



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
FACULDADE DE BIOTECNOLOGIA

NAIANA CORREA RIBEIRO

**CRIAÇÃO DE UM SELO PARA AUTENTICAÇÃO DE ALIMENTOS VEGANOS
UTILIZANDO MÉTODOS MOLECULARES**

BELEM

2022

NAIANA CORRÊA RIBEIRO

**CRIAÇÃO DE UM SELO PARA AUTENTICAÇÃO DE ALIMENTOS VEGANOS
UTILIZANDO MÉTODOS MOLECULARES**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia, Faculdade de Biotecnologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará.

Orientador: Prof. Dr. Diego Assis das Graças.

BELÉM

2022

NAIANA CORREA RIBEIRO

**CRIAÇÃO DE UM SELO PARA AUTENTICAÇÃO DE ALIMENTOS VEGANOS
UTILIZANDO MÉTODOS MOLECULARES**

Trabalho de Conclusão de Curso orientado pelo Prof. Dr. Diego Assis das Graças, apresentado ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção de grau de bacharel em Biotecnologia.

DATA DE APROVAÇÃO:22/06/2022

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. DIEGO ASSIS DAS GRAÇAS

Orientador – UFPA

Prof. Dr. RAFAEL AZEVEDO BARAÚNA

Examinador interno – UFPA

Profa. Dra. MAÍRA POMPEU MARTINS

Examinadora Externa – UFPA

Aos meus pais por todo o suporte, amor e carinho até aqui.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Diego Assis das Graças por sua atenção e orientação durante os últimos três anos e em especial a esse trabalho.

A Soraya Andrade, pela ajuda e acompanhamento em toda a parte técnica do trabalho e sua paciência comigo.

À FAPESPA e à associação BioTec-Amazônia pelo apoio financeiro, tornando esse trabalho possível.

A todos os membros do laboratório de Engenharia Biológica, pela troca de conhecimento e momentos de descontração, destacando meus grandes amigos e colegas de turma Beatriz Lobato e Davi Marcon, que sempre me auxiliaram quando precisei.

Aos meus pais, Ana Maria Silva Correa e Benedito José Costa Ribeiro, pelo amor e apoio incondicional durante esses 4 anos. À minha irmã Ana Paula Correa Ribeiro, que dividiu comigo nos últimos 2 anos as alegrias e tristezas da vida acadêmica longe de casa.

Ao meu tio Antônio Maria Ribeiro e sua família, pela iniciação à cidade nova em meus primeiros meses em Belém.

Ao meu namorado Gustavo Marques, que enquanto amigo sempre se fez presente em minha vida, pelo seu apoio, carinho e cuidado comigo, compartilhando a caminhada acadêmica na Biotecnologia.

Aos amigos que fiz na faculdade, em especial aos também colegas de turma Thiago Cordeiro, Valéria Silva, Joaquim Neto e Giovane Pinheiro que se tornaram muitíssimo importantes na graduação por atenuarem o estresse e angústia que a academia pode gerar.

Aos meus queridos professores do ensino médio que tenho imenso carinho até hoje. Alcides Junior que me acompanha desde o ensino fundamental e sempre deixou claro a sua atenção e carinho por mim; e ao inesquecível Rubens Filho, que tive a tristeza de perder para a COVID-19. Metade de mim é o que consegui absorver de vocês.

À faculdade de Biotecnologia, em especial a alguns dos professores que tive durante a graduação que fizeram a diferença durante ela e colaboraram para a construção de meus gostos e interesses acadêmicos, sendo eles Moysés Miranda, Rafael Baraúna, Bruno Duarte e Agenor Valadares.

RESUMO

Com o aumento no número de adeptos ao veganismo nos últimos anos, junto à procura por dietas mais saudáveis, a demanda por alimentos baseados em vegetais tem crescido, dando origem a um promissor nicho comercial. No entanto, para manter a confiabilidade desses produtos e os valores éticos exigidos para o estilo de vida, se faz necessário a autenticação destes, para a garantia de ausência de resíduos animais. Neste trabalho, foi utilizada a técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real, direcionada a regiões conservadas do DNA mitocondrial entre os animais, a fim de criar uma certificação biomolecular para alimentos *in natura* e levemente processados. Utilizando kits comerciais com sensibilidade de 0,01% para DNA animal, foi alcançado maior especificidade e rapidez ao trabalho de autenticação alimentar, comparado aos métodos empregados pelos órgãos certificadores vigentes. Os produtos submetidos apresentaram resultados positivos para a emissão do selo, livres de inibidores, a partir da observação dos controles de reação, o que demonstrou o êxito do método. Ainda, foi confirmada a ausência de elemento animal nas amostras, sendo todas aptas ao recebimento do selo vegano por certificação genética. Colaborando, desse modo, na valoração ética e econômica destes produtos e marcas, e entregando confiança aos consumidores e facilidade em suas buscas.

Palavras-chave: Veganismo, autenticação alimentar, qPCR, DNA mitocondrial.

ABSTRACT

With the increase in the number of vegans in recent years, along with the healthiest diets searching, the demand for plant-based foods has grown, giving rise to a promising commercial niche. However, to maintain the reliability of these products and ethical values required for that lifestyle, it's necessary to authenticate them to ensure the absence of animal residues. In this research, the real-time polymerase chain reaction technique was used, targeting conserved regions of mitochondrial DNA in animals, in order to create a biomolecular certification for *in natura* and lightly processed foods. Using commercial kits with sensitivity threshold of 0.01% for animal DNA, greater specificity and speed in food authentication work was achieved, compared to other methods employed by the certifying bodies, currently used. The submitted products showed positive results for the seal and inhibitors-free from the observation of the reaction controls, which demonstrated the success of the method. Furthermore, the absence of animal elements in the samples was confirmed, and all of them are suitable to receive the vegan seal by genetic certification. Thus, collaborating in the ethical and economic valuation of those products and brands, ensuring trust to consumers and ease in the searches.

Keywords: veganism, food authentication, qPCR, Mitochondrial DNA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Etapas da reação em cadeia da polimerase (PCR).	21
Figura 2 – Gráfico plotado em software de qPCR.	22
Figura 3 – Ação do corante SYBR Green ®.	23
Figura 4 – Ação da sonda TaqMan ®.	24
Figuras 5 – Produtos submetidos à análise da Alteroza LTDA: Linha Nátuz	27
Figuras 6 – Produtos submetidos à análise da Alteroza LTDA: Linha <i>Chef</i>	27
Figuras 7 – Produtos para análise da Gaudens Chocolate.....	28
Figuras 8 – Preparo das amostras para a extração de ácido nucleico.	29
Figura 9 – Gráfico para obtenção do valor de Ct Alteroza.	31
Figura 10 – Curva de amplificação das amostras Gaudens.....	32
Figuras 11 – Gráfico IPC Alteroza e Gaudens, respectivamente.	33
Figura 12 – Certificação visual do Selo Vegano.	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentração populacional de vegetarianos no Brasil.	18
Tabela 2 – Certificados veganos disponíveis no Brasil.	19
Tabela 3 – Identificação das amostras submetidas à análise.	30
Tabela 4 – Valores de Ct para as amostras de Alteroza LTDA.....	31
Tabela 5 – Valores de Ct para as amostras de Gaudens Chocolate	32

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
μL	Microlitro
ANVISA	Agência de Vigilância Sanitária
BRCGS	<i>Brand Reputation Compliance Global Standards</i> – Padrões Globais de Conformidade de Reputação da Marca de Marca
Cq	<i>Quantification cycle</i> – ciclo de quantificação
Ct	<i>Cycle threshold</i> – Limiar de ciclo
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> – Ácido Desoxirribonucleico
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EVU	<i>European Vegetarian Union</i> – União Europeia Vegetariana
GMO	<i>Genetically Modified Organism</i> – Organismo Geneticamente Modificado
IBOPE	Instituto brasileiro de Opinião Pública e Estatística
kb	Kilobase
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mL	Mililitro
mtDNA	DNA Mitocondrial
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> – Reação em Cadeia da Polimerase
qPCR	<i>Real Time Quantitative PCR</i> – PCR Quantitativa em Tempo Real
SVB	Sociedade Vegetariana Brasileira
xg	(Força) Gravitacional

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVO	16
2.1 Objetivo geral	16
2.1 Objetivos específicos	16
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 Veganismo.....	17
3.2 Mercado consumidor	17
3.3 Certificação.....	19
3.4 PCR	21
3.4.1 qPCR	22
3.4.1.1 SYBR Green ®	22
3.4.1.2 TaqMan®.....	23
3.5 DNA mitocondrial.....	24
3.5.1 Citocromo B	25
3.6 Kits para detecção.....	25
4.1 Amostragem	27
4.1.1 Alteroza	27
4.1.2 Gaudens Chocolate.....	28
4.2 Extração de DNA	28
4.3 qPCR.....	29
4.4 Emissão do laudo técnico	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1 Detecção	30
5.2 Controle interno positivo (ipc).....	33
5.3 Laudo técnico e emissão do selo.....	35
6. CONCLUSÃO.....	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

1. INTRODUÇÃO

A consciência ambiental tem sido amplamente discutida ao longo dos anos, despertando entre os indivíduos a busca por hábitos sustentáveis para com o planeta, principalmente no que estabelece harmonia nas relações entre animais humanos e não humanos. O Veganismo, por exemplo, dispõe de todas as ideias apontadas, propondo a exclusão de qualquer forma de exploração animal (SOUZA, 2015). Implicando desse modo, em novas configurações e estilos de consumo. Partindo deste princípio, surge a necessidade de um nicho mercadológico que atenda as demandas desse novo mercado consumidor, que segundo pesquisa IBOPE de 2018, já somam 7 milhões de adeptos no Brasil.

Para a alimentação, além das opções naturais disponíveis de insumos veganos, já existem opções de produtos industrializados isentos de ingredientes animais. Em 2015, 14% dos novos produtos lançados no mercado europeu correspondiam ao mercado vegano (SVB, 2017). Não obstante, com o surgimento de novos produtos que prometem substituir por exemplo carnes e leites, por semelhantes 100% vegetais, se instaura a dúvida e insegurança do consumidor se o que se está adquirindo está isento de fraudes – atos intencionais das empresas objetivando somente o lucro, por práticas de adulteração (CORREIA, 2018).

A verificação de autenticidade alimentícia é assim imposta para o controle de qualidade a partir de rigorosos testes que abrangem desde aspectos de adulteração intencional à segurança e inocuidade do alimento (LOPES, 2013), garantindo a ausência de quaisquer resquícios de origem animal. Essas exigências concomitam a empregabilidade de seus resultados na emissão de certificações visuais. Essas devem ser de fácil percepção, deixando explícito em rótulos e embalagens, informações úteis para a escolha e discernimento do que se está comprando e consumindo.

Os diversos métodos de verificação adotados pelos órgãos de fiscalização baseiam-se em análises logísticas e de fiscalização ao processo de obtenção de insumos e produção. Não obstante, métodos mais sofisticados e apropriados podem ser aplicados à problemática da autenticidade dos alimentos veganos, como técnicas moleculares de detecção, que assegurariam maior eficiência, sensibilidade e especificidade. Desde modo, é possível identificar e caracterizar corpos estranhos nesses alimentos, por detecção baseada no DNA, com tipagem a partir da reação em cadeia da polimerase (PCR) (MALORNY *et al.*, 2003), em que se amplifica sequências específicas de ácidos nucleicos.

Enumerando ainda, a detecção à sequências de DNA mitocondrial, que se fazem presentes em todos os organismos animais e que são comumente usados para detecção devido

sua conservação e resistência à degradação. Empregando a técnica de PCR em tempo real, até os fragmentos mais pequenos podem ser encontrados em alimentos altamente processados (JONKER *et al.*, 2008), se torna possível fazer uso de tais informações para a criação de um selo de autenticação vegana por confiabilidade genética, sendo mais específico e conciso, a fim de evitar fraudes.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Criar um selo a partir métodos moleculares de tipagem de DNA para a identificação e autenticação de produtos alimentícios veganos da cadeia produtora paraense.

2.1 Objetivos específicos

1. Implementar tecnologia de detecção e identificação de DNA de múltiplas origens por PCR em tempo real de amostras alimentícias;
2. Validar um serviço baseado em biologia molecular de autenticação alimentícia;
3. Gerar selos para alimentos *in natura* e levemente processados.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Veganismo

Segundo a *The Vegan Society*, o veganismo – termo criado por eles, em 1944 – é uma filosofia de vida que busca excluir, na medida do possível, todas as formas de exploração e crueldade contra animais não humanos. Para esse estilo de vida, são adotadas alternativas que dispensem o uso de animais na alimentação, vestuário, produtos em geral que usem direta ou indiretamente animais no seu processo de produção e para finalidades de lazer e qualquer outra forma de exploração. Nesta pauta, animais não humanos são tidos como seres de direitos, o que lhes conferem a busca pelo bem estar e dignidade.

As motivações estão atreladas a valores éticos, principalmente à reflexão crítica acerca do sofrimento animal para suprir as demandas nas diferentes esferas de consumo. O veganismo ativista dispõe de propósitos políticos, no intuito de promover a justiça animal, não compactuando com a hegemonia do consumo de carnes e derivados (LONDERO, 2019). A causa ambiental também é colocada em voga, visto a preocupação ao demasiado uso de recursos naturais e emissão de gases de efeito estufa para a criação de animais de consumo humano (EMBRAPA). Já o que diz respeito a mudanças comportamentais atreladas a questões nutricionais e de saúde, é cientificamente aceito que dietas a base de vegetais, com menor ingestão de gorduras totais e saturadas, colesterol dietético, sódio e açúcares adicionados sejam responsáveis pela diminuição de riscos à doenças crônicas não transmissíveis, como hipertensão, diabetes e dislipidemia (CASTAÑÉ, 2017).

O estilo de vida tem se popularizado, através da visibilidade ganhada na mídia e redes sociais, que compartilham vivências e rotinas de indivíduos que se definem veganas. Tal fator colabora para sua aceitação e influência social, aumentando o número de adeptos, e instigando ao consumo a esse novo conjunto de valores. Essa abordagem movida por interesses mercadológicos distância de certo modo os conceitos tradicionais do movimento, visto que gera o que é chamado pelos estudiosos, de “estilo de vida ou veganismo corporativo” (WHITE, 2019) que se reduz a questões alimentares, uma vez que ele vem sendo enquadrado como dieta benéfica a saúde, de propósito puramente nutricional.

3.2 Mercado consumidor

A demanda por produtos alimentícios veganos tem crescido seja por parte declarados veganos ou mesmo por simpatizantes, adeptos a outras configurações alimentares, vindo buscar no nicho alimentos mais saudáveis. Os chamados consumidores verdes, sustentáveis ou socialmente responsáveis promovem um consumo consciente e crítico, gerando a

reconstrução de seu *modus vivendi* (RIBEIRO, 2019) e sua responsabilidade para com a sustentabilidade – que é importante para 67% dos respondentes à pesquisa da Ingredion (2020). Cria-se, portanto, um conjunto de práticas de consumo que constroem espaços e identidades – objetos de observação e estudo acerca deste perfil consumidor.

Sendo traçado o perfil, fica evidente faixa etária, classe socioeconômica e até mesmo gênero majoritários na composição do grupo. Em pesquisa feita pela CONVIBRA (2017) a maioria dos entrevistados estão inseridos na faixa etária dos 16 a 25 anos, com predominância feminina. O cuidado com a saúde, seria um fator importante para o consumo de alimentos *Plant-based*, assim como o quesito nutritivo (INGREDION, 2020). A popularidade entre os jovens, pode ser presumida pelo “tempo de tela” destes, sendo os maiores usuários dos meios de comunicação virtuais, onde tendências são amplamente difundidas. Para FREITAS *et al.* (2021) O engajamento deste estilo de vida pelo compartilhamento de informações e conexões de pessoas nas redes sociais geram impacto na indústria e pontos comerciais, promovendo estudos e aprimoramento de produtos e processos nos setores alimentícios que atendam aos consumidores deste segmento.

Nos últimos 6 anos, as buscas pela palavra “veganismo” no Google tiveram um aumento de 1000%, somente no Brasil (*Google trends*). Não obstante, até o atual momento, apesar da notória popularidade, não há pesquisas sobre a população vegana brasileira. Logo, os números acerca tratam-se de estimativas a partir dos dados de vegetarianos, já que no segmento alimentar, o veganismo seria um subgrupo deste, e não distinguidos nas presentes pesquisas. Adotando a média de veganos de outros países, em consonância ao total de vegetarianos brasileiros, seriam cerca de 7 milhões de veganos. A concentração de vegetarianos, com base em pesquisa realizada pelo IBOPE (2018), tem aumentado em 75% desde 2012 e varia entre as regiões brasileiras (tabela 1).

Tabela 1 – Concentração populacional de vegetarianos no Brasil.

Região	Percentual
Norte e Centro Oeste	6%
Nordeste	10%
Sudeste	8%
Sul	6%

Fonte: IBOPE, 2018.

O mercado vegano tem crescido 40% ao ano e tem atualmente um leque diverso de opções de alimentos industrializados e os chamados “produtos prontos”. A oferta ainda parece pequena quando pesquisas como a da empresa Ingredion, junto a Opinaia (2020), apontam que 90% dos brasileiros procuram uma alimentação mais saudável em produtos vegetais. Porém, em oposição a esses dados, outras informações da mesma pesquisa apontam que a

principal motivação para a não aquisição de alimentos *plant-based* seria os preços elevados (59%). Desse modo, as buscas por produtos vão se dar principalmente pelo preço acessível (61%), e logo depois pelo sabor (57%).

Outros dados mostram que duas em cada três pessoas entrevistadas, estariam dispostas a consumir menos carne. A adaptação alimentar à nova dieta se dá por atributos sensoriais correspondentes à cor, textura, aroma e sabor (FREITAS *et al.*, 2021) que remetem a alimentos de origem animal antes consumidos. Esses substitutos proteicos industrializados devem proporcionar características atrativas não somente em sua composição, como também em estratégias de marketing e rotulagem. 55% dos entrevistados consumiriam mais produtos veganos se estivesse melhor indicados nos rótulos. Estas táticas mercadológicas denominam o marketing verde, que diz respeito a selos que certificam produtos com propostas sustentáveis para o consumidor.

3.3 Certificação

A certificação serve para verificar ingredientes, processo, produção, armazenamento de matérias-primas, embalagens e rotulagem para garantia da qualidade do produto final (MACEDO e PIERRE, 2020), os regulamentando dentro dos padrões exigidos. É um direito assegurado ao consumidor, que garante informações imparciais e precisas acerca do que virá a consumir. Sob essa perspectiva, os selos de certificação são os métodos mais confiáveis na geração de segurança e agregação de valor aos consumidores e empresas, respectivamente.

No Brasil, os órgãos governamentais responsáveis pela aplicação de legislações de segurança alimentar são o MAPA (Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento) e a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) que dispõe de resoluções e portarias sobre boas práticas de fabricação. Ainda não existe resolução ou lei que reconheça a manufatura ou rotulagem para alimentos vegetarianos e veganos no país. Neste contexto, surgem instituições alinhadas aos valores vegetarianos-veganos, que emitem selos a esses produtos, a partir da submissão feita pelas empresas interessadas (quadro 1).

Os padrões para avaliação são de presunção óbvia; criados pela *European Vegetarian Union* (EVU), alimentos veganos não podem conter ingredientes animal e/ou substâncias oriundas destes, assim como aditivos, suplementos ou enzimas, nem processados por tecnologias de origem animal. Ainda é abordado o não uso de animais em testes durante o processo de fabricação do alimento. Visto a possibilidade de contaminação não intencional, o percentual máximo para a certificação do produto vegano é de 0,1% de contaminação (EVU, 2017).

Tabela 2 – Certificados veganos disponíveis no Brasil.

Selo	Descrição	Métodos	Cobertura	Agência Certificadora
	Programa “Certificado Produto vegano SVB” foi criado em 2013, e abrange produtos de diversos setores	Avaliação do processo de desenvolvimento e fabricação, podendo haver análise laboratorial e visita à planta de produção.	Nacional	Sociedade vegetariana Brasileira (SVB)
	A Vegan Society identifica produtos veganos internacionalmente desde 1990, abrangendo produtos de vários segmentos.	Avaliação nos ingredientes do produto.	Internacional	The Vegan Society
	A associação brasileira de veganismo, certifica produtos e serviços veganos que não testados em animais ou que contenham ingrediente animal.	Padrões do selo original inglês <i>The Vegan Society Trademark</i> .	Nacional	Associação Brasileira de Veganismo
	O programa “BRCGS <i>Plant-based</i> ” certifica alimentos à base de plantas.	Avaliação no processamento, embalagem e ingredientes.	Internacional	Brand Reputation Compliance Global Standards (BRCGS)

Fonte: adaptado de MACEDO e PIERRE, 2020; BRCS.

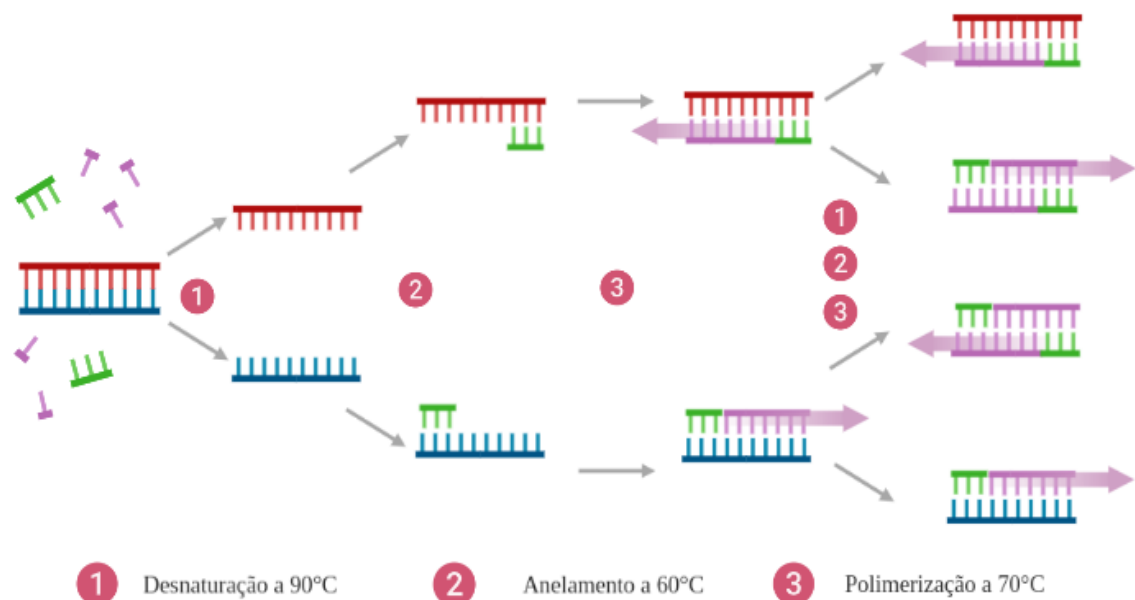
Nota-se que não há um padrão de métodos para avaliação. Empresas e organizações independentes sinalizam seus critérios e técnicas para a identificação, em que estes não são bem esclarecidos em seus veículos de informação; empresas com produtos não certificados optam por suas próprias sinalizações visuais, geralmente selos com a letra V, ou qualquer outro símbolo para a pretensão. Todos os selos acima dispõem de espaços para denúncias de uso indevido ou fraudulento dos selos.

3.4 PCR

A técnica da reação em cadeia da polimerase tem trazido grandes avanços para a biologia molecular no que condiz a detecção e quantificação amostral. Criada por Kary Mullis, que recebeu um Prêmio Nobel de Química pelo feito, a técnica ocorre *in vitro*, onde moléculas de DNA são amplificadas de forma contínua. Ela se constitui em um par de primers (*forward* e *reverse*) de oligonucleotídeos sintéticos, projetados para a sequência específica da fita de DNA em que devem se ligar para a síntese. Se faz necessário também uma enzima DNA polimerase, que pelas elevadas temperaturas admitidas na reação, usa-se a *Taq* polimerase, isolada da bactéria termofílica *Thermus aquaticus*.

Iniciam-se sucessivos ciclos, onde a reação se divide em três grandes etapas (figura 1): a (1) desnaturação do DNA dupla fita com o rompimento das pontes de hidrogênio, quando exposto a elevadas temperaturas de em média 90°C por 15 segundos; (2) anelamento, que é o reconhecimento pelos primers a sequência alvo, por incubação a 50°C a 60°C por 30 a 60 segundos e a (3) polimerização de uma nova fita de DNA, pela adição de nucleotídeos às extremidades da fita, realizada em temperaturas de 70°C durante 1 a 3 minutos. Após a amplificação, é utilizado eletroforese em gel de agarose para a detecção do produto final a partir de corante que intercala com o DNA, emitindo fluorescência sob luz ultravioleta (SUAREZ, 2010).

Figura 1 – Etapas da reação em cadeia da polimerase (PCR).



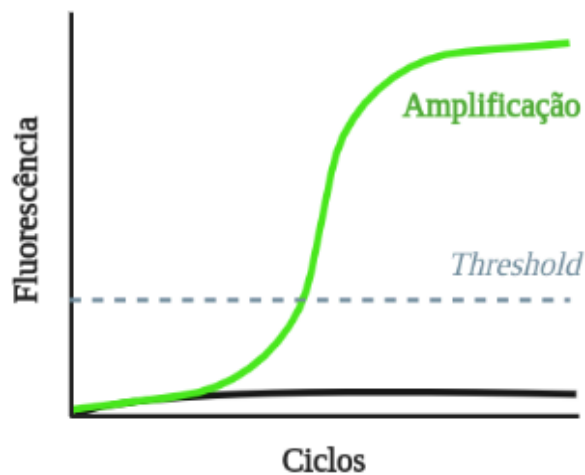
Fonte: adaptado de BioRender, 2019.

3.4.1 RT-qPCR

Na PCR em tempo real (RT-qPCR), a amplificação e quantificação são feitas simultaneamente de forma mais sensível e específica. A técnica monitora a amplificação em cada ciclo, confirmando a cinética de amplificação da PCR visualmente e identifica os produtos qualitativamente e/ou quantitativamente (MATSUDA, 2017), usando fluoróforos, que incidem fluorescência. À medida que essa fluorescência aumenta, vai sendo plotado uma curva de amplificação que discorre ao número de ciclos.

A partir disso, determina-se um ciclo de quantificação (Cq), denominado também como limiar de ciclo (Ct - *cycle threshold*), que diz respeito ao número de ciclos necessários para a amplificação atingir taxa exponencial e produzir fluorescência significativa. A caracterização do Ct é dada pelo traçamento de uma linha paralela ao número de ciclos e nivelada onde se inicia a fase exponencial de amplificação. Quando a linha de amplificação cruza com o *threshold*, se determina, portanto, o início da amplificação da sequência alvo (figura 2). Quanto menor o valor de Ct obtido, maior foi a expressão do gene-alvo (SUAREZ, *et al.*, 2010). Ao término da operação, não há manipulação, diminuindo as chances de contaminação. Para a execução da qPCR, existem comercialmente dois sistemas disponíveis, Sybr Green® e TaqMan®.

Figura 2 – Gráfico plotado em software de qPCR.



Fonte: Elaborado pelo autor.

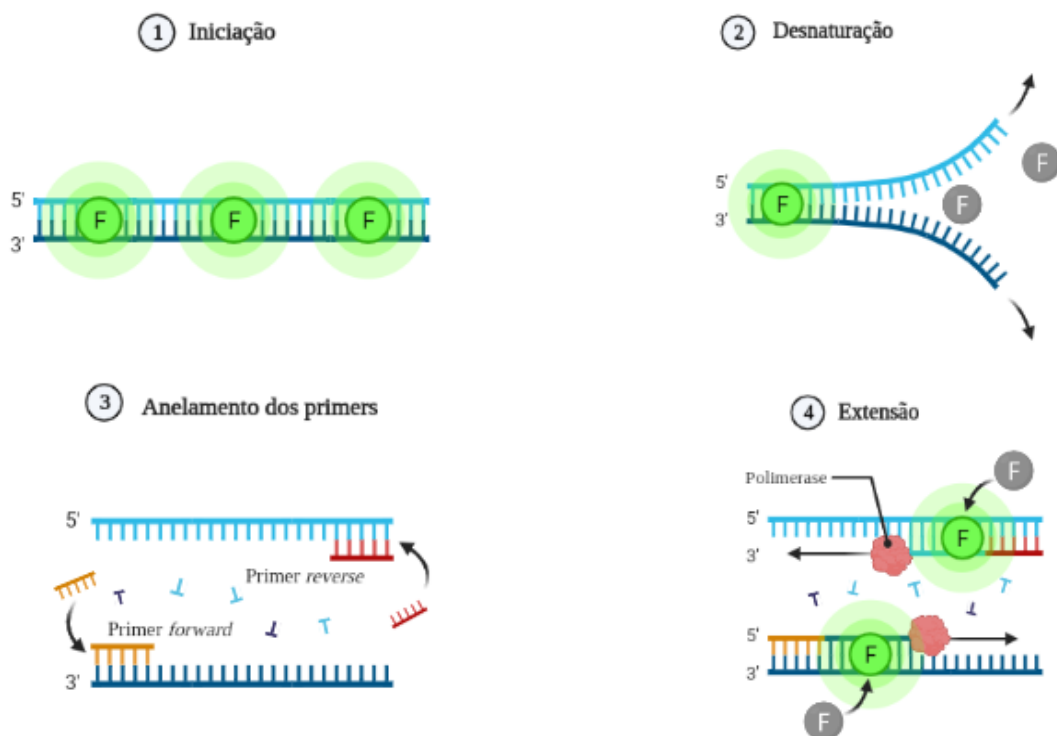
3.4.1.1 SYBR Green ®

Este sistema (Thermo Fisher scientific) é o mais utilizado por sua facilidade de execução e custo. Ele se caracteriza pelo uso de corante de cianina, que se liga a todo DNA dupla fita de forma não específica, fazendo a detecção a partir do acúmulo à medida que ocorre a reação (figura 3). Na adição do corante à amostra, este se ligará a todo o DNA dupla

fita presente. Na fase de desnaturação, a fluorescência é reduzida, porém retomada durante a extensão da fita, a DNA AmpliTaq Gold™ amplifica a sequência alvo e os fluoróforos se ligam nas fitas em formação, resultando num aumento de fluorescência a cada ciclo, que ao final será proporcional ao produto gerado pela PCR.

Há, portanto, a possibilidade de monitoramento de todas as sequências de dupla fita, o que leva de certo ponto a uma de suas desvantagens, que é produção de falso-positivos, uma vez que este composto se liga a qualquer produto de DNA, incluindo produtos não específicos da reação. Este é também um sistema de baixo custo, uma vez que não se faz necessário o uso de sondas à reação.

Figura 3 – Ação do corante SYBR Green ®.



Fonte: Elaborado pelo autor.

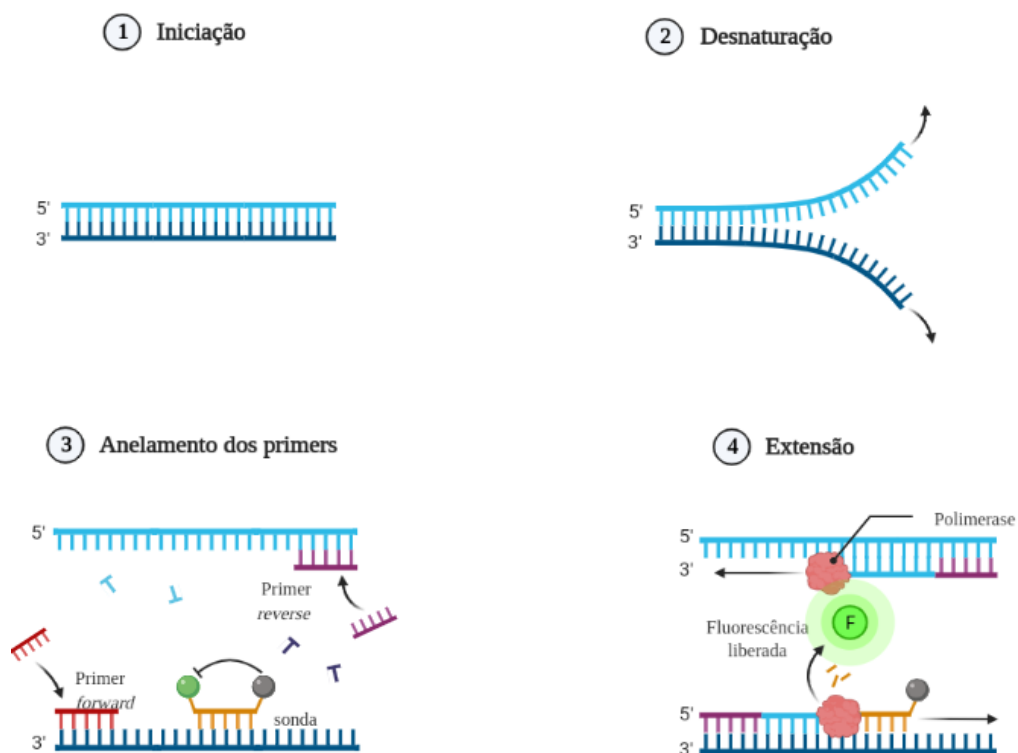
3.4.1.2 TaqMan®

O sistema TaqMan ® (Thermo Fisher scientific) utiliza sondas de hidrólise fluorogênicas para atividade da nuclease 5' da *Taq* DNA polimerase na detecção de sequências específicas. Neste, várias sondas podem ser usadas em um único tubo, amplificando vários alvos (PCR multiplex). Seu nome se dá pela alusão ao *videogame Pac-Man*, onde o mecanismo do sistema é baseado no princípio do jogo. É um método de custo elevado, levando em conta a síntese de uma sonda para cada região específica.

São desenvolvidas sondas oligonucleotídicas contendo em sua extremidade 5' um fluoróforo repórter (R), e na extremidade 3' uma molécula bloqueadora de fluorescência

quencher (Q). Inicialmente, com a sonda ainda intacta, há a transferência de energia por ressonância de fluorescência entre as moléculas *quencher* e repórter, o que reduz significativamente a fluorescência emitida desta última. Em contato com a sequência alvo, a sonda se anela a fita, próximo a um dos primers, sendo então clivada por ação da nuclease 5' da *Taq* polimerase (figura 4). Voltando às moléculas *quencher* e repórter, as duas são separadas, aumentando o sinal da repórter que já não é controlado pela, e finalmente a sonda é removida da fita, para ação plena dos primers. A cada novo ciclo este mecanismo se repete, havendo o acúmulo de fluorescência, que será, portanto, proporcional ao número de amplicons gerados.

Figura 4 – Ação da sonda TaqMan[®].



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.5 DNA mitocondrial

Presente na mitocôndria, o DNA mitocondrial (mtDNA) é um ácido nucleico circular exclusivo dessa organela, com um tamanho de aproximadamente 16kb para vertebrados, originando 37 genes (CUROLE,1999), não contendo íntrons em seu genoma. Sua transmissão ocorre de forma uniparental; herdados do oócito, antes da fertilização, pois o mtDNA paterno é degradado durante a fecundação.

Suas características o tornam um ótimo e completo marcador genético. Suas regiões conservadas entre as espécies (HARRISON, 1987), dentro de um genoma pequeno e simples,

em que não são encontradas sequências não codificantes. Ele é encontrado em elevadas quantidades de cópias na célula, o que torna fácil o seu isolamento. Não obstante, seu formato circular lhe garante maior resistência à degradação (HOPKIN, 1999) quando comparado ao DNA nuclear.

Sua escolha para testes de detecção é preferível quando se trabalha com amostras pequenas ou insuficientes para análise. Alimentos processados, por exemplo, são submetidos a etapas de preparo que podem degradar totalmente o DNA nuclear, originário de sua matéria prima, dependendo do nível de seu processamento.

3.5.1 Citocromo B

O citocromo b é uma proteína mitocondrial do complexo citocromo bc1 e b6f (ANDREU *et al.*, 2011), responsável pelo transporte de elétrons. Codificada pelo gene *cyb b*, essa região no DNA mitocondrial é usada para análises de relações evolutivas entre as espécies, por sua variabilidade (ANDREU *et al.*, 2011) e por ser compartilhada por quase todos os animais. Análises comparativas de Howell (1989) mostram regiões conservadas do gene durante a evolução entre diferentes eucariotos; a proteína por sua vez, tem sofrido mudanças de forma lenta durante o processo evolutivo, fator que colabora e estabelece relações filogenéticas entre animais (KOSHER *et al.*, 1989).

3.6 Kits para detecção

Para a detecção de contaminantes de origem animal em alimentos veganos, já existem kits comerciais e sistemas destinados exclusivamente para tal finalidade. São encontrados material para extração de DNA genômico e para sistemas de qPCR, dentro dos padrões de sensibilidade demandados para aplicação industrial. Constata-se que, ao comparar alguns desses kits, esses se baseiam nas mesmas premissas, com o alvo em comum para as análises.

A empresa alemã Minerva Biolabs ® desenvolve kits de biologia molecular para controle e contaminação microbiana e dispõe de uma linha vegana de kits de extração de DNA, e para qPCR. O *ExtractNow™ Vegan Control* faz a extração de DNA, baseada em coluna giratória. O sistema em qPCR *Vegan Control™ Mix* detecta até 0,1% de DNA animal de mamíferos, com alvo na região codificadora da proteína citocromo b no mtDNA, a partir de sondas TaqMan ® marcadas em FAM™ e HEX™ em duração de reação de 150 minutos.

Por conseguinte, para a linha RapidFinder™, da Thermo Fisher Scientific®, foi desenvolvido o kit *RapidFinder™ Vegan ID*. Ele identifica DNA animal de mamíferos em amostras de alimentos crus ou processados com sensibilidade de 0,01%, tendo também como

alvo sequências conservadas do DNA mitocondrial. A detecção se faz por uso de duas sondas TaqMan® MGB, marcadas nos canais FAM™ e VIC™, transcorrendo em 90 minutos.

Foi encontrado também o *VERYfinder food fraud prevention Real-time PCR kit – VEGETARIAN* (Generon®) *verification*. Este reconhece indícios de contaminação animal de até 0,1% em alimentos veganos. Maiores informações não puderam ser extraídas pelo caráter restrito ao manual do kit.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostragem

O presente estudo contou com amostras de alimentos *in natura* e processados, obtidas *in loco* na produção das empresas de alimentos Alterzoza LTDA e Gaudens Chocolate. Após as coletas, as amostras foram guardadas sob refrigeração para evitar degradação.

4.1.1 Alterzoza

A indústria e comércio de Conservas Alterzoza LTDA fica localizada na Vila dos Cabanos, em Barcarena. Seus produtos têm como matéria prima o fruto do açaí e sua palmeira para a fabricação de produtos alimentícios a partir da polpa da fruta e do palmito em conserva, respectivamente.

Paras as análises foram amostrados produtos da mesma composição, porém de duas linhas diferentes da marca. Da linha *Nátuz* (figuras 5) foram obtidos da esquerda à direita: polpa de açaí médio, sorbet e palmito em conserva; para a linha *Chef* (figuras 6): polpa de açaí médio e palmito em conserva.

Figuras 5 – Produtos submetidos à análise da Alterzoza LTDA: Linha *Nátuz*.



Fonte: acervo do autor.

Figuras 6 – Produtos submetidos à análise da Alterzoza LTDA: Linha *Chef*.



Fonte: acervo do autor.

4.1.2 Gaudens Chocolate

A Gaudens Chocolate é uma empresa de chocolates finos, com fábrica e loja localizadas no centro de Belém. São comercializados diversos tipos de doces, bebidas e chocolate advindos do fruto do cacau.

Para as análises (figuras 7), foram utilizados a barra de chocolate 71% cacau da linha *Fit* e amostras de nibs de cacau de duas origens: de frutos provenientes do município de Medicilândia, sudoeste paraense; e do cultivo orgânico da casa de Chocolate da Filha do Combu, localizada da Ilha do Combu, em Belém.

Figuras 7 – Produtos para análise da Gaudens Chocolate.



Fonte: acervo do autor.

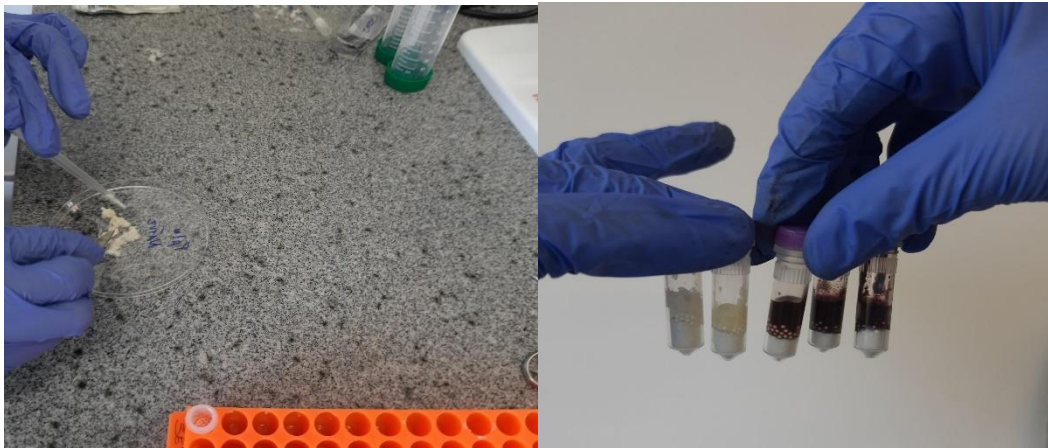
4.2 Extração de DNA

A extração do DNA total foi feita utilizando o kit GMO Extraction Kit (Thermo Scientific, EUA), seguindo o protocolo do fabricante. Em suma, foram feitas as alíquotas de 500mg de cada amostra e transferidos para tubos de lise para a extração de DNA (figuras 8). Visto o caráter sólido das amostras de palmito, essas tiveram que sofrer maceração cônica. Foi finalmente iniciada a preparação das amostras com a adição de 978 μ L de fosfato Buffer, seguidos de 122 μ L de MT Buffer aos tubos. As misturas foram homogeneizadas em vórtex por 40 segundos em velocidade 6x; as amostras de palmito permaneceram por mais 40 segundos para sedimentar. Após isso, foram centrifugadas a 14000 xg por 10 minutos para a obtenção do pellet e transferidos 2,0ml do sobrenadante para tubos limpos, com a adição de 250 μ L de PPS (*Protein Precipitation Solution*), sendo invertidos manualmente por 10 vezes. Em seguida, as amostras foram centrifugadas novamente a 10000 xg por 5 minutos, com transferência do sobrenadante para novos tubos.

Foi adicionado então o *Binding Matrix Solution*, com 1,0 ml de sobrenadante em tubos de 15ml. Os tubos foram invertidos manualmente por 2 minutos para o material

genético intercalar à matriz, e posteriormente acomodados em estante por mais 3 minutos. Após isso foi descartado 500µL de sobrenadante e adicionado novamente o *binding Matrix*, e transferidos 600µL dessa mistura para tubos *SPIN Filter* para centrifugação a 14000 xg por 1 minuto. O tubo foi esvaziado e adicionado o restante da mistura para nova centrifugação e repetição deste processo. O *SPIN Filter* foi colocado para secagem a 5 minutos em temperatura ambiente, seguidos de ressuspensão da matriz em 100µL de DES (DNase). Por fim, as amostras foram centrifugadas a 14000 xg por 1 minuto, e descartado o filtro do tubo.

Figuras 8 – Preparo das amostras para a extração de ácido nucleico.



Fonte: acervo do autor.

4.3 qPCR

As amostras foram preparadas com o kit RapidFinder™ Vegan ID (Thermo Scientific, EUA), que utiliza duas sondas TaqMan™ -MGB. Foram usados 5µl e amostras de DNA extraído, para uma concentração de 10ng/µl para a execução da análise, com um volume final de 25µl, contendo 7,5µl de *Vegan Master Mix* e 12,5µl de *General Mix*. A PCR foi manipulada em equipamento QuantStudio 12k Flex (Thermo Scientific, EUA), seguindo o protocolo de ciclagem: 95 °C por 10 min, seguido por 36 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 min. Para os controles da amplificação, foram incluídos aos ensaios um controle negativo da extração de DNA, além dos controles do kit; um controle negativo (NTC) e controle positivo com DNA bovino. As configurações do software foram definidas automaticamente para a linha de base, e manualmente para FAM e VIC com limiar de 0.1.

4.4 Emissão do laudo técnico

Após as análises, os selos de autenticidade vegana serão emitidos para aqueles produtos que contenham até 0,3% de DNA animal na amostra, sendo considerada contaminação não intencional (manipulação dos operadores, equipamentos e ambiente), estando dentro de condições sem perigos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras foram manipuladas em reações separadas, de acordo com suas respectivas marcas. Estas foram listadas e identificadas conforme a tabela 2. A cada reação foram adicionados um controle negativo da extração contendo água destilada processada junto às amostras de DNA isolado, e controles positivo e negativo da PCR.

Tabela 3 – Identificação das amostras submetidas à análise.

Alteroza LTDA		GAUDENS CHOCOLATE	
Produto	Sigla	Produto	Sigla
Palmito <i>Chef</i>	PC	Chocolate <i>Fit</i> 71%	GC71
Palmito <i>Nátuz</i>	PN	Nibs cacau torrado	GNCT
Polpa <i>Chef</i>	POC	Nena Nibs	GNN
Polpa <i>Nátuz</i>	PON	Controle positivo	<i>Positive Control</i>
Sorbet <i>Nátuz</i>	SN	Cont. negativo da extração	NEC
Controle positivo	<i>Positive Control</i>	Controle negativo	NTC
Cont. negativo da extração	NEC		
Controle negativo	NTC		

Fonte: Elaborada pelo Autor.

5.1 Detecção

Os primers para a reação foram projetados para a amplificação de regiões específicas do mtDNA, conservada entre os mamíferos. Para isso, o resultado em qPCR esperado para a emissão do selo vegano para os produtos testados é dado quando o Ct das amostras for maior que o Ct *cut off* da reação. Para a configuração do equipamento, junto às instruções do kit utilizado para a reação, o valor do Ct *cut off* é definido pelo Ct do controle positivo + 3,32. Dentro destas configurações de padronização, as amplificações foram bem sucedidas, com os resultados negativos para a detecção de DNA animal tanto para a marca Alteroza (tabela 3, figura 9), quanto para a Gaudens Chocolate (tabela 4, figura 10).

O valor de Ct *cut off* para a reação dos produtos Alteroza foi de aproximadamente 31,79. Todas as amostras apresentaram valores de Ct posteriores ao Ct *cut off*, demonstrando a ausência de qualquer resíduo animal. Ademais, as amplificações ocorreram de forma tardia e apresentaram diferença estreita entre as amostras, com valores de Ct aproximados. Desse modo, se pondera que mesmo com uma sensibilidade do sistema de 0,01%, houve um fraquíssimo ou nenhum contato cruzado com material animal ou contaminação por manipulação humana durante a cadeia de produção.

Para uma empresa com produtos provenientes de uma única matéria prima - o pé de açazeiro - e estes em classificações *in natura* e levemente processados, tais resultados condizem também ao nível de segurança e qualidade da cadeia produtora para com higiene e boas práticas de produção. Com a comercialização fruto crescimento no mercado nacional e

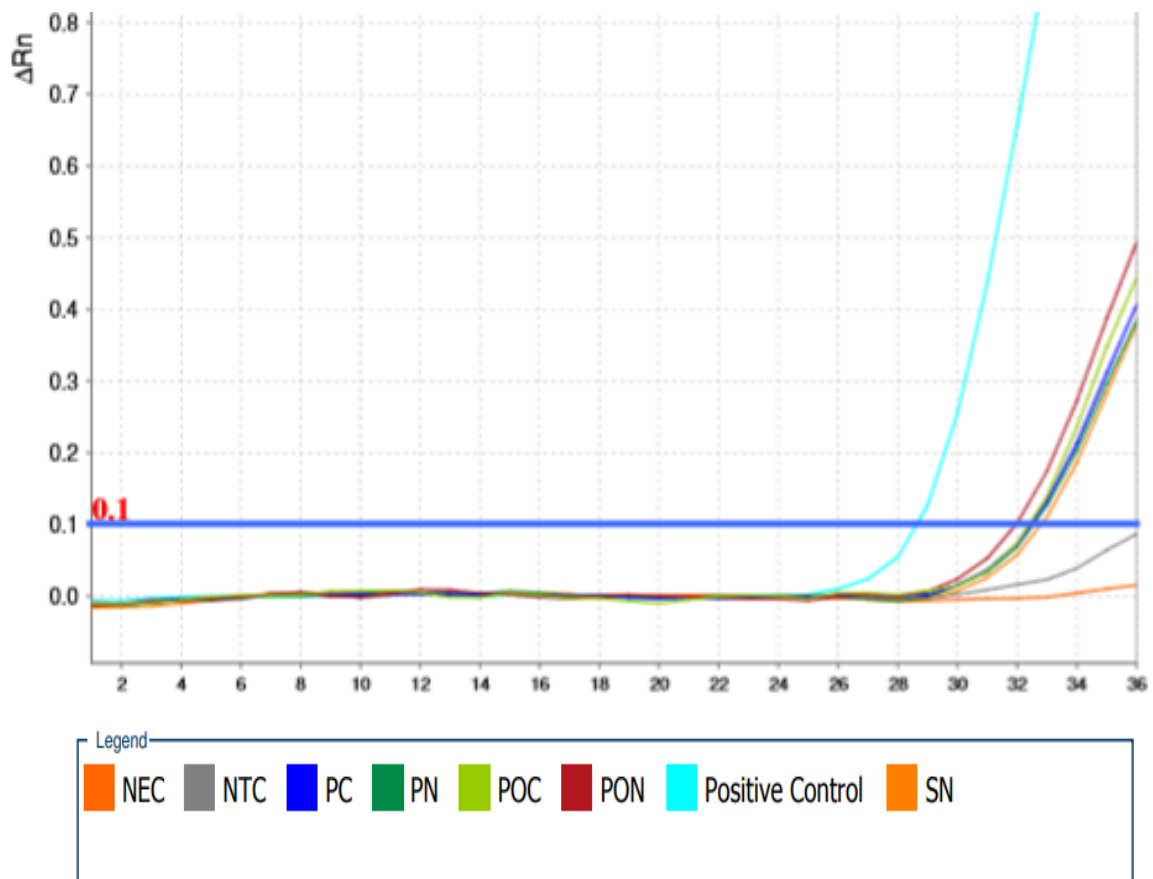
internacional, houve um aumento em seu cultivo para maior produção de polpas e derivados (Homma *et al.*, 2006), o que levou também a incidência de práticas fraudulentas para suprir demandas e obtenção de lucro. São documentadas ocorrências de adulterações de polpas e derivados do fruto, principalmente na adição de compostos amiláceos, mas também pelo uso de corantes e emulsificantes para alterações na espessura, cor e sabor do produto (DA SILVA *et al.*, 2021).

Tabela 4 – Valores de Ct para as amostras de Alteroza LTDA.

<i>ct cut off (28,5+3,32)</i>		
Amostra	Ct	Laudo
PC	32,3	Vegano
PN	32,5	Vegano
POC	32,7	Vegano
PON	32,3	Vegano
SN	35,7	Vegano

Fonte: Elaborada pelo Autor

Figura 9 – Gráfico para obtenção do valor de Ct Alteroza.

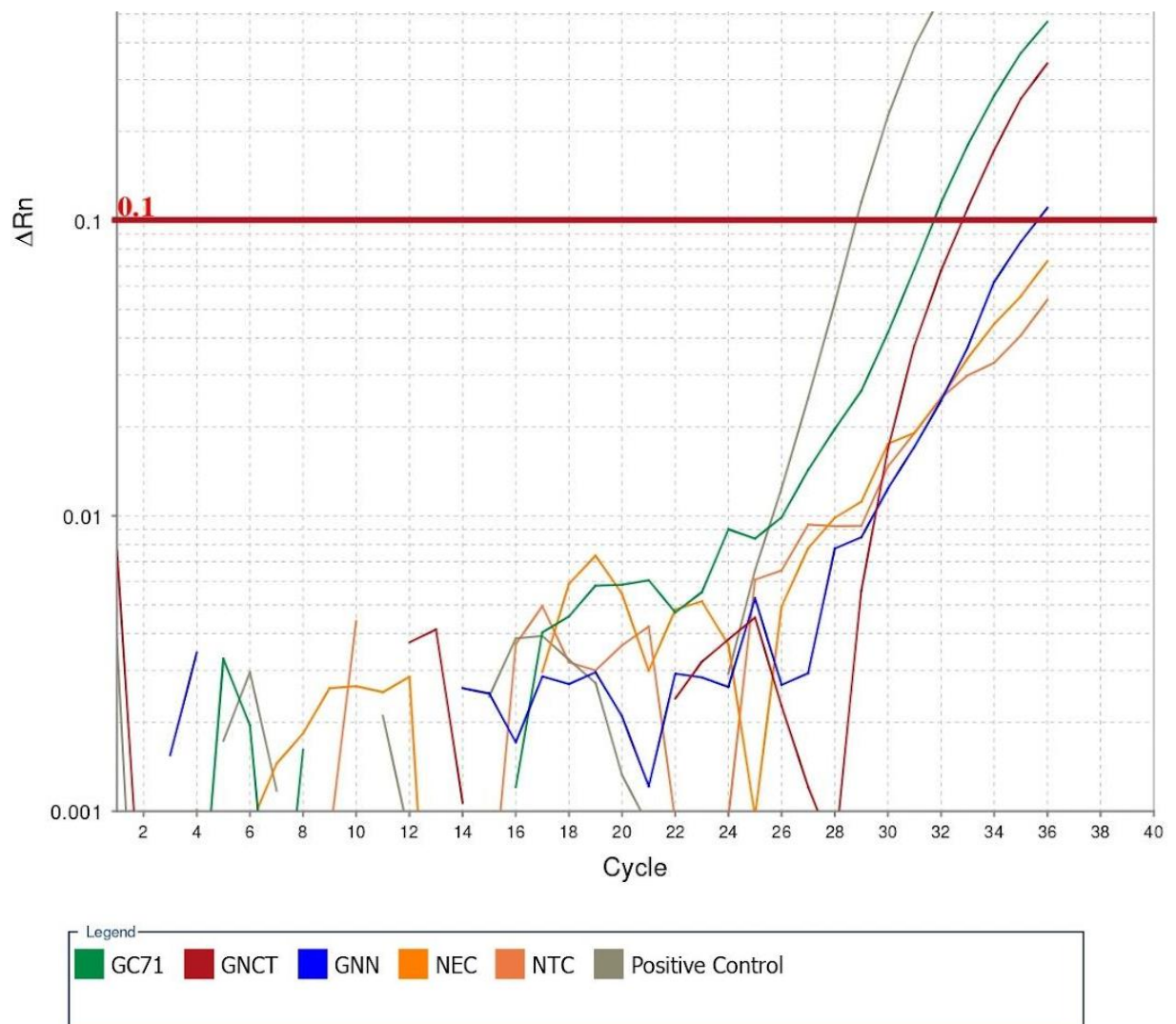


Fonte: Elaborada pelo Autor.

Tabela 5 – Valores de Ct para as amostras de Gaudens Chocolate.

<i>ct cut off (28,7+3,32)</i>		
Amostra	Ct	Laudo
GC71	31,9	Vegano
GNCT	32,9	Vegano
GNN	35,7	Vegano

Fonte: Elaborada pelo Autor.

Figura 10 – Curva de amplificação das amostras Gaudens.

Fonte: Elaborada pelo Autor.

Para os produtos amostrados da Gaudens Chocolate, o Ct *cut off* ficou marcado em aproximados 31,85. Para este ensaio, novamente as três amostras iniciaram a amplificação acima do Ct de corte, representando a ausência de DNA de mamíferos nos alimentos, estando em consonância com as informações declaradas comercialmente dos itens.

As considerações levantadas para a fábrica da Alteroza LTDA, são retomadas agora para a Gaudens, por boas práticas de produção e higiene. Esta empresa, não sendo exclusivamente do nicho vegano, possui outras linhas de chocolates processados, tendo em sua composição leite e derivados, o que não interfere na integridade dos processados veganos, por possíveis contaminações a partir do uso dos mesmos equipamentos de produção e no armazenamento.

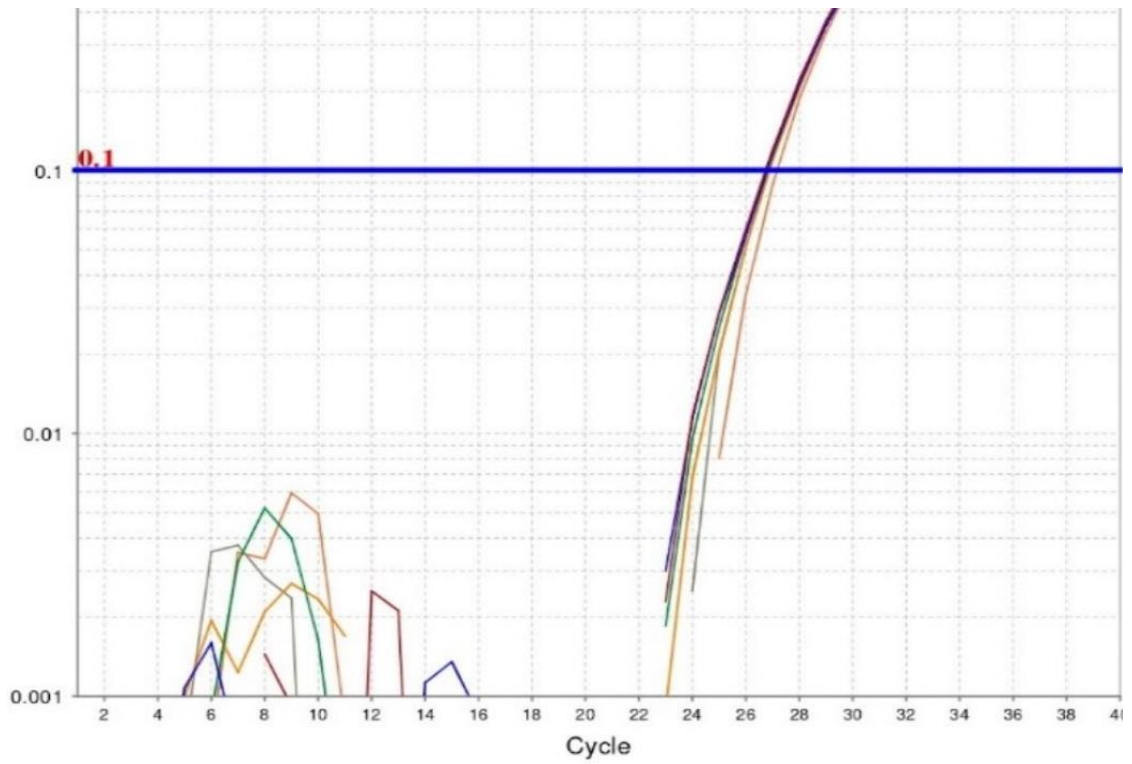
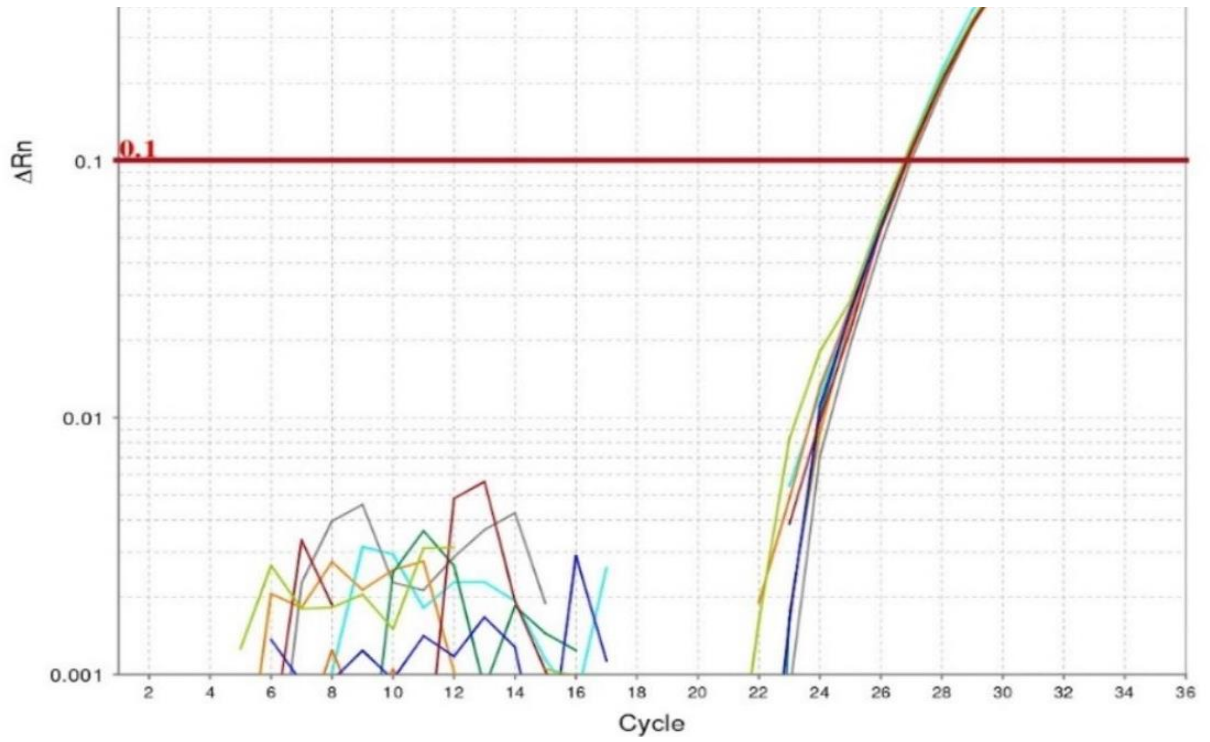
Para adulteração de chocolates processados são datados uso de gorduras animais, como banha (CHE MAN *et al.*, 2005; ROSMAN *et al.*, 2016), para a substituição da manteiga de cacau e consequente barateamento na produção, comprometendo a qualidade do chocolate (BAHRI e CHE MAN, 2016). ROSMAN (2016) identificou em componentes básicos do chocolate adulterações com banha suína para autenticação *halal*.

5.2 Controle interno positivo (IPC)

Para a determinação de pureza dos ácidos nucleicos e possível interferência na detecção de fluorescência e geração de falsos negativos, é feito o uso de um controle interno de amplificação (LOPES, 2013). A amplificação do IPC deve ocorrer de forma igual entre todas as amostras e controles, tendo, portanto, valores semelhantes de Ct (STRAYER, 2014), constatando a ausência de inibidores de PCR.

As reações executadas para este trabalho deveriam apresentar valor do IPC_{cq} semelhante ao Ct do controle positivo (figuras 11). Assim, ambas obtiveram IPC aprovado, com os valores de ICPC_{cq} aproximados, aprovando sua confiabilidade para os testes de amplificação.

Figuras 11 – Gráfico IPC Alteroza e Gaudens, respectivamente.



Fonte: Elaborada pelo Autor.

5.3 Laudo técnico e emissão do selo

Após as etapas de bancada, validação dos resultados e avaliação técnica, os produtos analisados receberam o selo de certificação por DNA, para os rótulos e afins dos produtos (imagem 15), emitidos pela associação BioTec-Amazônia. Eles terão vigência de 12 meses, havendo possibilidade de renovação, a partir de auditoria e nova análise técnica para averiguação no processo de produção.

Fica claro o ganho das empresas para com o recebimento da certificação. As marcas impulsionadas pelo intuito de assegurar maior transparência nas informações do produto e de seus componentes, fazem uso de certificações visuais claras e concisas. aumentando de tal maneira a confiança dos consumidores quanto a procedência da matéria prima e produção, os considerando para composição de suas dietas, sejam elas de indivíduos veganos ou não veganos.

Figura 12 – Certificação visual do Selo Vegano.



Fonte: BioTec-Amazônia, 2021.

6. CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos, constata-se a eficiência do método molecular para a avaliação qualitativa para produtos alimentícios e sua autenticação. Os kits comerciais utilizados demonstraram alta eficiência e sensibilidade, proporcionando a diferenciação na presença intencional e acidental de resíduos cárneos e afins em matrizes alimentares simples e complexas. Ressalta-se também a rapidez na obtenção de resultados, onde a metodologia empregada transcorre em até um dia, com a possibilidade de manipulação de um significativo número de amostras. Para estudos futuros, se faz necessário e importante a aplicação da técnica a outras matrizes alimentares, como a de alimentos altamente processados e mesmo pratos prontos das redes de restaurantes de Belém. Aumentando a variedade de dados da indústria alimentícia paraense, e implementações à técnica.

Os produtos submetidos ao estudo estão todos aptos à concessão do selo vegano, não contendo qualquer resquício ínfimo de deturpação ou contaminação cruzada. A certificação visual já está sendo empregada em rótulos e em divulgação através dos meios de comunicação. Implicando de tal forma na agregação de valor às marcas e destaque em relação à concorrência, assim como aumento na procura e interesse dos consumidores. Reações essas, positivas a ambas as partes a partir de uma certificação confiável e incontestável.

Levando em consideração a diversidade de selos de autenticação vigentes com predominância na fiscalização logística, revisões deste caráter, junto a avaliação de lista de ingredientes não são suficientes, tendo em vista as ocorrências de fraude tanto na fabricação, quanto em rótulos. Normas de padronização futuras necessitam adotar dentre seus métodos de garantia de qualidade, análises laboratoriais que atestem a ausência de material genético animal, em razão que a análise por DNA se mostra uma das mais seguras, visto sua especificidade.

Por fim, fica claro o potencial da cadeia produtiva de alimentos paraense para atender o nicho vegano regional e mesmo nacional, pois atendem todos os requisitos internacionais de produção. Por essa perspectiva se mostra possível a fabricação de produtos veganos locais, atendendo à demanda de consumo que está em constante crescimento, e proporcionando o desenvolvimento cultural e econômico da região.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREU, A. et al. **Exercise Intolerance Due to Mutations in the Cytochrome b Gene of Mitochondrial DNA**. N. Engl. J. Med, 1999. In: Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas, ed 7, 2011.
- ARANCE, E. et al. **Determination of Exosome Mitochondrial DNA as a Biomarker of Renal Cancer Aggressiveness**. Cancers, Granada, 2022, v 14, n 199. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/cancers14010199>>. Acesso em: 02 de maio de 2022.
- ARIF, I. A.; KHAN, H. A. **Molecular Markers for Biodiversity Analysis of Wildlife Animals: A Brief Review**. Animal Biodiversity and Conservation, Riad, v 32.1, p 9-17, 2009.
- AURELIANO, P; FERREIRA, S. **Rotulagem de Produtos Vegetarianos Estritos: Uma Avaliação Frente à Legislação Brasileira**. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Nutrição). Faculdade Pernambucana de Saúde. Recife, 2020.
- BAHRI, S.; CHE MAN, Y. **Rapid Detection of Lard in Chocolate and Chocolate-based Food Products Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy**. J Trop Agric Food Sci. v 44, n 2, p 253-263, 2016.
- CARVALHO, L. et al. **Amplificação por PCR da Região Controle do DNA Mitocondrial de Raças de *Bombyx mori***. Arq. Ciênc. Vet. Zool. Unipar, Umuarama, v. 11, n. 1, p. 15-19, jun. 2008.
- CASTAÑÉ, S.; ANTÓN, A. **Assessment of the Nutritional Quality and Environmental Impact of two Food Diets: A Mediterranean and a Vegan Diet**. Journal of Cleaner Production, v 167, p 929-937. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.04.121>>. Acesso em: 22 de março de 2022.
- CHE MAN, Y. et al. **Analysis of Raw Meats and Fats of Pigs Using Polymerase Chain Reaction for Halal Authentication**. Meat Sci, v 69, n 1, p 47-52, jan. 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.06.020>>. Acesso em: 20 de maio de 2022.
- CONVIBRA. **Consumo Vegano: Perspectiva de um novo negócio**. 2017. Disponível em: <www.convibra.com.br>. Acesso em: 05 de fevereiro de 2022.
- CORREIA, A. M. N. **Fraude Alimentar: Fatores de Risco e Medidas de Controle e Prevenção**. 2018. Dissertação (Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa) - Universidade Nova de Lisboa, 2018. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10362/58098>>. Acesso em: 15 mar. 2022.
- COTTENET, G.; BLANCPAIN, C. **A Real-Time Pcr Method to Assess the Presence of Vertebrate Material in Plant-Based Products**. Lausanne, 2021. Food Control, v 125, n 108001. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108001>>. Acesso em: 20 de abril de 2022.
- DA SILVA, D. et al. **Modelo de aplicabilidade de sistema para rastreabilidade na cadeia produtiva do açaí**. Escola Regional de Informática do Rio De Janeiro (ERI-RJ), 2021, Online. **Anais**. Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Computação, 2021. p. 87-94. Disponível em: <<https://doi.org/10.5753/eri-rj.2021.18779>>. Acesso em 22 de maio de 2022.

Definition of veganism. The Vegan Society. Disponível em: <<https://www.vegansociety.com/go-vegan/definition-veganism>>. Acesso em: 24 de fevereiro de 2022.

DE FREITAS, C. et al. **Avaliação do Perfil de Potenciais Consumidores de Produtos Veganos.** Brazilian Journal of Development, Curitiba, v.7, n.3, p. 28036-28044, mar. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.34117/bjdv7n3-492>>. Acesso em: 15 de maio de 2022.

Emissão de Gases de Efeito Estufa. Embrapa. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/biogasfert/gee/gases-de-efeito-estufa>>. Acesso em: 21 de maio de 2022.

FERNÁNDEZ, L; MARTÍNEZ, G. P. **El Veganismo no es Una Dieta. Una Revisión Crítica Antigorfóbica y Antiespecista del ‘Veganismo de Estilo de Vida’.** 2022. Animal Ethics Review. v 2, n 1, p 44-59, maio. 2022.

HARRISON, R.; RAND, D.; WHEELER, W. **Mitochondrial DNA Variation in Field Crickets across a Narrow Hybrid Zone.** Mol. Biol. Evol, v 4, n 2. p 144-158, 1987.

HEID, A. et al. **REAL TIME QUANTITATIVE PCR.** Genome Research. 1996, p 986-994. Disponível em: <<https://doi.org/10.1101/gr.6.10.986>>. Acesso em: 23 de abril de 2022.

HOFSTATTER, P. **Identificação Humana por DNA Mitocondrial.** 2013. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Biomedicina). Faculdade de Ciências da Educação e Saúde, Centro Universitário de Brasília. 2013.

HOPKIN, K. **Death to Sperm Mitochondria.** Sci Am, v 280, n 3, 1999.

HOWELL, N. **Evolutionary Conservation of Proteins Regions in the Protonmotive Cytochrome b and Their Possible Roles in Redox Catalysis.** J. Mol. Evol, v 29, p 157-169. 1989.

INSTITUTO BRASILEIRO DE OPINIÃO PÚBLICA E ESTATÍSTICA (IBOPE). **Pesquisa de Opinião Pública Sobre Vegetarianismo.** 2018. Disponível em: <https://www.svb.org.br/images/Documentos/JOB_0416_VEGETARIANISMO.pdf>. acesso em: 12 de fevereiro de 2022.

KANO, M. **Natural ou Orgânico? Influência de Selos Certificadores de Alimentos no Comportamento do Consumidor.** Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Administração). Escola Paulista de Política, Economia e Negócios, Universidade Federal de São Paulo. Osasco, mar. 2021.

KAPP, C. **Avaliação do Mercado de Alimentos Processados Veganos no Brasil – Uma Análise Comparativa a Partir do Mercado Canadense.** Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Engenharia de Alimentos). Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, dez. 2017.

KOCHER T. **Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers.** Proc. Natl. Acad. Sci. v 86, n 16, p 6196-6200, ago. 1989. Disponível em: <<https://doi.org/10.1073/pnas.86.16.6196>>. Acesso em: 21 de maio de 2022.

LONDERO, D. **‘Você é Aquilo que Você Come’**: O Veganismo enquanto Estilo de Vida e Ativismo Político. Dissertação (Mestrado em Ciências Sociais). Centro de Ciências Sociais e Humanas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2019.

LOPES, A. R. **Métodos de Biologia Molecular Aplicados à Segurança Alimentar**: Identificação de Espécies de Bovino (*Bos taurus*) e Suíno (*Sus scrofa*) em Produtos Cárneos. 2013. Dissertação (Mestrado em Segurança Alimentar). Faculdade de farmácia, Universidade de Coimbra, Coimbra, jul. 2013.

LYNCH, H.; JOHNSTON, C.; WHARTON, C. **Plant-Based Diets**: Considerations for Environmental Impact, Protein Quality, and Exercise Performance. *Nutrients*, San Diego, 01 dez. 2018. V 10, n 12. Disponível em: < <https://doi.org/10.3390/nu10121841> >. Acesso em: 24 de abril de 2022.

MACEDO, F; PIERRE, F. **Certificação na Agroindústria Cosmética**. *Tekhne e Logos, Botucatu*, v.11, n.3, p 42-54, dez. 2020.

MALORNY, B. et al. **Multicenter Validation of the Analytical Accuracy of Salmonella PCR**: Towards an International Standard. *Appl Environ Microbiol.* 2003, v 69, n 1, p 290-296, jan. 2003. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.69.1.290-296.2003>>. Acesso em: 21 de maio de 2022.

MATSUDA, K. **PCR-Based Detection Methods for Single-Nucleotide Polymorphism or Mutation: Real-Time PCR and Its Substantial Contribution Toward Technological Refinement**. *Adv Clin Chem*, v 80, p 45-72, jan, 2017. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2016.11.002>>. acesso em: 10 de maio de 2022.

ONELLI, R. **Influência da Terra na Qualidade de Chocolates Desenvolvidos com Diferentes Concentrações de Massa de Cacau**. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, fev, 2021.

PERETTI, A; ARAÚJO, W. **Abrangência do Requisito Segurança em Certificados de Qualidade da Cadeia Produtiva de Alimentos no Brasil**. *Gest. Prod.*, São Carlos, v 17, n 1, p 35-49, 2010.

RIBEIRO, U. L. **A Ascensão do Consumo Ético de Produtos Vegetarianos e Veganos no Mercado Brasileiro**. *Revista Observatorio de la Economía Latinoamericana*, jul. 2019. Disponível em: < <https://www.eumed.net/rev/oel/2019/07/consumo-productos-vegetarianos.html>>. Acesso em: 19 de abril de 2022.

Robin, E.; Wong, E. **Mitochondrial DNA Molecules and Virtual Number of Mitochondria per Cell in Mammalian Cells**. *J. Cell. Physiol.* v 136, n 3, p 507-513, set. 1988. Disponível em: < <https://doi.org/10.1002/jcp.1041360316>>. Acesso em 12 de abril de 2022.

ROSMAN, N. et al. **Inhibitory Effect of Chocolate Components Towards Lards Detection in Chocolate Using Real Time PCR**. *International Journal of Food Properties*, v 19, p 2587-2595, 2016. Disponível em: < <https://doi.org/10.1080/10942912.2015.1137936>>. Acesso em: 12 de maio de 2022.

SOUZA, A. **Benefícios da Dieta Vegana para a Saúde**. *Revista Vida & Saúde Vegana*, n. 6, p. 10–13, 2015.

STRAYER, C. **Understanding the IPC in DNA Quantitation Assays**. 2014. Promega Corporation Web site. Disponível em: <<https://www.promega.com.br/resources/profiles-in-dna/2014/understanding-the-ipc-in-dna-quantitation-assays/>>. Acesso em 21 de maio de 2022.

SUAREZ, E. **Tecnologia de PCR e RT-PCR em Tempo Real e Suas Aplicações na Área Médica**. Revista Brasileira de Medicina, nov. 2010, v 67, p 7-19. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/284719832>>. Acesso em: 14 de março de 2022.

Mercado Vegetariano. SOCIEDADE VEGETARIANA BRASILEIRA (SVB). Disponível em: <<https://www.svb.org.br/vegetarianismo1/mercado-vegetariano>>. Acesso em: 16 mar. 2022.

WHITE, R. **Looking Backward, Moving Forward: Articulating a ‘yes... BUT!’ Response to Lifestyle Veganism**. Europe Now. 2019. Disponível em: <<https://www.europenowjournal.org/2018/09/04/looking-backward-moving-forward-articulating-a-yes-but-response-to-lifestyle-veganism/>>. Acesso em 2 de março de 2022.

WITTEWER, C. et al. **Continuous Fluorescence Monitoring of Rapid Cycle DNA Amplification**. Biotechniques, v 22, n 1, p 130-134, agosto de 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.2144/97221bi01>>. Acesso em: 21 de maio de 2022.

ZHANG, D.; HEWITT, G. Nuclear Integrations: Challenges for Mitochondrial DNA Markers. *Three*, v 11, ed 6, p 247-251. Jun, 1996. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0169-5347\(96\)10031-8](https://doi.org/10.1016/0169-5347(96)10031-8)>. Acesso em: 31 de abril de 2022.

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

C824c Corrêa Ribeiro, Naiana.
CRIAÇÃO DE UM SELO PARA AUTENTICAÇÃO DE
ALIMENTOS VEGANOS UTILIZANDO MÉTODOS
MOLECULARES / Naiana Corrêa Ribeiro. — 2022.
38 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. Diego Assis das Graças
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade
Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Faculdade de
Biotecnologia, Belém, 2022.

1. Veganismo. 2. Autenticação alimentar. 3. qPCR. 4.
DNA mitocondrial. I. Título.

CDD 576.5
