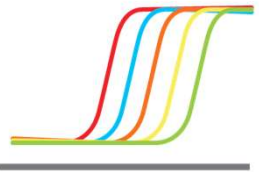


# Métodos de análise em Biologia Molecular



**Esta espécie  
está presente na  
amostra?**

## **Deteção de organismos ou microorganismos**

### **PCR Convencional (end-point) ou real-time PCR**

- Alvo definido;
- Positivo ou Negativo;
- Económica €;
- Elevadas sensibilidade e especificidade;
- Adequada para deteção em quantidades vestigiais;
- Elevadas repetibilidade e reprodutibilidade.

**Microrganismos**

**Alergénios**

**OGMs**

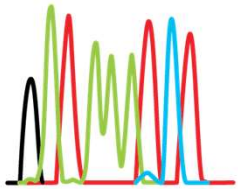
**Carnes**

**Peixes**

**Plantas**

**Outras fraudes**

# Métodos de análise em Biologia Molecular



Qual é a espécie  
desta amostra?

## Identificação de espécie em amostras puras

### Sequenciação Sanger

- Identificação da espécie;
- Relativamente económica €€;
- Muito precisa;
- Sequências longas– Excelente resolução.

**Microrganismos - isolados**

**Carnes**

**Peixes**

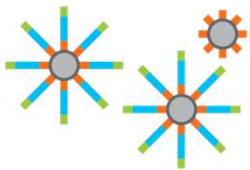
**Marisco**

**Plantas**

**Insetos**

**Parasitas**

# Métodos de análise em Biologia Molecular



**Que espécies  
estão presentes  
nesta amostra?**

## Identificação de misturas de espécies

### Sequenciação NGS

- Sequenciação de amostras complexas;
- Identificação das várias espécies presentes;
- Análise mais complexa mas com grande informação de resultados €€€€;
- Múltiplas espécies na mesma amostra; múltiplas amostras na mesma corrida (mesmo chip);

**Microrganismos**

**Carnes**

**Peixes**

**Marisco**

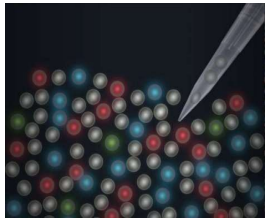
**Plantas**

**Insetos**

**Parasitas**

**Objeto estranho**

# Métodos de análise em Biologia Molecular



**Esta espécie está presente na amostra? Se sim, em que quantidade?**

## Deteção e quantificação de organismos por dPCR

### Droplet digital PCR

- Uma nova geração de PCR;
- Possibilidade de combinar múltiplos alvos;
- Resultado Positivo, e respetiva quantificação, ou resultado Negativo;
- Análise relativamente económica €€€;
- Elevadas especificidade e sensibilidade;
- Elevadas repetibilidade e reprodutibilidade

**OGMs**

**Carnes**

**Vegan**

**Norovirus e Hepatite A**

# Métodos de análise em Biologia Molecular

## Identificação de variedades

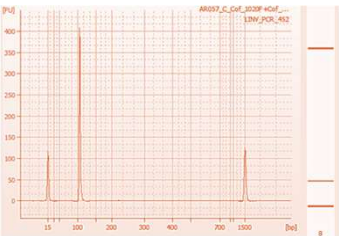
### Advanced Fragment Analytics DNA

- Identificação de subespécies – perfil de DNA;
- Análise relativamente económica €€;
- DNA fingerprinting – perfil de cada variedade / colheita;
- Dependente de base de dados de material de referência;
- Quantificação relativa possível em alguns casos particulares.

Café arábica e robusta

Arroz Basmati

Batatas



Que variedade é esta?

# Comparação métodos e tempos de resposta

Teste	Método	Resultado	Preço	TAT (dias)
Deteção DNA cabra	PCR	Positivo ou Negativo	€	1* - 4
Identificação em amostras puras	Sanger	Capra hircus (Cabra)	€	3 - 6
Identificação de múltiplas espécies	NGS	Capra hircus (Cabra) 92% + Bos taurus (Vaca) 5% + Bubalus bubalis (Búfalo) 3%	€€€	4* - 10
Deteção e quantificação de DNA de cabra	dPCR	Positivo 5,3%	€€	2* - 5
Perfil DNA arroz Basmati	Análise Fragmentos	Pusa Basmati 1	€€	3* - 5
Identificação DNA em objecto/corpo desconhecido	NGS + Sanger	Bos taurus (Vaca) + Sus scrofa (Porco) + Mus musculus (Rato)	€€€€	8* - 12

\* TAT urgente

# Comparação métodos – Autenticidade, segurança alimentar e alergénios

Método	Localização	Aplicação	Resultados	Standard TAT (wd)	Preço
<b>Conventional / Real time PCR</b>	Lisboa	Autenticidade/ Segurança Alimentar/ Alergénios	Positivo/negative para um alvo	5	€
<b>Sanger</b>	Lisboa	Autenticidade	Nome da espécie	6	€
<b>NGS</b>	Lisboa	Autenticidade/ Segurança Alimentar/ Alergénios	Nome das espécies	7	€€
<b>dPCR</b>	Lisboa	Autenticidade/ Segurança Alimentar/ Alergénios	Positivo (%) /negative para um target	5	€
<b>Análise de fragmentos</b>	Lisboa	Autenticidade	Nome da variedade	6	€€
Whole Genome Sequencing	UK	Autenticidade / Rastreabilidade	Nome da especie e estirpe	15	€€€
ELISA	Lisboa / UK / Alemanha	Alergénios	Quantidade da proteína alvo	10	€€
LC-MS/MS	Lisboa / UK / Alemanha	Autenticidade / Alergénios	Quantidade da proteína alvo	10	€€€
Análise Isótopos	Austria	Autenticidade	Depende do teste	15	€€€

# Comparação métodos – Alergénios

Método	PCR	ELISA	LC-MS/MS
<b>Abordagem de deteção</b>	Amplificação de DNA	Deteção de proteína através de anticorpos	Peptídeos de proteínas alergénicas são detetados através da sua massa
<b>Menor limite de deteção</b>	< 10 pg (equivalente a 1-100 ppm)	ppm	ppm
<b>Número de alergénios por análise</b>	1 ou mais por reação	1	> 2 (múltiplos peptídeos por proteína)
<b>Efeitos do processamento alimentar</b>	O processamento de alimentos ácidos pode destruir o DNA (resultados falsos negativos)	Cozimento ou outros processos podem desnaturar ou modificar proteínas, impossibilitando a deteção (resultados falsos negativos)	Não é significativamente impactado pelo processamento de alimentos
<b>Especificidade</b>	Altamente específico	Alguns alergénios podem ter reatividade cruzada	Altamente específico
<b>Preparação da amostra</b>	Um pouco trabalhoso	Fácil e rápido	Um pouco trabalhoso
<b>Influência da matriz</b>	Algumas matrizes podem inibir o PCR e causar interferências significativas (resultados falsos negativos)	Interferência potencial (resultados falsos negativos e falsos positivos)	Interferência potencial falso negativo (depende da influência da falsa digestão)
<b>Tempo de análise</b>	6 - 8 horas	4 horas (depende do método)	> 4 horas (depende do tempo de digestão)
<b>Desvantagens</b>	- Os alérgenos do leite e do ovo não podem ser detetados - Principalmente Qualitativo	Análise de apenas um alérgeno por vez Reatividade cruzada	Longo tempo de análise - digestão ON Grande investimento em equipamentos e treinamento de pessoal
<b>Vantagens</b>	- Altamente específico - Multiplex - Sensível	- Rápido, fácil e barato - Quantitativo	- Deteção direta de múltiplos peptídeos por massa distinta - Alta especificidade e precisão - Multiplex - Menos suscetível à reatividade cruzada

# Microbiologia

- Análises clássicas e automatizadas (matérias-primas, produtos processados, zanganoas, água)
- Kitty, Vidas e Tempo
- Estudo de validade e challenge test
- Validações personalizadas
- Zanganoas e placas de contato
- Legionella (deteção clássica e PCR)
- Microrganismos indicadores e patogénicos
  - *Listeria monocytogenes*, *Salmonella sp.*, *E. coli*, *Vibrio cholera and parahaemolyticus*, *S. Aureus*, *Campylobacter sp...*

# Química

- Nutricional, Vitamina C, outros;
- Contaminantes;
- Metais pesados (Chama AA, Grafite AA e ICPMS – Cd, Pb, Hg);
- Micotoxinas (Aflatoxinas, DON, Ocrá, Zea, Natamicina);
- PAH e acrilamida;
- Pesticidas;
  - Multiresíduos – 500 substâncias
  - Específicos (Glifosato, ditiocarbamatos, cloratos e percloratos, outros)
- Outros: Histamina, aditivos (ácido sórbico/benzóico),  $\text{NO}_3$  e  $\text{NO}_2$ ...