ProDOP Serra da Estrela

Proteção, Promoção e Potencialização do Queijo Serra da Estrela

Entregável 1.3

Relatório Técnico: Base de dados dos marcadores moleculares e documento técnico para implementação das metodologias desenvolvidas.

Parceiros envolvidos na tarefa 1.3	Universidade do Minho (responsável)
Data de Início da Tarefa 1.3	1 de abril de 2020
Data de Conclusão da Tarefa 1.3	31 de agosto de 2022

Índice

Índice de Tabelas 3

Introdução 4

Execução da tarefa 7

Bibliografia 11

Índice de Tabelas

Tabela 1. Soluções usadas na extração de DNA de leite e queijo através do método fenol-clorofórmio modificado 8

Tabela 2. *Primers* SCAR desenhados para amplificar um fragmento potencialmente específico da raça 'Mocha' e *primers* desenhados para amplificação da região D-loop do DNA mitocondrial de vaca e ovelha. MO- 'Mocha'. Tm- temperatura de melting 9

Introdução

O queijo Serra da Estrela é um produto português, com Denominação de Origem Protegida (DOP), com características organoléticas distintas. Este produto lácteo é considerado um dos melhores queijos de montanha a nível global e uma das 7 Maravilhas Gastronómicas Portuguesas. Enquanto produto DOP, a origem dos seus ingredientes deve cingir-se aos 18 concelhos autorizados na região da Serra da Estrela. Também o seu fabrico deve ser efetuado na região, obedecendo ao conjunto de práticas tradicionalmente estabelecidas, fazendo deste queijo um produto único e escasso nos mercados internacionais (ANCOSE).

Porém, devido à pressão da concorrência e falta de regulamentação no mercado, o seu valor tem vindo a cair consideravelmente desde a entrada no atual milénio. A queda do preço do produto final, tal como acontece na região vinhateira do Douro com os vinhos Douro DOC, poderá resultar numa desvalorização da matéria-prima de qual este queijo deve ser exclusivamente produzido, nomeadamente dos leites lactados pelas raças de ovelhas autóctones, 'Bordaleira Serra da Estrela' e 'Churra Mondegueira'. Consequentemente, poderá (continuar a) ocorrer erosão do tecido socioeconómico regional, devido ao desincentivo financeiro à atividade pastorícia, culminando num abandono crescente do território. Portugal, enquanto país repleto de microclimas únicos, poderá beneficiar de uma aposta no desenvolvimento rural baseado numa economia de produção de produtos alimentares autóctones que, devido à sua autenticidade, distinção sensorial, tradição e escassez permite basear nesta narrativa um posicionamento estratégico no mercado global. No atual cenário de muitas regiões portuguesas, frequentemente a exploração do território e extração dos seus recursos não resulta numa fixação de riqueza a nível local. Uma forte aposta no desenvolvimento regional, excluindo do âmbito deste projeto o atual debate sobre a regionalização, poderá apresentar vantagens evidentes na unificação do território português, na regeneração do tecido socioeconómico do interior e a nível de geração e fixação de riqueza. À semelhança do que se verificou durante os últimos 20 anos na região do Douro, num trabalho que está longe de concluído desde o seu reconhecimento enquanto Património Mundial pela UNESCO, uma forte integração entre a produção de produtos autóctones/regionais, a investigação científica, a reabilitação do território, o turismo e a formação de pessoas poderão contribuir para solucionar os problemas aqui mencionados (ANCOSE).

A problemática em torno da Iniciativa ProDop assenta na recorrente incorporação de leites de origem indevida no fabrico de queijo Serra da Estrela, dada a dificuldade em garantir

PDR 2020 PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO RURAL 2014·2020
PORTUGAL 2020
UNIÃO EUROPEIA Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural
A Europa Investe nas Zonas Rurais

a sua origem após a sua transformação no produto final. Tal prática culmina numa desacreditação do selo DOP enquanto garantia de qualidade e, portanto, na desvalorização do produto e no atraso do desenvolvimento regional. Assim, a prioridade assenta no reforço da credibilidade do selo DOP do queijo Serra da Estrela através do desenvolvimento de métodos analíticos que permitam detetar e desincentivar a produção fraudulenta deste escasso e distinto produto autóctone.

A identificação da origem da matéria-prima em produtos lácteos é, normalmente, efetuada através de métodos analíticos que utilizam proteínas e ácido desoxirribonucleico (DNA) como alvo, como ensaios imunológicos (Anguita, 1996), eletroforéticos e cromatográficos (Propping, 2002; Ferreira e Caçote, 2003). Devido à sua maior instabilidade, as proteínas são um alvo menos comum, sendo os métodos baseados em DNA normalmente mais fiáveis do que a avaliação e identificação da composição proteica destes alimentos (Lockley e Bardshley, 2002).

Comumente, métodos analíticos que utilizam DNA como alvo para deteção da origem de leite são baseados em amplificação de polimerase em cadeia (PCR), que permite a obtenção de um elevado número de moléculas de DNA a partir de amostras rarefeitas, na sua composição, neste ácido nucleico. As moléculas de DNA amplificadas podem, posteriormente, ser resolvidas através da sujeição a um gradiente eletroquímico que promove a sua migração através da matriz de géis de agarose e sua consequente separação, por peso molecular (Lockley e Bardshley, 2002). As técnicas de PCR podem não ter um alvo específico, baseando a sua capacidade de resolução na geração de "impressões digitais" reprodutíveis, frequentemente de difícil obtenção e/ou validação (Wiseman, 2002). Por outro lado, a técnica permite também amplificação de fragmentos de DNA com elevada especificidade, permitindo uma abordagem mais controlada e, eventualmente reprodutível, com prejuízo para a quantidade de informação obtida num único ensaio (Lockley e Bardshley, 2002; López-Cadella *et al*., 2005). A quantidade de informação, e consequente aumento do poder de resolução, pode ser aumentada utilizando técnicas como *multiplex* PCR (Rea *et al*., 2001), onde são amplificados vários locais genómicos em simultâneo, e PCR-RFLP (Plath *et al*., 1997), onde o fragmento amplificado por PCR é posteriormente sujeito a digestão com enzimas de restrição. A adequabilidade de métodos baseados em PCR específicos ou inespecíficos para autenticação de produtos lácteos deve ser avaliada caso-a-caso e determinada empiricamente, podendo exigir validação com amostras provenientes de um grande número de indivíduos e o seu sucesso sujeito à variabilidade experimental. Esta pode ser oriunda de diversos fatores, que

podem ser mais ou menos difíceis de controlar, como a quantidade de ácidos nucleicos na amostra, presença de inibidores reacionais, erros intrínsecos aos métodos de medição e às técnicas de transferência de líquidos (por exemplo, pipetagem), entre outros (Schrader *et al.*, 2002).

O DNA mitocondrial, dada a sua elevada estabilidade e ao elevado número de cópias presentes nas células somáticas dos mamíferos, assim como a sua elevada variabilidade, por comparação com o DNA genómico, torna-se um alvo interessante para identificação da origem dos leites utilizados no fabrico de queijo (Brown *et al.*, 1996; Ganopoulas *et al.*, 2013). Anteriormente verificado no âmbito desta Iniciativa, a região controlo do DNA mitocondrial (D-loop) permite efetuar a deteção de leite de vaca quando misturado com leite de ovelha, num desenho experimental, cuja elegância é primada pela sua simplicidade. Também devido à variabilidade intrínseca às moléculas de DNA mitocondrial, e especificamente a esta região, é possível que o D-loop seja um dos alvos mais interessantes para o desenvolvimento de métodos que se estendem, não só à distinção inter-espécie, mas também intra-espécie, nomeadamente inter-raça.

Posto isto, após a validação de todos os marcadores moleculares e estabelecimentos das metodologias foi criado um manual sobre a aplicação das metodologias desenvolvidas e validadas nas tarefas 1.1 e 1.2 da Iniciativa ProDop. Neste documento foi colocada uma descrição dos equipamentos e reagentes/consumíveis necessários, das condições do local de execução das análises, dos protocolos da metodologia a aplicar, requisitos de formação do analista e outras informações relevantes para que diferentes laboratórios e produtores de queijo possam se informar sobre esta tecnologia e implementar estas técnicas nos seus laboratórios de controlo.

Execução da tarefa

A tarefa 1.3 teve como finalidade construir uma base de dados de marcadores moleculares, assim como um manual sobre a aplicação de metodologias desenvolvidas e otimizadas após a validação de todos os marcadores moleculares. Neste documento consta a descrição dos equipamentos e reagentes/consumíveis necessários, das condições do local de execução das análises, dos protocolos da metodologia a aplicar, requisitos de formação do analista e outras informações relevantes para que diferentes laboratórios e produtores de queijo possam se informar sobre esta tecnologia e implementar estas técnicas nos seus laboratórios de controlo.

A Universidade do Minho (UM) teve um papel principal e fundamental na execução da tarefa 1.3 devido a todo o conhecimento e material/ equipamento que possuem na área de biologia molecular.

De seguida apresentam-se os tópicos que fazem parte do manual para a aplicação de metodologias moleculares desenvolvidas.

- ***Equipamentos e Reagentes/Consumíveis necessários***

Tendo em consideração a natureza da técnica desenvolvida serão necessários para a sua reprodução equipamentos e reagentes/consumíveis de uso comum na prática de biologia molecular. De uma forma geral serão necessários equipamentos encontrados normalmente em laboratórios, tais como frigorífico, arca -20 °C, microondas, banho de água e hotte de extração de gases. Especificamente, para aplicação da técnica desenvolvida, os equipamentos necessários consistem em micropipetas, microcentrífuga, espectrofotómetro para micro volumes, termociclador, sistema de eletroforese horizontal e transiluminador de luz UV. Além disso, são também necessários à realização destas técnicas consumíveis de uso regular em laboratório, tais como, microtubos (de centrífuga e PCR) e pontas para micropipetas. Os reagentes necessários estão especificados na secção da metodologia.

- ***Condições do local onde serão executadas as análises***

Apesar de ser de fácil realização e ser uma das técnicas mais habitualmente utilizada em laboratórios de investigação molecular, a técnica de PCR é um método sensível e, como tal, deverá existir uma área reservada à sua realização, que se deverá encontrar limpa e livre de possíveis fontes de contaminação.

PDR 2020 PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO RURAL 2014·2020
PORTUGAL 2020
UNIÃO EUROPEIA Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural A Europa Investe nas Zonas Rurais

- ***Protocolos da metodologia a aplicar***

1. Extração de DNA de leite e queijo

Adicionar 0,5 mL de solução clarificante (**Tabela 1**) a 1 mL de leite ou a 0,2 g de queijo dissolvido em 800 µL de água destilada, e misturar por inversão (10 vezes). Centrifugar a mistura a 13000 rpm numa microcentrífuga durante 5 min. Remover o sobrenadante e a camada superior cuidadosamente e ressuspender o *pellet* de células em 860 µL de tampão de extracção (**Tabela 1**), 100 µL de hidrocloreto de guanidina 5 M e 40 µl de Proteinase K 20 mg/mL. Incubar as amostras durante a noite a 55 °C, e de seguida arrefecê-las à temperatura ambiente. Adicionar 500 µL de fenol - clorofórmio-isoamilalcool (25:24:1) (PanReac AppliChem) ao lisado e centrifugar a 13000 rpm durante 15 min. Recuperar o sobrenadante aquoso transparente (500 µL) e precipitar o DNA adicionando 1 mL de álcool absoluto gelado e centrifugando a 13000 rpm durante 30 min. Descartar o sobrenadante e deixar o *pellet* secar. Ressuspender o DNA em 100 µL de água desionizada estéril e determinar a sua concentração num espectrofotómetro.

Tabela 1. Soluções usadas na extração de DNA de leite e queijo através do método fenol-clorofórmio modificado

Solução clarificante	0,25 M EDTA pH 8,0 0,5 % Triton X-100
Tampão de extração	10 mM Tris-HCl pH 7,5 150 mM NaCl 2 mM EDTA pH 8,0 1 % SDS

2. PCR para diferenciação de raças em amostras de leite e queijo

Preparar a mistura de reação com um volume final de 50 µL contendo 100 ng de DNA genómico, 3 mM $MgCl_2$, 0,1 µM de cada *primer* (**Tabela 2**, Diferencicação intra-espécie), 1 µM dNTP mix, tampão NZYTaq 1x e 2,5 U NZYTaq (NZYTech). Executar a amplificação com o seguinte programa: um passo de desnaturação inicial de 2 min a 95 °C, seguido de 45 ciclos consistindo em 1 min a 95 °C, 1 min a 63 °C e 30 s a 72 °C, terminado com um passo final de extensão a 72 °C durante 5 min.

Tabela 2. *Primers* SCAR desenhados para amplificar um fragmento potencialmente específico da raça 'Mocha' e *primers* desenhados para amplificação da região D-loop do DNA mitocondrial de vaca e ovelha. MO- 'Mocha'. Tm-temperatura de melting

Diferenciação	Primer	Sequência (5´->3´)	% GC	T (°C)	Fragmento(s) esperado (pb)
Intra-espécie	MO_GLA19_FW	CAAACGTCCGGTGGTTTCAAGG	54,5	58,9	244
	MO_INT_RV	TTACAATACTAAAGGCTGCCGACAG	44	56,9	
Inter-espécie	PRO	CACCATCAACCCCCAAAGCTGAAG	54	63	1181 (ovelha)
	PHE	CAGTGCCTTGCTTTGGGTTAAGC	52	62	910 (vaca)

3. PCR para diferenciação de espécies em amostras de leite

A reação de PCR deve ser realizada num volume final de 50 µl contendo 200 ng de DNA genómico, 4 mM $MgCl_2$, 1 µM de cada *primer* (**Tabela 2**, Diferenciação inter-espécie), 0,5 µM dNTPs mix, tampão NZYTaq 1x e 1,25 U NZYTaq II DNA polimerase (NZYTech). A amplificação foi executada no termociclador MyCycler™ Personal (BioRad), iniciando-se com um passo de desnaturação de 2 min a 95 °C, seguido de 35 ciclos consistindo em 1 min a 95 °C, 1 min a 60 °C e 30 s a 72 °C. O passo final de extensão a 72 °C teve a duração de 5 min.

4. Deteção dos produtos PCR em eletroforese em gel de agarose

Analisar 10 µL de produto de PCR em gel de agarose 1,5 % com GreenSafe Premium (Nzytech), em tampão TBE 1X, a 100 V durante 120 min. Visualizar e fotografar o gel num transiluminador de luz UV.

Em relação à reação de PCR para diferenciação intra-espécie, a deteção de leite de ovelhas da raça 'Mocha' em mistura com leite Serra da Estrela é possível se visualizar em gel um fragmento de 244 pb, específico para a raça 'Mocha' e que não é amplificado a partir de DNA de ovelhas da raça 'Bordaleira Serra da Estrela'. Em relação à reação de PCR para diferenciação inter-espécie, é possível realizar a diferenciação a partir de misturas binárias de leite de vaca, quer seja pasteurizado ou não, e ovelha 'Bordaleira Serra da Estrela' é feita através da deteção de duas bandas: uma de 1181 pb (D-loop de ovelha) e outra de 910 pb (D-loop de vaca).

5. Metodologia de PCR-RFLP com a enzima de restrição *TaiI* (ThermoFisher)

As condições de PCR são as mencionadas na seção 3 do presente documento. Segue-se o protocolo do fabricante para digestão de produtos de PCR sem purificação prévia. A reação de digestão é levada a cabo num volume total de 30 µL, a 65 °C durante 16 horas, seguida de inativação por incubação a 80 °C durante 20 minutos. Os produtos de digestão são

PDR 2020 PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO RURAL 2014·2020 | PORTUGAL 2020 | UNIÃO EUROPEIA Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural A Europa Investe nas Zonas Rurais

posteriormente resolvidos em gel de 2 % de agarose, com uma corrente de 55 V durante 120 minutos. O ensaio foi testado para digerir os fragmentos de PCR do D-loop com a enzima *Tail*, de modo a verificar o seu potencial de aplicação para deteção de contaminação intra-espécie. As condições de eletroforese podem ter de ser ajustadas de acordo com o caso específico.

6. Requisitos de formação do analista que irá aplicar a metodologia na empresa

O analista deverá possuir domínio das práticas básicas de trabalho experimental em laboratório, especificamente na área da biologia molecular.

7. Outras informações relevantes

Apesar da técnica desenvolvida ter sido testada em amostras de leite e queijo, a sua utilização deverá ser efetuada com precaução, por não ter sido possível analisar um número significativo de amostras de raças não autóctones.

8. Identificação de riscos e constrangimentos associados ao trabalho desenvolvido

O principal risco associado ao trabalho laboratorial desenvolvido é o risco operacional, nomeadamente devido à falta de amostras de leite de raças não autóctones, cujo impacto se traduz num possível comprometimento da validação da metodologia de RAPD-SCAR e PCR-RFLP desenvolvida para distinção de raças em amostras de leite e queijos. Note-se que o risco químico também estará presente devido aos reagentes usados para extração de DNA.

Adicionalmente, também foi realizada uma base de dados dos marcadores moleculares, que pode ser consultada no ficheiro *Excel* com a designação de “ProDop_Entregavel_1.3_PCR-RFLP-database”.

Bibliografia

ANCOSE: www.ancose.pt (acesso em 03/01/2022).

É ou não é? (RTP): "Douro - 20 Anos de Património Mundial." (transmitido em 14/12/2021).

ANCOSE - Raça Serra da Estrela: https://www.ancose.com/raca-serra-da-estrela/ (acesso em 03/01/2022).

ProDOP – Proteção, Promoção e Potencialização do queijo Serra da Estrela: https://inovacao.rederural.gov.pt/grupos-operacionais/13-projectos-groupos-operacionais/156-prodop-serra-da-estrela (acesso em 03/01/2022).

ANGUITA, G. *et al.* Immunostick ELISA for Detection of Cow's Milk in Ewe's Milk and Cheese Using a Monoclonal Antibody against Bovine β-Casein. *Journal of Food Protection* **59**, 436–437 (1996).

Popping, B. The application of biotechnological methods in authenticity testing. *Journal of Biotechnology* **98**, 107–112 (2002).

Ferreira, I. M. P. L. V. O. & Caçote, H. Detection and quantification of bovine, ovine and caprine milk percentages in protected denomination of origin cheeses by reversed-phase high-performance liquid chromatography of beta-lactoglobulins. *Journal of Chromatography A* **1015**, 111–118 (2003).

Lockley, A. K. & Bardsley, R. G. DNA-based methods for food authentication. *Trends in Food Science & Technology* **11**, 67–77 (2000).

Wiseman, G. State of the art and limitations of quantitative polymerase chain reaction. *Journal of AOAC International* **85**, 792–6 (2002).

López-Calleja, I. *et al.* PCR detection of cows' milk in water buffalo milk and mozzarella cheese. *International Dairy Journal* **15**, 1122–1129 (2005).

REA, S. *et al.* Use of duplex polymerase chain reaction (duplex-PCR) technique to identify bovine and water buffalo milk used in making mozzarella cheese. *Journal of Dairy Research* **68**, 689–698 (2001).

Plath, A., Krause, I. & Einspanier, R. Species identification in dairy products by three different DNA-based techniques. *Zeitschrift fur Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A* **205**, 437–441 (1997).

Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L. & Johne, R. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology* **113**, 1014–1026 (2012).

Brown, J. R., Beckenbach, K., Beckenbach, A. T. & Smith, M. J. Length Variation, Heteroplasmy and Sequence Divergence in the Mitochondrial DNA of Four Species of Sturgeon (*Acipenser*). *Genetics* **142**, 525–535 (1996).

Ganopoulos, I., Sakaridis, I., Argiriou, A., Madesis, P. & Tsaftaris, A. A novel closed-tube method based on high resolution melting (HRM) analysis for authenticity testing and quantitative detection in Greek PDO Feta cheese. *Food Chemistry* **141**, 835–840 (2013).