sistema HACCP**

O sistema HACCP é um método internacionalmente reconhecido que identifica, analisa e controla os perigos na cadeia alimentar. Este sistema visa garantir a segurança alimentar no processo de produção. Assim sendo, a identificação dos pontos onde é possível ocorrer o controlo dos perigos por parte do operador, é crucial para produzir alimentos seguros (Wallace *et al.*, 2014). Foi aplicado pela primeira vez no final da década de 50, na missão Apolo, através de uma parceria entre a empresa Pillsbury, a NASA, os laboratórios do exército e também a força aérea dos Estados Unidos da América. A aplicação deste sistema tinha como objetivo garantir um fornecimento de alimentos seguros aos astronautas durante a sua estadia no espaço. Contudo, só a partir da década de 90 do século passado, é que se fixou como a principal ferramenta utilizada para a obtenção de géneros alimentícios seguros, começando a fazer parte dos regulamentos europeus. (Afonso, 2006; Gilling *et al.*, 2001; Mil-Homens, 2007). A partir do dia 1 de Janeiro de 2006, este sistema passou a ser de obrigatória aplicação em todos os estados membros da União Europeia através do Regulamento (CE) nº 853/2004 (Afonso, 2006).

O objetivo do sistema HACCP é prevenir acidentes alimentares através da eliminação dos perigos ou então da redução dos mesmos, fornecendo alimentos seguros à população. Este sistema é constituído por 7 princípios e 8 pré-requisitos (Tabela 1). Estes últimos estão mais relacionados com o meio envolvente da cadeia de produção dos produtos alimentares, enquanto que os princípios estão associados diretamente com os perigos da cadeia de produção (Mil-Homens, 2007).

**Tabela 1-** Os pré-requisitos e os princípios do sistema HAACP.

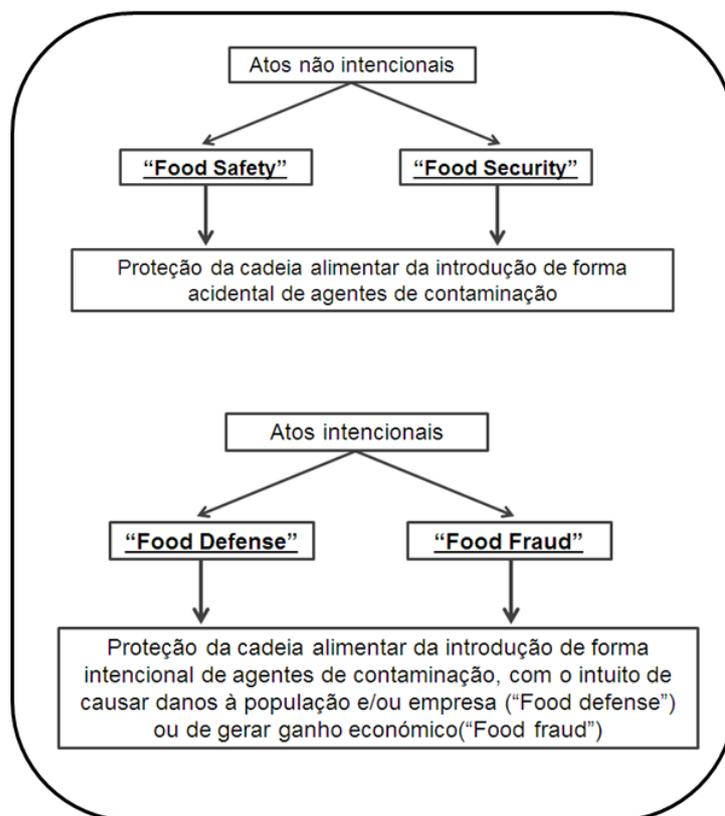
<b>Pré-requisitos</b>	<b>Princípios</b>
Controlos de infestações de origem animal	Identificação dos perigos
Fornecimento de água	Identificação dos pontos críticos de controlo
Infra-estruturas e equipamentos	Estabelecimento dos limites críticos para cada medida referente a cada ponto crítico de controlo
Planos de limpeza	Processos de vigilância de cada ponto crítico de controlo
Recolha de resíduos alimentares	Estabelecimento de ações corretivas
Materiais que entram em contacto com os géneros alimentícios	Verificação das medidas
Higiene dos manipuladores	Criação de um sistema de registo
Formação	

**Fonte:** Mil-Homens (2007).

#### **1.4- Enquadramento da fraude alimentar**

Fraude alimentar (“food fraud”) é um conceito que não é desconhecido para a população em geral. Trata-se de um problema emergente que põe os consumidores e as autoridades responsáveis pelo controlo oficial dos géneros alimentícios em alerta constante, uma vez que pode ser uma ameaça à saúde pública. Um fator que veio agravar os potenciais riscos que podem advir desta atividade é a globalização da cadeia de fornecimento de alimentos, algo que se tem acentuado muito nas últimas décadas.

O conceito de “food fraud” é incluído no tema de proteção dos géneros alimentícios, juntamente com outros conceitos como “food security”, “food defense” e “food safety”, sendo fulcral percebê-los (Figura 1) (Spink e Moyer, 2011).



**Figura 1-** Esquema da relação entre os diversos conceitos que se encontram adjacentes à proteção dos alimentos.

**Fonte:** Spink e Moyer (2011).

### **1.4.1- “Food safety”**

O conceito de “food safety” está relacionado com a oferta de alimentos inócuos. Refere-se à capacidade do sistema alimentar proteger os géneros alimentícios da exposição a perigos que não são intencionais, como diversos tipos de contaminantes que possam existir ao longo da cadeia alimentar (Tola, 2018). Uma forma de obter alimentos seguros é através da aplicação de medidas preventivas como a implementação do sistema HACCP, ter boas práticas de fabrico e também de higienização, tentando minimizar ao máximo potenciais fontes de perigo para os produtos alimentares (Spink e Moyer, 2011). Contudo, para além de “food safety”, também é importante “food quality” para que um produto alimentar não seja rejeitado pelo consumidor. Este conceito de “food quality” pode-se definir como um conjunto de características que o género alimentício deve possuir, sejam externas (como a forma e a consistência) ou internas (sabor e textura) de maneira a agradar ao consumidor e não levar à rejeição do produto (Ansari *et al.*, 2013).

A segurança dos alimentos e a sua qualidade tornaram-se uma das grandes preocupações dos consumidores na hora da escolha do produto alimentar. Não importa só a produção de alimentos, mas também se são saudáveis, nutritivos e livres de agentes patogénicos e contaminantes.

#### **1.4.2- “Food security”**

A primeira vez que o conceito “food security” foi abordado, remete ao ano de 1943 na Conferência de Alimentação e Agricultura de Hot Springs. Contudo, como já foi referido anteriormente, só a partir do ano de 1974, com Conferência Mundial de Alimentação realizada em Roma, é que todo o tema de segurança alimentar começou a ganhar maiores proporções e desde então muitas definições de “food security” surgiram. A definição mais aceite é a que foi apresentada em 1996 na Conferência Mundial de Alimentação, organizada pela FAO. Segundo eles, “Food security” existe quando todas as pessoas, em todos os momentos, têm acesso físico, social e económico a alimentos suficientes, seguros e nutritivos, que atendem às suas necessidades e preferências alimentares para uma vida ativa e saudável” (Pinstrup-Andersen, 2009).

Este conceito é mais amplo do que o conceito de “food safety”, uma vez que não engloba só a inocuidade dos alimentos, mas também as necessidades nutricionais de cada indivíduo.

#### **1.4.3- “Food defense”**

“Food denfense” é um conceito que aponta para as medidas que têm como objetivo a proteção dos produtos alimentares e da água contra ataques de contaminação intencional (de agentes biológicos, físicos e/ou químicos) que exerçam uma ameaça à saúde pública (Manning e Soon, 2016).

Existem diversas formas e origens de uma contaminação intencional e, apesar de pouco frequentes, quando acontece pode ter repercussões seríssimas na população. Embora haja diversos casos descritos de contaminação intencional de produtos alimentares, o caso que remonta à década de 80 do século passado, mais precisamente em 1984 no Oregon, é um dos casos de bioterrorismo mais mediáticos e estudados. O que aconteceu foi a contaminação intencional de saladas comercializadas em restaurantes com bactérias *Salmonella* spp, com o intuito de provocar danos na saúde dos consumidores e assim aumentar a abstenção numa votação eleitoral. Neste caso em particular houve graves consequências, em que 751 pessoas

ficaram doentes e mais de 40 foram hospitalizadas (Carus, 2001). De forma a evitar mais ataques deste género, existe a formação de planos de defesa que visam proteger os consumidores de atos classificados como intencionais, que constituem perigo para a saúde dos consumidores, que representam um prejuízo económico e que provocam receio nas pessoas (Severino e Almeida, 2007).

Na UE este movimento de aplicação de sistemas de “food defense” encontra-se em crescimento, tendo sido divulgado em 2013 a Decisão nº 1082/2013 do Parlamento Europeu, que se foca no estabelecimento de medidas por parte da UE para combater possíveis riscos alimentares que advêm de um mercado único sem fronteiras, e também na criação de medidas de vigilância para assegurar a proteção da saúde dos consumidores (Decisão nº 1082, 2013).

### **1.5- “Food fraud”**

Tanto o conceito de “food fraud” como o de “food defense” dizem respeito a práticas intencionais, porém no caso de “food fraud” as motivações são económicas, podendo ou não provocar danos na saúde dos consumidores (Manning e Soon, 2016). Diversas repercussões advêm destas ilegalidades, como o facto do negócio do produto em si ficar afetado, assim como a perda da confiança por parte do consumidor (Tola, 2018).

Na EU não existe uma definição de fraude alimentar contudo, o artigo 16<sup>a</sup> do Regulamento (CE) N°178/2002 refere que a embalagem, a rotulagem, a propaganda e também a apresentação dos produtos (tanto para humanos como para animais) não podem induzir o consumidor em erro. Spink e Moyer (2011) definem fraude alimentar como “um termo indireto usado para abranger a substituição deliberada e intencional, adição, alteração ou adulteração de alimentos, ingredientes alimentícios ou embalagens de alimentos; ou declarações falsas ou enganosas feitas sobre um produto para ganho económico”.

De notar que a fraude alimentar não se trata de algo novo. São conhecidos vários casos na antiguidade de adulterações nos alimentos. Há documentos históricos que levam a acreditar que no tempo da Grécia antiga e também do império Romano, já ocorria fraude alimentar em vários produtos, como por exemplo o vinho. Na idade média, com os descobrimentos, iniciou-se a importação de especiarias para a Europa, havendo uma intensificação deste tipo de atividade fraudulenta. Como se tratava de um produto caro, por vezes os comerciantes juntavam substitutos mais baratos de maneira a aumentar a quantidade. Os substitutos que se adicionavam às especiarias eram variadíssimos, entre os quais é possível destacar nozes, sementes e até mesmo poeiras. Outro fator que contribuiu para o aumento de adulterações nos

gêneros alimentícios, foi a separação entre as pessoas que produzem os alimentos e as que os consomem, o que não era tão comum antigamente, em que grande parte da população produzia os seus próprios alimentos com recurso à agricultura. Tal foi acentuado a partir do século XVIII nos EUA, em que uma economia industrial começou-se a sobrepor a uma economia agrícola. Desta altura conhecem-se muitos casos de adulterações no leite como a sua diluição ou então a adição de produtos como gesso para o branquear e disfarçar possíveis falhas. O chá era outro produto alvo de fraude, em que adicionavam folhas de outras plantas ou até mesmo areia. É de notar que naquela época já existiam leis que proibiam estes atos fraudulentos, contudo devido à ausência de testes fiáveis, não se conseguia controlar estas práticas (Schumm, 2014).

As fraudes alimentares para além de serem enganadoras para os consumidores a nível económico, também vão comprometer o alimento a nível sensorial e nutritivo. Nelas pode-se distinguir três tipos de riscos. Os riscos diretos, os indiretos e os técnicos. Nos riscos diretos há um risco imediato e iminente para o consumidor. O risco indireto refere-se a situações em que ocorre o consumo de baixas doses de um contaminante durante um longo período de tempo e nesse caso há uma contaminação crónica (efeito acumulativo) em que os sintomas podem demorar meses ou anos a se manifestarem. Por fim o risco técnico não está relacionado com o género alimentício em si, mas com a sua documentação, em que há informações deturpadas ou ocultas, por exemplo dados incorretos no rótulo, na composição do alimento, na sua origem, etc. (Spink e Moyer, 2011).

### **1.5.1- Tipos de fraudes alimentares**

De acordo com Spink e Moyer (2011) as fraudes alimentares podem ser cometidas de diversas maneiras, podendo ser divididas em 7 tipos (Figura 2).



**Figura 2-** Os vários tipos de fraudes alimentares.

As fraudes por **adulteração**, como o próprio nome indica, referem-se a fraudes em que há adulteração do produto final. Este tipo de fraude pode ser dividido em 3 categorias (Moore, Spink e Lipp, 2012):

- Substituição – Ocorre a troca da matéria-prima ou ingrediente(s) do alimento por outro, normalmente de valor económico inferior. Pode-se dar como exemplo a substituição de uma carne de determinada espécie por outra que seja mais barata, etc.;
- Adição – Quando se adiciona determinado ingrediente, sem ser declarado no rótulo, cuja intenção é mascarar a falta de qualidade do género alimentício. Por exemplo a adição de corantes aos sumos para mascarar produtos de baixa qualidade, nomeadamente a falta de frutas;
- Remoção – Quando algum componente é removido do género alimentício, sem ser mencionado no rótulo, comprometendo a qualidade do mesmo. Um exemplo deste tipo de prática acontece nas especiarias, nomeadamente na paprica, em que há a remoção de alguns dos seus constituintes com a finalidade de produzir extratos da especiaria. Este tipo de prática vai retirar os traços característicos da paprica. Outro exemplo é a remoção da gordura do leite (para a produção de manteiga), sem informar o consumidor.

Fraudes por **falsificação** é um termo aplicado a situações que ocorrem no ato de venda do produto, sendo uma tentativa do vendedor enganar o consumidor. Refere-se a produtos com características parecidas com um de qualidade superior, que são denominados como o produto genuíno e portanto vendidas mais caras. Neste tipo de fraudes pode ocorrer por exemplo o reaproveitamento de embalagens ou rótulos.

Fraudes por **Roubo** são práticas em que produtos autênticos são roubados e depois vendidos como sendo originais do produtor.

Nas fraudes denominadas “**Over- Run**” a composição do produto não é alterada, sendo um produto autêntico, contudo existe uma produção excessiva, contrariamente ao que está estipulado.

As fraudes por **desvio** dizem respeito a géneros alimentícios autênticos que são vendidos fora do âmbito/mercado pretendido, por exemplo produtos destinados a pessoas desfavorecidas que não chegam ao destino e são vendidas no mercado normal.

Nas fraudes por **simulação** os produtores, com o intuito de maximizar o seu lucro, produzem géneros alimentícios muito semelhantes a outros muito populares. Um dos perigos associados a este tipo de prática é a falta de garantia de segurança alimentar destas quase imitações.

Nas fraudes por **manipulação** o produtor/vendedor utiliza um produto autêntico para a prática de atividades fraudulentas, por exemplo aumentando a data limite de consumo com o intuito de maximizar o seu lucro (Spink e Moyer, 2011).

### **1.5.2- Os géneros alimentícios com maior risco de fraude na Europa**

De acordo com um relatório do Parlamento Europeu de 2013, é difícil saber em que ponto a UE se encontra em relação à fraude alimentar, todavia o relatório indica um possível aumento. Diversos géneros alimentícios podem ser alvos de fraudes, contudo o Parlamento Europeu (2013) enumera os 10 que mais estão expostos a essas práticas (Figura 3).



**Figura 3-** Os 10 gêneros alimentícios com maior risco de sofrerem fraude.

### **1.5.2.1- Azeite**

No azeite podem ser cometidas diversas fraudes, nomeadamente a sua mistura com outro azeite de menor qualidade e portanto mais barato, como por exemplo mistura de azeite extra virgem com azeite refinado. Pode também haver misturas de azeite com óleos alimentares (Dourtoglou *et al.*, 2003). Este tipo de prática é especialmente perigosa por exemplo quando ocorre a junção de óleo de nozes e há o consumo por pessoas que tenham alergia a este alimento, podendo assim levar a danos gravíssimos nestes consumidores, inclusive a morte. Também há relatos de casos em que ocorre a junção de óleos não alimentar, porém é mais raro (Everstine, Spink e Kennedy, 2013).

### **1.5.2.2- Peixe**

No caso do peixe, o tipo de fraude mais frequente é ocorrer a substituição de uma espécie por outra que exista em maiores quantidades e portanto seja mais barata (Tola, 2018). Um exemplo é o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*). Esta espécie é bastante consumida na Europa, mais particularmente em Portugal, contudo, devido a um elevado consumo ao longo dos anos, o seu *stock* já não é tão elevado, o que faz com o que o seu valor de mercado

amente. Como tal, pode-se encontrar fraudes em que o bacalhau é substituído por outros peixes com morfologia e sabor semelhantes, contudo mais baratos, como é o caso do peixe-gato riscado (*Pangasius* spp.) (Saull *et al.*, 2015). Nas refeições cozinhadas que se encontram à venda nas grandes superfícies, como por exemplo preparados de bacalhau com natas ou bacalhau à brás, é onde é mais difícil detetar possíveis fraudes.

### **1.5.2.3- Géneros alimentícios biológicos**

A procura por produtos biológicos tem aumentado. Uma agricultura biológica pretende promover a saúde do consumidor, diminuir a poluição e diminuir o impacto ambiental. Como tal, neste tipo de agricultura deverão estar ausentes contaminantes como pesticidas, adubos químicos, organismos geneticamente modificados, etc. (Agrobio, [s.d.]). Assim o preço no mercado será maior do que aqueles que advêm de uma agricultura cujo objetivo é produzir em maior escala. Existem vendedores que se aproveitam deste detalhe e rotulam produtos de agricultura convencional como sendo biológicos, levando o consumidor a pagar um preço superior (Tola, 2018).

### **1.5.2.4- Leite**

Como já foi referido anteriormente, as práticas fraudulentas no leite não são nenhuma novidade na história da humanidade. A junção de água ao leite para aumentar o volume e portanto trazer enriquecimento ao vendedor, é algo que acontece há milhares de anos (Spink e Moyer, 2011).

Leites de cabra, de ovelha e de búfala, uma vez que são mais caros, costumam ser alvos de adulteração com a junção de leites de outras espécies (geralmente de vaca uma vez que é de mais fácil obtenção pois é mais abundante) ou com leite em pó. Em alguns países adultera-se o leite com a junção dos mais variados produtos como açafião, cana-de-açúcar, farinha de arroz, etc. Os leites adulterados podem ser utilizados para o fabrico de iogurtes, queijos, manteiga, fórmulas para lactantes, etc. (Tola, 2018).

### **1.5.2.5- Cereais**

Assim como nos outros produtos alimentares, as fraudes nos cereais estão orientadas para que o produtor/vendedor maximize o seu lucro. Como exemplo pode-se mencionar um

caso que aconteceu na década de 90 do século passado no Minnesota. Trata-se de uma empresa que adicionava ureia aos cereais antes de eles serem vendidos para a transformação em farinha, uma vez que assim os grãos eram vendidos mais caros pois tinham uma maior quantidade de proteína (Everstine, Spink e Kennedy, 2013).

Outro exemplo é o arroz *basmati*. Este arroz é vendido ao consumidor por um preço mais elevado do que os outros tipos de arroz, devido a um conjunto de características do grão que o tornam distinto. Já foi encontrado neste tipo de arroz rastros de atividades fraudulentas, em que ocorreu a junção de grãos de arroz mais barato ao arroz *basmati* (Shears, 2008).

Os cereais também podem ser vendidos como sendo orgânicos quando na verdade não o são, sendo este um outro tipo de fraude cometida neste tipo de produto alimentar (Everstine, Spink e Kennedy, 2013).

#### **1.5.2.6- Mel e xarope de ácer**

Existem diversos tipos de fraudes no mel, sendo que na maioria consistem em aumentar a quantidade de produto. Para isso pode haver a junção de substâncias que não vêm mencionadas no rótulo como xaropes de açúcar, xaropes de milho, frutose, etc. Contudo também é comum a venda de mel com uma origem geográfica diferente da que é reivindicada. (Everstine, Spink e Kennedy, 2013). Relativamente ao xarope de ácer, por vezes o produtor adiciona outras substâncias não declaradas como o xarope de milho (Tola, 2018).

#### **1.5.2.7- Chá e café**

No chá o tipo de fraude mais frequente é a adulteração com folhas de outras plantas mais comuns e portanto de mais fácil obtenção, contudo também se pode encontrar corantes, areias e também folhas de chá já usadas. Relativamente ao café, podem ser encontrados adulterantes tanto no moído, como no instantâneo. O café moído pode conter substâncias como folhas, milho e cevada torrada que foram introduzidos aquando o processo de moagem dos grãos. No café instantâneo também são encontrados cereais, mas também substâncias como caramelo e chicória, sendo considerado uma fraude caso não se encontrem mencionados no rótulo. A qualidade do café vai ficar alterada e, conseqüentemente, as características sensoriais vão ser diminutas (Tola, 2018).

### **1.5.2.8- Especiarias**

Existem várias qualidades de especiarias, mas como é de esperar, as que apresentam um maior valor no mercado, são as que mais são adulteradas. Devido à baixa capacidade dos consumidores em detetar fraudes nas especiarias, elas tornaram-se um produto atrativo para possíveis infrações (Silvis *et al.*, 2017). Por exemplo, uma das especiarias mais caras do mundo é o açafrão e, já houve casos em que para se aumentar o seu volume, foram adicionadas substâncias como a glicerina e o sulfato de bário (Tola, 2018).

### **1.5.2.9- Vinho**

Nos vinhos a maioria das fraudes estão associadas com uma rotulagem incorreta, nomeadamente em relação à sua origem geográfica, onde vinhos são rotulados como tendo uma origem (tornando-os com um valor de mercado superior), quando na verdade provêm de locais completamente diferentes. Contudo, nos vinhos, também pode ocorrer outros tipos de fraudes, nomeadamente a adição de adulterantes (como por exemplo dietilenoglicol, um químico que é adicionado com o intuito de mascarar a adição de açúcar ao vinho) ou a mistura de vários vinhos com diferentes qualidades. (Everstine, Spink e Kennedy, 2013).

### **1.5.2.10- Sumos de fruta**

Nos sumos de fruta os consumidores podem ser enganados de diversas formas. Uma das fraudes que pode acontecer é a adição de água com o intuito de aumentar o volume do produto. Outra prática é a junção de frutas mais baratas em sumos onde no rótulo só estão referidas a presença de outras frutas (mais caras), como o caso das frutas tropicais. Nalguns sumos de frutas o que acontece é que o produto é rotulado como tendo frutas quando na verdade só tem corantes, água e aromatizantes que são de natureza açucarada para conceder o sabor ao sumo (Tola, 2018).

## **1.6- Rotulagem**

O comércio internacional tem sofrido o impacto das adulterações dos alimentos, levando a um aumento do controlo dos mesmos. Uma rotulagem correta é muito importante para que o consumidor possa fazer uma escolha consciente. Existem vários fatores que

interferem na escolha dos produtos no ato da compra, como o estilo de vida, práticas religiosas e também problemas de saúde, sendo de especial atenção os consumidores que padecem de algum tipo de alergia alimentar (Meira *et al.*, 2015). Uma maneira de assegurar que há o cumprimento das regras de rotulagem é recorrendo a laboratórios que avaliem a autenticidade dos alimentos.

E o que é a rotulagem? Segundo o Regulamento (CE) nº 1169/2011, rotulagem é definida como “todas as indicações, menções, marcas de fabrico ou comerciais, imagens ou símbolos referentes a um género alimentício que figurem em qualquer embalagem, documento, aviso, rótulo, anel ou gargantilha que acompanhem ou se refiram a esse género alimentício.” Este regulamento é extensível a todos os estados membros da UE e veio trazer mudanças na área da rotulagem, de forma a assegurar a defesa dos consumidores relativamente a este campo e harmonizar todas as regras que existem sobre as informações que devem constar no rótulo dos géneros alimentícios. Tem diversas especificações como por exemplo forçar a que a informação sobre os produtos alimentares tenha de estar presente, tendo que ter o nome do alergénio realçado (com uma grafia diferente), de forma a distinguir dos demais constituintes. No final de 2014, este regulamento sofreu alterações e a informação nutricional passou a ser obrigatória nos produtos pré-embalados. Passados dois anos, em Dezembro de 2016, passou a ser obrigatória para os produtos que até à data de saída do regulamento não indicavam informação nutricional (ASAE, [s. d.]<sup>b</sup>). Segundo o artigo nº 9 do Regulamento (UE) nº 1169/2011 a informação obrigatória que os géneros alimentícios devem conter é a seguinte:

- Denominação dada ao produto alimentar;
- Quantidade líquida do produto alimentar (sendo que existem determinados ingredientes cuja quantidade tem de ser especificada);
- Data-limite de consumo do produto alimentar;
- Lista com todos os ingredientes que o constituam;
- Indicação de todos os componentes presentes que provoquem intolerâncias ou então alergias alimentares;
- Condições especiais de conservação do produto alimentar (em certos casos é necessário também virem referidas as condições de utilização);
- Nome da empresa (e o respetivo endereço) responsável pela informação fornecida;
- Local de origem (se for aplicável);
- Para bebidas com teor alcoólico superior 1,2%, tem de se indicar o título alcoométrico;
- Declaração nutricional.

Todas estas informações devem ser claras e de fácil compreensão para o consumidor. Em Portugal tem de vir tudo escrito em português para que todos os consumidores possam conhecer os produtos que se encontram à venda no contexto nacional (ASAE, [s. d.]<sup>b</sup>).

## **1.7- Rastreabilidade e acreditação**

É importante conseguir fazer a rastreabilidade dos géneros alimentícios desde o ponto de venda até à sua origem, caso contrário todo o setor do mercado alimentar pode ficar comprometido. É assim essencial estabelecer um sistema de rastreabilidade nas empresas deste setor, de maneira a saber detalhadamente todos os passos dos produtos, daí a famosa expressão “do prado ao prato”.

De acordo com o Regulamento nº 178/2002, a rastreabilidade é “a capacidade de detetar a origem e de seguir o rasto de um género alimentício, de um alimento para animais, de um animal produtor de géneros alimentícios ou de uma substância, destinados a ser incorporados em géneros alimentícios ou em alimentos para animais, ou com probabilidades de o ser, ao longo de todas as fases da produção, transformação e distribuição”. Todo este elevado nível de informação em todas as etapas é uma imposição por parte dos consumidores, que se têm vindo a tornar mais exigentes com os produtos que compram e consomem. Assim, gera-se confiança por parte dos clientes, há acesso a informação precisa e, mais importante é que há uma maior proteção da saúde do consumidor.

Para assegurar que os consumidores estão a receber informações corretas e que não são alvo de práticas fraudulentas, é necessário verificar os produtos. Os laboratórios são entidades que permitem apurar a verdade, como tal, necessitam não só de trabalhar bem mas também de demonstrar que trabalham bem. Uma forma de isso acontecer, é pertencendo à rede de laboratórios acreditados, sendo a acreditação a evidência da competência técnica dos laboratórios. Ao longo dos últimos anos, o número de empresas com certificado de qualidade tem vindo a aumentar, o que traz diversas vantagens nomeadamente a parceria entre diversos laboratórios e institutos, técnicos, instalações e também equipamentos com procedimentos normalizados e, mais importante, apresentam resultados que se consideram equivalentes a qualquer outro laboratório que também seja acreditado (Barradas e Sampaio, 2011).

Em Portugal o estatuto de acreditação é emitido e mantido pelo IPAC, que gere o sistema nacional de acreditação. Este sistema é constituído por regras e procedimentos usadas pelas entidades acreditadas, de maneira a que sejam reconhecidas como competentes para a avaliação de conformidades especificadas (Instituto Português de Acreditação, [s.d.]).

As entidades acreditadas na UE podem possuir certificação segundo a norma ISO 9001 e a norma ISO 17025 (Barradas e Sampaio, 2011). A primeira é para as empresas e fabricantes e a segunda aplica-se à área laboratorial evidenciando quais os requisitos gerais de competência que estes têm de respeitar. Os laboratórios da ASAE encontram-se acreditados pela norma ISO 17025. Esta norma refere os requisitos que os laboratórios acreditados devem seguir, de maneira a assegurar e evidenciar que os resultados obtidos são confiáveis e fidedignos (resultado de um rigoroso controlo de qualidade) e, garantir assim, a satisfação de todos os clientes (quer sejam internos ou externos) (ASAE, [s. d.]<sup>c</sup>). Todos os procedimentos têm de apresentar uma total rastreabilidade, sendo por isso necessário registar minuciosamente todas as ações neles implicados.

### **1.7.1- Autoridade de segurança alimentar e económica (ASAE)**

A ASAE foi criada em 2005 e tem como missão “fiscalização e prevenção do cumprimento da legislação reguladora do exercício das atividades económicas nos setores alimentar e não alimentar bem como a avaliação e comunicação dos riscos na cadeia alimentar sendo o organismo nacional de ligação com as suas entidades congéneres, a nível europeu e internacional” (ASAE, [s. d.]<sup>d</sup>).

Tendo a ASAE como foco a defesa da saúde pública, é relevante ser uma entidade acreditada. O seu Laboratório de Segurança Alimentar é resultado da junção de 3 laboratórios, o Laboratório Central de Qualidade Alimentar (da ex-Direcção Geral de Fiscalização e Controlo de Qualidade Alimentar), o Laboratório de Química Orgânica, Analítica e de Síntese e o Laboratório Vitivinícola do Instituto da Vinha e do Vinho. Como já foi referido anteriormente, o estatuto de acreditação é responsabilidade do IPAC e serve para assegurar que os resultados apresentados por este laboratório são confiáveis e, consequentemente trazer confiança aos consumidores (ASAE, 2019).

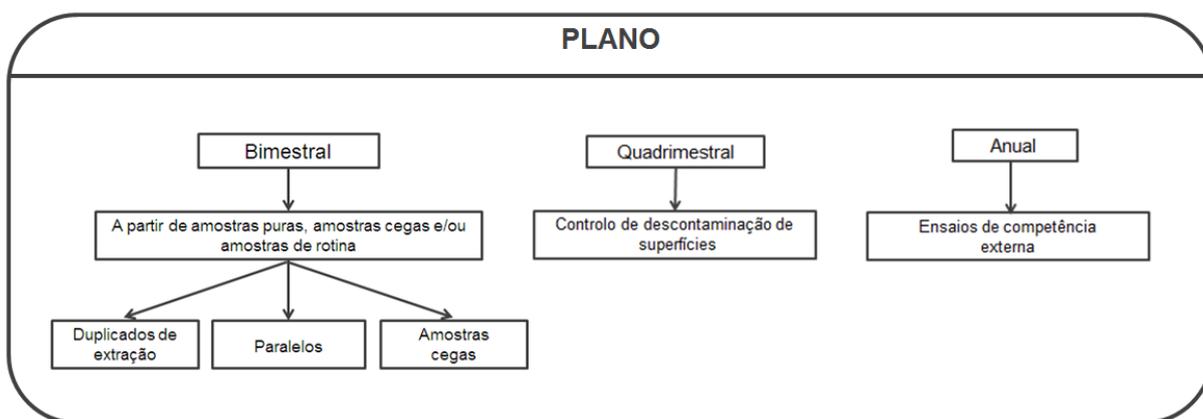
Aos laboratórios acreditados é exigido a execução de análises de controlo de qualidade interna e externa, de acordo com o requisito evidenciado na norma ISO 17025. Estas análises devem ser periódicas e programadas, feitas de acordo com o que está definido no plano de controlo interno e externo. Os ensaios de competência interna, como o próprio nome refere, são feitos internamente no laboratório, de maneira a evidenciar o desempenho em equipa e a consistência dos resultados. Já os ensaios de competência externa dizem respeito a ensaios que se realizam em simultâneo numa rede organizada de laboratórios europeus e cujos resultados devem ser todos consistentes e coerentes de acordo com os resultados esperados,

de maneira a demonstrar a equivalência técnica e desempenho dos vários laboratórios acreditados (ASAE, 2017).

Para garantir a obtenção de resultados “verdadeiros”, a norma ISO 17025 apresenta vários requisitos técnicos:

- Amostragem (colheita de uma porção representativa do lote). O Laboratório de Segurança Alimentar da ASAE, não é responsável pela amostragem;
- Rastreabilidade das várias medições de maneira a garantir que um resultado é verdadeiro e não tendencioso;
- Manuseio dos vários itens a ensaiar (regras de boas práticas laboratoriais que se tem de cumprir para garantir que a amostra mantém as suas características originais);
- Garantia de resultados fiáveis e de confiança, através de controlo de qualidade interno e externo (ASAE, 2017).

A garantia da qualidade dos resultados de ensaio implica vários tipos de controlo dentro do laboratório. Esses controlos são realizados de acordo com o plano de ensaios de controlo da qualidade do laboratório. O laboratório de Segurança alimentar da ASAE, sendo um laboratório acreditado, tem de um plano de controlo de qualidade (Figura 4).



**Figura 4-** Plano de ensaios de controlo de qualidade no Laboratório de Segurança Alimentar na área de biologia molecular de eucariotas.

### **1.8- Búfalo asiático (*Bubalus bubalis*)**

O búfalo é um animal de origem asiática, contudo hoje é possível encontrá-lo em todos os continentes, em parte devido à sua grande adaptabilidade para os mais diversos regimes ambientais incluindo aqueles em que os bovinos não se conseguem adaptar (Pitacas e Rodrigues, 2013).

A espécie *Bubalus bubalis* pertence à família *Bovidade* e está dividida em duas subespécies: búfalo do pântano (*B. bubalis carabensis*) e búfalo asiático (ou búfalo do rio) (*B. bubalis bubalis*). Esta espécie animal tem como mais-valia para o ser humano a sua produção de leite, carne e também a possibilidade de ser utilizado como meio de trabalho (por exemplo na China este animal é utilizado na ajuda da cultura de arroz). Contudo, é possível distinguir características produtivas diferentes nestas subespécies. Enquanto o búfalo de pântano é utilizado mais concretamente para trabalho e para obtenção de carne (uma vez que tem uma produção de leite reduzida), o búfalo asiático é mais utilizado para a produção leiteira (Pitacas e Rodrigues, 2013).

### **1.8.1- Produção de leite**

Devido á exploração leiteira, os búfalos são uma boa opção económica para os proprietários. Com esta matéria-prima produz-se também os produtos derivados de leite, cujo mercado se encontra em plena expansão, possuindo um preço elevado quando comparado com produtos derivados de leite de bovinos.

Desde 1965 até 2005, a produção de leite de búfala aumentou cerca de 300%, sendo assim a espécie que obteve um maior aumento da sua produção. O leite de vaca ficou em segundo lugar, com um aumento de apenas 60% (Ricci e Domingues, 2012). Em 2012 estimava-se que existiam mais de 190 milhões de búfalos em todo o mundo (Pitacas e Rodrigues, 2013) e que a produção de leite desta espécie seria cerca de 12% da produção total de leite, sendo assim o segundo tipo de leite mais produzido mundialmente (Ahmad *et al.*, 2008). Um dos fatores que contribui para um aumento da produção de leite de búfala nestes últimos anos foi o aumento de restrições que existe relativo à produção de leite de vaca (Pitacas e Rodrigues, 2013). Por outro lado, o leite de búfala apresenta um maior rendimento na produção dos seus derivados (como por exemplo queijo e manteiga), comparativamente com o leite de vaca (Ricci e Domingues, 2012). Estes fatores aliados ao aumento da procura de produtos derivados de leite de búfala, fizeram com que nos últimos anos tenha ocorrido um aumento da sua produção (Pitacas e Rodrigues, 2013). Assim sendo, a produção de búfalos destina-se na sua maioria para a atividade leiteira, sendo o seu leite só ultrapassado em relação ao volume pelo leite dos bovinos. Os maiores produtores são os países asiáticos, contudo a Itália também apresenta uma grande criação de búfalas leiteiras, em que a maioria se destina à produção de queijos *mozzarella* (Liu *et al.*, 2018).

### **1.8.2- Leite de búfala e os seus derivados**

Fazendo a comparação com outras espécies utilizadas para exploração leiteira, pode-se afirmar que o leite de búfala apresenta características que o diferencia dos outros tipos de leite. Uma das características mais notórias é a cor muito branca deste leite, resultado da ausência dos  $\beta$ -carotenos (uma vez que são totalmente transformados em retinol). Possui um maior teor de gordura, proteína e de sais minerais como cálcio, fósforo, magnésio e ferro. Devido ao seu alto teor de cálcio, a ingestão deste leite torna-se importante para prevenir doenças como a osteoporose e, no caso das crianças, ajuda no crescimento e na formação dos ossos. Assim sendo trata-se de um leite altamente nutritivo, sendo uma fonte de proteína de alta qualidade para a população que o consome. Relativamente ao colesterol e à água, o seu teor é inferior, assim como o seu conteúdo de potássio (Pitacas e Rodrigues, 2013; Ricci e Domingues, 2012; Ahmad *et al.*, 2008).

A transformação desta matéria-prima permite obter diversos produtos lácteos como por exemplo queijo, manteiga e leite em pó.

A *mozzarella* é um dos principais queijos produzidos a partir de leite de búfala, e isto deve-se ao facto de ser um produto nutritivo, bem aceite pelo consumidor e que tem um elevado preço de mercado, o que torna rentável para o produtor a criação de búfalos (Rosati e Van Vleck, 2002). Contudo, a *burrata* também é um queijo que pode ser produzido a partir de leite de búfala e que também é muito apreciado.

### **1.8.3- Autenticidade do leite e derivados de búfala**

Como já foi referido anteriormente, o leite de búfala apresenta um elevado valor de mercado. Esta particularidade pode aliciar o produtor a misturar esse leite com leites mais baratos para maximizar o seu lucro. Esta mistura tem de ser declarada no rótulo, caso contrário o produtor estará a cometer fraude e então o consumidor vai adquirir o produto como sendo genuíno, pagando um valor mais elevado e não beneficiando das qualidades nutricionais do produto autêntico. Existem muitíssimos tipos de queijo no mercado, sendo aqueles com uma denominação DOP os mais valorizados, uma vez que se trata de produtos em que a sua produção, confeção e transformação ocorre numa determinada região geográfica, sendo um produto que tem a maneira de fabrico reconhecida e também verificada (ASAE, [s.d.]<sup>e</sup>). Estes tipos de queijos têm políticas rígidas, sendo por isso bastante importante a identificação das espécies presentes para o controlo de fraudes (Dalmaso *et al.*, 2011). Em Itália existe um elevado número de queijos com denominação DOP como por

exemplo o queijo “Mozzarella di Bufala Campana”, que pode chegar a atingir 40 €/kg, um preço elevado e chamativo para possíveis práticas fraudulentas (Pitacas *et al.*, 2013).

Ao falar das adulterações do leite de búfala não se pode mencionar apenas as misturas com outros tipos de leite. A verdade é que nas adulterações no leite, pode ocorrer diversos atos fraudulentos como já foi referido anteriormente, como por exemplo a adição de água ou de quaisquer outras substâncias que provoquem uma alteração das características físico-químicas originais (Tola, 2018).

## **1.9- Métodos de identificação de espécies**

A autenticidade dos géneros alimentícios é adjacente à qualidade dos mesmos, sendo importante haver métodos que permitam a identificação das espécies animais presentes. Assim certifica-se se os rótulos estão corretos ou se se está perante uma fraude alimentar (Meira *et al.*, 2015).

Nas fraudes alimentares pode haver a substituição total ou parcial de espécies, sempre com o objetivo do produtor obter maiores lucros económicos. Existem 2 tipos de métodos para a identificação das espécies que se encontram presentes nos produtos alimentares: métodos baseados na análise de proteínas e métodos baseados na análise do ADN. Dentro dos métodos baseados em proteínas estão técnicas imunológicas, cromatografias e eletroforeses, porém estes métodos são considerados menos eficazes relativamente aos que se baseiam na análise do ADN. Uma das desvantagens é a desnaturação das proteínas quando sujeitas a elevadas temperaturas, sendo este tipo de métodos muito afetados por processos industriais dos géneros alimentícios. Já os métodos baseados em ADN conseguem identificar as espécies de animais presentes mesmo que o produto tenha sido sujeito a um tratamento térmico ou mesmo que se trate de um produto com uma composição muito complexa. Trata-se de um tipo de métodos mais rápido, sensível e específico (Meira *et al.*, 2017).

### **1.10- PCR em tempo real**

O PCR em tempo real é uma técnica baseada na análise de ADN e nos últimos anos tem sido das mais utilizadas para a identificação de espécies de animais nos géneros alimentícios. Esta é a técnica utilizada no laboratório de Segurança Alimentar da ASAE. Mais concretamente esta técnica consiste na amplificação de um fragmento alvo de ADN, devido à sua hibridação com *primers* específicos, ocorrendo desta forma a síntese de milhões de cópias

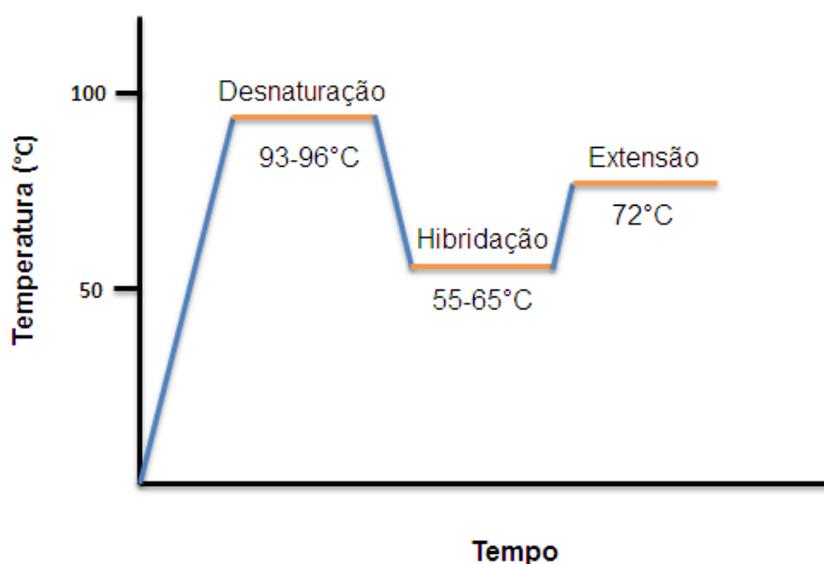
do mesmo fragmento (Rodríguez-Lázaro e Hernández, 2015; Novais e Pires-Alves, 2004). Trata-se de uma técnica semelhante ao PCR convencional, a diferença está na simultaneidade em que ocorre a amplificação, detecção e quantificação do ADN alvo. É possível visualizar em tempo real a amplificação e também haver a quantificação devido a um sistema de fluorescência em que ocorre a emissão e detecção da mesma. Assim sendo traz vantagens como ser mais rápida, realizar a quantificação do produto amplificado, ser mais sensível e apresentar um menor risco de contaminação, uma vez que existe menos manuseamento já que não é necessário haver a realização de eletroforese, como acontece no PCR convencional (Rodríguez-Lázaro e Hernández, 2015).

O PCR em tempo real apresenta 3 etapas (Figura 5), que se realizam entre 30 a 40 ciclos:

1ª Etapa- **Desnaturação** - Nesta etapa ocorre o aumento de temperatura, com o intuito de provocar a quebra da cadeia dupla de ADN, uma vez que vai haver a destruição das pontes de hidrogénio, ficando assim na presença de duas cadeias simples (93-96°C) (Rodríguez-Lázaro e Hernández, 2015).

2ª Etapa- **Hibridação** - Neste passo ocorre a diminuição da temperatura e portanto há a ligação dos *primers* às suas regiões complementares através da formação de pontes de hidrogénio (55-65°C) (Rodríguez-Lázaro e Hernández, 2015).

3ª Etapa- **Extensão** - Nesta última etapa há a síntese da nova cadeia dupla de ADN devido à ação de uma polimerase do ADN termoestável onde se encontram as bases nucleotídicas e os *primers* são prolongados percorrendo toda a sequência do ADN alvo (72°C) (Pelt-Verkuil, Belkum e Hays, 2008).



**Figura 5-** Representação gráfica das 3 etapas da técnica de PCR.

Estas etapas possuem temperaturas e tempo de duração diferente, representando o conjunto das três um ciclo que vai ser repetido normalmente entre 30 a 40 vezes (no caso do PCR em tempo real para a detecção de *Bubalus bubalis* são 35). Assim, no final do PCR, haverá cerca de 1000 bilhões de cópias do fragmento de ADN, uma vez que em cada ciclo a quantidade de ADN duplica (Rodríguez-Lázaro e Hernández, 2015).

Para que se possa realizar uma técnica de PCR, é fundamental conhecer bem a sequência alvo de ADN, de maneira a se conseguir desenhar um *primer* específico para a mesma (estes *primers* vem incluídos na *mastermix* fornecida nos *kits* de PCR em tempo real disponíveis no mercado).

A *mastermix* é composta por um conjunto de reagentes:

- **Polimerase do ADN** - Estas moléculas são enzimas termostáveis responsáveis pela formação de uma nova cadeia dupla de ADN durante a fase de extensão do PCR. Esta enzima liga-se ao segmento alvo e, devido à sua atividade de nuclease, a sonda de fluorescência será degradada permitindo a separação da molécula *reporter* da molécula *quencher*, o que irá provocar um aumento exponencial da emissão de fluorescência (Novais e Pires-Alves, 2004; Wong e Medrano, 2005).
- **Primers** - São pequenos fragmentos de ADN que se vão ligar à sequência alvo uma vez que são complementares à mesma. Como já foi referido anteriormente, é na fase de hibridação que ocorre a sua junção com a respetiva sequência, devido à diminuição da temperatura. Estes *primers* devem ter um tamanho entre 16 a 30 pb. Um tamanho muito grande pode levar à formação de produtos não específicos e um tamanho demasiado reduzido aumenta a probabilidade de ocorrer a amplificação de uma região que não seja a de interesse (Chen e Janes, 2002; Somma e Querci, 2006).
- **dNTP's** - Os 4 desoxirribonucleótidos trifosfato (guanina, citosina, timina e adenina) são fundamentais para que possa ocorrer a síntese de ADN, devendo estar presente uma concentração equivalente de cada um, de maneira a que não ocorra erros na sua integração (Chen e Janes, 2002; Somma e Querci, 2006).
- **Tampão** - É necessário existir um tampão para que o pH da reação seja regulado.
- **Concentração de Mg** - É fundamental a incorporação de magnésio na reação uma vez que a sua presença é necessária para o bom funcionamento da polimerase do ADN. Esta substância também vai interagir com os dNTP's formando um complexo, sendo assim essencial para que ocorra a formação da nova cadeia de ADN. É importante ter uma concentração de Mg adequada, uma vez que uma alta concentração faz com que

se forme produtos não específicos e uma baixa concentração faz com que o PCR não obtenha os melhores rendimentos (Somma e Querci, 2006).

A visualização do ADN amplificado é possível devido à emissão de fluorescência cujo sinal é diretamente proporcional ao produto amplificado, uma vez que estas sondas fluorescentes hibridam com a porção de ADN amplificado. É possível distinguir dois sistemas principais de fluorescência: corantes intercalares e sondas de sequência específica. Os primeiros diferem-se dos outros na medida em que se ligam a qualquer molécula de cadeia dupla de ADN do produto de PCR, não apresentando especificidade, sendo o mais comum o fluoróforo SYBER Green 1. Contrariamente, as sondas de sequência específica são, como o nome indica, específicos para uma determinada sequência de ADN. Estas sondas apresentam dois fluoróforos (uma molécula *reporter* e uma molécula *quencher*), um em cada extremidade, sendo a molécula *quencher* responsável por suprimir a fluorescência da molécula *reporter*. Se a sequência alvo das sondas se encontrar presente, estas mudam para uma estrutura linear (e não mantêm uma estrutura *hairpin-loop*), provocando um afastamento das moléculas *reporter* e *quencher* registando-se um aumento de fluorescência, uma vez que a atividade de absorção desta última molécula será reduzida. Esta atividade de fluorescência é medida devido à presença de um detetor e, com um *software*, a intensidade de fluorescência versus número de ciclos vai ser representada graficamente, de maneira a que se consiga interpretar e retirar conclusões quanto à presença ou não de determinada sequência de ADN (Rodríguez-Lázaro e Hernández, 2015).

Para a interpretação das curvas obtidas devem-se ter em conta os seguintes conceitos:

- **Baseline** - é considerado “ruído de fundo”. Nesta fase está ocorrer acumulação de fluorescência (Arya *et al.*, 2005).
- **Threshold** - corresponde ao ponto em que a fluorescência emitida na reação inicia a fase do crescimento exponencial (Kubista *et al.*, 2006).
- **Ponto Ct** - o valor deste ponto corresponde ao número de ciclos necessários para que a fluorescência emitida na reação de PCR atinga o *threshold* conseguindo assim ser detetada pelo equipamento (Novais e Pires-Alves, 2004). Este termo representa algo que é inversamente proporcional ao número de moléculas na reação, pois quantas mais moléculas existirem inicialmente, menos ciclos são necessários para que a fluorescência ultrapasse o valor da *baseline*.

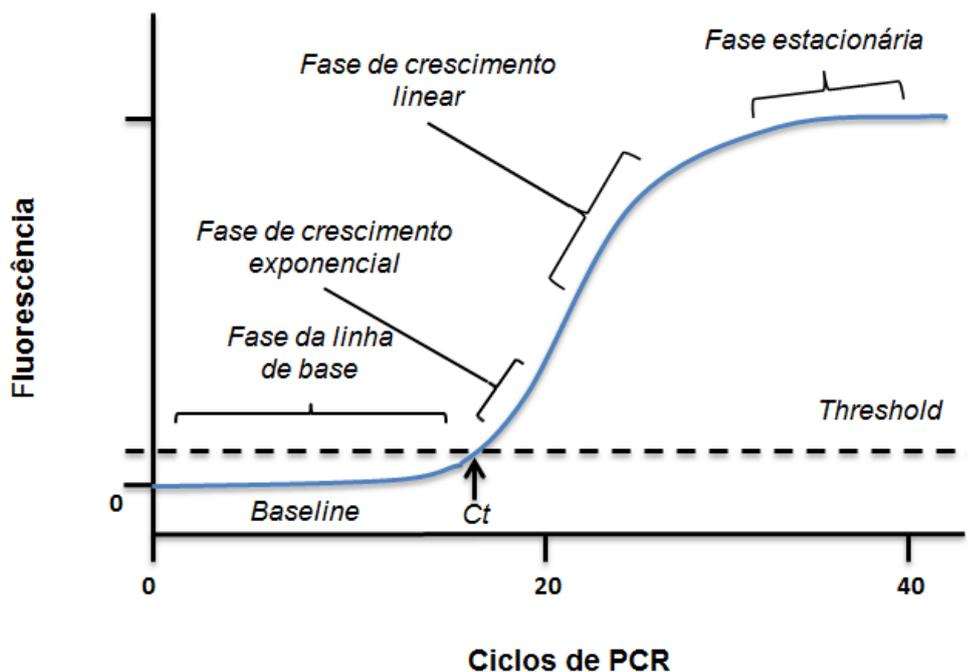
A curva de amplificação permite-nos visualizar a variação da emissão da fluorescência em cada ciclo durante a reação de PCR em tempo real, o que permite que se encontre o ponto Ct e a *baseline* (Wong e Medrano, 2005). Esta curva apresenta 4 fases (Figura 6):

1ª **Fase da linha de base**- corresponde à fase inicial da curva onde a fluorescência emitida ainda não é suficiente para alcançar o ponto Ct (Novais e Pires-Alves, 2004).

2ª **Fase de crescimento exponencial**- é nesta fase que a reação deve ser estudada, uma vez que é a mais específica e precisa dado que existe uma relação mais forte entre a fluorescência e o ADN (Wong e Medrano, 2005).

3ª **Fase de crescimento linear**- no início desta fase a amplificação é ótima, contudo vai-se começando a sentir o processo de degradação, o que provoca uma baixa eficiência de amplificação (Wong e Medrano, 2005).

4ª **Fase estacionária** - os produtos da PCR estão bastante degradadas nesta fase, constituindo o final da reação, uma vez que já não ocorre amplificação (Wong e Medrano, 2005).



**Figura 6-** Representação gráfica da curva de amplificação do PCR em tempo real (adaptado de Wong e Medrano (2005)).

## **1.11- Objetivos e âmbito do trabalho**

Um dos objetivos da UE é ter uma política que assente no bem-estar das pessoas, plantas e animais, num mercado transparente onde a fraude alimentar não esteja presente e no fornecimento de géneros alimentícios seguros e nutritivos, sempre com a finalidade de proteger a população dos perigos alimentares que possam existir (Comissão Europeia, [s.d.]).

O mercado de leite de búfala e seus derivados, mais especificamente a *mozzarella*, encontra-se em plena expansão não só na UE como também no mundo, assim, frequentemente aparecem novos produtos no mercado. Uma vez que se trata de produtos com uma procura crescente e com um elevado valor de mercado, este tipo de género alimentícios é atrativo para atividades fraudulentas. Assim sendo este trabalho visa testar se houve adulteração dos diferentes queijos obtidos a partir de leite de búfala presentes no mercado nacional com leite de vaca. Através da utilização da técnica de PCR em tempo real, consegue-se verificar se os produtos analisados estão de acordo com o descrito nos seus rótulos.

A avaliação da autenticidade deste tipo de produtos permitirá tirar conclusões de como o mercado nacional se encontra ao nível da autenticidade dos géneros alimentícios neste setor em particular.

## **2- Componente Experimental**

## **2.1- Implementação do método de detecção da espécie *Bubalus bubalis* por PCR em tempo real**

Para que ocorra a implementação no Laboratório de Segurança Alimentar da ASAE do método de detecção da espécie *Bubalus bubalis* por PCR em tempo real, tem de se seguir os seguintes passos (de acordo com o procedimento interno do laboratório):

- Determinação do **limite de detecção**, realizando-se uma reta de calibração com os 4 padrões (10%, 5%, 1% e 0,1%) para visualizar em quais houve amplificação. De seguida, para validar o limite encontrado, amplifica-se 2 padrões (no mínimo 3 vezes cada um), em que um corresponde à concentração mais baixa em que houve amplificação e o outro à concentração imediatamente acima;
- Realização de **ensaios com diferentes tipos de matrizes**, no mínimo 20, dos quais em 10 tem de se obter um resultado positivo;
- Realização de **ensaios de seletividade em condições laboratoriais**, de forma a analisar qual a influência que essas condições vão ter nos resultados obtidos. Assim sendo tem de se utilizar 3 organismos diferentes do alvo e eles não poderão ser amplificados;
- Realização de pelo menos 10 ensaios de **amostras em duplicado**, podendo ser amostras puras, amostras de rotinas ou até amostras de ensaio de competência externa;
- É necessário haver ensaios intralaboratoriais, realizadas por diferentes técnicos, de pelo menos 3 **amostras em paralelo** podendo ser amostras puras, amostras de rotina e amostras de competência externa.

## **2.2- Amostragem**

As matrizes utilizadas neste estudo foram amostras de queijos de leite de búfala, de vaca e de cabra, queijo de leite de búfala e de leite de vaca retirados de uma *pizza*, *raviolis* de queijo de leite de búfala, hambúrguer de novilho, lasanha de porco e leite meio gordo de vaca (Tabela 2). Nos queijos analisados estão incluídos os do tipo *burrata*, fresco e *mozzarella*. A escolha das amostras derivadas de leite de búfala foi feita de forma a representar o que se encontra no mercado nacional, sendo elas de diferentes matrizes, marcas, preços e composição global. Os produtos alvo de estudos foram provenientes de supermercados de grandes superfícies, de uma queijaria regional e também de restaurantes.

**Tabela 2-** Lista das amostras utilizadas e a respetiva espécie declarada no rótulo.

<u>Matriz</u>	<u>Espécie rotulada</u>
Queijo <i>mozzarella</i> 1 A	Leite de búfala
Queijo <i>mozzarella</i> 1 B	Leite de búfala
Queijo <i>mozzarella</i> 2	Leite de búfala
Queijo <i>mozzarella</i> 3	Leite de vaca
Queijo <i>mozzarella</i> 4	Leite de búfala
Queijo <i>mozzarella</i> 5	Leite de búfala
Queijo <i>mozzarella</i> DOP 1	Leite de búfala
Queijo <i>mozzarella</i> DOP 2	Leite de búfala
Queijo <i>mozzarella</i> DOP 3	Leite de búfala
Queijo <i>mozzarella</i> DOP 4	Leite de búfala
Queijo <i>burrata</i> 1	Leite de vaca
Queijo <i>burrata</i> 2	Leite de vaca
Queijo <i>burrata</i> 3	Leite de vaca
Queijo <i>burrata</i> 4	Leite de búfala
Queijo fresco	Leite de búfala
Queijo de búfala em <i>pizza</i>	Leite de búfala
Queijo de vaca em <i>pizza</i>	Leite de vaca
<i>Ravioli</i>	Leite de búfala
Leite meio gordo 1	Leite de vaca
Leite meio gordo 2	Leite de vaca
Hambúrguer	Carne de vaca
Lasanha	Carne de porco
Amostra do ensaio de competência externa	Carne de ovelha

**Nota:** O queijo *mozzarella* 1 A e o queijo *mozzarella* 1 B são do mesmo produtor mas de lotes diferentes.

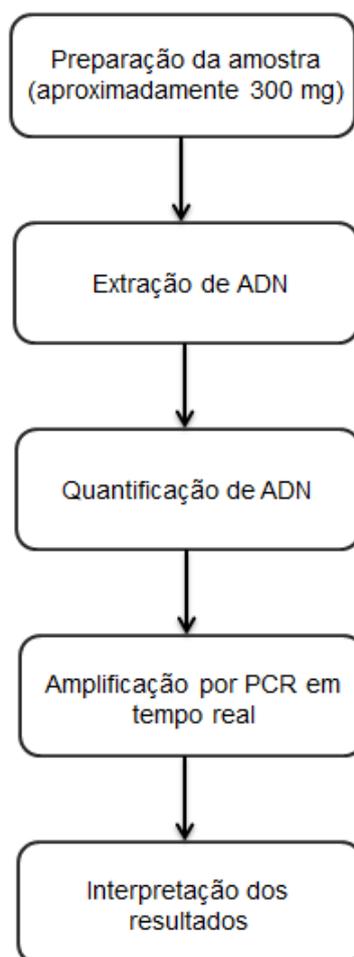
Para haver a implementação do método de detecção da espécie *Bubalus bubalis* por PCR em tempo real no laboratório, realizaram-se 16 amostras em duplicado (mesmo analista) e 4 amostras em paralelo (diferente analista) (Tabela 3) desde o passo de preparação da amostra, até à amplificação.

**Tabela 3-** Lista das amostras que foram realizadas em duplicado e das amostras que foram realizadas em paralelo.

<u>Amostras em duplicado</u>	<u>Amostras em paralelo</u>
Queijo <i>mozzarella</i> 1 A	Queijo <i>mozzarella</i> 1 A
Queijo <i>mozzarella</i> 1 B	Queijo <i>mozzarella</i> DOP 3
Queijo <i>mozzarella</i> 3	Queijo fresco
Queijo <i>mozzarella</i> 4	Leite meio gordo 1
Queijo <i>mozzarella</i> 5	
Queijo <i>mozzarella</i> DOP 3	
Queijo <i>mozzarella</i> DOP 4	
Queijo <i>burrata</i> 1	
Queijo <i>burrata</i> 2	
Queijo <i>burrata</i> 3	
Queijo <i>burrata</i> 4	
Queijo fresco	
Queijo de búfala em <i>pizza</i>	
Queijo de vaca em <i>pizza</i>	
<i>Ravioli</i>	
Leite meio gordo 1	

## **2.3- Procedimento para a detecção de organismos eucariotas através do método de PCR em tempo real**

De acordo com o procedimento interno do laboratório, antes de o PCR em tempo real é necessário que se realizem diversas etapas, todas efetuadas com muito rigor para que os resultados obtidos sejam fidedignos (Figura 7).



**Figura 7-** Etapas para a detecção das várias espécies analisadas por PCR em tempo real.

### **2.3.1- Preparação das amostras**

Esta etapa da preparação das amostras é crucial para que todo o processo ocorra da forma pretendida. Tem de ser realizada tendo em conta as boas práticas laboratoriais no que diz respeito à desinfeção/ limpeza das superfícies de trabalho entre a preparação de diferentes amostras, de forma a reduzir/ eliminar os riscos de contaminação cruzada. Para tal é obrigatório o uso de luvas e a manipulação das amostras com a ajuda de pontas e bisturis esterilizados.

Foi retirada uma porção representativa do alvo a amplificar, de aproximadamente 300 mg, para um tubo de centrífuga com capacidade de 2 mL.

### **2.3.2 - Extração do ADN**

Esta fase é muito importante pois para que a amplificação do ADN alvo corra bem, é necessário obter material genético com qualidade e também em alguma quantidade. Para isso, é necessário que ocorra a lise celular e a separação do ADN do resto das partículas celulares. Atualmente estão disponíveis no mercado vários *kits* comerciais. Neste caso, o *kit* de extração usado foi o *NucleoSpin<sup>®</sup> Food*, constituído por tampões que contêm detergentes, sais caotrópicos, agentes desnaturantes e proteinase K (NucleoSpin Food, [s.d.]).

Na extração do ADN foi seguido o protocolo de extração do fabricante, contudo o laboratório fez uma otimização em que duplicou a quantidade de proteinase K para quando a matriz fosse queijo. No primeiro passo desta etapa começou-se por adicionar 850  $\mu\text{L}$  do tampão CF e 40  $\mu\text{L}$  de proteinase K (ou 20  $\mu\text{L}$  no caso das amostras de hambúrguer, lasanha e da amostra do ensaio de competência externa) aos 300 mg da amostra preparada anteriormente. De seguida, agitou-se no vórtex e colocou-se numa placa térmica com uma temperatura de 65°C durante cerca de 2 horas e 30 minutos. Durante esse tempo foi necessário agitar as amostras no vórtex de 15 em 15 minutos. Todo este procedimento serve para provocar a lise celular em que se pode distinguir uma lise química (aquando a junção do reagente), uma lise física (com o calor da placa térmica e a agitação no vórtex) e ainda houve a clivagem das proteínas do núcleo devido à adição da proteinase K.

Após essas 2 horas e 30 minutos, os tubos contendo as amostras foram colocadas numa centrifugadora durante 10 min a 14000 g, de maneira a se obter um sobrenadante. Desse mesmo sobrenadante pipetou-se 550  $\mu\text{L}$ , aos quais se juntaram outros 550  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto (que estava guardado no congelador a -20°C) e 550  $\mu\text{L}$  de Tampão C4. Posteriormente, misturou-se tudo através de inversão e retirou-se 630  $\mu\text{L}$  para um tubo com coluna (fornecido no *kit*) que tem uma camada de sílica onde o ADN fica retido. Esses 630  $\mu\text{L}$  foram centrifugar durante 2 min, mas alterou-se o programa da centrifugadora para 9000 g em vez dos iniciais 14000 g. Após esse tempo repetiu-se novamente este último procedimento. O passo seguinte foi a junção do tampão CQW à coluna, numa quantidade de 450  $\mu\text{L}$ . Foi novamente a centrifugar a 9000 g durante 2 min. Depois pipetou-se mais 630  $\mu\text{L}$ , mas desta vez do tampão C5 e foi a centrifugar nas mesmas condições. De seguida, voltou-se a pipetar o tampão C5 mas numa quantidade de 200  $\mu\text{L}$  e todo o procedimento de centrifugação foi

repetido. É relevante mencionar que no fim da coluna ir a centrifugar ia-se trocando sempre o tubo por um novo. Posteriormente, repetiu-se o passo anterior mas sem a adição de reagentes, de forma a promover a limpeza total da coluna, que foi de seguida colocada num tubo de centrífuga com capacidade de 1,5 mL ao qual se juntou 100 µL de um tampão de eluição (CE). A composição deste tampão é revelada pelo fabricante (contrariamente aos outros tampões) e é 5 mM Tris/HCl a pH 8,5. Este tampão teve de ser previamente aquecido a uma temperatura de 70°C. Por fim centrifugou-se novamente durante 2 min a 9000 g (NucleoSpin Food, [s.d.]). As amostras extraídas foram conservadas no congelador (a pelo menos -18°C) até posterior utilização.

**Nota:** Na matriz leite, o processo de extração de ADN foi otimizado, de forma a se conseguir obter um produto final com melhor qualidade. Para tal, aumentou-se o volume inicial da amostra para 50 mL e realizou-se uma centrifugação. Após esse passo foi obtido um *pellet*, ao qual se adicionou 1 mL de água para biologia molecular e foi novamente a centrifugar. Posteriormente recolheu-se 300 mg do sobrenadante obtido e adicionou-se o tampão CF e um maior volume de proteínase K, tal como acontece para as matrizes de queijo. De seguida, foram realizados todos os passos anteriormente descritos no protocolo de extração.

### **2.3.3 - Quantificação do ADN**

Após a extração fez-se uma leitura de quantificação do ADN extraído, utilizando o fluorómetro *Qubit*<sup>®</sup> que, através da utilização de corantes fluorescentes, permite que se quantifique o ADN, uma vez que ocorre a ligação do ADN extraído a esses corantes e é emitida fluorescência (*Qubit*, [s.d.]).

Para a leitura do ADN extraído é seguido um procedimento interno do laboratório em que se preparou uma reação de 200 µL composta por 198 µL de *Qubit Buffer*, 1 µL de *Qubit Reagent* e 1 µL da amostra num tubo próprio com capacidade de 0,5 mL.

Este passo de quantificação do ADN é recomendado dado que é indicador da quantidade de ADN total que se conseguiu extrair.

### 2.3.4 - PCR em tempo real

Para se proceder à amplificação e quantificação do ADN presente nas amostras utilizando a técnica de PCR em tempo real, foi utilizado um *kit* de ensaio de deteção do búfalo asiático da *Generon*<sup>®</sup>. Este *kit* deteta e amplifica uma sequência específica do ADN do *Bubalus bubalis* através de uma sonda de sequência específica (FAM).

Este *kit* é composto pelos seguintes componentes (Generon, [s.d.]):

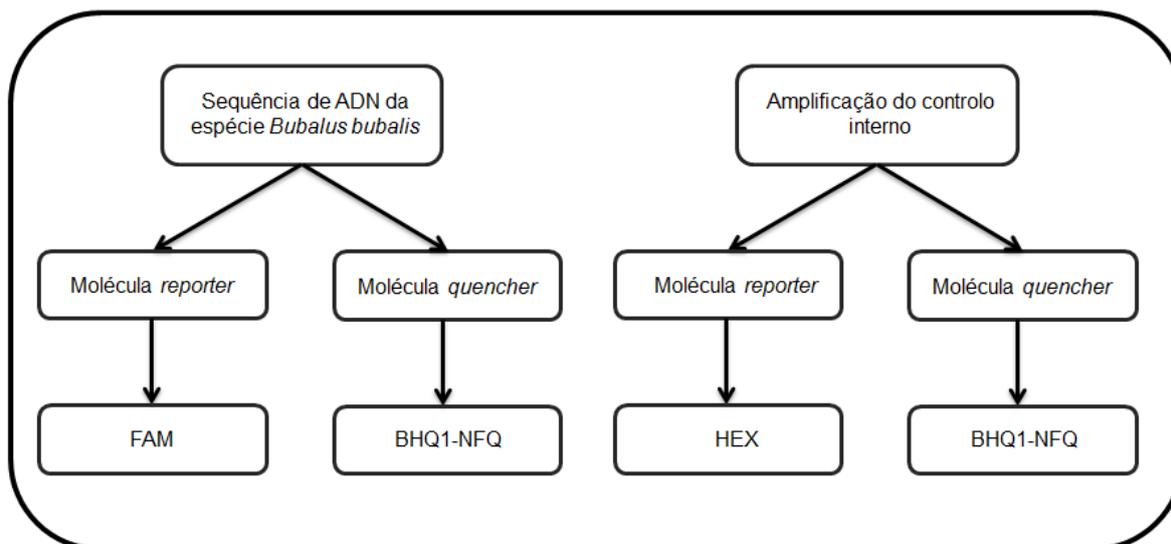
- **Oligomix** - onde estão as sondas fluorescentes e como tal é necessário proteger da luz, uma vez que são fotossensíveis.
- **Mastermix** - como já foi referido anteriormente, trata-se de uma solução composta por elementos fulcrais para a reação de PCR em tempo real, tais como polimerase do ADN, dNTP's, tampão, *primers* e também Mg.
- **Controlo positivo** - neste *kit* existe 2 tipos de controlo positivo: um para utilizar quando se trata de matrizes cruas (Controlo positivo R) e outro quando se trata de matrizes processadas (Controlo positivo HT). Neste trabalho só se utilizou o controlo positivo HT para as amostras dos queijos em *pizza* e para o *ravioli*.
- **Controlo negativo.**

Todos estes reagentes estiveram guardados no congelador a -20°C para não se degradarem. Aquando a sua utilização, teve de se proceder ao seu descongelamento e só se pode utilizar após já estarem há algum tempo à temperatura ambiente. De seguida, colocaram-se os reagentes no vórtex por alguns segundos, procedida por uma breve centrifugação numa micro centrífuga, de maneira a assentar para o fundo do frasco algum produto que possa ter ficado na tampa.

Para se preparar a *mastermix* de trabalho, juntaram-se 150 µL de *oligomix* com 750 µL de *mastermix*. De seguida, foi ao vórtex e posteriormente à micro centrífuga. Dessa preparação de *mastermix* de trabalho, retiraram-se 18 µL e colocaram-se em tubos opacos de PCR. A cada um desses tubos opacos foi adicionado 12 µL ou de ADN da amostra, ou de controlo positivo ou de controlo negativo, perfazendo um total de 30 µL de volume da reação.

Após a amplificação, o *software* permitiu interpretar os resultados das amostras com os controlos (através do valor de Ct).

Como já foi referido anteriormente, as sondas específicas apresentam dois fluorocromos: a molécula *reporter* e a molécula *quencher*. Neste *kit* é fornecido o nome das moléculas *reporter* e das moléculas *quencher* para a espécie *Bubalus bubalis* e também para a amplificação do controlo interno (Figura 8).



**Figura 8-** As moléculas *reporter* e as moléculas *quencher* do kit da *Generon*<sup>®</sup> para a amplificação de ADN da espécie *Bubalus bubalis* e do controlo interno.

Para além de todas as informações mencionadas anteriormente, este *kit* também apresenta as condições do programa de amplificação, onde é dada a temperatura em que cada etapa acontece, o tempo de duração e o número de ciclos (Tabela 4).

**Tabela 4-** Programa de amplificação do *kit* da *Generon*<sup>®</sup> de deteção de *Bubalus bubalis* por PCR em tempo real.

	Ativação da Taq polimerase	Desnaturação	Extensão
Temperatura °C	95		60
Duração	3 min	10 seg	45 seg
Ciclos	1	35	

### **2.3.5- Interpretação dos resultados**

Os resultados obtidos podem ser positivos ou negativos em relação à presença da espécie *Bubalus bubalis*.

Todas as corridas de amplificação de PCR em tempo real realizam-se com:

- A amostra a analisar;
- Controlo negativo;
- Controlo positivo;
- Branco.

Para uma amostra ser considerada **negativa**, tem de apresentar as seguintes características:

- Não apresentar amplificação (fluorescência), ou então apresentar uma amplificação com um valor de Ct superior ao padrão correspondente ao limite de deteção;
- Tanto o controlo negativo como o branco não podem apresentar amplificação (fluorescência);
- O controlo positivo tem de amplificar;
- A amostra tem de amplificar no controlo interno.

Para uma amostra ser considerada **positiva**, tem de possuir estas características:

- Apresentar amplificação (fluorescência) com um valor de Ct inferior ao do limite de deteção;
- Tanto o controlo negativo como o branco não podem apresentar fluorescência;
- O controlo positivo tem amplificar.

Caso o branco amplifique, terá de se realizar uma nova extração procedida por uma nova amplificação, uma vez que todos os resultados obtidos no PCR em tempo real serão classificados como inválidos.

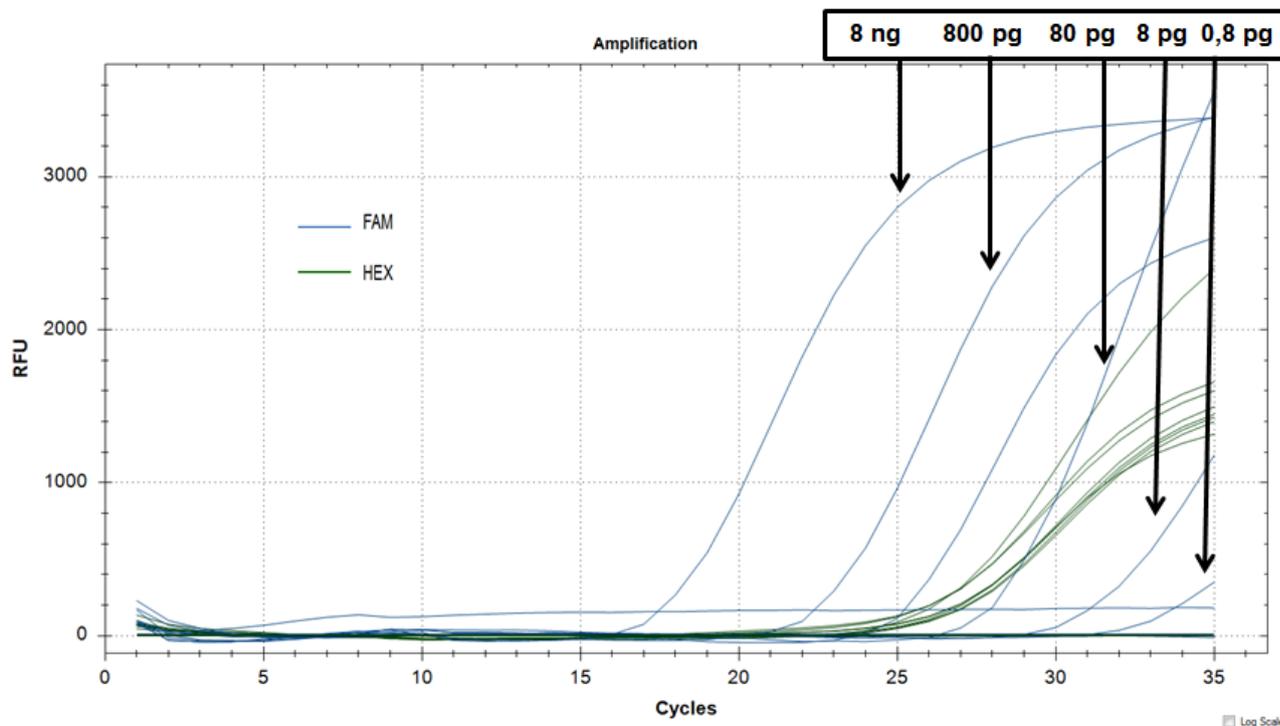
Se o controlo positivo e /ou o controlo negativo fornecidos pelo *kit* não obtiverem o resultado esperado, terá de se repetir o PCR em tempo real, para se fazer uma nova avaliação dos resultados.

## 2.4- Resultados e discussão

### 2.4.1- Amplificação por PCR em tempo real para a implementação do método de detecção da espécie *Bubalus bubalis*

Como já foi referido anteriormente, para ocorrer a implementação do método de detecção da espécie *Bubalus bubalis* por PCR em tempo real, é necessário seguir um conjunto de passos. Assim sendo, foram realizados 23 ensaios com diferentes matrizes. Desses ensaios, 16 foram feitos em duplicado e 4 em paralelo, número de ensaios suficientes para cumprir um dos requisitos da implementação do *kit* no laboratório.

Para a determinação do limite de detecção, procedeu-se à realização de uma reta de calibração utilizando os padrões 100%, 10%, 1%, 0,1% e 0,01% que correspondiam a 8 ng/ $\mu$ L, 800 pg/ $\mu$ L, 80 pg/ $\mu$ L, 8 pg/ $\mu$ L e 0,8 pg/ $\mu$ L respetivamente (Figura 9). Na tabela 5 estão os valores de Ct associados a este PCR em tempo real.



**Figura 9-** Representação gráfica da fluorescência em função do número de ciclos, obtida por PCR em tempo real para calcular o limite de detecção.

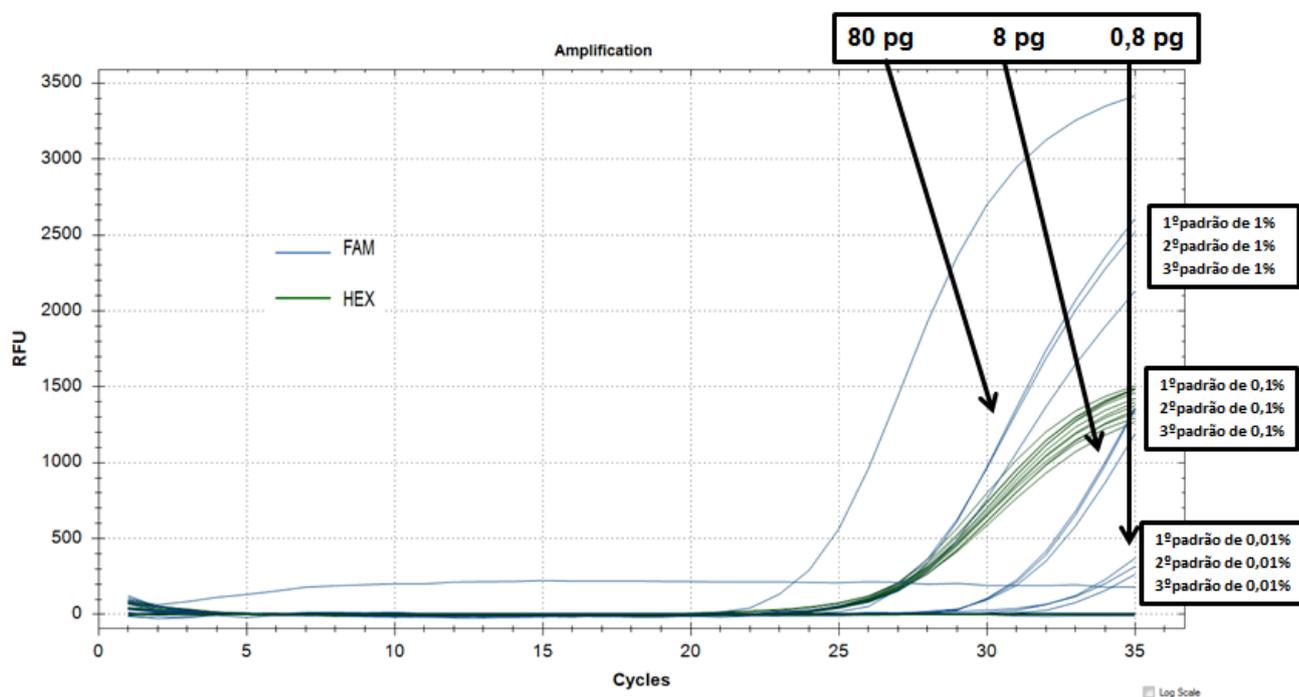
**Tabela 5-** Valores do Ct das várias amostras necessárias para calcular o limite de deteção.

Sonda	Amostra	Valor do Ct
FAM	Padrão 100% Búfala	15,94
FAM	Padrão 10% Búfala	20,37
FAM	Padrão 1% Búfala	26,31
FAM	Padrão 0,1% Búfala	28,96
FAM	Padrão 0,01% Búfala	31,03
FAM	Branco Búfala	13,24
FAM	Controlo Positivo Búfala	23,86
FAM	Controlo Negativo Búfala	N/A
HEX	Padrão 100% Búfala	17,00
HEX	Padrão 10% Búfala	16,32
HEX	Padrão 1% Búfala	22,35
HEX	Padrão 0,1% Búfala	17,59
HEX	Padrão 0,01% Búfala	17,42
HEX	Branco Búfala	22,01
HEX	Controlo Positivo Búfala	21,03
HEX	Controlo Negativo Búfala	22,07

O kit para a deteção de *Bubalus bubalis* por PCR em tempo real, refere que o limite de deteção é 0,1% contudo, como se vê na figura 9, todos os padrões amplificaram, mesmo o padrão de 0,01%. O controlo interno (HEX) amplificou, assim como o controlo positivo (FAM). O controlo negativo (FAM) não amplificou (sendo assim ao seu valor de Ct na tabela 5 atribuído um N/A). O branco não apresenta um valor de Ct não nulo, contudo é considerado como uma amostra válida, uma vez que tal se deve a uma amplificação não significativa. Todos estes fatores referidos anteriormente, tornam as amostras válidas e permitiram seguir para o próximo passo da amplificação por PCR em tempo real, para a implementação do método de deteção da espécie *Bubalus bubalis*.

O passo seguinte foi a validação do limite de deteção em que se amplificou novamente os padrões 1%, 0,1% e 0,01% (3 vezes cada um), pois são os padrões com a concentração

mais baixa (Figura 10). O PCR em tempo real, para além do gráfico, fornece também os valores de Ct associados (Tabela 6).



**Figura 10-** Representação gráfica da fluorescência em função do número de ciclos, obtida por PCR em tempo real para validar o limite de detecção anteriormente encontrado.

**Tabela 6-** Valores do Ct das várias amostras necessárias para validar o limite de detecção anteriormente encontrado.

Sonda	Amostra	Valor do Ct
FAM	Padrão 1% Búfala	22,16
FAM	Padrão 1% Búfala	22,20
FAM	Padrão 1% Búfala	24,12
FAM	Padrão 0,1% Búfala	27,81
FAM	Padrão 0,1% Búfala	27,90
FAM	Padrão 0,1% Búfala	27,09

**Tabela 6** - Valores do Ct das várias amostras necessárias para validar o limite de deteção anteriormente encontrado (Cont.).

Sonda	Amostra	Valor do Ct
FAM	Padrão 0,01% Búfala	29,64
FAM	Padrão 0,01% Búfala	30,58
FAM	Padrão 0,01% Búfala	25,35
FAM	Branco Búfala	N/A
FAM	Controlo Positivo Búfala	20,56
FAM	Controlo Negativo Búfala	N/A
HEX	Padrão 1% Búfala	18,25
HEX	Padrão 1% Búfala	22,61
HEX	Padrão 1% Búfala	22,40
HEX	Padrão 0,1% Búfala	22,25
HEX	Padrão 0,1% Búfala	22,53
HEX	Padrão 0,1% Búfala	22,45
HEX	Padrão 0,01% Búfala	22,44
HEX	Padrão 0,01% Búfala	21,37
HEX	Padrão 0,01% Búfala	17,61
HEX	Branco Búfala	22,53
HEX	Controlo Positivo Búfala	21,48
HEX	Controlo Negativo Búfala	20,44

O limite de deteção do *kit* deteção de *Bubalus bubalis* por PCR em tempo real é 0,1%. Ao analisar a figura 10 e a tabela 6, verifica-se que se conseguiu não só amplificar os padrões de 0,1%, mas também o de 0,01%, que é 10 vezes mais baixo. Contudo, uma das curvas de amplificação do padrão de 0,01% já não apresenta um desenho tão característico como as outras, fazendo com que o valor de Ct diminua um pouco. Como tal, e devido ao *kit* mencionar o seu limite de deteção, foi escolhido o padrão 0,1%.

## 2.4.2- Quantificação do ADN nas amostras utilizadas

Para se fazer a quantificação do ADN das várias amostras, utilizou-se 198  $\mu\text{L}$  de *Qubit Buffer*, 1  $\mu\text{L}$  de *Qubit Reagent* e 1  $\mu\text{L}$  de amostra, lendo-se de seguida no fluorómetro *Qubit*<sup>®</sup> (Tabela 7).

**Tabela 7-** Valores obtidos através da quantificação de 1  $\mu\text{L}$  de amostra.

<u>Amostra</u>	<u>Quantificação (ng/<math>\mu\text{L}</math>)</u>
Queijo <i>mozzarella</i> 1 A	T.L.
Queijo <i>mozzarella</i> 1 A <b>DUPLICADO</b>	T.L.
Queijo <i>mozzarella</i> 1 A <b>PARALELO</b>	T.L.
Queijo <i>mozzarella</i> 1 B	5,14
Queijo <i>mozzarella</i> 1 B <b>DUPLICADO</b>	5,64
Queijo <i>mozzarella</i> 2	T.L.
Queijo <i>mozzarella</i> 3	T.L.
Queijo <i>mozzarella</i> 3 <b>DUPLICADO</b>	T.L.
Queijo <i>mozzarella</i> 4	T.L.
Queijo <i>mozzarella</i> 4 <b>DUPLICADO</b>	T.L.
Queijo <i>mozzarella</i> 5	T.L.
Queijo <i>mozzarella</i> 5 <b>DUPLICADO</b>	T.L.
Queijo <i>mozzarella</i> DOP 1	T.L.
Queijo <i>mozzarella</i> DOP 2	T.L.
Queijo <i>mozzarella</i> DOP 3	T.L.
Queijo <i>mozzarella</i> DOP 3 <b>DUPLICADO</b>	T.L.
Queijo <i>mozzarella</i> DOP 3 <b>PARALELO</b>	T.L.
Queijo <i>mozzarella</i> DOP 4	5,94
Queijo <i>mozzarella</i> DOP 4 <b>DUPLICADO</b>	5,60
Queijo <i>burrata</i> 1	T.L.
Queijo <i>burrata</i> 1 <b>DUPLICADO</b>	T.L.
Queijo <i>burrata</i> 2	6,14
Queijo <i>burrata</i> 2 <b>DUPLICADO</b>	6,08

**Tabela 7** - Valores obtidos através da quantificação de 1  $\mu\text{L}$  de amostra (Cont.).

<u>Amostra</u>	<u>Quantificação (ng/<math>\mu\text{L}</math>)</u>
Queijo <i>burrata</i> 3	T.L.
Queijo <i>burrata</i> 3 <b>DUPLICADO</b>	T.L.
Queijo <i>burrata</i> 4	T.L.
Queijo <i>burrata</i> 4 <b>DUPLICADO</b>	T.L.
Queijo fresco	T.L.
Queijo fresco <b>DUPLICADO</b>	T.L.
Queijo fresco <b>PARALELO</b>	T.L.
Queijo de búfala em <i>pizza</i>	T.L.
Queijo de búfala em <i>pizza</i> <b>DUPLICADO</b>	T.L.
Queijo de vaca em <i>pizza</i>	T.L.
Queijo de vaca em <i>pizza</i> <b>DUPLICADO</b>	T.L.
<i>Ravioli</i>	2,98
<i>Ravioli</i> <b>DUPLICADO</b>	1,90
Leite meio gordo 1	T.L.
Leite meio gordo 1 <b>DUPLICADO</b>	T.L.
Leite meio gordo 1 <b>PARALELO</b>	T.L.
Leite meio gordo 2	T.L.
Hambúrguer	6,52
Lasanha	4,22
Amostra do ensaio de competência externa	87,20

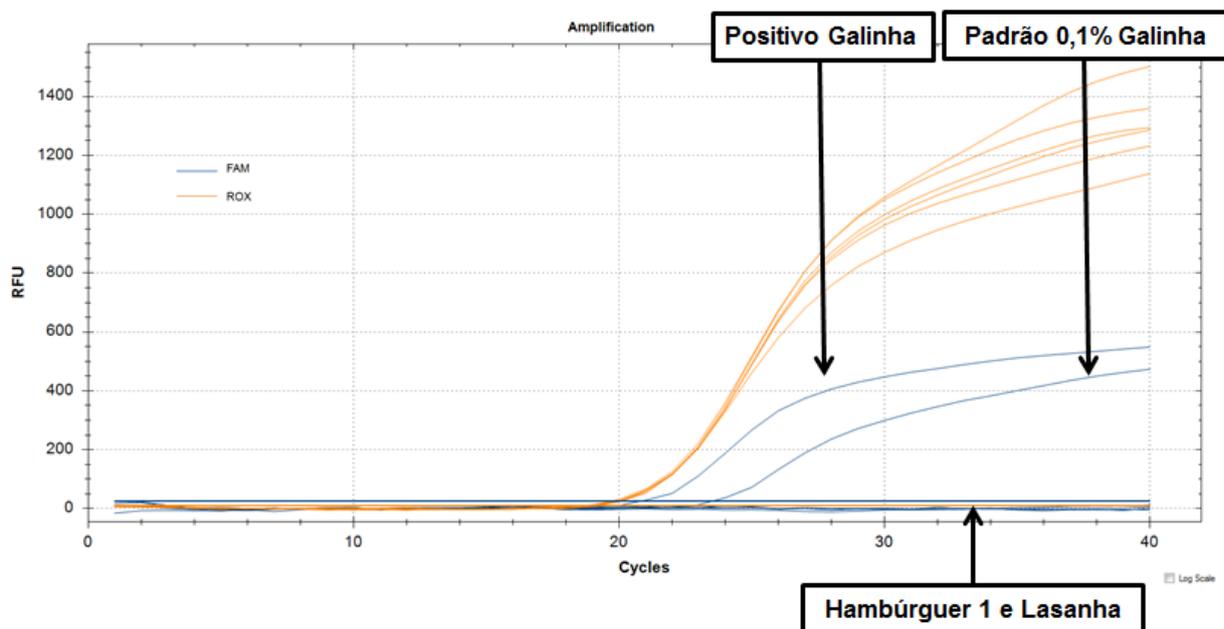
O *kit* para a de detecção de *Bubalus bubalis* por PCR em tempo real, refere que as amostras têm de ser normalizadas para uma concentração de 8 ng/ $\mu\text{L}$ , de maneira a ficarem com uma concentração igual à do controlo positivo. Neste trabalho não foi necessário realizar diluições para as amostras de queijo de leite de búfala, pois os valores obtidos na quantificação nunca foram superiores a 8 ng/ $\mu\text{L}$ , tendo até apresentado como resultado um valor demasiado baixo (T.L.).

## 2.4.3- Análise por PCR em tempo real

### 2.4.3.1- Amostras de lasanha de vaca e hambúrguer de porco

Como já foi referido anteriormente, para que ocorra a implementação de um método no Laboratório de Segurança Alimentar da ASAE, é necessário realizar ensaios com pelo menos 3 espécies diferentes da espécie alvo (*Bubalus bubalis*). Nesse sentido, foi analisada uma amostra de hambúrguer de vaca e uma lasanha de porco, para verificar se estas continham galinha e cavalo (Figura 11 e 12). As tabelas 8 e 9 contêm os valores de Ct associados a cada figura respetivamente.

**Nota:** Amplificação realizada com um *kit* de deteção de galinha do fabricante *Biopremier*<sup>®</sup>.



**Figura 11-** Representação gráfica da fluorescência em função do número de ciclos, obtida por PCR em tempo real para analisar o hambúrguer 1 e a lasanha quanto à presença de galinha.

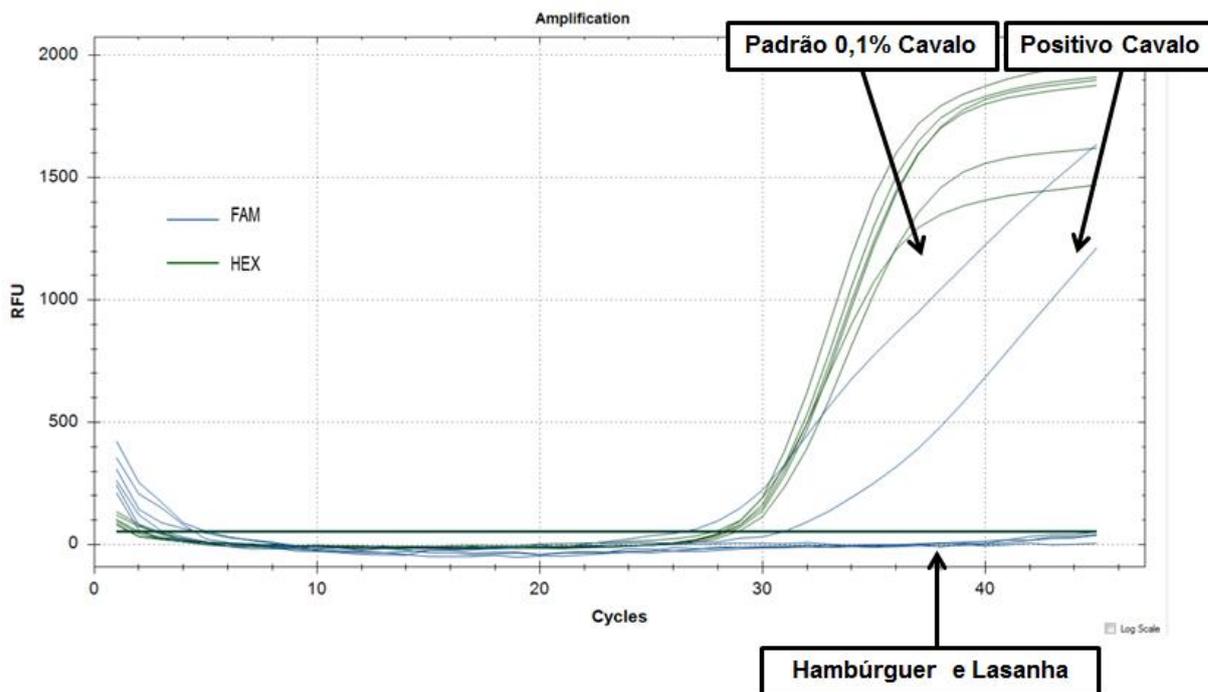
**Tabela 8-** Valores do Ct do hambúrguer 1 e da lasanha, necessários para os analisar quanto à presença de galinha.

Sonda	Amostra	Valor do Ct
FAM	Hambúrguer	N/A
FAM	Lasanha	N/A
FAM	Padrão 0,1% Galinha	23,50
FAM	Branco Galinha	N/A
FAM	Controlo Positivo Galinha	20,80
FAM	Controlo Negativo Galinha	N/A
ROX	Hambúrguer	18,74
ROX	Lasanha	19,13
ROX	Padrão 0,1% Galinha	19,18
ROX	Branco Galinha	18,62
ROX	Controlo Positivo Galinha	18,58
ROX	Controlo Negativo Galinha	18,90

Ao analisar a figura 11 e a tabela 8 verifica-se que o controlo interno (ROX) e o controlo positivo (FAM), amplificaram. Já o branco, o controlo negativo e as amostras de hambúrguer e lasanha (FAM) não amplificaram (sendo assim ao seu valor Ct na tabela 8, atribuído um N/A). Pode-se assim concluir que tanto o hambúrguer de vaca, como a lasanha de porco não foram adulterados com a adição de galinha.

De seguida, procedeu-se à análise para verificar se estas amostras continham cavalo (Figura 12). Na tabela 9 são fornecidos os respetivos valores de Ct.

**Nota:** Amplificação realizada com um *kit* de deteção de cavalo do fabricante *Generon*<sup>®</sup>.



**Figura 12-** Representação gráfica da fluorescência em função do número de ciclos, obtida por PCR em tempo real para analisar o hambúrguer 1 e a lasanha quanto à presença de cavalo.

**Tabela 9** - Valores do Ct do hambúrguer 1 e da lasanha, necessários para os analisar quanto à presença de cavalo.

Sonda	Amostra	Valor do Ct
FAM	Hambúrguer	N/A
FAM	Lasanha	N/A
FAM	Padrão 0,1% Cavalo	26,64
FAM	Branco Cavalo	N/A
FAM	Controlo Positivo Cavalo	31,07
FAM	Controlo Negativo Cavalo	N/A
HEX	Hambúrguer	27,82
HEX	Lasanha	28,86
HEX	Padrão 0,1% Cavalo	28,28
HEX	Branco Cavalo	28,30
HEX	Controlo Positivo Cavalo	28,16
HEX	Controlo Negativo Cavalo	28,50

A partir dos dados da figura 12 e da tabela 9, verifica-se que as amostras são consideradas negativas para a presença de cavalo. O controlo interno (HEX) e controlo positivo (FAM) amplificaram e as amostras de hambúrguer e de lasanha, o controlo negativo e o branco (FAM), não sofreram amplificação (sendo assim ao seu valor Ct na tabela 9, atribuído um N/A). Tanto o padrão 0,1% de galinha, como o padrão 0,1% de cavalo amplificaram.

#### **2.4.3.2- Amostra do ensaio de competência externa**

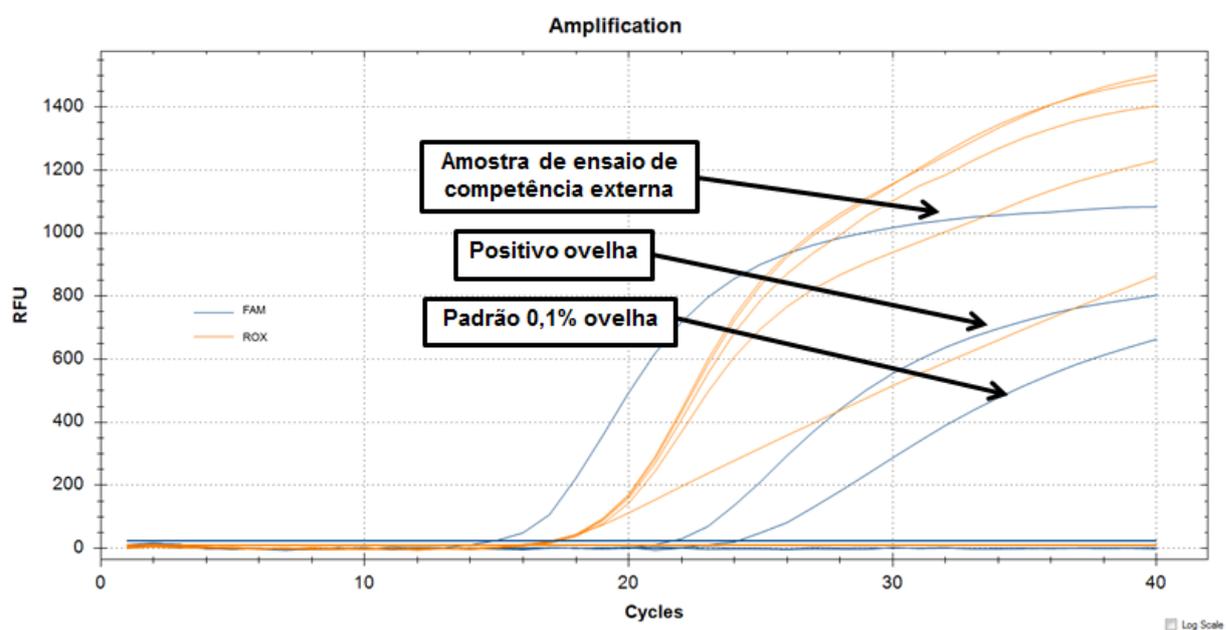
Foi realizada uma amostra de ensaio de competência externa, que referia ser de ovelha, com o intuito de avaliar os resultados obtidos, dado que este ensaio já tinha sido realizado pelos técnicos do Laboratório de Segurança Alimentar da ASAE, para a deteção das espécies de cabra, ovelha e vaca, no plano anual para o controlo de qualidade no laboratório.

Este ensaio também foi realizado no âmbito dos requisitos impostos pelo procedimento de implementação do método de deteção por PCR em tempo real, em que

específica que se tem de utilizar pelo menos 3 organismos diferentes do alvo e que estes não poderão ser amplificados.

Primeiramente foi-se testar a amostra para verificar a presença de ovelha (Figura 13). Os valores de Ct obtidos nesse PCR em tempo real são fornecidos na tabela 10.

**Nota:** Todas estas 3 amplificações foram realizadas com um *kit* de detecção de espécies (ovelha, cabra e vaca) do fabricante *Biopremier*<sup>®</sup>

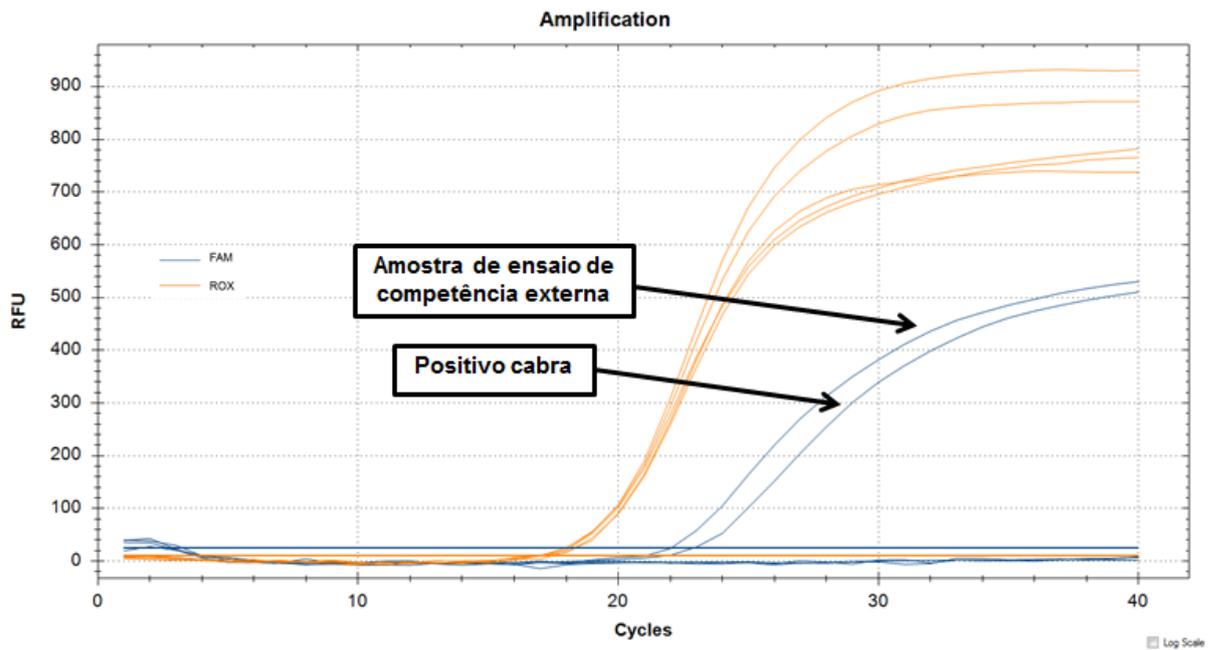


**Figura 13-** Representação gráfica da fluorescência em função do número de ciclos, obtida por PCR em tempo real, para analisar a amostra de ensaio de competência externa quanto à presença de ovelha.

**Tabela 10-** Valores do Ct da amostra de ensaio de competência externa, necessários para a analisar quanto á presença de ovelha.

Sonda	Amostra	Valor do Ct
FAM	Amostra de ensaio de competência externa	15,01
FAM	Padrão 0,1% Ovelha	24,18
FAM	Branco Ovelha	N/A
FAM	Controlo Positivo Ovelha	21,73
FAM	Controlo Negativo Ovelha	N/A
ROX	Amostra de ensaio de competência externa	15,69
ROX	Padrão 0,1% Ovelha	16,20
ROX	Branco Ovelha	16,29
ROX	Controlo Positivo Ovelha	15,87
ROX	Controlo Negativo Ovelha	16,18

De seguida, a amostra foi analisada para verificar se continha cabra (Figura 14). Nesta corrida não foi adicionado o padrão 0,1%, dado que se encontrava à espera de ser fornecido pelo fabricante ao laboratório. Os valores de Ct obtidos neste PCR em tempo real são fornecidos na tabela 11.

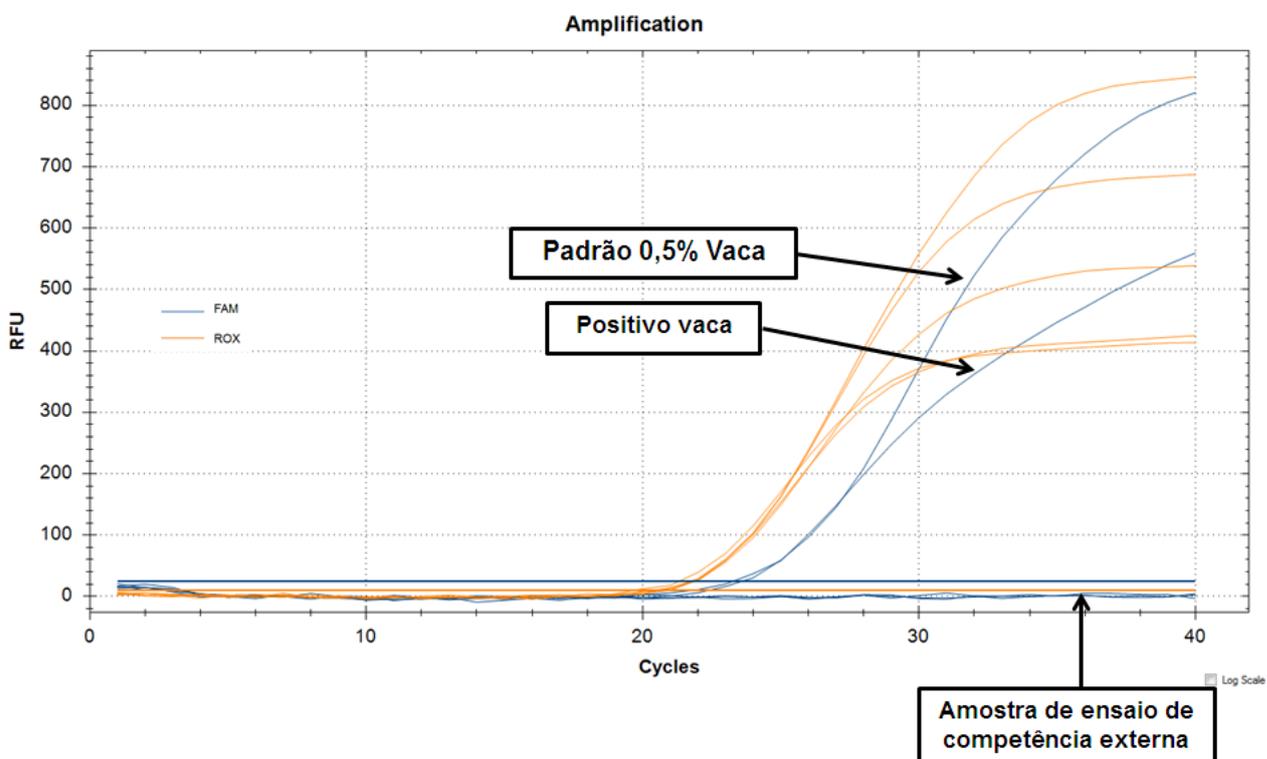


**Figura 14-** Representação gráfica da fluorescência em função do número de ciclos, obtida por PCR em tempo real, para analisar a amostra de ensaio de competência externa quanto à presença de cabra.

**Tabela 11-** Valores do Ct da amostra de ensaio de competência externa, necessários para a analisar quanto à presença de cabra.

Sonda	Amostra	Valor do Ct
FAM	Amostra de ensaio de competência externa	22,03
FAM	Branco Cabra	N/A
FAM	Controlo Positivo Cabra	22,88
FAM	Controlo Negativo Cabra	N/A
ROX	Amostra de ensaio de competência externa	16,96
ROX	Branco Cabra	17,44
ROX	Controlo Positivo Cabra	16,98
ROX	Controlo Negativo Cabra	16,87

E por fim, foi-se verificar se a amostra de ensaio de competência externa continha na sua constituição vaca (Figura 15). Os valores de Ct obtidos neste PCR em tempo real são fornecidos na tabela 12.



**Figura 15-** Representação gráfica da fluorescência em função do número de ciclos, obtida por PCR em tempo real, para analisar a amostra de ensaio de competência externa quanto à presença de vaca.

**Tabela 12-** Valores do Ct da amostra de ensaio de competência externa, necessários para a analisar quanto à presença de vaca.

Sonda	Amostra	Valor do Ct
FAM	Amostra de ensaio de competência externa	N/A
FAM	Padrão 0,5% Vaca	23,28
FAM	Branco Vaca	N/A
FAM	Controlo Positivo Vaca	23,61
FAM	Controlo Negativo Vaca	N/A
ROX	Amostra de ensaio de competência externa	19,69
ROX	Padrão 0,5% Vaca	20,96
ROX	Branco Vaca	20,74
ROX	Controlo Positivo Vaca	20,58
ROX	Controlo Negativo Vaca	20,27

Ao analisar o gráfico do PCR em tempo real para analisar a presença de **ovelha** (Figura 13) e os respetivos valores de Ct (Tabela 10), verificou-se que o controlo interno (ROX) amplificou, assim como o controlo positivo (FAM). O controlo negativo e o branco (FAM) não amplificaram (sendo assim ao seu valor Ct na tabela 10, atribuído um N/A). Nomeadamente à amostra de ensaio de competência externa, esta amplificou (FAM) e apresentou um valor de Ct inferior ao do limite de deteção (padrão 0,1% ovelha).

Observando o gráfico do PCR em tempo real obtido ao analisar a amostra de ensaio de competência externa quanto à presença de **cabra** (Figura 14) e os valores de Ct correspondentes (Tabela 11), verifica-se que, mais uma vez, o controlo interno (ROX) e o controlo positivo (FAM) amplificaram. A amostra de ensaio de competência externa também amplificou no FAM. O controlo negativo e o branco (FAM) não amplificaram (sendo assim ao seu valor Ct na tabela 11, atribuído um N/A). Neste caso não se tem padrão, contudo, como apresenta um valor de Ct relativamente baixo (22,03), considera-se a amostra de ensaio de competência externa como sendo positiva para a presença de cabra.

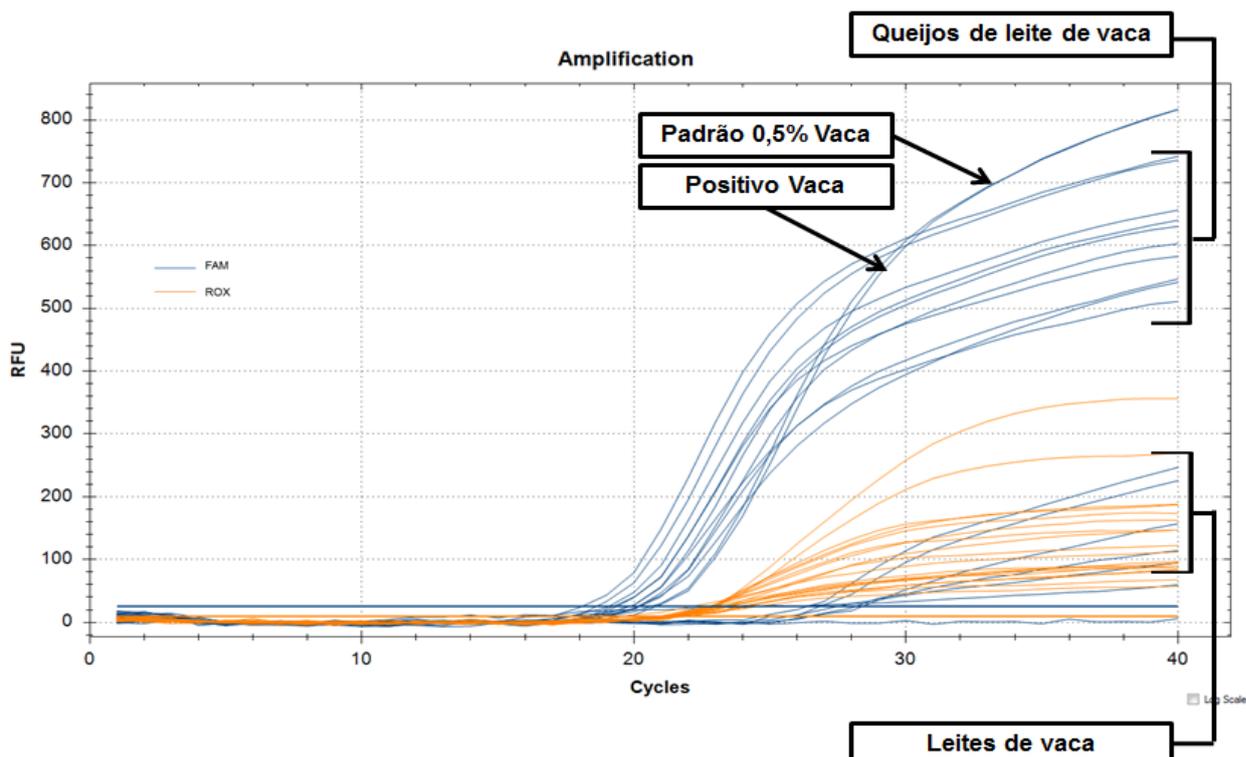
Por fim, através do gráfico obtido por PCR em tempo real obtido ao analisar a amostra relativamente à presença de **vaca** (Figura 15) e os valores de Ct (Tabela 12), verificou-se que o controlo interno (ROX) e o controlo positivo (FAM) amplificaram. Já o branco, o controlo negativo e a amostra (FAM) não amplificaram (sendo assim ao seu valor Ct na tabela 12, atribuído um N/A).

A amostra de ensaio de competência externa possui realmente ovelha, contudo não se trata de uma amostra autêntica, uma vez que também têm na sua composição cabra. Ao analisar a presença de vaca, conclui-se que DNA desta espécie não está presente na amostra. Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos no ensaio de competência externa.

#### **2.4.3.3- Amostras de queijos de leite de vaca**

Todas as amostras de queijos de leite de vaca deste trabalho foram analisadas para perceber se de facto era utilizado leite de vaca para o seu fabrico (Figura 16). Também se analisou o leite meio gordo neste PCR em tempo real. Na tabela 13 estão mencionados os valores de Ct obtidos.

**Nota:** Esta amplificação foi realizada com um *kit* de deteção de vaca do fabricante *Biopremier*<sup>®</sup>.



**Figura 16-** Representação gráfica da fluorescência em função do número de ciclos, obtida por PCR em tempo real, para analisar os queijos derivados de leite de vaca e os leites quanto à presença de leite de vaca.

**Tabela 13-** Valores do Ct das amostras de queijo derivadas de leite de vaca e dos leites, necessários para os analisar quanto à presença de leite de vaca.

Sonda	Amostra	Valor do Ct
FAM	Leite meio gordo 1 duplicado	26,36
FAM	Leite meio gordo 1	28,13
FAM	Leite meio gordo 1 paralelo duplicado	27,45
FAM	Leite meio gordo 1 paralelo	26,82
FAM	Leite meio gordo 2	28,38
FAM	Queijo <i>burrata</i> 1	19,36
FAM	Queijo <i>burrata</i> 1 duplicado	19,81
FAM	Queijo <i>mozzarella</i> 3	18,07

**Tabela 3-** Valores do Ct das amostras de queijo derivadas de leite de vaca, necessários para as analisar quanto à presença de leite de vaca (Cont.).

Sonda	Amostra	Valor do Ct
FAM	Queijo <i>mozzarella</i> 3 duplicado	18,61
FAM	Queijo de vaca da <i>pizza</i>	20,17
FAM	Queijo de vaca da <i>pizza</i> duplicado	20,19
FAM	Queijo <i>burrata</i> 2	20,12
FAM	Queijo <i>burrata</i> 2 duplicado	19,83
FAM	Queijo <i>burrata</i> 3	19,22
FAM	Queijo <i>burrata</i> 3 duplicado	19,07
FAM	Padrão 0,5% Vaca	20,60
FAM	Branco Vaca	24,40
FAM	Controlo Positivo Vaca	20,79
FAM	Controlo Negativo Vaca	N/A
ROX	Leite meio gordo 1 duplicado	21,38
ROX	Leite meio gordo 1	21,34
ROX	Leite meio gordo 1 paralelo duplicado	21,79
ROX	Leite meio gordo 1 paralelo	21,44
ROX	Leite meio gordo 2	21,20
ROX	Queijo <i>burrata</i> 1	21,63
ROX	Queijo <i>burrata</i> 1 duplicado	21,52
ROX	Queijo <i>mozzarella</i> 3	21,54
ROX	Queijo <i>mozzarella</i> 3 duplicado	21,30
ROX	Queijo de vaca em <i>pizza</i>	21,27
ROX	Queijo de vaca em <i>pizza</i> duplicado	20,96
ROX	Queijo <i>burrata</i> 2	21,42
ROX	Queijo <i>burrata</i> 2 duplicado	22,13

**Tabela 13-** Valores do Ct das amostras de queijo derivadas de leite de vaca, necessários para as analisar quanto à presença de leite de vaca (Cont.).

Sonda	Amostra	Valor do Ct
ROX	Queijo <i>burrata</i> 3	19,68
ROX	Queijo <i>burrata</i> 3 duplicado	21,44
ROX	Padrão 0,5% Vaca	21,04
ROX	Branco Vaca	21,41
ROX	Controlo Positivo Vaca	21,66
ROX	Controlo Negativo Vaca	21,68

Ao analisar a tabela 13, verifica-se que o controlo interno (ROX) amplificou, assim como o controlo positivo (FAM). O controlo negativo (FAM) não amplificou (sendo assim ao seu valor Ct na tabela 13, atribuído um N/A). O branco apresenta um valor de Ct não nulo, contudo é considerado válido, uma vez esse valor se deve a uma ligeira amplificação derivada de um ADN vestigial.

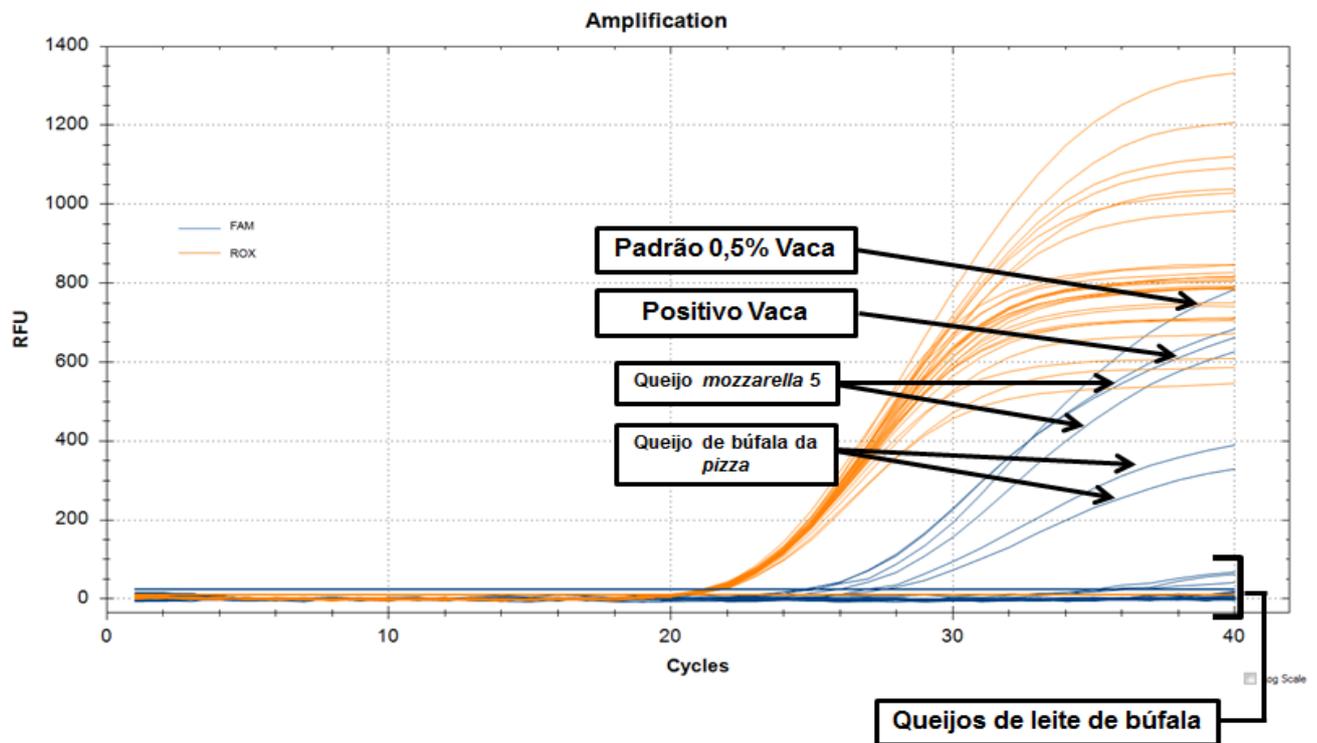
Todos estes dados, associados ao facto de todas as amostras de queijos derivados de leite de vaca apresentarem um valor de Ct no FAM inferior ao limite de deteção de vaca (padrão 0,5%), validam as amostras como sendo positivas.

Relativamente aos leites, o gráfico e a interpretação dos resultados evidenciam que houve amplificação para a espécie de vaca. Dado que esta amplificação é inferior à amplificação do limite de deteção, pode-se inferir que, sendo o leite uma matriz de difícil extração, não se tenha conseguido extrair ADN em quantidade suficiente. No entanto, revela que as amostras são positivas para vaca.

#### **2.4.3.4- Amostras de queijos de leite de búfala**

Para todas as amostras de queijo de leite de búfala, fez-se primeiramente uma avaliação quanto à presença de leite de vaca (Figuras 17 e 18), uma vez que uma das fraudes mais comuns nestes produtos é a junção de leite de vaca por se tratar de uma matriz mais barata. Nas tabelas 14 e 15 estão os valores dos Ct associados às figuras 17 e 18 respetivamente.

**Nota:** Esta amplificação foi realizada com um *kit* de detecção de vaca do fabricante *Biopremier*<sup>®</sup>.



**Figura 17-** Representação gráfica da fluorescência em função do número de ciclos, obtida por PCR em tempo real, para analisar as amostras de queijos derivados de leite de búfala (com exceção do *ravioli* e do queijo *burrata* 4) quanto à presença de leite de vaca.

**Tabela 14-** Valores do Ct das amostras de queijos derivados de leite de búfala (com exceção do *ravioli*), necessários para analisar quanto à presença de leite de vaca.

Sonda	Amostra	Valor do Ct
FAM	Queijo <i>mozzarella</i> 1 A	N/A
FAM	Queijo <i>mozzarella</i> 1 A duplicado	N/A
FAM	Queijo <i>mozzarella</i> 1 A paralelo	N/A
FAM	Queijo <i>mozzarella</i> DOP 2	N/A
FAM	Queijo <i>mozzarella</i> DOP 1	N/A
FAM	Queijo <i>mozzarella</i> 2	N/A
FAM	Queijo <i>mozzarella</i> DOP 3 paralelo	N/A
FAM	Queijo <i>mozzarella</i> DOP 3 paralelo duplicado	N/A
FAM	Queijo <i>mozzarella</i> DOP 3	N/A
FAM	Queijo <i>mozzarella</i> DOP 3 duplicado	N/A
FAM	Queijo fresco paralelo duplicado	N/A
FAM	Queijo fresco paralelo	N/A
FAM	Queijo fresco duplicado	36,54
FAM	Queijo fresco	N/A
FAM	Queijo <i>mozzarella</i> 4	N/A
FAM	Queijo <i>mozzarella</i> 4 duplicado	N/A
FAM	Queijo de búfala em <i>pizza</i>	26,02
FAM	Queijo de búfala em <i>pizza</i> duplicado	24,85
FAM	Queijo <i>mozzarella</i> DOP 4	35,13
FAM	Queijo <i>mozzarella</i> DOP 4 duplicado	35,65
FAM	Queijo <i>mozzarella</i> 1 B	N/A
FAM	Queijo <i>mozzarella</i> 1 B duplicado	N/A
FAM	Queijo <i>mozzarella</i> 5	26,99
FAM	Queijo <i>mozzarella</i> 5 duplicado	27,60
FAM	Padrão 0,5% Vaca	25,17

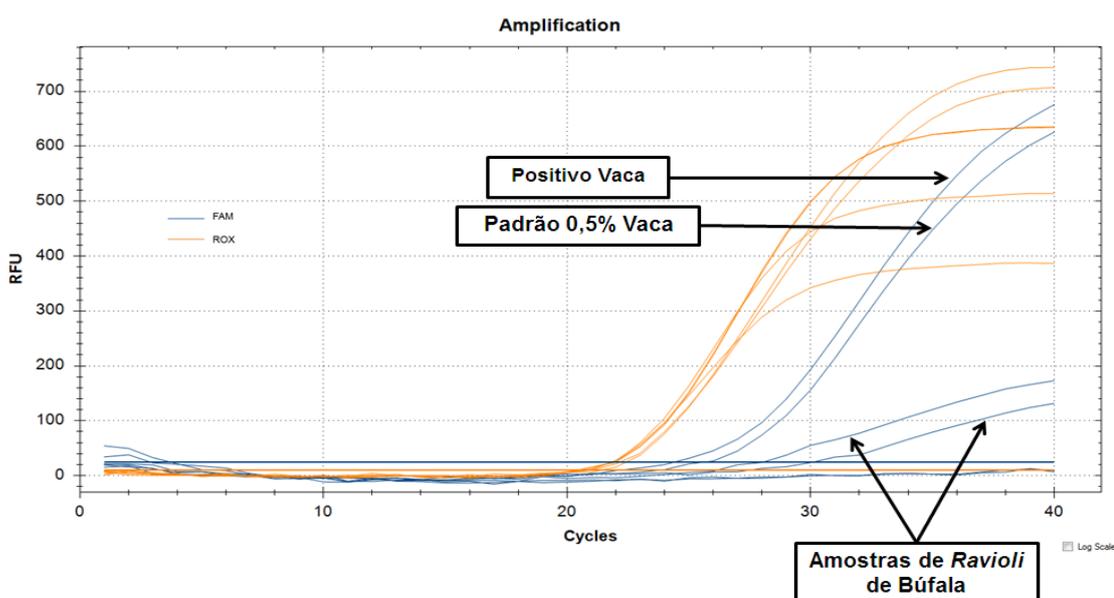
**Tabela 14-** Valores do Ct das amostras de queijos derivados de leite de búfala (com exceção do *ravioli*), necessários para analisar quanto à presença de leite de vaca (Cont.).

Sonda	Amostra	Valor do Ct
FAM	Branco Vaca	24,40
FAM	Controlo Positivo Vaca	20,79
FAM	Controlo Negativo Vaca	N/A
ROX	Queijo <i>mozzarella</i> 1 A	20,12
ROX	Queijo <i>mozzarella</i> 1 A duplicado	20,11
ROX	Queijo <i>mozzarella</i> 1 A paralelo	19,92
ROX	Queijo <i>mozzarella</i> DOP 2	19,88
ROX	Queijo <i>mozzarella</i> DOP 1	20,27
ROX	Queijo <i>mozzarella</i> 2	19,74
ROX	Queijo <i>mozzarella</i> DOP 3 paralelo	20,15
ROX	Queijo <i>mozzarella</i> DOP 3 paralelo duplicado	20,03
ROX	Queijo <i>mozzarella</i> DOP 3	20,41
ROX	Queijo <i>mozzarella</i> DOP 3 duplicado	20,43
ROX	Queijo fresco paralelo duplicado	20,49
ROX	Queijo fresco paralelo	20,42
ROX	Queijo fresco duplicado	20,21
ROX	Queijo fresco	20,07
ROX	Queijo <i>mozzarella</i> 4	20,40
ROX	Queijo <i>mozzarella</i> 4 duplicado	20,22
ROX	Queijo de búfala em <i>pizza</i>	20,21
ROX	Queijo de búfala em <i>pizza</i> duplicado	20,26
ROX	Queijo <i>mozzarella</i> DOP 4	20,34
ROX	Queijo <i>mozzarella</i> DOP 4 duplicado	20,04
ROX	Queijo <i>mozzarella</i> 1 B	20,48
ROX	Queijo <i>mozzarella</i> 1 B duplicado	20,08

**Tabela 14-** Valores do Ct das amostras de queijos derivados de leite de búfala (com exceção do *ravioli*), necessários para analisar quanto à presença de leite de vaca (Cont.).

Sonda	Amostra	Valor do Ct
ROX	Queijo <i>mozzarella</i> 5	20,47
ROX	Queijo <i>mozzarella</i> 5 duplicado	20,40
ROX	Padrão 0,5% Vaca	20,09
ROX	Branco Vaca	20,19
ROX	Controlo Positivo Vaca	19,78
ROX	Controlo Negativo Vaca	20,23

Posteriormente foi-se analisar as amostras de *ravioli* com queijo de leite de búfala, quanto à presença de vaca (Figura 18). Na tabela 15 vêm os valores de Ct associados ao respetivo gráfico.



**Figura 18-** Representação gráfica da fluorescência em função do número de ciclos, obtida por PCR em tempo real, para analisar as amostras de *ravioli* quanto à presença de leite de vaca.

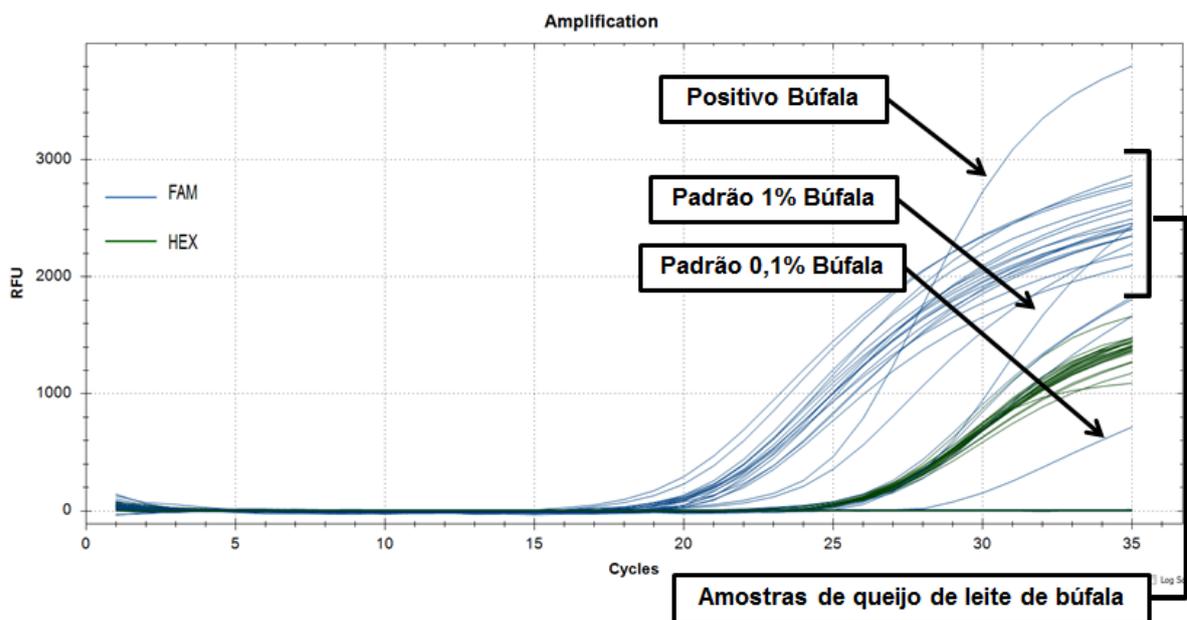
**Tabela 15-** Valores do Ct das amostras de *ravioli*, necessários para as analisar quanto à presença de leite de vaca.

Sonda	Amostra	Valor do Ct
FAM	<i>Ravioli</i>	30,13
FAM	<i>Ravioli</i> duplicado	28,08
FAM	Padrão 0,5% Vaca	25,69
FAM	Branco Vaca	N/A
FAM	Controlo Positivo Vaca	24,44
FAM	Controlo Negativo Vaca	N/A
ROX	<i>Ravioli</i>	20,44
ROX	<i>Ravioli</i> duplicado	20,78
ROX	Padrão 0,5% Vaca	20,67
ROX	Branco Vaca	21,41
ROX	Controlo Positivo Vaca	20,48
ROX	Controlo Negativo Vaca	21,01

Ao analisar as figuras 17 e 18 e as tabelas 14 e 15, verifica-se que todas as amostras analisadas não amplificaram (FAM) (sendo atribuído um N/A ao valor de Ct nas tabelas em questão), tendo amplificado sim no controlo interno (ROX). Os controlos negativos (FAM) não amplificaram, no entanto na tabela 14 verifica-se que o branco do respetivo PCR em tempo real não apresenta um valor não nulo, contudo as amostras são válidas, uma vez que tal se deve a uma amplificação não significativa. As amostras do queijo *mozzarella* 5, queijo de leite de búfala em *pizza* e de *ravioli* de queijo de leite de búfala (assim como os respetivos duplicados), apresentaram uma fraca amplificação. Estas amostras são consideradas negativas, uma vez que os seus valores de Ct são superiores ao valor do Ct do padrão 0,5% de vaca (ou então apresentam um valor superior mas muito próximo do limite de deteção), contudo revelam uma quantidade de ADN vestigial para esta espécie. Todas as outras amostras são também consideradas negativas, dado que não amplificaram. Pode-se então aferir que todas as amostras derivadas de leite de búfala analisadas são consideradas negativas quanto à presença de ADN de vaca.

Posteriormente foi-se verificar a presença de leite de búfala nas amostras (Figuras 19 e 20). Nas tabelas 16 e 17 vêm os valores de Ct associados ao respetivo gráfico.

**Nota:** O duplicado do queijo *mozzarella* 5, de queijo de búfala da *pizza* e *ravioli* (assim como os respetivos duplicados destas últimas amostras) só foram amplificados posteriormente (Figura 20), devido à espera do fornecimento do *kit* para a deteção por PCR em tempo real da espécie *Bubalus bubalis*.



**Figura 19-** Representação gráfica da fluorescência em função do número de ciclos, obtida por PCR em tempo real, para analisar as amostras de queijos derivados de leite de búfala (com exceção do duplicado do queijo *mozzarella* 5, de queijo de búfala da *pizza* e *ravioli* e dos respetivos duplicados destas últimas duas amostras) quanto à presença de leite de búfala.

**Tabela 16-** Valores do Ct das amostras de queijos derivados de leite de búfala (com exceção do duplicado do queijo *mozzarella* 5, de queijo de búfala da *pizza*, *ravioli* e dos respectivos duplicados destas últimas duas amostras), necessários para as analisar quanto à presença de leite de búfala.

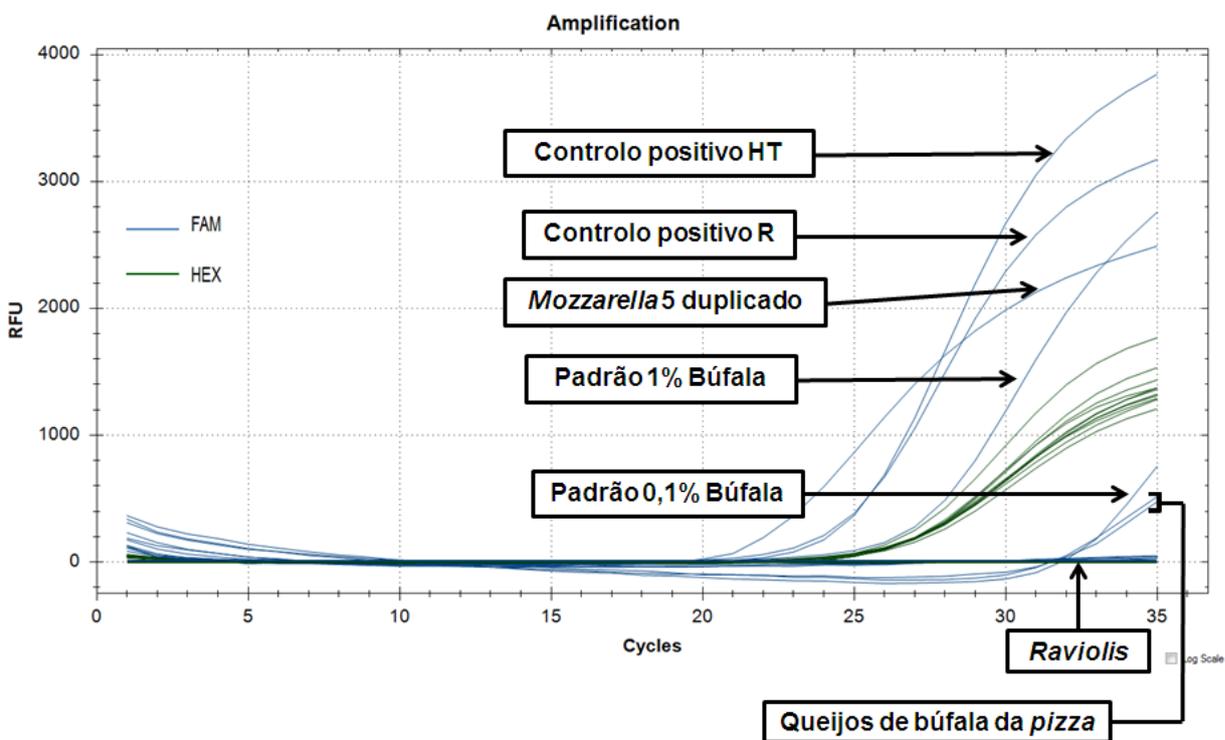
Sonda	Amostra	Valor do Ct
FAM	Queijo <i>mozzarella</i> 1 A	18,59
FAM	Queijo <i>mozzarella</i> 1 A duplicado	16,84
FAM	Queijo <i>mozzarella</i> 1 A paralelo	17,99
FAM	Queijo <i>mozzarella</i> DOP 2	24,10
FAM	Queijo <i>mozzarella</i> DOP 1	22,09
FAM	Queijo <i>mozzarella</i> 2	21,12
FAM	Queijo <i>mozzarella</i> DOP 3 paralelo	16,14
FAM	Queijo <i>mozzarella</i> DOP 3 paralelo duplicado	18,76
FAM	Queijo <i>mozzarella</i> DOP 3	19,09
FAM	Queijo <i>mozzarella</i> DOP 3 duplicado	17,16
FAM	Queijo fresco paralelo duplicado	16,95
FAM	Queijo fresco paralelo	16,51
FAM	Queijo fresco duplicado	17,46
FAM	Queijo fresco	17,41
FAM	Queijo <i>mozzarella</i> 4	19,04
FAM	Queijo <i>mozzarella</i> 4 duplicado	18,96
FAM	Queijo <i>mozzarella</i> DOP 4	18,60
FAM	Queijo <i>mozzarella</i> DOP 4 duplicado	16,10
FAM	Queijo <i>mozzarella</i> 1 B	15,22
FAM	Queijo <i>mozzarella</i> 1 B duplicado	15,04
FAM	Queijo <i>mozzarella</i> 5	26,99
FAM	Padrão 1% Búfala	24,92

**Tabela 16-** Valores do Ct das amostras de queijos derivados de leite de búfala (com exceção do duplicado do queijo *mozzarella* 5, de queijo de búfala da *pizza* e *ravioli* e dos respetivos duplicados destas últimas duas amostras), necessários para as analisar quanto à presença de leite de búfala (Cont.).

Sonda	Amostra	Valor do Ct
FAM	Padrão 0,1% Búfala	26,82
FAM	Branco Búfala	N/A
FAM	Controlo Positivo Búfala	17,87
FAM	Controlo Negativo Búfala	34,09
HEX	Queijo <i>mozzarella</i> 1 A	22,80
HEX	Queijo <i>mozzarella</i> 1 A duplicado	22,36
HEX	Queijo <i>mozzarella</i> 1 A paralelo	23,09
HEX	Queijo <i>mozzarella</i> DOP 2	21,94
HEX	Queijo <i>mozzarella</i> DOP 1	23,09
HEX	Queijo <i>mozzarella</i> 2	22,24
HEX	Queijo <i>mozzarella</i> DOP 3 paralelo	22,63
HEX	Queijo <i>mozzarella</i> DOP 3 paralelo duplicado	22,70
HEX	Queijo <i>mozzarella</i> DOP 3	22,83
HEX	Queijo <i>mozzarella</i> DOP 3 duplicado	23,04
HEX	Queijo fresco paralelo duplicado	19,08
HEX	Queijo fresco paralelo	23,04
HEX	Queijo fresco duplicado	22,01
HEX	Queijo fresco	22,18
HEX	Queijo <i>mozzarella</i> 4	22,40
HEX	Queijo <i>mozzarella</i> 4 duplicado	22,64
HEX	Queijo <i>mozzarella</i> DOP 4	22,71
HEX	Queijo <i>mozzarella</i> DOP 4 duplicado	22,74

**Tabela 16-** Valores do Ct das amostras de queijos derivados de leite de búfala (com exceção do duplicado do queijo *mozzarella* 5, de queijo de búfala da *pizza* e *ravioli* e dos respetivos duplicados destas últimas duas amostras), necessários para as analisar quanto à presença de leite de búfala (Cont.).

Sonda	Amostra	Valor do Ct
HEX	Queijo <i>mozzarella</i> 1 B	19,01
HEX	Queijo <i>mozzarella</i> 1 B duplicado	18,69
HEX	Queijo <i>mozzarella</i> 5	23,38
HEX	Padrão 1% Búfala	22,77
HEX	Padrão 0,1% Búfala	21,57
HEX	Branco Búfala	22,03
HEX	Controlo Positivo Búfala	22,06
HEX	Controlo Negativo Búfala	34,09



**Figura 20-** Representação gráfica da fluorescência em função do número de ciclos, obtida por PCR em tempo real, para analisar as amostras de queijo derivados de leite de búfala em *pizza* e *ravioli* (e dos seus respetivos duplicados) e do duplicado da amostra de queijo *mozzarella* 5 quanto à presença de leite de búfala.

**Tabela 17-**Valores do Ct das amostras de queijo de búfala em *pizza* e *ravioli* (e dos seus respetivos duplicados) e do duplicado da amostra de queijo *mozzarella 5*, necessários para as analisar quanto à presença de leite de búfala.

Sonda	Amostra	Valor do Ct
FAM	Queijo de búfala da <i>pizza</i>	31,61
FAM	Queijo de búfala da <i>pizza</i> duplicado	31,56
FAM	Queijo <i>mozzarella 5</i> duplicado	19,49
FAM	<i>Ravioli</i>	29,71
FAM	<i>Ravioli</i> duplicado	29,93
FAM	Padrão 1% Búfala	20,35
FAM	Padrão 0,1% Búfala	31,91
FAM	Branco Búfala	31,52
FAM	Controlo Positivo R Búfala	18,68
FAM	Controlo Positivo HT Búfala	20,70
FAM	Controlo Negativo Búfala	31,04
HEX	Queijo de búfala em <i>pizza</i>	19,32
HEX	Queijo de búfala em <i>pizza</i> duplicado	17,91
HEX	Queijo <i>mozzarella 5</i> duplicado	23,08
HEX	<i>Ravioli</i>	16,72
HEX	<i>Ravioli</i> duplicado	22,13
HEX	Padrão 1% Búfala	22,31
HEX	Padrão 0,1% Búfala	17,58
HEX	Branco Búfala	19,71
HEX	Controlo Positivo R Búfala	22,95
HEX	Controlo Positivo HT Búfala	20,73
HEX	Controlo Negativo Búfala	22,54

Ao analisar a figura 19 e 20 e as tabelas 16 e 17, pode-se verificar que quase todas as amostras que dizem ser produzidas a partir de leite de búfala, realmente contêm leite de búfala, uma vez que apresentaram um valor de Ct inferior ao limite de detecção do *kit* (padrão 0,1%), sendo validadas pelo facto do controlo interno (HEX) de todas elas ter amplificado, assim como ter ocorrido amplificação no controlo positivo (FAM). O controlo negativo (FAM) da tabela 16 e o controlo negativo e o branco (FAM) da tabela 17 apresentam um valor de Ct não nulo, o que demonstra que houve amplificação (dado que os valores de Ct são muito altos, esta amplificação ocorreu no final da reação de PCR), contudo considera-se que não é algo significativo, sendo as amostras consideradas válidas.

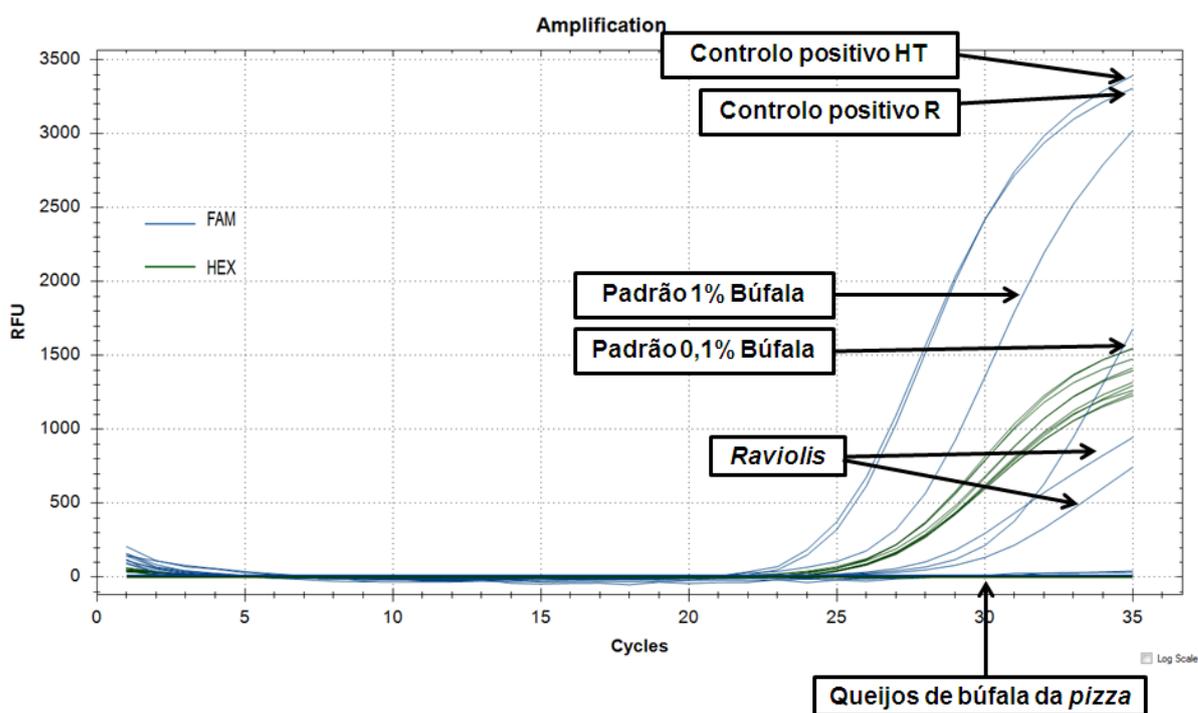
Contudo, as amostras de queijo de búfala em *pizza* e de *ravioli* (juntamente com os seus respetivos duplicados), não apresentaram amplificação (no caso dos *raviolis*) ou então apresentaram pouca amplificação e inferior ao padrão 0,1% de búfala (no caso do queijo de búfala em *pizza*). Isto não indica necessariamente que se trata de amostras que sejam resultado de uma fraude, pois como são matrizes muito processadas, pode não se ter conseguido extrair ADN de qualidade e em quantidade. Como tal, foi-se repetir a preparação das amostras e a extração do ADN. Neste último passo, aumentou-se a quantidade de proteinase K (pipetando-se 45 µL em vez de 40 µL) e o tempo em que as amostras foram colocadas na placa térmica também foi superior (3 horas). Além disso, também se diminuiu o volume adicionado de tampão de eluição, pipitando-se 50 µL em vez de 100 µL. Após a extração, foi-se quantificar o ADN (Tabela 18).

**Tabela 18-**Valores obtidos através da quantificação de 1µL de amostra para os *raviolis*, queijos de búfala em *pizza* e os respetivos duplicados de ambas as amostras.

<u>Amostra</u>	<u>Quantificação (ng/µL)</u>
<i>Ravioli</i>	11,50
<i>Ravioli duplicado</i>	T.L.
Queijo de búfala em <i>pizza</i>	T.L.
Queijo de búfala em <i>pizza duplicado</i>	2,22

Ao analisar a tabela 18 verifica-se que mais uma vez que há amostras com um valor demasiado baixo para quantificar (T.L.).

De seguida, realizou-se novo PCR em tempo real para estas amostras (Figura 21), estando mencionados os valores de Ct do ensaio de PCR em tempo real na tabela 19.



**Figura 21-** Representação gráfica da fluorescência em função do número de ciclos, obtida por PCR em tempo real, para analisar o queijo derivado de leite de búfala em *pizza*, o *ravioli* e os respetivos duplicados de ambas as amostras quanto à presença de leite de búfala, após nova extração de ADN.

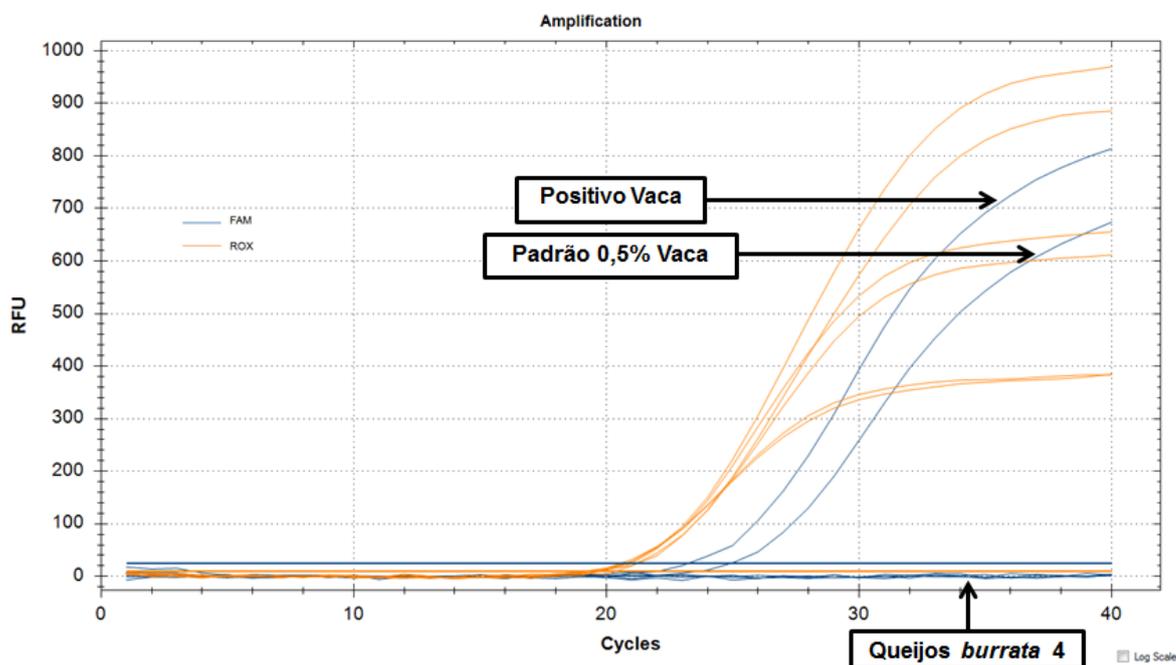
**Tabela 19-** Valores do Ct das amostras do queijo derivado de leite de búfala em *pizza*, do ravioli e dos respetivos duplicados de ambas as amostras, necessários para as analisar quanto à presença de leite de búfala, após nova extração de ADN.

Sonda	Amostra	Valor do Ct
FAM	Queijo de búfala em <i>pizza</i>	31,49
FAM	Queijo de búfala em <i>pizza</i> duplicado	30,60
FAM	<i>Ravioli</i>	23,21
FAM	<i>Ravioli</i> duplicado	22,52
FAM	Padrão 1% Búfala	21,06
FAM	Padrão 0,1% Búfala	23,68
FAM	Branco Búfala	29,57
FAM	Controlo Positivo HT Búfala	21,47
FAM	Controlo Positivo R Búfala	21,03
FAM	Controlo Negativo Búfala	3,91
HEX	Queijo de búfala em <i>pizza</i>	22,66
HEX	Queijo de búfala em <i>pizza</i> duplicado	22,74
HEX	<i>Ravioli</i>	22,35
HEX	<i>Ravioli</i> duplicado	22,16
HEX	Padrão 1% Búfala	19,27
HEX	Padrão 0,1% Búfala	22,39
HEX	Branco Búfala	18,57
HEX	Controlo Positivo HT Búfala	21,47
HEX	Controlo Positivo R Búfala	21,05
HEX	Controlo Negativo Búfala	22,23

Ao analisar o gráfico (Figura 21) e os valores Ct (Tabela 19), pode-se verificar que o controlo interno (HEX) amplificou, assim como os controlos positivos (FAM). O branco e o

controlo negativo (FAM) são considerados negativos. Apesar destes apresentarem um valor de Ct não nulo, são consideradas amostras válidas, uma vez que esses valores se devem a uma ligeira amplificação derivada de um ADN vestigial. Reunidos estes fatores podemos considerar as amostras válidas. Os *raviolis* apresentaram amplificação (FAM), contudo, apesar de ter um valor de Ct inferior ao do padrão de 0,1%, é baixa. Neste PCR em tempo real as amostras de queijo de leite de búfala em *pizza* não amplificaram (FAM). Tal como no PCR anterior, não se conseguiu extrair ADN em quantidade suficiente para se retirar conclusões.

Fez-se um último PCR em tempo real para uma amostra de queijo *burrata* de leite de búfala. Esta amostra encontra-se separada das demais devido à dificuldade de encontrar no mercado português um queijo *burrata* que só tivesse na sua constituição leite de búfala e não uma mistura com leite de vaca. Por esse motivo só se obteve este produto depois de já se ter realizado o PCR das outras amostras de queijo de leite de búfala. Assim como aconteceu em todas as outras amostras fabricadas com leite desta espécie, primeiro foi-se analisar quanto à presença de leite de vaca (Figura 22) e posteriormente de leite de búfala (Figura 23). Nas tabelas 20 e 21 vêm os respetivos valores de Ct.



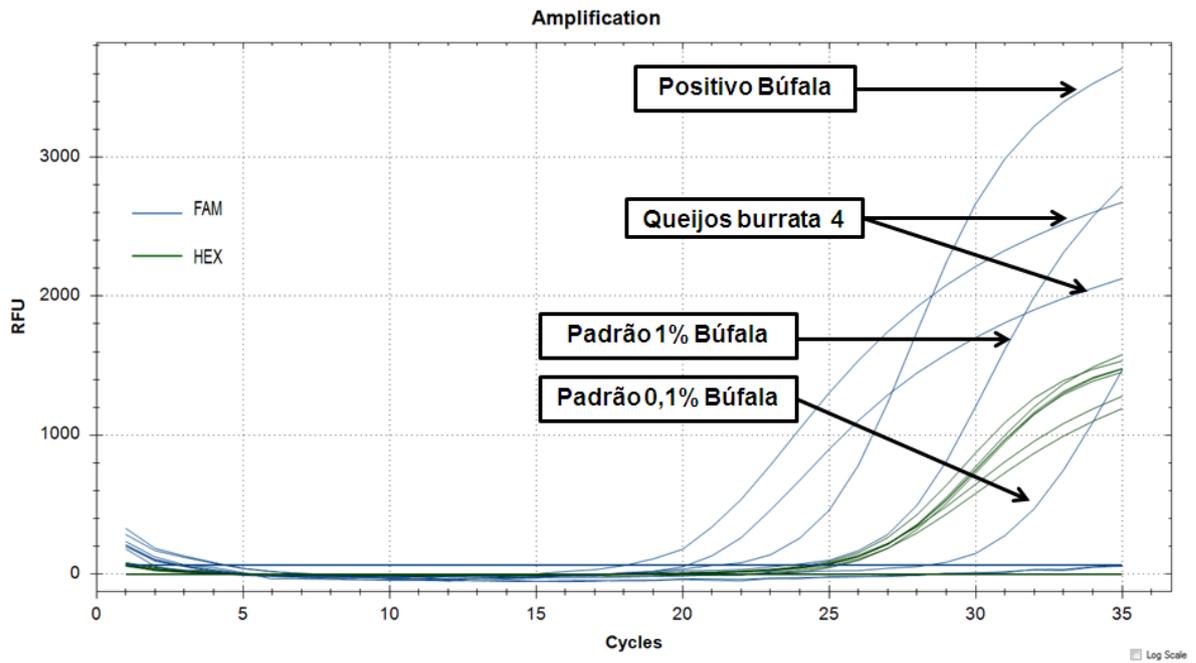
**Figura 22-** Representação gráfica da fluorescência em função do número de ciclos, obtida por PCR em tempo real, para analisar o queijo *burrata* 4 e o seu duplicado quanto à presença de leite de vaca.

**Tabela 20-** Valores do Ct da amostra de queijo *burrata 4* e do seu duplicado, necessários para as analisar quanto à presença de leite de vaca.

Sonda	Amostra	Valor do Ct
FAM	Queijo <i>burrata 4</i>	N/A
FAM	Queijo <i>burrata 4</i>	N/A
FAM	Padrão 0,5% Vaca	24,94
FAM	Branco Vaca	N/A
FAM	Controlo Positivo Vaca	23,24
FAM	Controlo Negativo Vaca	N/A
ROX	Queijo <i>burrata 4</i>	19,13
ROX	Queijo <i>burrata 4</i>	19,28
ROX	Padrão 0,5% Vaca	19,77
ROX	Branco Vaca	19,54
ROX	Controlo Positivo Vaca	19,66
ROX	Controlo Negativo Vaca	20,40

Após os resultados obtidos na figura 22 e na tabela 20, pode-se concluir que o queijo *burrata 4* não tem na sua constituição leite de vaca, uma vez que não houve amplificação da amostra e do respetivo duplicado (FAM) (apresentando assim na tabela 20 um N/A no valor do Ct). No controlo interno (ROX) houve amplificação. Tanto o controlo negativo como o branco (FAM) não amplificaram, tendo sido o controlo positivo e o padrão 0,5% de vaca, os únicos onde ocorreu amplificação neste canal.

De seguida, foi-se analisar a amostra do queijo *burrata 4* e do seu duplicado, quanto à presença de leite de búfala (Figura 23).



**Figura 23-** Representação gráfica da fluorescência em função do número de ciclos, obtida por PCR em tempo real, para analisar o queijo *burrata 4* e o seu duplicado quanto à presença de leite de búfala.

**Tabela 21-** Valores do Ct da amostra de queijo *burrata 4* e do seu duplicado, necessários para as analisar quanto à presença de leite de búfala.

Sonda	Amostra	Valor do Ct
FAM	Queijo <i>burrata 4</i>	20,15
FAM	Queijo <i>burrata 4</i>	18,05
FAM	Padrão 1% Búfala	23,59
FAM	Padrão 0,1% Búfala	28,34
FAM	Branco Búfala	N/A
FAM	Controlo Positivo Búfala R	21,13
FAM	Controlo Negativo Búfala	N/A
HEX	Queijo <i>burrata 4</i>	21,88
HEX	Queijo <i>burrata 4</i>	17,36
HEX	Padrão 1% Búfala	19,14
HEX	Padrão 0,1% Búfala	22,59
HEX	Controlo Positivo Búfala R	17,44
HEX	Controlo Negativo Búfala	17,35

Através dos resultados obtidos ao analisar a amostra de queijo *burrata 4* para a presença de leite de búfala (Figura 23 e Tabela 21), verifica-se que houve amplificação, tanto da amostra como do seu duplicado. Os valores de Ct no FAM desta amplificação foram bastantes inferiores ao do limite de deteção (padrão 0,1%) e também ao do padrão 1%. O facto do controlo negativo e do branco (FAM) não terem amplificado (tendo assim sido atribuído um N/A no respetivo valor do Ct da tabela 21) e do controlo positivo (FAM) e do controlo interno (HEX) terem amplificado, evidencia validam esta amostra como sendo positiva quanto à presença de leite de búfala.

## **2.5- Conclusão**

As fraudes alimentares já acontecem há milhares de anos. Os produtores alteram os géneros alimentícios de maneira a poderem obter um maior lucro económico. No caso dos queijos, pode ocorrer por exemplo a junção de leite de outras espécies, de água ou até de substâncias não comestíveis. Para que o consumidor consiga fazer uma compra consciente e informada, é fundamental que lhe seja fornecida informação completa e correta sobre o género alimentício em questão. No mercado dos queijos existe uma variedade imensa de produtos, sendo eles de diversas formas, tipos de matrizes e matérias-primas. Os queijos produzidos com leite de búfala apresentam um valor de mercado mais elevado, uma vez que a matéria-prima não é tão abundante como por exemplo o leite de vaca. Contudo, o leite de búfala e seus derivados trazem numerosos benefícios para a saúde e bem-estar dos consumidores. Todos estes fatores fazem com que este nicho de mercado se encontre em expansão.

Em relação aos queijos de leite de búfala, a fraude mais provável de acontecer é a sua mistura com leite de vaca, uma vez que este é mais barato. Misturar leite de búfala com, por exemplo, leite cabra, não trazia um lucro tão elevado para o produtor uma vez que este leite é mais caro do que o de bovino.

Para avaliar a autenticidade dos queijos utilizou-se a técnica de PCR em tempo real, antecedida por uma série de passos até à obtenção de ADN amplificável. As amostras de queijos de leite de búfala obtidos foram assim analisadas quanto à presença de ADN de búfala e de ADN de vaca, para se perceber se tinha ocorrido junção de leite de vaca aquando o fabrico dos mesmos. Contudo, não se analisou só amostras de queijos da espécie alvo, mas também amostras de queijos de leite de vaca e também outras matrizes, como leite de vaca, lasanha de porco, hambúrguer de novilho e uma amostra de ensaio de competência externa que se declarava ser de ovelha.

Antes de se ter procedido à análise das amostras de queijos derivados de leite de búfala para verificar a sua autenticidade, foi-se implementar o método para a deteção da espécie *Bubalus bubalis* por PCR em tempo real no laboratório. Para isso, foi necessário estabelecer/ cumprir vários passos:

- Primeiro encontrou-se o limite de deteção que correspondeu ao padrão 0,1% e procedeu-se à sua validação. Conseguiu-se também amplificar o padrão 0,01%, contudo uma das curvas de amplificação evidenciava já não ser tão característica.
- Utilizou-se 23 ensaios com diferentes tipos de matrizes (queijos provenientes de supermercados de grandes superfícies, de restaurantes e de uma queijaria regional, um

leite meio gordo de vaca, um hambúrguer e uma lasanha de um supermercado das grandes superfícies, e uma amostra de ensaio de competência externa), dois quais 13 eram amostras de ou com queijos de leite de búfala e dessas, 11 obtiveram um resultado positivo.

- Utilizou-se 3 organismos diferentes do alvo em que não pode ocorrer a amplificação dos mesmos, funcionando assim como ensaios de selectividade em condições laboratoriais, tendo sido realizada a deteção de cavalo e galinha no hambúrguer de vaca e na lasanha de porco e a deteção de vaca no ensaio de competência externa e nas amostras de queijo de leite búfala.
- Neste trabalho realizaram-se 16 ensaios de duplicados e 4 de paralelos, de forma a cumprir o procedimento de implementação de métodos rotinados no Laboratório de Segurança Alimentar. Nestes ensaios obtiveram-se sempre resultados concordantes.

As amostras de lasanha de porco e hambúrguer de vaca foram não apresentaram vestígios de galinha ou de cavalo.

A amostra do ensaio de competência externa foi analisada para 3 espécies, revelando-se ser positiva para ovelha e cabra e negativa para vaca. Os resultados obtidos são idênticos aos obtidos pelos técnicos do Laboratório de Segurança Alimentar da ASAE.

As 7 amostras de queijos de leite de vaca e as duas amostras de leite meio gordo de vaca foram analisados quanto à presença de vaca. Todas estas amostras foram consideradas positivas.

Para este trabalho analisou-se 13 amostras de ou com queijo de leite de búfala que foram testadas quanto à presença de leite de vaca e de leite de búfala.

Ao analisar a presença de leite de vaca nas amostras cujo rótulo dizia ser queijo de leite de búfala, concluiu-se que não se estava perante uma adulteração com leite de bovino. As amostras queijo *mozzarella* 5, *ravioli*, queijo de leite de búfala em *pizza* e os respetivos duplicados apresentaram alguma amplificação, contudo são consideradas negativas uma vez que apresentam uma amplificação inferior ao padrão 0,5% de vaca (limite de deteção para a espécie vaca). Todas as restantes amostras também foram consideradas negativas quanto à presença de leite de vaca, não tendo amplificado.

Depois de se analisar as amostras para perceber se havia leite de vaca, foi-se testá-las para a presença de leite de búfala. Mais uma vez, através de PCR em tempo real, conseguiu-se perceber que quase todas tinham leite de búfala, apresentando um valor de Ct menor do que o do limite de deteção (padrão 0,1%). Contudo, com as amostras processadas (queijo de leite de búfala em *pizza* e *ravioli*) foi mais difícil tirar uma conclusão. No primeiro PCR em tempo

real, o queijo de leite de búfala em *pizza* apresentou uma amplificação baixa, muito perto do limite de detecção e, no caso dos *raviólis*, não houve qualquer amplificação. Como tal, foi-se realizar uma segunda extração onde se fizeram algumas otimizações ao protocolo, de maneira a facilitar a extração de ADN amplificável. Neste segundo PCR os resultados obtidos foram ligeiramente diferentes. A amostra de *ravioli*, apresentou desta vez uma amplificação (contudo baixa) e o queijo de leite de búfala em *pizza* não amplificou. Estes resultados evidenciam que estamos perante amostras muito processadas (tratamento térmico, adição de condimentos, etc.) o que provoca uma degradação do ADN presente, fazendo com que a extração de ADN se torna muito difícil em termos de qualidade e de quantidade. Assim sendo, nestas amostras não é possível tirar conclusões quanto à sua autenticidade.

Para este trabalho foi feita uma procura exaustiva para encontrar amostras de queijos de leite de búfala, uma vez que no mercado nacional não se encontram muitos produtos disponíveis. Com os resultados obtidos a partir das amostras recolhidas, pode-se extrapolar que os queijos derivados de leite de búfala presentes no mercado nacional não são adulterados com leite de vaca.

### **3- Referências bibliográficas**

AFONSO, A. - Metodologia HACCP Prevenir os acidentes alimentares. Segurança e Qualidade Alimentar. ISSN 0379-0355. Nº1 (2006), p.1–4.

AFONSO, A. - Análise de perigos. Segurança e Qualidade Alimentar. Nº5 (2008), p.26–28.

AGROBIO - Associação portuguesa de Agricultura Biológica. O que é a Agricultura Biológica? [Consult. 1 junho 2019]. <https://agrobio.pt/agricultura-biologica/o-que-e/>

AHMAD, S.; GAUCHER, I.; ROUSSEAU, F.; BEAUCHER, E.; PIOT, M.; GRONGNET, J.F. - Effects of acidification on physico-chemical characteristics. Food Chemistry. Vol. 106 (2008), p.11–17

ANSARI, M. A.; KUMAR, V.; SINGH, C.; SHUKLA, V.; KUMAER, R. - Studies on Food Safety Management and It's Significance in Maximizing the Profit for Food Industry. Internet Journal of Food Safety. Vol.15 (2013), p.20–28.

ARYA, M.; SHERGILL, I.; WILLIAMSON, M.; GOMMERSALL, L.; ARYA, N.; PATEL, H. - Basic principles of real-time quantitative PCR. Expert review of Molecular Diagnostics. Vol.5, Nº2 (2005), p.1–11.

ASAE ([s.d.]<sup>a</sup>) - Autoridade de Segurança Alimentar e Económica. **Perigos de Origem Alimentar** [Consult. 6 maio 2019]. <https://www.asae.gov.pt/cientifico-laboratorial/area-tecnico-cientifica/perigos-de-origem-alimentar.aspx>

ASAE ([s. d.]<sup>b</sup>) - Autoridade de Segurança Alimentar e Económica. **Rotulagem de Géneros Alimentícios** [Consult. 12 maio 2019]. <https://www.asae.gov.pt/perguntas-frequentes1/rotulagem-de-generos-alimenticios-.aspx>

ASAE ([s. d.]<sup>c</sup>) - Autoridade de Segurança Alimentar e Económica. **Estatuto de Laboratório Acreditado** [Consult. 14 maio 2019].: <http://www.asae.gov.pt/laboratorio-de-seguranca-alimentar/estatuto-de-laboratorio-acreditado-.aspx>

ASAE ([s. d.]<sup>d</sup>) - Autoridade de Segurança Alimentar e Económica. **Missão, Visão e Valores** [Consult. 14 maio 2019]. <https://www.asae.gov.pt/asae20/missao-visao-e-valores.aspx>

ASAE ([s. d.]<sup>e</sup>) - Autoridade de Segurança Alimentar e Económica. **Produtos Tradicionais** [Consult. 15 maio 2019]. <https://www.asae.gov.pt/perguntas-frequentes1/produtos-tradicionais.aspx>

ASAE (2017) - Autoridade de Segurança Alimentar e Económica. **A Qualidade num Laboratório de Análises de Alimentos** [Consult. 15 maio 2019]. Disponível em <https://www.asae.gov.pt/newsletter2/asaenews-n-107-maio-2017/a-qualidade-num-laboratorio-de-analises-de-alimentos.aspx>

ASAE (2019) - Autoridade de Segurança Alimentar e Económica. **Laboratório de Segurança Alimentar** [Consult. 15 maio 2019]. <https://www.asae.gov.pt/cientifico-laboratorial/laboratorio-de-seguranca-alimentar.aspx>

BAPTISTA, P.; LINHARES, M. - **Higiene e Segurança Alimentar na Restauração- Volume 1- Iniciação**. Forvisão ed. Guimarães : [s.n.]. ISBN 972-99099.

BAPTISTA, P.; VENÂNCIO, A. - **Os perigos para a segurança alimentar no processamento de alimentos**. Guimarães: Forvisão, 2003. ISBN 972-99099-3-8.

BARRADAS, J.; SAMPAIO, P. - A ISO 9001 e a ISO 17025 num Laboratório de Metrologia. Encontro Nacional de Engenharia e Gestão Industrial. (2011), p.357–358.

BRISSOS, S. - **Segurança Alimentar e Nutricional Global: Evolução conceptual, desafios atuais e indicadores de medida**. Lisboa : Working Paper CEsa CSG 149, (2016).

BURCHI, F.; MURO, P. - From food availability to nutritional capabilities: Advancing food security analysis. Food policy. Vol.60 (2016), p.10–19.

CARUS, W. Seth - **Bioterrorism and Biocrimes: The Illicit Use of Biological Agents Since 1900**. Washington, D.C. : Center for Counterproliferation Research, National Defense University, (2001).

CHEN, B.; JANES, H. - **PCR cloning Protocols**. 2ªED. New Jersey: Humana Press, 2002. ISBN 0-89603-969-2.

COMISSÃO EUROPEIA - **Segurança dos Alimentos** [Consult. 21 maio 2019]. [https://ec.europa.eu/info/strategy/food-safety\\_pt](https://ec.europa.eu/info/strategy/food-safety_pt)

DALMASSO, A.; CIVERA, T.; LA NEVE, F.; BOTTERO, M.T. - Simultaneous detection of cow and buffalo milk in mozzarella cheese by Real-Time PCR assay. Food Chemistry. ISSN 0308-8146. Vol.124, N°1 (2011), p.362–366.

DECISÃO N° 1082/2013 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 22 de Outubro relativa às

ameaças sanitárias transfronteiriças graves e que revoga a Decisão n.o 2119/98/CE, Jornal Oficial da União Europeia, L 293, 2013.

DOURTOGLOU, V. G.; DOURTOGLOU, T.; ANTONOPOULOS, A.; STEFANOY, E.; LALAS, S. POULOS, C. - Detection of olive oil adulteration using principal component analysis applied on total and regio FA content. Journal of the American Oil Chemists' Society. ISSN 0003-021X. Vol.80, N°3 (2003), p.203–208.

LIU, J.J.; LIANG, A.X.; CAMPANILE, G.; PLASTOW, G., ZHANG, C.; WANG, Z.; SALZANO, A. ; GASPARRINI, B.; CASSANDRO, M.; YANG, L.G. - Genome-wide association studies to identify quantitative trait loci affecting milk production traits in water buffalo. Journal of Dairy Science. Vol.101, N°1 (2018), p.433–444.

EUROPEAN FOOD INFORMATION COUNCIL - **Difference Between Hazard and Risk** [Consult. 15 maio 2019]. Disponível em <https://www.eufic.org/en/understanding-science/article/hazard-vs.-risk-infographic>

EVERSTINE, K.; SPINK, J.; KENNEDY, S. - Economically motivated adulteration (EMA) of food: common characteristics of EMA incidents. Journal of Food Protection. Vol.76, N°4 (2013), p.723–735.

Generon ([s.d.])- VERYfinder Buffalo (Bubalus bubalis) Semi-Q Assay, adquirido à Selectingredient limitada, Estoril, Portugal.

GILLING, S. J.; TAYLOR, E. A.; KANE, K.; TAYLOR, J. Z. - Successful Hazard Analysis Critical Control Point Implementation in the United Kingdom : Understanding the Barriers through the Use of a Behavioral Adherence Model. Journal of Food Protection. Vol.64, N°5 (2001), p.710–715.

GRAÇA, P.; GREGÓRIO, M. J. - Evolução da política alimentar e de nutrição em portugal e suas relações com o contexto internacional. Revista de Alimentacao Humana. ISSN 0873-4364. Vol.18, N°3 (2012), p.79–96.

INSTITUTO PORTUGUÊS DE ACREDITAÇÃO - **A Acreditação** [Consult. 14 maio 2019]. <http://www.ipac.pt/ipac/funcao.asp>

KUBISTA, M.; ANDRADE, J. M.; BENGTSSON, M.; FOROOTAN, A.; JONÁK, J.; LIND, K.; SINDELKA, R.; SYOBACK, R.; SJOGREEN, B.; STROMBOM, L.; STAHLBERG, A.; ZORIC, N. - The real-time polymerase chain reaction: Review. Molecular Aspects of Medicine. ISSN 0098 2997. Vol.27 (2006), p. 95–125.

MANNING, L.; SOON, J.- Food safety, food fraud and food defense: A fast evolving literature. Journal of Food Science. Vol.81, N°4 (2016), p.823–834.

MEIRA, L.; MAFRA, I.; COSTA, J.; AMARAL, J. S.; RAMOS, F.; OLIVEIRA, M.B.P.P. - Novas metodologias para a identificação de adulterações de produtos cárneos com carne de cavalo. **Riscos e Alimentos - Carne e Produtos Cárneos**. N°9 (2015), p.4–7.

MEIRA, L., COSTA, J., VILLA, C., RAMOS, F., OLIVEIRA, M.B.P.P., MAFRA, I. - EvaGreen real-time PCR to determine horse meat adulteration in processed foods. LWT - Food Science and Technology, Vol.75 (2017), p.408–416.

MIL-HOMENS, S. - **HACCP** [Consult. 9 maio 2019]. <http://www.asae.gov.pt/pagina.aspx?back=1&codigono=54105579AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA> A>.

MOORE, J. C.; SPINK, J.; LIPP, M. - Development and Application of a Database of Food Ingredient Fraud and Economically Motivated Adulteration from 1980 to 2010. Journal of Food Science. Vol. 77, N° 4 (2012), p.118–126.

NP EN ISO/IEC 17025 (2005). Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. - PCR em tempo real. Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento. N°33 (2004), p.10–13.

NucleoSpin Food ([s.d.])- DNA, RNA and protein purification, adquirido à Fisher Scientific, Lisboa, Portugal.

Parlamento Europeu - food crisis, fraud in the food chain and the control thereof. Draft Report (2013).

PELT-VERKUIL, E.; BELKUM, A.; HAYS, J. P. - **Principles and Technical Aspects of PCR Amplification**. Springer, 2008. ISBN 978-1-4020-6240-7.

PINSTRUP- ANDERSEN, P. - Food security: definition and measurement. Food Science. Vol.1 (2009), p.5-7.

PITACAS, F. I.; RODRIGUES, A. M. - Produção de búfalos de leite na Europa. Agroforum. Vol.31, Nº21 (2013).

Qubit ([s.d.])- The Qubit® 2.0 Fluorometer, adquirido à Alfagene, Lisboa, Portugal.

REGULAMENTO (CE) Nº 178/2002 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 28 de Janeiro, que determina os princípios e normas gerais da legislação alimentar, cria a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos e estabelece procedimentos em matéria de segurança dos géneros alimentícios, Jornal Oficial das Comunidades Europeias, L31, 2012.

REGULAMENTO (UE) Nº 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 25 de Outubro, relativo à prestação de informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios, que altera os Regulamentos (CE) n. o 1924/2006 e (CE) n. o 1925/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho e revoga as Directivas 87/250/CEE da Comissão, 90/496/CEE do Conselho, 1999/10/CE da Comissão, 2000/13/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, 2002/67/CE e 2008/5/CE da Comissão e o Regulamento (CE) N.º 608/2004 da Comissão, Jornal Oficial da União Europeia, L304, 2011.

RICCI, G. D.; DOMINGUES, P. F. - O leite de búfala. Revista de educação continuada em medicina veterinária e zootecnia do CRMV-SP. Vol.10, Nº1 (2012), p.14–19.

RODRÍGUEZ-LÁZARO, D.; HERNÁNDEZ, M. - Real-time PCR in Food Science: Introduction. Current Issues in Molecular Biology. ISSN 1467-3045. Vol.15 (2015), p.25–38.

ROSATI, A.; VAN VLECK, L.D. - Estimation of genetic parameters for milk, fat, protein and mozzarella cheese production for the Italian river buffalo *Bubalus bubalis* population. Livestock Production. Vol.74 (2002), p.185–190.

SAULL, J.; DUGGAN, C.; HOBBS, G.; EDWARDS, T. - The detection of Atlantic Cod (*Gadus morhua*) using loop mediated isothermal amplification in conjunction with a simplified DNA extraction process. Food Control. ISSN 0956-7135. Vol. 59 (2015), p.306–313.

SCHUMM, L. - **Food Fraud: A Brief History of the Adulteration of Food** atual. 2014. [Consult. 10 maio 2019]. <https://www.history.com/news/food-fraud-a-brief-history-of-the-adulteration-of-food>

SEVERINO, P.; ALMEIDA, D. - **Food Defense: Sistemas de Gestão Contra o Terrorismo Alimentar**. Lisboa: Publindustria, 2017. ISBN 9789897232350.

SHEARS, P. - Food Fraud , Current Issue but an Old Problem. The Plymouth Law and Criminal Justice Review. Vol.1 (2008), p.118–139.

SILVIS, I. C. J.; VAN RUTH, S. M.; VAN DER FELLS-KLERX, H.J.; LUNING, P. A. - Assessment of food fraud vulnerability in the spices chain: An explorative study. Food Control. ISSN 0956-7135. Vol.81 (2017), p.80–87.

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 (2006).

SPINK, J.; MOYER, D. C. - Defining the Public Health Threat of Food Fraud. Journal of Food Science. ISSN 0185-4038. Vol.76, N°9 (2011), p.157–163.

TOLA, A. - Global Food Fraud Trends and Their Mitigation Strategies : The Case of Some Dairy Products : A Review. Food Science and Quality Management. ISSN 2224-6088. Vol.77 (2018), p.30–42.

WALLACE, C. A.; HOLYOAK, L.; POWELL, S. C.; DYKES, Fiona C. - HACCP e The difficulty with Hazard Analysis. Food Control. Vol.35 (2014), p.233–240.

WONG, M. L.; MEDRANO, J. F. - Real-time PCR for mRNA quantitation: Review. BioTechniques. ISSN 0736-6205. Vol.39 (2005), p.75–85.