



**Miguel
Bruno
das
Neves
Galante**

**Autenticação biomolecular de ervas e
especiarias - proposta de modelo para
autenticação de *Cinnamomum verum* por
real-time PCR**



Universidade de Aveiro
2021

**Miguel
Bruno
das
Neves
Galante**

**Autenticação biomolecular de ervas e
especiarias - proposta de modelo para
autenticação de *Cinnamomum verum* por
real-time PCR**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Luís Manuel Souto de Miranda, professor auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

o júri

- Presidente: Doutora Ana Cristina de Fraga Esteves, Investigadora Auxiliar em Regime Laboral, CESAM & Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro
- Arguente: Prof. Doutora Maria de Lourdes Gomes Pereira, Professora Associada c/ Agregação, Departamento de Ciências Médicas, Universidade de Aveiro
- Orientador: Prof. Doutor Luís Manuel Souto de Miranda, Professor Auxiliar em Regime Laboral, Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro

agradecimentos

Gostava de agradecer à minha mãe e ao meu pai por todo o apoio e tolerância em toda a minha carreira académica e à minha avó que toda a vida me ajudou. Um especial agradecimento para a Bárbara Duarte Coelho pela sua paciência, me incentivar a trabalhar e me ter tornado uma pessoa melhor.

palavras-chave

Canela, Segurança Alimentar, PCR em tempo real, Fraude Alimentar, *Cinnamomum verum*

resumo

A alimentação faz inevitavelmente parte do quotidiano de todos nós, e hoje em dia, mais que nunca, a alimentação é muito importante. Temos estilos alimentares muito variados e doutrinas ou condições de saúde que requerem uma alimentação específica.

Este trabalho consiste numa análise detalhada sobre as fraudes alimentares, as suas causas, tipos e consequências. São também abordadas as entidades relevantes e as estratégias adotadas a nível europeu para prevenir e detetar fraudes alimentares.

Neste trabalho foi principalmente analisado um dos setores alimentares mais aliciante para cometer fraudes alimentares, o setor das ervas e especiarias. Foi realizada uma análise do estado da arte, e são mencionados os principais métodos usados para a autenticação de ervas e especiarias da atualidade.

Por fim há uma análise dos métodos de autenticação da canela e é realizada uma proposta de autenticação para a mesma com o uso do *Real-Time PCR* com base numa análise de diversos artigos científicos.

keywords

Cinnamon, Food Safety, Real-Time PCR, Food Fraud, *Cinnamomum verum*

abstract

Food is inevitably part of our daily lives, and today, more than ever, food is very important. We have a wide range of dietary styles and doctrines or health conditions that require a specific diet.

This work consists of a detailed analysis of how food fraud, its causes, types and consequences. Relevant entities and strategies adopted at European level to prevent and detect food fraud are also addressed.

This work mainly analysed one of the most attractive food sectors to commit food fraud, the herb and spice sector. A state-of-the-art analysis was carried out, and the main methods used for authenticating today's herbs and spices are mentioned. Finally, there is an analysis of the cinnamon authentication methods and an authentication proposal for cinnamon using *Real-Time PCR* is made based on the analysis of several scientific articles.

Índice

Introdução.....	9
Segurança Alimentar.....	9
Fraudes Alimentares.....	10
Pesquisa e produtos protegidos.....	12
Saúde Pública.....	14
Entidades europeias.....	15
Entidades de resposta a fraudes alimentares.....	15
Ações coordenadas pela União Europeia.....	18
Fraude alimentar em ervas e especiarias.....	19
Métodos de autenticação.....	21
Técnicas com base em propriedades físicas.....	21
Técnicas analíticas.....	22
Técnicas moleculares.....	25
Polymerase Chain Reaction.....	28
Real-Time PCR.....	30
A Canela.....	32
Objetivo.....	34
Proposta de método.....	35
Isolamento do ADN.....	35
Amplificação por PCR.....	37
Amostragem.....	38
Inquérito.....	40
Discussão e conclusão.....	45
Referências.....	47

Índice de Figuras

Figura 1: Estratégia Farm to Fork (Farm to Fork strategy European Commission, s.d.)	10
Figura 2: Critérios operacionais principais para distinguir se um caso é considerado fraude ou não conformidade (Food fraud: What does it mean? European Commission, s.d.).	11
Figura 3- Número dos pedidos de investigação de fraudes alimentares dos estados-membros da União Europeia em 2020 (Publication Office of the European Union, 2020).....	15
Figura 4- Número de pedidos no AAC nos últimos anos (Publication Office of the European Union, 2020).	17
Figura 5: Distribuição de publicações pelas diversas técnicas em 2015 (Danezis G. P., 2016).	23
Figura 6: Objetivos da autenticação alimentar e métodos usados para o conseguir (Böhme K., 2019).....	28
Figura 7-Passos de um PCR (Khan Academy, s.d.)	29
Figura 8-Aumento exponencial do ADN durante PCR (Khan Academy, s.d.).....	30
Figura 9- Galeão das especiarias (Cruz P., 2015).....	32
Figura 10- Vários tipos de canela adquiridos em supermercados portugueses.	39
Figura 11- Rótulos de canela sem e com a especificação da espécie usada.....	39
Figura 12- Resultados da resposta 1 do inquérito.	40
Figura 13- Resultados da resposta 2 do inquérito.	41
Figura 14- Resultados da resposta 3 do inquérito.	41
Figura 15- Resultados da resposta 4 do inquérito.	42
Figura 16- Resultados da resposta 5 do inquérito	42
Figura 17- Resultados da resposta 6 do inquérito.	43
Figura 18- Resultados da resposta 7 do inquérito.	43
Figura 19- Resultados da resposta 8 do inquérito.	44

Abreviaturas

ISO – International Organization for Standardization
DOP – Designação de Origem Protegida
ETG – Especialidade Tradicional Garantida
IGP – Indicação Geográfica Protegida
FDA – Food and Drug Administration
OCR – Official Controls Regulation
RASFF – Rapid Alert System for Food and Feed
EFSA – European Food Safety Authority
Europol – European Police Office
Eurojust – European Union Agency for Criminal Justice Cooperation
AAC – Administrative Assistance and Cooperation
ASAE – Autoridade de Segurança Alimentar e Económica
DGVA – Direção Geral de Alimentação e Veterinária
JRC – Joint Research Center
EURLs – European Union Reference Laboratories
NRLs – National Reference Laboratories
ESA – European Spice Association
FI – FoodIntegrity
FAKB – Food Authenticity Base
FAIR – The Food Adulteration Incidents Registry
MEDISYS – Medical Information Systems
EMM – Europe Media Monitor
BfR – Federal Institute of Risk Assessment
NMR – Nuclear Magnetic Resonance
HPTLC – High-Performance Thin-Layer Chromatography
GC – Gas Chromatography
LC – Liquid Chromatography
MS – Mass Spectrometry
HS-SPMEGC-IRMS – Head-Space Solid-Phase Microextraction with Gas Chromatography – Isotope Ratio Mass Spectrometry
IR – Infra-Red Spectroscopy
FT-IR – Fourier Transform Infra-Red Spectroscopy
HIS – Hyperspectral Imaging
ADN – Ácido desoxirribonucleioco
RFPL – Restriction-Fragment-Length Polymorphism
RAPD – Random Amplified Polymorphic DNA
PCR – Polymerase Chain Reaction
HRM – High Resolution Melting
ddPCR – Droplet Digital PCR
NGS – Next Generation Sequencing
SCARs – Sequence-Characterized Amplified Regions
OGM – Organismos Genéticamente Modificados
LOD – Limite de Detecção
LAMP – Loop-Mediated Isothermal Amplification

CTAB – Brometo de cetrinônio
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
PVP – Polivinilpirrolidona
ITS – Internal Transcribed Spacer

Introdução

Segurança Alimentar

Num mundo cada vez mais populoso a necessidade de uma alimentação segura nunca foi tão notória. Embora sejam feitos esforços todos os anos para diminuir a escassez de alimentos nos países em desenvolvimento ainda existem muitos seres humanos com carência alimentar e todos os anos milhões de pessoas adoecem devido à falta de alimentos e ao consumo de alimentos inseguros. Para realçar a importância da segurança alimentar basta lembrar que o direito à alimentação é universal e está bem explícito no artigo 25 da Declaração Universal dos Direitos Humanos: “Toda a pessoa tem direito a um nível de vida suficiente para lhe assegurar e à sua família a saúde e o bem-estar, principalmente quanto à alimentação, ao vestuário, ao alojamento, à assistência médica e ainda quanto aos serviços sociais necessários, e tem direito à segurança no desemprego, na doença, na invalidez, na viuvez, na velhice ou noutros casos de perda de meios de subsistência por circunstâncias independentes da sua vontade.” (Declaração Universal dos Direitos Humanos)

A realidade nos países desenvolvidos é bem distinta e embora a oferta de alimentos seja grande as preocupações também existem, principalmente no que toca à qualidade e composição dos alimentos. Estas preocupações existem tanto por parte do consumidor como pela comunidade científica, o que está bem refletido no aumento exponencial de artigos científicos sobre autenticação alimentar após o ano de 2000 (Danezis, Tsagkaris, Camin, Brusica, & Georgiou, 2016).

Na Europa a proteção da saúde dos consumidores é o objetivo de todas as leis e normas nos setores da agricultura, pecuária e produção alimentar. A política de segurança alimentar tem como objetivo garantir a segurança dos alimentos. Com a estratégia *Farm to Fork* a União Europeia pretende tornar os nossos alimentos mais sustentáveis tendo como objetivos:

- Ter um impacto ambiental positivo ou neutro;
- Ajudar a mitigar as mudanças ambientais e sua adaptação;
- Reverter a perda de biodiversidade;

- Assegurar a segurança dos alimentos, nutrição e saúde pública, e ainda garantir o acesso alimentar suficiente, seguro, nutritivo e sustentável;
- Preservar a acessibilidade dos alimentos enquanto gera retornos económicos justos, incentivando a competitividade do setor alimentar europeu e promovendo o comércio justo (Farm to Fork strategy European Comission, s.d.).



Figura 1: Estratégia *Farm to Fork* (Farm to Fork strategy European Comission, s.d.)

Fraudes Alimentares

As fraudes alimentares são uma ameaça à segurança alimentar, ocorrem com bastante frequência e tem aumentado ao longo dos anos. Uma fraude alimentar é definida pela *International Organization for Standardization* como “Wrongful or criminal deception that utilizes material goods for financial or personal gain; Note 1 to entry: Fraud means wrongful

or criminal deception intended to result in a financial or personal gain that creates social or economic harm” (ISO, 2018).

As fraudes alimentares incluem vários tipos, e podem ser qualificadas nas seguintes categorias:

- Diluição, processo em que é misturado um produto de valor mais baixo a um de valor superior;
- Substituição, existe troca de um nutriente, ingrediente, ou uma parte do alimento por uma de valor inferior;
- Ocultação, é ocultada a baixa qualidade dos ingredientes ou do produto;
- Melhoramento não aprovado, neste caso são adicionados componentes desconhecidos e não declarados aos produtos alimentares de forma a melhorar as suas qualidades;
- Contrafação, são infringidos direitos de propriedade intelectual;
- Rotulagem incorreta, existem alegações falsas ou distorção da informação disponível no rótulo ou na embalagem;
- Falsificação e venda no mercado negro, produtos são vendidos fora dos mercados supostos (Food fraud: What does it mean? European Commission, s.d.).



Figura 2: Critérios operacionais principais para distinguir se um caso é considerado fraude ou não conformidade (Food fraud: What does it mean? European Commission, s.d.).

Para ser possível definir um plano de combate e prevenção de fraudes alimentares é necessário perceber a vulnerabilidade das cadeias e indústrias alimentares. Um estudo realizado em 2017 revelou que os setores alimentares mais vulneráveis incidem sobre as carnes, peixe, azeite e especiarias (Silvis, Ruth, Fels-Klerx, & Luning, 2017).

As ervas e as especiarias são especialmente apelativas devido ao seu elevado preço por peso e à capacidade limitada dos consumidores de conseguirem detetar as adulterações (C., J., & M., 2012).

A indústria global de ervas e especiarias foi avaliada em cerca de 12 mil milhões de dólares em 2020 (Shahbandeh, 2021). Esta indústria encontra-se constantemente sob ameaça de criminosos que cometem fraudes para ganhos económicos pessoais, oportunidades para estas adulterações podem acontecer a qualquer ponto da cadeia de abastecimento (Galvin-King, Haughey, & Elliott, 2017). Na verdade, quanto maior é a cadeia de abastecimento maior é a probabilidade de ocorrer fraudes, e o impacto destas é bem real, de acordo com John Spink (PwC, 2016) estima-se que as fraudes alimentares causem a nível global perdas entre 30000 e 40000 milhões de dólares anuais. A necessidade de mais controlo na autenticação de produtos alimentares para detetar e prevenir fraudes alimentares tem vindo a aumentar e tornou-se bastante evidente depois do escândalo da carne de cavalo em 2013 que agitou toda a Europa.

Como já foi mencionado o setor das ervas e especiarias é bastante aliciante para fraudes alimentares devido aos seus produtos de valor acrescentado e a outros fatores propícios à sua realização, sendo o fator principal a sua longa cadeia de fornecimento. As fraudes no setor podem incluir diversos tipos, nomeadamente a substituição, onde ervas e especiarias são substituídos por produtos de valor inferior. Por exemplo pode haver a substituição de folhas de orégão por folhas de oliveira. Entre os tipos de fraudes mais comuns no setor encontra-se também as melhorias não aprovadas, como é o caso da adição de corantes à paprika para a sua cor ser mais apelativa.

Outro tipo bastante comum é a declaração de origens geográficas falsas, neste caso é atribuída uma origem geográfica específica de um produto de alta qualidade a um produto de qualidade inferior para este ser vendido a um preço superior ao seu valor. Por exemplo açafraão importado de fora da União Europeia é rotulado como originário de *La Mancha*, Espanha (Autentika Global, s.d.).

Pesquisa e produtos protegidos

A investigação na área da autenticação de alimentos está distribuída por vários países, sendo os principais envolvidos os países do sul da Europa, como a Itália, Portugal, Grécia, Espanha e França. Estes países têm em comum o facto de produzirem um grande número de produtos classificados como produtos com Designação de Origem Protegida (DOP), produtos com Especificidades Tradicionais Garantidas (ETG) e produtos com Indicação Geográfica Protegida (IGP) (Danezis, Tsagkaris, Camin, Brusic, & Georgiou, 2016).

É de salientar que do top10 de países que efetuam mais pesquisa na área, todos são países europeus à exceção da China e dos Estados Unidos da América, isto é o resultado das legislações nacionais e europeias, a Itália encontra-se em primeiro lugar sendo também o país que produz mais produtos classificados como DOP, ETG, ou IGP no mundo (Danezis, Tsagkaris, Camin, Brusic, & Georgiou, 2016).

Estas três designações foram criadas pela União Europeia para identificar regiões geográficas e especialidades tradicionais. E são definidas como:

- DOP: para receber o status de DOP, todo o produto deve ser tradicional e inteiramente fabricado (preparado, processado e produzido) dentro da região específica e, assim, adquirir propriedades únicas;
- IGP: para receber o status de IGP, todo o produto deve ser tradicionalmente e pelo menos parcialmente fabricado (preparado, processado ou produzido) dentro da região específica e, assim, adquirir propriedades únicas;
- ETG: para receber o status de ETG, um alimento deve ser de “caráter específico” (ter atributos de produção característicos que distinguem claramente um produto de outros produtos semelhantes da mesma categoria) e suas matérias-primas, método de produção ou processamento devem ser “tradicionais” (deve ter uma utilização comprovada no mercado nacional por um período que permite a transmissão entre gerações; este período deve ser de pelo menos 30 anos) (FoodChain ID, s.d.).

Estas designações são baseadas na Regulação N°1151/2012 da União Europeia (anexo 1), e asseguram que apenas produtos genuínos originários naquela região podem ser identificados como tal (FoodChain ID, s.d.).

Portugal conta com produtos em diversas categorias como nas carnes, queijos, azeite, produtos de padaria e pastelaria entre outras. Ter um selo de DOP, ETG ou IGP transmite

confiança ao consumidor sobre a qualidade dos produtos, e diversas iguarias regionais portuguesas tem um destes selos, nomeadamente os famosos ovos moles de Aveiro.

Saúde Pública

Para além das perdas económicas, algumas substâncias usadas nas adulterações podem causar problemas de saúde como reações alérgicas ou exibirem propriedades tóxicas, isto reforça ainda mais a importância das regulamentações e da autenticação alimentar, porque nestes casos deixa de ser apenas um problema de perda de lucros e passa a ser um possível problema de saúde pública.

Vários casos acontecem todos os meses em diversos ramos da indústria alimentar, e são expostos pelos meios de comunicação em todo o mundo. Basta analisar qualquer dos *Food Fraud Summary* disponíveis no website da União Europeia, *knowledge4policy.com* na secção dos *Monthly Food Fraud Summary Reports* para encontrar notícias com títulos como ‘*Three detained for adulterated spice business in Ganjam*’, ‘*Over 9000 Kg of Lollipop Candies Adulterated with Talcum Powder Seized, Case Filed Under FSA*’, ‘*Spain seizes meat and rum in two crackdowns*’, ‘*Big Potato Fraud Exposed in Bulgaria*’ entre muitos outros casos (European Commission, 2021).

Entre os escândalos de fraudes alimentares mais conhecidos temos o caso do ‘Azeite’ espanhol em 1981 onde óleo de sementes foi contaminado com anilina e vendido como azeite, mais de 300 pessoas morreram nos primeiros 12 meses devido ao, agora chamado, *síndrome do óleo tóxico* (Gelpí, et al., 2002).

O caso do leite chinês em 2008, afetou 290000 consumidores no mundo, causou mais de 50000 hospitalizações e seis mortes na China (Cardoso, Freienstein, & Morehouse, 2010). Neste caso foi adicionado melamina, uma substância com alto nível de proteína, a leite que estava a ser diluído para este passar nos testes ao número de proteínas (Pavlović A., 2019). Infelizmente a melamina causa problemas renais, podendo levar a pedras nos rins e insuficiência renal.

É de referir também o já citado famoso escândalo da carne de cavalo, em que carne de cavalo entrou na cadeia de abastecimento como carne bovina e foi depois vendida em vários

produtos no Reino Unido (Taylor, 2019). Este foi identificado na Irlanda, mas acabou por se estender a toda a Europa e levou à retirada de milhões de produtos do mercado europeu, sendo seguido de uma perda de confiança enorme por parte dos consumidores.

Estes casos foram dos mais importantes a nível mundial e mudaram a maneira como os nossos alimentos são tratados hoje, chamando atenção para a necessidade de regulamentações e métodos de autenticação alimentar para prevenir fraudes futuras.

Entidades europeias

Entidades de resposta a fraudes alimentares

A União Europeia criou entidades reguladoras que trabalham no sentido de prevenir e detetar fraudes no mercado europeu.

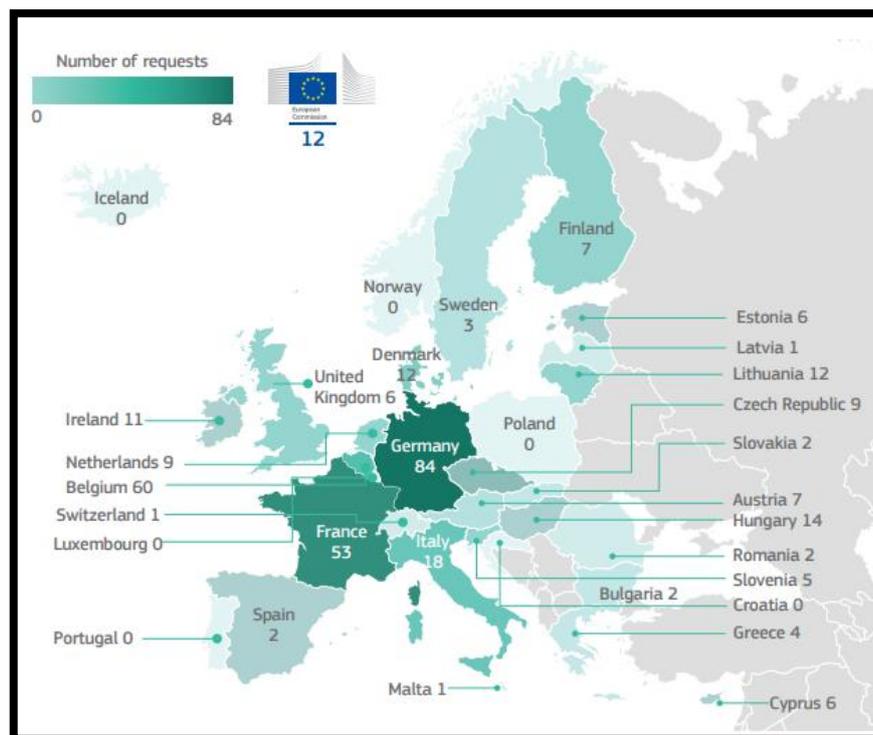


Figura 3- Número dos pedidos de investigação de fraudes alimentares dos estados-membros da União Europeia em 2020 (Publication Office of the European Union, 2020).

A União Europeia e os seus estados-membros têm prestado a devida atenção à segurança dos consumidores no que toca ao setor alimentar, e têm os padrões alimentares mais restritos do mundo.

Os países da União Europeia seguem as *Official Controls Regulation* (OCR) para garantir o cumprimento das leis alimentares, o bem-estar dos animais, plantas e seus produtos. Para garantir o cumprimento das OCR, manter os consumidores seguros e combater as fraudes alimentares foi necessário criar entidades e meios adequados (European Commission, 2017).

Em 1979 foi criado o *Rapid Alert System for Food and Feed* (RASFF), este sistema permite partilhar informação entre os seus membros e garante que notificações urgentes são enviadas e recebidas para uma resposta eficiente, coletiva e rápida. Desde a sua criação o RASFF já evitou muitos riscos de segurança antes de serem perigosos para os consumidores (European Commission, s.d.).

A *European Food Safety Authority* (EFSA) foi criada em 2002 após um período de crises alimentares no final da década de noventa. Esta entidade foi criada com o objetivo de servir de fonte de conselhos científicos e comunicação em riscos associados a cadeias de abastecimento. Desde a sua criação a EFSA já aconselhou em diferentes questões e áreas como na segurança alimentar, aditivos alimentares, organismos geneticamente modificados, pesticidas e saúde animal. É também da sua responsabilidade comunicar informação e as suas implicações a parceiros, às partes interessadas (*Stakeholders*) e ao público em geral para servir de ponte entre a ciência e o consumidor (European Food Safety Authority, s.d.).

A *Food Fraud Network* foi criada em 2013 e é uma rede composta pela Comissão Europeia, o Serviço Europeu de Polícia (Europol), os organismos de ligação designados pelos estados-membros e pela Agência da União Europeia para a Cooperação Judiciária Penal (Eurojust) (European Commission, s.d.). Esta rede inclui os estados-membros, a Suíça, a Noruega e a Islândia e tem como objetivo a troca de informação e cooperação para o cumprimento das legislações alimentares europeias. Ajuda assim os membros da rede a seguir as OCR.

A *Food Fraud Network* consulta o *Knowledge Center for Food Fraud* que fornece perícia alimentar. Existe também cooperação com a Europol na luta contra alimentos e bebidas falsificadas e abaixo do padrão e ainda contra pesticidas falsificados. Em 2019 a

rede foi chamada a atuar no ‘*Opson VIII Europol*’ que tinha como alvo vários produtos orgânicos com café e 2,4-Dinitrofenol DNP (Europol, 2020).

Em 2015 a Comissão desenvolveu uma ferramenta informática, o *Administrative Assistance and Cooperation* (AAC), esta ferramenta permite que os países da União Europeia troquem dados confidenciais de forma segura em casos de suspeita de fraude alimentar. O número de pedidos de assistência e cooperação entre os membros têm vindo a aumentar ao longo dos anos e atingiu 292 pedidos em 2019. As ervas e especiarias ocupam o sexto lugar nos produtos com mais pedidos no AAC em 2019, manteve a sua posição apesar do aumento de 10 para 12 pedidos quando comparado com 2018 (European Commission, s.d.).

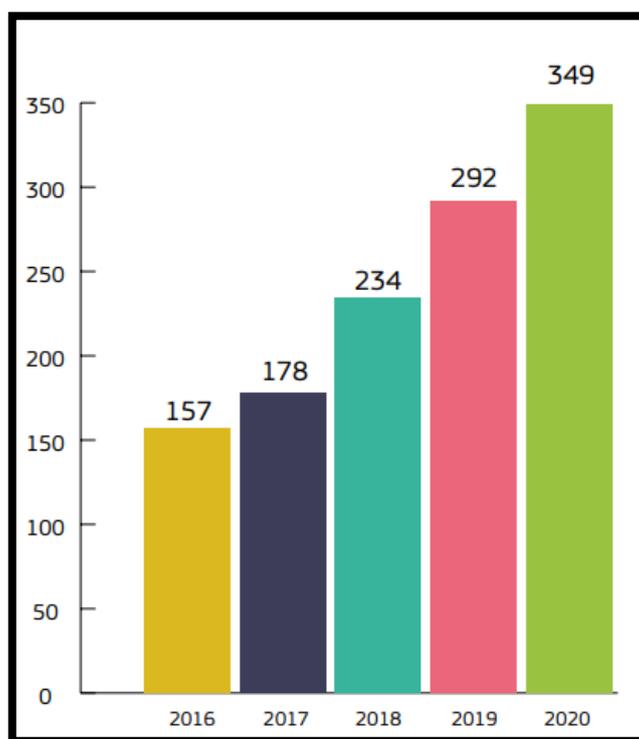


Figura 4- Número de pedidos no AAC nos últimos anos (Publication Office of the European Union, 2020).

Cada país da União Europeia têm a sua própria entidade, ou várias, que são responsáveis pela segurança alimentar, no caso de Portugal temos a Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE) e a Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGVA). A lista dos países, suas entidades responsáveis e contatos pode ser encontrada no documento

Food Fraud contact points (anexo 2) disponível na página web da Comissão Europeia na secção *The EU Food Fraud Network*.

Ações coordenadas pela União Europeia

A Comissão Europeia tira proveito do seu acesso privilegiado a dados de rastreabilidade e aos alertas na União Europeia, e pede aos estados-membros ou ela mesmo coordena atividades para investigar casos de suspeita de fraude alimentar. Os estados-membros recebem análise de dados e coordenadas dentro do *EU Food Fraud Network* e se necessário o caso é transferido à Europol de modo a ocorrer investigação policial.

A Comissão realiza uma triagem semanal de todas as notificações realizadas no *Administrative Assistance and Cooperation* e no *Rapid Alert System for Food and Feed* para identificar potenciais infrações na legislação alimentar europeia que não tenham sido ainda detetadas pelos estados-membros ou caso necessário atuar a nível da União Europeia. As notificações são identificadas no iRASFF para chamar a atenção dos estados-membros ou transferidas diretamente para o *Eu Food Fraud Network* para tratamento e ação. As partes interessadas são também informadas quando novos ou inesperados esquemas fraudulentos são detetados.

Os estados-membros podem pedir serviços à Comissão ou esta pode atuar por iniciativa própria. Isto acontece quando o possível esquema fraudulento envolve operadores em vários estados-membros, quando estão envolvidos países terceiros e quando as suspeitas representam perigo de saúde ou socioeconómico. O critério de decisão para uma ação coordenada depende do risco. Caso a suspeita esteja relacionada com produtos importados, a comissão discute com os países em causa e solicita informações e investigações específicas. A comissão conta ainda com o *Joint Research Center (JRC)* e a *European Food Safety Authority (EFSA)* para suporte científico (European Commission, s.d.).

A Comissão tem também o poder de criar *EU Reference Laboratories (EURLs)* nos setores que achar adequado promover práticas uniformes e métodos de análise, teste e

diagnósticos certificados. A decisão de estabelecer os EURLs é feita em conjunto pelo Parlamento e Conselho Europeu, sendo o título atribuído pela Comissão Europeia. A designação tem a duração mínima de 5 anos e pode ser revista com regularidade pela Comissão Europeia. A Comissão criou também uma rede de *National Reference Laboratories* (NRLs) que são coordenados pelos EURLs, esta rede é responsável por manter os padrões alimentares da União Europeia para procedimentos padrão e para métodos de teste na área alimentar (European Commission, s.d.).

Fraude alimentar em ervas e especiarias

Para além das autoridades alimentares oficiais da União Europeia existem outras organizações privadas interessadas na luta contra a fraude alimentar de ervas e especiarias. Na Europa temos como exemplo a *European Spice Association* (ESA). A ESA é uma organização constituída por federações nacionais da indústria alimentar nos estados-membros da União Europeia, Suíça e Turquia. A inclusão na ESA pode ser atribuída também a associações, organizações e companhias envolvidas na indústria das ervas e especiarias que cumpram os requisitos necessários. Os objetivos da ESA são:

- Representar os interesses dos membros perante os órgãos e departamentos da União Europeia e as instituições e organizações internacionais;
- Promover o interesse dos membros em relação aos produtos e proteger a imagem dos produtos do setor;
- Estudar temas de interesse aos associados nas áreas científica, legislativa, tecnológica e econômica (European Spiece Association, 2021).

A ESA publicou vários documentos (anexo 3) que ajudam a evitar fraudes alimentares na indústria das ervas e especiarias, é de destacar o *ESA Adulteration Awareness Document*, este documento expressa o apoio da associação e dos seus membros ao cumprimento das legislações, sendo a associação extremamente contra qualquer prática de adulteração ou competição injusta, à padronização dos produtos e à prevenção de fraudes alimentares através da avaliação das cadeias de abastecimento, a natureza do material e testes aos produtos. Está também disponível entre outros o *Quality Minima Document* que tem o objetivo de estipular a qualidade mínima das ervas e especiarias que deve ser requerida pelos compradores (European Spice Association, 2021).

A *International Organization for Standardization (ISO)* é uma organização não governamental, independente com 165 membros e organismos nacionais. Portugal juntou-se à ISO em 1949. Esta organização foi criada em 1947 e contava com 67 comités técnicos, desde a sua criação a organização publicou imensas normatizações em diferentes áreas de interesse, sendo uma delas a das ervas e especiarias. Pode ser encontrado um resumo das normas da ISO referentes a ervas e especiarias num documento publicado pela ESA, o *H&S Sources of Variation -ISO*, neste documento podem ser consultadas várias informações sobre as ervas e especiarias, nomeadamente o número da normalização publicada pela ISO, a sua definição, variações ou espécies, origem, percentagem de matéria estranha e estrangeira, notas e receitas e parâmetros físicos e químicos (International Organization for Standardization, 2021).

Existem também projetos financiados pela União Europeia para reforçar a luta contra as fraudes alimentares, como é o caso do *FoodIntegrity (FI)*. Este projeto envolve universidades, empresas privadas do ramo alimentar, laboratórios e autoridades públicas de mais de 20 países de dentro e fora da União Europeia. O projeto aborda a fraude alimentar e tem como objetivo a internacionalização, harmonização e exploração das tecnologias para garantir a integridade dos alimentos europeus (FoodIntegrity, 2021). A FI disponibiliza diversas ferramentas, entre elas duas bases de dados, a *Knowledge Base* e a *FoodIntegrity Network*. Estão disponíveis online diversos infográficos, a *FoodIntegrity App*, opiniões científicas, um livro de mão e ainda o livro *Foodintegrity Guidelines* com guias recomendados para prevenir fraudes alimentares (FoodIntegrity, 2021).

A Comissão Europeia disponibiliza várias bases de dados como a *EU Wine DB* específica para os vinhos, a *Food Authenticity Base (FAKB)*, a *Oleum DB* e a *Honey DB*. Na Comissão existem outros recursos na luta contra a fraude alimentar, como:

- *The Food Adulteration Incidents Registry (FAIR)*, é uma compilação de eventos históricos e atuais que envolvem fraude alimentar;

- *Medical Information Systems (MEDISYS)*, é um sistema de monitorização dos media para rápida identificação de potenciais ameaças à saúde pública, a informação do MEDISYS deriva do *Europe Media Monitor (EMM)* desenvolvido pelo *Joint Research Center (JRC)*;

- *Federal Institute for Risk Assessment (BfR)*, o BfR está a trabalhar no *FoodAuthent* que tem como objetivo desenvolver a *fAuthent System*, uma ferramenta informática aberta para gerir dados relacionados a comida, esta pode ser usada para proteção de produtos,

laboratórios de controlo oficiais e documentação da frequência de controlo para produtos particulares (European Commission, 2019).

Métodos de autenticação

Embora a segurança alimentar do modo como a conhecemos seja algo relativamente recente é necessária fazer a contextualização e o enquadramento das técnicas usadas atualmente, isto ajuda a perceber o ponto da situação em que vivemos e a compreender melhor o estado da área. Existem vários métodos analíticos usados na deteção de fraudes alimentares e o número de técnicas têm vindo a aumentar ao longo dos anos.

Quando temos que escolher um método para autenticar produtos alimentares temos que ter atenção às suas características, ao modo como funcionam, se podem ser intrusivos ou não, e às suas vantagens e desvantagens. No entanto há condições que todos devem possuir, estes devem ser replicáveis, demorar o menor tempo possível e serem de confiança. Diferentes técnicas são usadas para diferentes fins, como seria de esperar, uma técnica que determine o local de origem provavelmente não nos diz a composição química. Diversas técnicas químicas, bioquímicas e moleculares são usadas de momento enquanto algumas técnicas cromatográficas, de espectroscopia vibracional e moleculares estão a emergir na autenticação de especiarias (A., A., & Meenatchi R., 2021).

Técnicas com base em propriedades físicas

Esta técnicas tem como objetivo analisar as propriedades físicas das ervas e especiarias. As técnicas macroscópicas e microscópicas podem ser usadas em conjunto com métodos sensoriais.

Os métodos macroscópicos para identificar matérias de origem vegetal são baseados em parâmetros como a forma, tamanho, cor, textura, características superficiais e de fratura, odor e sabor enquanto os métodos microscópicos são usados para determinar características estruturais, e a estrutura celular e interna dos tecidos (Revathy, Rathinamala, & Murugesan, 2012).

A microscopia pode ser usada na identificação de amido em especiarias que naturalmente não contem amido como o açafraão da Índia, cominho, coentros, cravo e pimenta (Food Safety and Standards Authority of India, 2015).

Este método foi usado para identificação de adulterantes em especiarias em pó em diferentes especiarias, nomeadamente no pimentão, pimenta, cominho e mostarda (Zhu & Zhao, 2014). Através da microscopia foram identificados adulterantes em 4 de 11 amostras de chá em saquetas e misturas de corte grosso (Michetti, Cuadra, & N., 2019).

Estes são apenas alguns exemplos entre muitos casos, é possível encontrar dezenas de artigos publicados na Ásia, Europa, América do Norte e América do Sul que usaram métodos microscópicos para autenticar ervas e especiarias (C., A., & Nick P., 2020).

Técnicas analíticas

Existem várias técnicas químicas e bioquímicas que são usadas na autenticação de ervas e especiarias, cada uma com as suas vantagens e desvantagens. As técnicas não moleculares mais usadas nos últimos anos tem sido as técnicas cromatográficas e isotópicas.

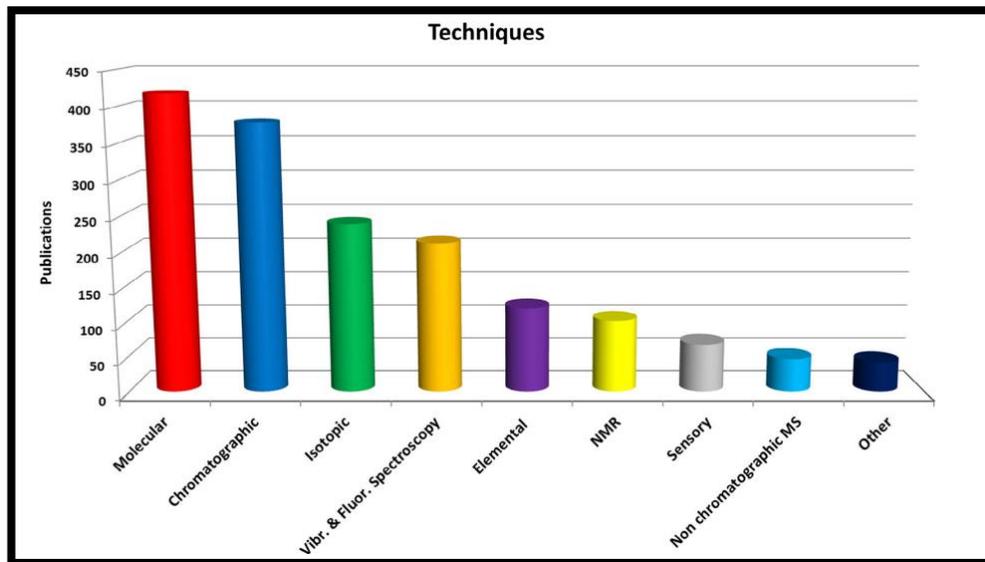


Figura 5: Distribuição de publicações pelas diversas técnicas em 2015 (Danezis, Tsagkaris, Camin, Brusic, & Georgiou, 2016).

As técnicas cromatográficas têm a vantagem de separar eficientemente uma mistura de componentes em partes individuais, o que as torna uma ferramenta de controlo de qualidade amplamente preferida para a deteção de adulterantes ou caracterização de produtos alimentares (A., A., & Meenatchi R., 2021).

Através do uso de *High-Performance Thin-Layer chromatography* (HPTLC) bidirecional, foi possível a determinação em simultâneo de curcumina, amarelo de metanil e corantes *Sudan* em curcuma, pimenta e vários tipos de caril em pó (Dixit, KHANNA, & DAS, 2008).

Através de *Thin-Layer chromatography* foi detetada a presença de corantes magenta e rosa em amostras de açafrão comercial (Bhooma, Nagasathiya, Vairamani, & Parani, 2020).

Uma análise por *High-Performance Liquid chromatography* e *Gel Permeation chromatography* em 83 amostras de várias especiarias (pimenta, curcuma, pimentão, sumac, cominho e caril) selecionadas de forma aleatória de vários supermercados egípcios permitiu a deteção de 5 tipos diferentes de corantes *Sudan* estando 50% das amostras adulteradas (Sebaei, Youssif, & Ghazi, 2019).

Devido à complexidade das matrizes alimentares e a maior exigência na qualidade dos produtos, várias técnicas de alta resolução como a *Gas chromatography* (GC) e *Liquid chromatography* (LC) tem sido usadas em conjunto com *Mass spectrometry* (MS),

nomeadamente na autenticação de orégãos, pimenta preta e açafrão (A., A., & Meenatchi R., 2021).

Num estudo mais recente foi desenvolvido o método de *Head-space solid-phase microextraction with Gas Chromatography – Isotope Ratio Mass Spectrometry* (HS-SPME GC-IRMS). O método mostrou ser rápido e eficiente na análise dos isótopos ^{13}C e ^2H da vanilina, isto permite verificar se a origem da vanilina é natural ou sintética (Perini, Pianezze, Strojnik, & Camin, 2019).

A espectroscopia é usada em autenticação alimentar e é o estudo da interação entre radiação eletromagnética e a matéria dos alimentos que pode ser absorvida, espalhada ou transmitida com base nos seus constituintes físicos ou químicos (Modupalli, Naik, Sunil, & Natarajan, 2021). A espectroscopia estuda então a absorção e emissão de luz ou outras radiações de matéria, as técnicas espectroscópicas são extremamente sensíveis e conseguem detetar quantidades vestigiais de poluentes e contaminantes (Graybeal J. D., 2021).

Diversas técnicas de espectroscopia são usadas em autenticação de alimentos, como a *Infra-Red spectroscopy* (IR), *Fourier Transform Infra-Red spectroscopy* (FT-IR), *Raman spectroscopy*, *Hyperspectral Imaging* (HSI) e *Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy* (NMR), estas são das técnicas de espectroscopia de maior destaque. Pode consultar a comparação entre elas no anexo 4.

Através do uso de ^1H NMR foram analisados os corantes específicos de 15 amostras de açafrão, foi possível confirmar que 13 das amostras era efetivamente açafrão, e que uma das amostras tinha sido adulterada com tartrazina (Schumachera, Mayer, Sproll, Lachenmeier, & Kuballa, 2016).

Em 2019 foi usada a técnica de *Hyperspectral Imaging* para detetar adulterantes em amostras de noz-moscada. As amostras adulteradas neste estudo foram identificadas com sucesso e com uma capacidade de deteção até 5% de adulterante adicionado, esta técnica demonstrou ter bom potencial para o desenvolvimento de um procedimento de controlo de qualidade visual para a autenticação de noz-moscada em pó (Kiani, van, van, & Minaei, 2019).

Por vezes são usadas técnicas em conjunto, Kuanglin Chao (Chao, Dhakal, Qin, Kim M., & Huang, 2020) e a sua equipa usaram espectroscopia de *Raman* e IR para a identificar o corante *Sudan Red* e curcuma branca em curcuma em pó. Tanto o IR como o *Raman* geraram impressões digitais espectrais exclusivas, o IR é mais sensível a grupos funcionais,

enquanto o *Raman* é mais sensível a múltiplas estruturas de ligação, neste estudo os métodos foram usados de forma independente, mas o ideal seria desenvolver um sistema de imagem IR e incorporar *Raman* no sistema para a detecção de adulterantes (Chao, Dhakal, Qin, Kim M., & Huang, 2020).

Técnicas moleculares

Existe uma grande variedade de técnicas analíticas que foram aplicadas a estudos de autenticação alimentar, e embora técnicas pioneiras como a cromatografia líquida, o perfil eletroforético e a análise sensorial ainda sejam bastante usadas as novas técnicas moleculares ultrapassam as limitações das técnicas anteriores (Böhme, Calo-Mata, Barros-Velazquez, & L., 2019).

As técnicas moleculares têm como principal vantagem a detecção de ácidos nucleicos de forma rápida e reproduzível, são técnicas com elevada sensibilidade, precisão, exatidão e não dependem da idade da amostra, do tipo de material e da sua condição, são também úteis para detetar a origem geográfica, adulterações, contaminações, pesticidas e microrganismos (A., A., & Meenatchi R., 2021). A maior vantagem das técnicas moleculares é o fato de usarem ácidos nucleicos, o ADN é muito estável e igual em qualquer célula somática do organismo (Danezis, Tsagkaris, Camin, Brusica, & Georgiou, 2016), o que o torna ideal para fins de autenticação.

As técnicas moleculares envolvem extração ou isolamento de ADN, amplificação do ADN isolado com os *primers* adequados e uma detecção dos produtos de amplificação que posteriormente são comparados ao controlo adequado ou a referências (A., A., & Meenatchi R., 2021).

Os métodos baseados no ADN usados em autenticação alimentar incluem Sequenciação de ADN, *Restriction-Fragment-Length Polymorphism* (RFPL), *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), *Multiplex PCR*, *Simple Sequence repeats*, *Micro Satellites*, e no últimos anos tem surgido novas técnicas como *High Resolution Melting PCR* (HRM PCR), *Droplet Digital PCR* (ddPCR), várias técnicas de *Isothermal Amplification* e *Next-Generation Sequencing* (NGS) (Böhme, Calo-Mata, Barros-Velazquez, & L., 2019).

Podemos encontrar vários artigos científicos onde estas técnicas moleculares são aplicadas na autenticação de ervas e especiarias nos últimos anos.

Métodos de análise de ADN têm sido usados na luta contra a fraude alimentar e os avanços nestes métodos tornou-os mais baratos, eficientes e precisos (Galvin-King, Haughey, & Elliott, 2017).

Existiram alguns avanços na área nos últimos anos, um método que usa *Sequence-Characterized Amplified Regions* (SCARs) foi desenvolvido através de marcadores *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) e usado para detetar adulterantes em açafão e orégão comercial (Marieschi, Torelli, & Bruni, Quality Control of Saffron (*Crocus sativus* L.): Development of SCAR Markers for the Detection of Plant Adulterants Used as Bulking Agents, 2012) (Marieschi, Torelli, Poli, Sacchetti, & Bruni, 2009). O SCAR-PCR revelou limites de deteção baixos nos trabalhos de Matteo Marieschi mencionados. A principal limitação do SCAR-PCR é a necessidade que o método apresenta de ter que ser conhecida a sequência para o design dos *primers* para PCR (Ganie, P., Das, & Sharma, 2015).

O *DNA barcoding* tem sido uma técnica também usada nos últimos anos, temos como exemplo o uso desta mesma com sucesso para a identificação de adulterações em especiarias em pó (Zhang, et al., 2019). No entanto, foi reportado que a insuficiente qualidade do ADN pode reduzir o sucesso da amplificação dos *barcodes* de ADN (Huang, Li, Liu, & Long, 2015).

A aplicação de técnicas de *Next Generation Sequencing* (NGS) têm sido exploradas na autenticação de produtos alimentares, no entanto o seu uso ainda é limitado quando comparado com outras técnicas (Haynes, Jimenez, Pardo, & Helyar, 2019).

Uma estratégia que combina NGS e *DNA walking* foi desenvolvida com o objetivo de identificar Organismos Geneticamente Modificados (OGM) (Fraiture, et al., 2017). A área em que NGS é mais usada é na análise de matrizes complexas de alimentos, e embora seja maioritariamente usada na indústria, existem poucos estudos publicados (Haynes, Jimenez, Pardo, & Helyar, 2019).

Para além do já referido RAPD temos outras técnicas que envolvem *Polymerase Chain Reaction* (PCR) como o *Real-Time PCR*, este método está a tornar-se muito comum em análises alimentares (Salihah, Hossain, Lubis, & Ahmed, 2016). Foi possível identificar alergénicos de amêndoa através de *Real-Time PCR* em alimentos processados, no entanto

para espécies relacionadas foi necessário recorrer a *High Resolution Melting* (HRM) para a sua distinção (Costa, Mafra, & Oliveira, 2012).

Um sistema de *Real-Time PCR* baseado no gene de manitol desidrogenase do aipo mostrou ser altamente específico e uma ferramenta sensível na detecção de alergénicos de aipo (Hupfer, Waiblinger, & Busch, 2007).

Foram detetadas adulterações com sementes de mamão, pimenta caiena e farinha de milho em pimenta preta (*Piper nigrum*) através de *Real-Time PCR* (Sousa, Ferreira, & Faria, 2019). Neste estudo as amostras de referência foram obtidas frescas em mercados locais, para serem comparadas com pimenta em pó embalada adquirida em supermercados, o Limite de Detecção (LOD) do método foi baixo e 41% das 29 amostras revelaram estar adulteradas, no entanto alguns dos valores eram tão baixo que sugerem contaminações acidentais e não realmente intenções de fraude (Sousa, Ferreira, & Faria, 2019).

Foi confirmado que é possível identificar adulterações com *Cuminum cyminum* (cominho) em amostras de *Bunium persicum* (cominho preto) através de *DNA Barcoding* (Bansal, Thakur, Mangal, Mangal, & RK., 2018). Com o uso do *barcode* de ADN *psbA-trnH*, foi possível detetar alterações no cominho preto até 3% confirmando assim a sua utilidade para a autenticação do cominho preto e na detecção de seus adulterantes (Bansal, Thakur, Mangal, Mangal, & RK., 2018).

O açafão é a especiaria mais cara do mundo, portanto não é de admirar que seja alvo de adulterações, em 2016 através da técnica *Loop-mediated Isothermal Amplification* (LAMP) e seis *primers* LAMP específicos foi possível diferenciar o açafão dos seus adulterantes (Zhao, et al., 2016). O ensaio LAMP revelou-se simples, sensível e bem adequado para a discriminação imediata no local de materiais à base de plantas (Zhao, et al., 2016).

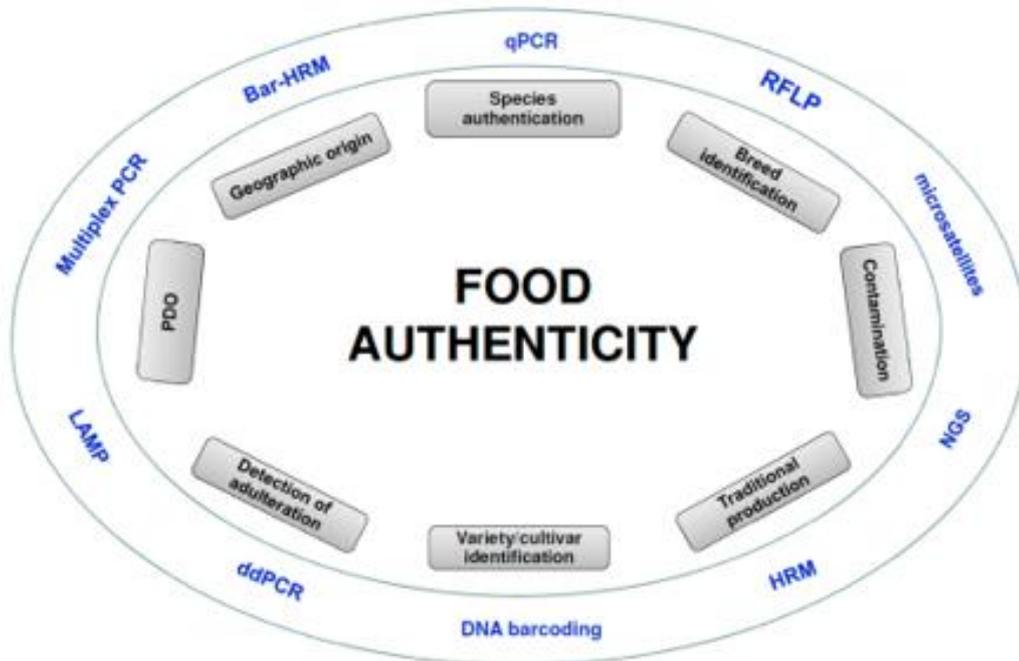


Figura 6: Objetivos da autenticação alimentar e métodos usados para o conseguir (Böhme, Calo-Mata, Barros-Velazquez, & L., 2019).

Polymerase Chain Reaction

O PCR é uma técnica que gera cópias em massa de um fragmento de ADN de forma rápida e precisa. Este foi criado em 1983 por Kary B. Mullis, feito que dez anos depois lhe deu direito ao prémio Nobel da química, embora a técnica inventada por Kary já tenha sofrido alterações continua na sua essência a mesma. Os ingredientes chave de um PCR são a Taq polimerase, *primers*, o ADN modelo e nucleótidos.

Um PCR decorre em 3 passos que são repetidos múltiplas vezes:

- Desnaturação (96° C): Acontece um aumento de temperatura com o objetivo de desnaturar o ADN, passando este de uma dupla hélix para uma cadeia simples;
- Hibridização (55 - 65° C): Existe um arrefecimento da reação e os *primers* ligam-se à sua sequência complementar no ADN de cadeia simples;
- Polimerização (72° C): A temperatura volta a aumentar, mas não aos níveis da etapa de desnaturação, para que a Taq polimerase inicie a extensão dos *primers* e ocorra a síntese de uma nova cadeia de ADN.

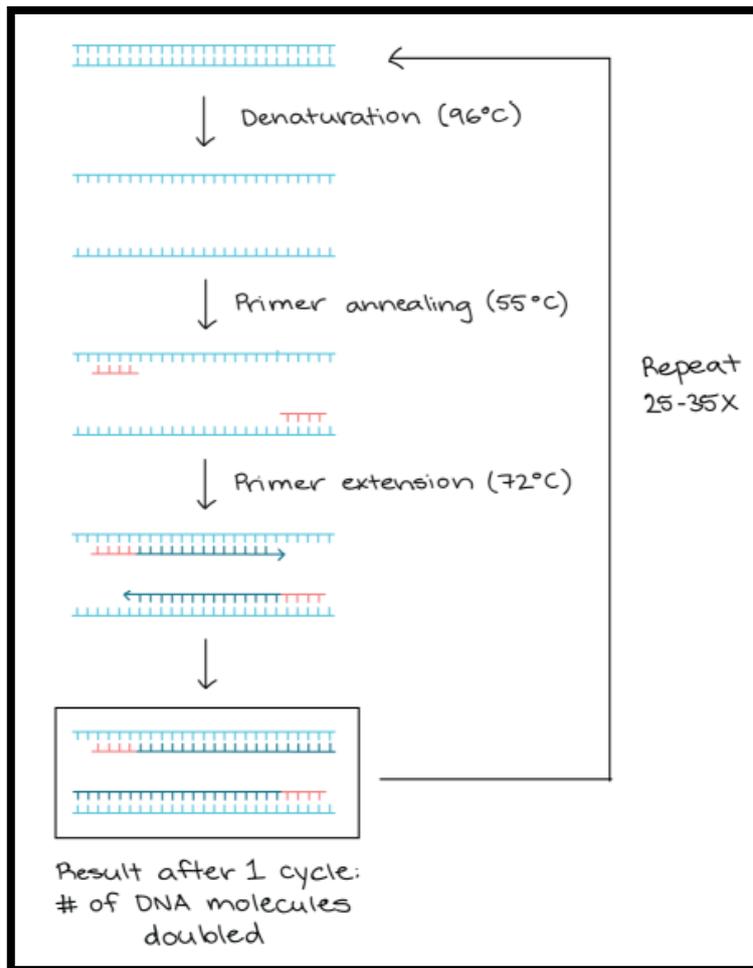


Figura 7-Passos de um PCR (Khan Academy, s.d.)

A cada ciclo são produzidas novas cadeias de ADN, as novas cadeias podem ser usadas como molde para o ciclo seguinte o que leva a um aumento exponencial de cópias de ADN da nossa região alvo.

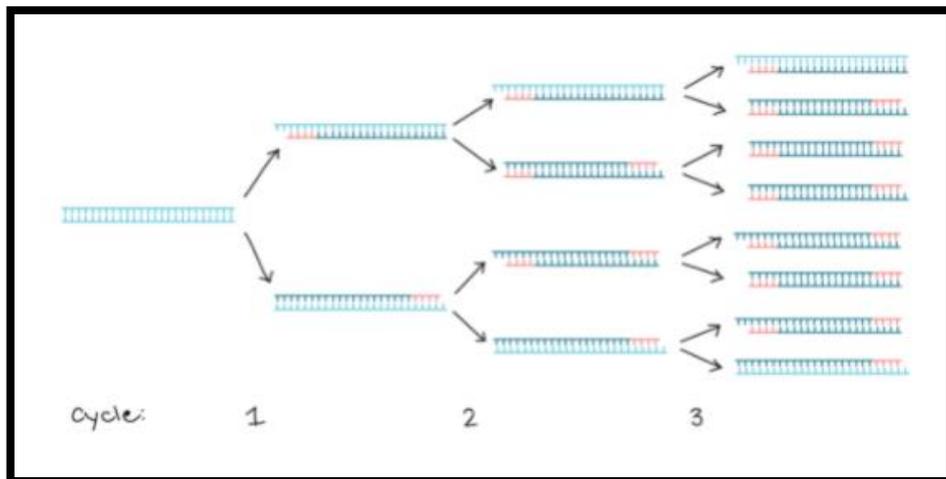


Figura 8-Aumento exponencial do ADN durante PCR (Khan Academy, s.d.)

O PCR é muito útil na detecção de adulterantes e autenticação na indústria alimentar devido à sua rapidez, precisão e custo reduzido. A detecção de adulterantes e autenticação com base no PCR é feita através de *primers* extremamente específicos que definem um perfil de bandas específicas para os indivíduos alvo que podem ser analisados posteriormente por eletroforese em gel (A., A., & Meenatchi R., 2021).

Real-Time PCR

O *Real-Time PCR* foi inventado em 1993 por Russell Higuchi e os seus colaboradores. Estes conseguiram monitorizar a reação e detetar a acumulação de ADN de dupla hélix a cada ciclo através de uma câmara de vídeo e devido ao aumento da fluorescência do brometo de etídio (Higuchi, Fockler, Dollinger, & Watson, 1993). O que distingue o *Real-Time PCR* de um PCR tradicional é a adição de um composto fluorescente que aumente a fluorescência com o aumento do ADN, estes podem ser corantes que se ligam ao ADN ou sondas ou *primers* para sequências específicas marcadas com fluorescência (Bio-Rad, s.d.). Termocicladores equipados com detecção de fluorescência são usados para monitorizar o sinal fluorescente enquanto a ampliação ocorre, a fluorescência é proporcional à quantia total do *amplicon*, e a diferença de fluorescência é usada para calcular a quantidade do *amplicon* produzida a cada ciclo (Bio-Rad, s.d.).

A maior vantagem do *Real-Time PCR* em relação ao PCR tradicional é que o *Real-Time PCR* permite determinar o número de cópias iniciais do *amplicon* com precisão e alta sensibilidade, transformando assim uma técnica que era puramente qualitativa noutra que pode ser qualitativa e quantitativa (Bio-Rad, s.d.). Como a monitorização do aumento do ADN acontece em tempo real os passos convencionais pós-PCR não são necessários (Böhme, Calo-Mata, Barros-Velazquez, & L., 2019).

Um gráfico de uma análise por *Real-Time PCR* apresenta três fases distintas, a fase exponencial, seguida da fase de crescimento linear e por fim a fase estacionária. A fase de crescimento exponencial é a melhor para estudar a reação devido à relação consistente entre o produto e o input de ADN (Oliveira T. M. S., 2010).

A Canela

Todos nós estamos familiarizados com imensas ervas e especiarias, dada a sua presença comum na gastronomia mediterrânea e a grande influência portuguesa no decorrer da história mundial do comércio de especiarias durante a época dos descobrimentos. Seria de esperar que um povo que dominou o mercado de troca de especiarias incluísse algumas delas na sua culinária, e assim aconteceu em Portugal.

A gastronomia portuguesa está cheia de sabores de especiarias, sendo muitas delas provenientes de lugares distantes, entre as ervas e especiarias mais usadas na cozinha portuguesa podemos encontrar a pimenta preta, o cominho, o pimentão doce, o louro e a canela (Compadre cooking school, 2020).



Figura 9- Galeão das especiarias (Cruz P., 2015)

Além de ser das especiarias mais usadas não só na gastronomia portuguesa, mas em todo o mundo, a autenticação da canela pode evitar perdas monetárias devido a fraudes alimentares e problemas de saúde associados à cumarina. O excesso de consumo de cumarina pode causar problemas de saúde a crianças e adultos mais sensíveis.

A canela é proveniente da casca de diversas espécies do género *Cinnamomum*. A maioria da canela que usamos é proveniente do Sri Lanka e da China. O género

Cinnamomum pertence à família Lauraceae, esta família conta com cerca de duas mil espécies e inclui diversas espécies conhecidas como o loureiro, o abacate, o louro da Califórnia, e a canela (Encyclopedia, 2021).

O uso da canela retoma à antiguidade onde esta já era apreciada pelo seu sabor e fragrância. O seu uso ia muito além da culinária, tendo sido usada pelos egípcios no embalsamento de mortos, e pelos romanos que queimavam canela durante os funerais. Foi também usada pelos hebreus em cerimônias religiosas e é mencionada na bíblia como ingrediente do óleo para a unção.

Durante a idade média a canela era uma especiaria apreciada pela sociedade de elite na Europa. E esta chegava à europa através de comerciantes árabes que a traziam do Ceilão (hoje chamado de Sri Lanka). No século XV o comércio da canela é assumido pelos portugueses, o controle da especiaria levou a séculos de lutas entre portugueses, holandeses, britânicos e os habitantes do Ceilão. Nos tempos de hoje os principais produtores mundiais de canela são a Indonésia, a China, o Vietname, o Sri Lanka e o Madagáscar.

A *Cinnamomum verum*, também conhecida como a canela verdadeira ou canela do Ceilão é proveniente do Sri Lanka. A canela do Ceilão tem um sabor mais suave que a Cássia e é considerada de melhor qualidade, sendo também o seu valor de mercado superior.

A *Cinnamomum cassia* é proveniente da China e é a que é facilmente encontrada à venda em qualquer supermercado nos dias que correm, esta foi substituindo a *Cinnamomum verum* nos mercados europeus devido ao seu preço inferior. A Cássia contém um alto nível de cumarina quando comparada com a canela do Ceilão. A cumarina já foi usada como aditivo alimentar, mas hoje em dia a sua adição pura é proibida devido aos danos de saúde que pode causar. No entanto, produtos alimentares podem conter cumarina de fontes vegetais, como por exemplo da canela. Na União Europeia o nível de cumarina em produtos alimentares encontra-se regulado.

O facto de existirem diferentes tipos de canelas com diferentes propriedades e valores de mercado faz dela um excelente alvo para fraudes alimentares, visto que, quando moída é praticamente impossível a sua distinção através de características morfológicas. São então necessários métodos para fazer autenticação da canela do Ceilão. Esta é o principal alvo de adulterações devido ao seu valor económico superior, o valor do mercado da canela em 2018 foi de 760,2 milhões de dólares e estima-se que continue a crescer nos próximos anos (GrandViewResearch, 2019).

Objetivo

Já vimos que o valor e a importância da canela a nível mundial são inegáveis. Esta tem sido alvo de fraudes alimentares nos últimos anos, sendo uma das mais comuns a substituição ou diluição de *Cinnamomum verum* com *Cinnamomum cassia*, o que leva a perdas económicas e gera problemas de saúde alimentar, uma vez que a *Cinnamomum cassia* apresenta níveis de cumarina mais elevados que a *Cinnamomum verum*. A cumarina é uma substância que pode causar problemas nos rins a pessoas mais sensíveis e apresenta características tóxicas para alguns animais. Já existem técnicas que distinguem estas duas espécies de canela, no entanto a maioria delas são técnicas não moleculares de custos elevados, ou com outras limitações.

Devido à necessidade de técnicas moleculares que consigam distinguir ambas as espécies, esta dissertação tem como objetivo, primeiramente identificar e analisar artigos científicos focados na autenticação e análise de várias espécies de canela para de seguida ser apresentada uma proposta de método capaz de distinguir a *Cinnamomum verum* da *Cinnamomum cassia* através do uso da técnica de *Real-Time PCR*. Nesta proposta de método é sugerido um protocolo de isolamento do ADN específico para a canela, elaborado um protocolo específico para a autenticação da *C. verum* através de *Real-Time PCR* e ainda um plano de amostragem para a realização de um estudo no mercado português.

Proposta de método

Isolamento do ADN

Devido à grande variabilidade entre as espécies de *Cinnamomum* a sua identificação com base nas características morfológicas não é suficiente, e dada a sua importância económica a nível mundial são necessárias técnicas moleculares capazes de distinguir as diferentes espécies. Marcadores genéticos podem ser usados para estabelecer relações genéticas, diferenças interespecíficas e intraespecíficas e na deteção e autenticação de adulterantes em produtos alimentares. A distinção da *C. verum* das suas espécies adulterantes com base nas características físicas é muito difícil, e a sua dificuldade aumenta caso a mercadoria perca a sua forma física, como é o caso da canela em pó (Bhau, et al., 2015). Os perfis bioquímicos das plantas são muito influenciados pelo lugar de origem, o processamento dos tecidos vegetais, a idade e o tipo de tecido e ainda do clima (A., L., T.S., & A., 2014), no entanto estes fatores não tem qualquer tipo de influência no ADN.

Muitas das técnicas molecular mais usadas na atualidade envolvem como primeiro passo a extração do ADN para posteriormente ser aplicada a técnica em questão, e no *Real-Time PCR* não é diferente, portanto antes de qualquer análise ser feita é necessária uma extração do ADN da canela. Um dos maiores problemas na extração do ADN da canela é o grande número de metabolitos secundários que podem interferir na extração do ADN. Alguns destes metabolitos como polissacarídeos e polifenóis dificultam o processo de purificação do ADN, estes interagem de forma irreversível com o material genético e com a função de enzimas em análises posteriores (Demeke & Adams, 1992)

Diversos protocolos de extração foram propostos, tanto para especiarias e material vegetal em geral como especializados para espécies de *Cinnamomum*. No entanto nem todos os protocolos para extração de ADN são adequados para a nosso método de autenticação de *Cinnamomum verum* através de *Real-Time PCR*.

Caihui Chen (Chen, et al., 2017) e a sua equipa isolaram os cloroplastos de *Cinnamomum camphora* recorrendo ao *Sigma Chloroplast DNA Isolation kit* (Sigma, St. Louis, MO, USA) e efetuaram a extração do ADN dos cloroplastos com o *DNeasy Plant Mini Kit* (QIAGEN, Hilden, Germany). No artigo mencionado foi extraído e usado o ADN

dos cloroplastos dos espécimes, mas este não é o adequado ao objetivo visto que para a autenticação da canela o nosso produto é a especiaria em si, e esta provem da casca da planta.

Em 2011 Sandigawad descreve no seu artigo sobre a diversidade genética em *Cinnamomum zeylanicum* que o ADN genómico foi extraído de folhas jovens através do método de CTAB (brometo de cetrimônio) modificado descrito por Doyle e Doyle em 1990 (Sandigawad & Patil, 2011). Um grupo de investigação tinha usado também um método de CTAB melhorado para a extração de ADN de alta qualidade de *Cinnamomum cassia* em 2004 (Xu, Zhang, Zheng, & Yuan, 2004).

O método de CTAB sofreu alterações e melhoramentos ao longo do tempo, num protocolo em que foi adicionado maior concentração de sal e carvão ativo ao método CTAB foi conseguida a extração de diferentes espécies lenhosas e 4 espécies de canela por B.S. Bhau (Bhau, et al., 2015).

A maioria dos protocolos de extração usados para espécies de canela são especializados para extração de ADN das folhas, como o nosso objetivo é autenticar canela em pó ou em pau, que provem da casca da planta, um protocolo adequado consiste no método criado por Valya, Viswanath, Thotten e Bhaskaran em 2013 (Swetha, Parvathy, Sheeja, & Sasikumar, 2013), método este específico para a extração de ADN da casca de espécies de *Cinnamomum*. Este protocolo de isolamento do ADN foi baseado no de Asif e Cannon (Asif M. J., 2005), no entanto foram realizadas várias alterações para melhorar a qualidade do ADN.

Procedimento:

As amostras devem ser transformadas em pó caso sejam provenientes de ‘canela em pau’.

1- Uma grama da amostra em pó deve ser homogeneizada com 10 ml do tampão de extração (100 mM Tris base (Himedia)) de brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB) pré aquecido, ácido etilenodiamino tetra-acético 20 mM (EDTA) (Himedia), cloreto de sódio 3 M (Sigma), 5% CTAB (Sigma), polivinilpirrolidona 1% (PVP) (solúvel) (Sigma), e 2-Mercaptoetanol 0,3% (Himedia);

2- Os tubos devem ser incubados a 65 °C num banho-maria com agitação constante a 200 x g durante 2 horas;

3- Os tubos devem arrefecer à temperatura ambiente e um volume igual de clorofórmio (Merck):álcool isoamílico (Merck) (24:1, v/v) tem que ser adicionado;

- 4- Centrifugar os tubos a 1118 x g por 15 minutos a 4 °C.
- 5- A fase aquosa deve ser transferida para outro tubo e um terço do volume de acetato de sódio 3 M (pH 5,2) e dois terço de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1, v/v) são adicionados de seguida;
- 6- Os tubos voltam a ser centrifugados a 1118 x g durante 15 minutos a 4 °C e a fase aquosa é retirada para outro tubo;
- 7- Isopropanol gelado (Merck) deve ser adicionado em volumes iguais para incubação a -40 °C durante a noite;
- 8- Centrifugar os tubos a 4472 x g durante 20 minutos;
- 9- Lavar o sedimento com etanol a 70%;
- 10- Secar o sedimento e dissolver em água estéril livre de nucleases ou em tampão TE (Swetha, Parvathy, Sheeja, & Sasikumar, 2013).

Amplificação por PCR

Na ausência de bibliografia sobre a autenticação da canela através de *Real-Time PCR*, faz sentido considerar estudos em que o método foi aplicado com sucesso para outras especiarias. Caterina e Joana (Villa, Costa, Oliveira, & Mafra, 2017) usaram *Real-Time PCR* para identificar e quantificar açafão bastardo com o objetivo de detetar este adulterante em amostras de açafão. Foi também desenvolvido um sistema com o uso de *Real-Time PCR* que revelou ser adequado e de confiança tanto na autenticação como nos processos de segurança alimentar para o azeite e produtos com azeite (Ramos-Gómez, Busto, Albillos, & Ortega, 2016).

Para o uso do *Real-Time PCR* na autenticação da canela é necessário *primers* específicos para a espécie, neste caso o nosso alvo é a *C. verum*.

Estudos mostraram o uso de *primers* de diversas regiões, sendo possível fazer a distinção entre as diversas espécies de canela. No entanto porque a análise foi feita através de regiões específicas de ADN dos cloroplastos, estes exemplos não se aplicam ao objetivo, dado que tem que ser feita uma análise da casca e não das folhas da Canela.

Foram utilizados *primers* para a sequencia ITS, por Bo-Cheng (Yang, et al., 2020) e a sua equipa para identificar *Cinnamomum osmophloeum*, e também por Eui e Jung-Hoon

(Doh, Kim, Oh, & Lee, 2017) no seu artigo de 2017, '*Identification and monitoring of Korean medicines derived from Cinnamomum spp. by using ITS and DNA marker*'. Neste estudo foram identificadas e avaliadas as relações genéticas entre diversas espécies de *Cinammomum*, para tal foram analisadas as sequências ITS de 29 amostras de casca e folha de 7 espécies diferentes de canelas. As amostras foram transformadas em pó e o ADN foi extraído com o *NucleoSpin Plant II kit* (Macherey–Nagel, Germany) segundo as instruções do produtor. As espécies mostravam uma percentagem de homologia na sua região ITS elevada, mas com diferenças suficientes para permitir a sua identificação. Foi então concluído que é possível distinguir as 7 espécies analisadas através da sua sequência ITS e ainda desenvolvido um marcador de ADN específico para a *C. cassia*. Uma das espécies analisadas foi a *C. verum*, então podemos concluir que através da região ITS será possível desenhar um par de *primers* específicos para a *C. verum* e criar um método através de *Real-Time PCR* capaz de distinguir a *C. verum* de outras espécies.

Amostragem

No mercado português existem várias marcas e tipos de canela, no entanto muitos dos rótulos não especificam a espécie de *Cinammomum* usada, descrevendo os ingredientes apenas como 'Canela'. Na verdade, este é o caso mais comum em 8 canelas diferentes adquiridas em 3 Supermercados de Anadia. Segundo a legislação é apenas necessário a lista dos ingredientes do produto (anexo 5), nada é mencionado para ingredientes que possam ser originários de diferentes espécies. Dado os obstáculos colocados pelas rotulagens sugerimos duas opções distintas e de bastante interesse para a amostragem.

Na opção 1 seriam analisadas diferentes marcas de canelas cujo a sua composição seja 100% *Cinammomum verum* com o objetivo de verificar que não foram adulteradas, as amostras devem ser de canela em pó e canela em pau, no entanto as amostras de canela em pó devem estar em maior número porque é mais fácil adulterar canela em pó do que canela em pau.

Para a opção 2 seriam analisadas canelas cujos ingredientes possuem *Cinammomum verum*, e outros tipos de canela, esta opção de amostragem é apenas possível analisar canela

em pó. O objetivo seria quantificar a quantidade de *Cinammomum verum* nestes produtos e garantir que contem realmente *Cinammomum verum* na sua composição.



Figura 10- Vários tipos de canela adquiridos em supermercados portugueses.



Figura 11- Rótulos de canela sem e com a especificação da espécie usada.

Inquérito

Foi realizado um inquérito online sobre o consumo de canela e a rotulagem da mesma em Portugal. Este era constituído por 8 questões simples sobre a canela, e tentava averiguar se os inqueridos consumiam canela, que tipo de canela compravam, e os seus conhecimentos sobre as espécies e rótulos da canela. Os inquiridos que não consumiam canela realizavam apenas a pergunta 1, 2 e 3 do inquérito. O número total de pessoas que respondeu ao inquérito foi de 121, e no total a pergunta 1, 2, 3 tiveram 121 respostas enquanto as perguntas 4, 5, 6, 7 e 8 tiveram 105 respostas, o correspondente ao número de indivíduos que consumiam canela dos inquiridos.

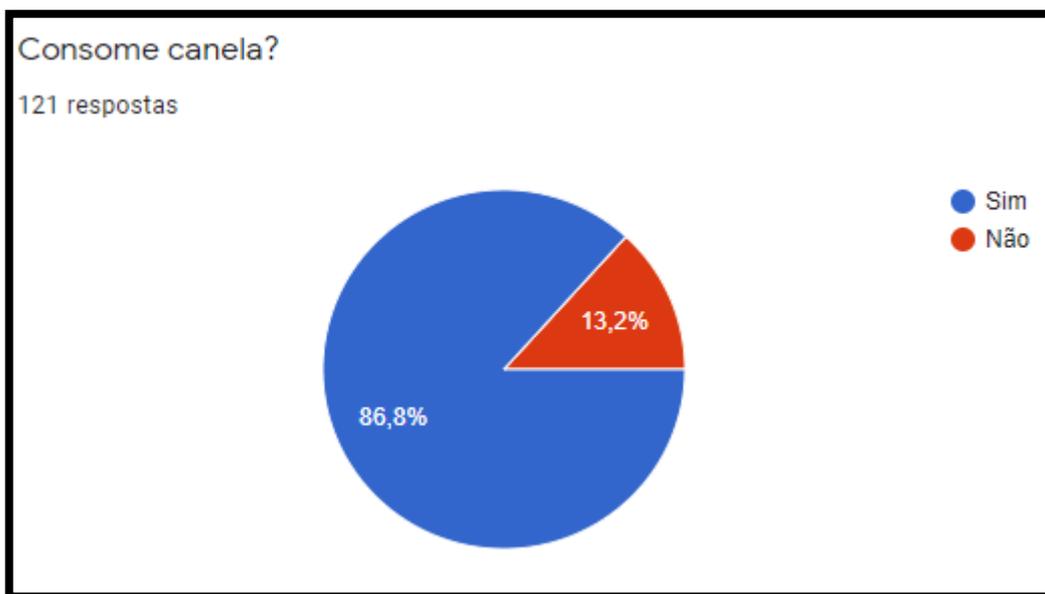


Figura 12- Resultados da resposta 1 do inquérito.

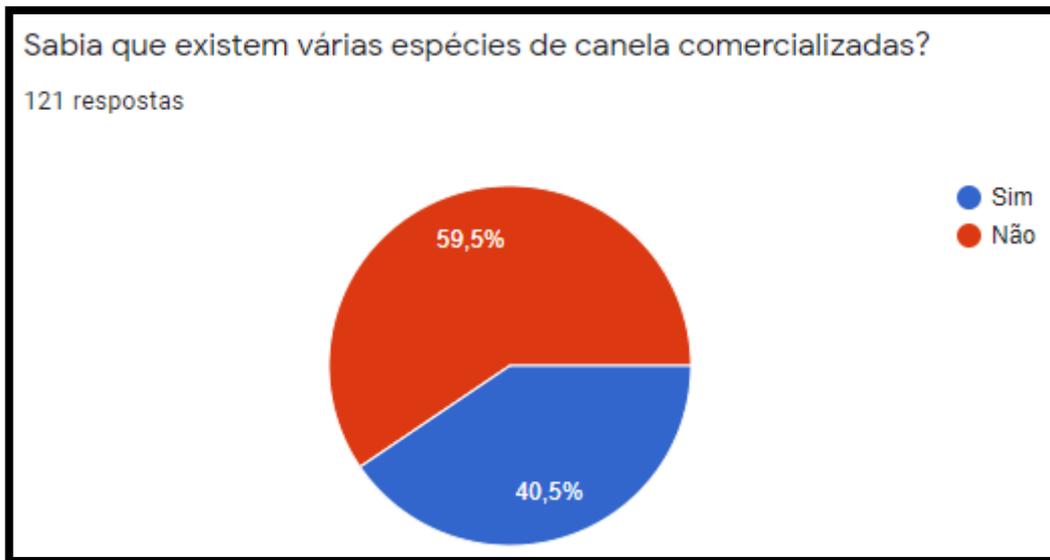


Figura 13- Resultados da resposta 2 do inquérito.

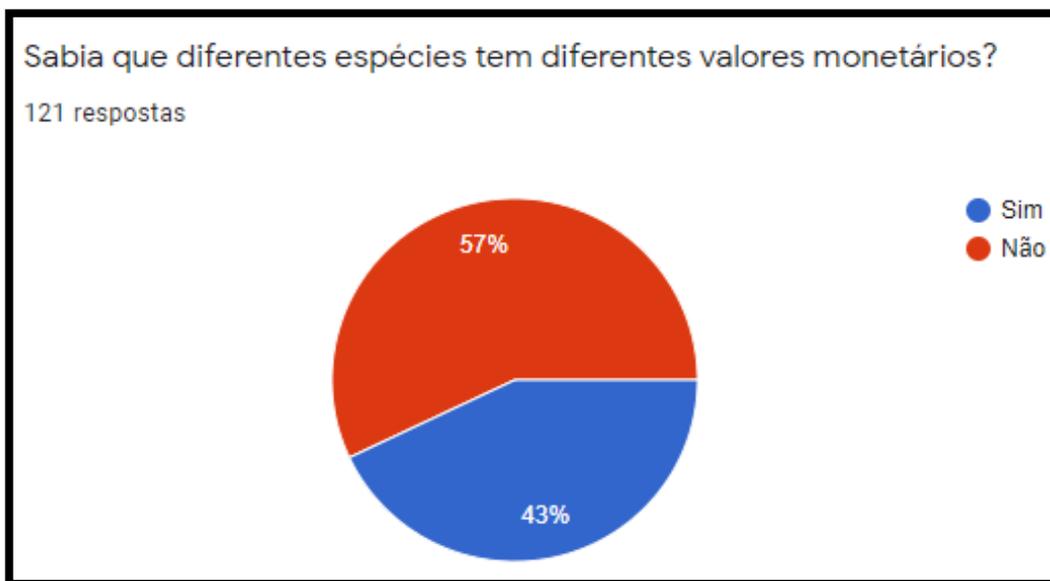


Figura 14- Resultados da resposta 3 do inquérito.

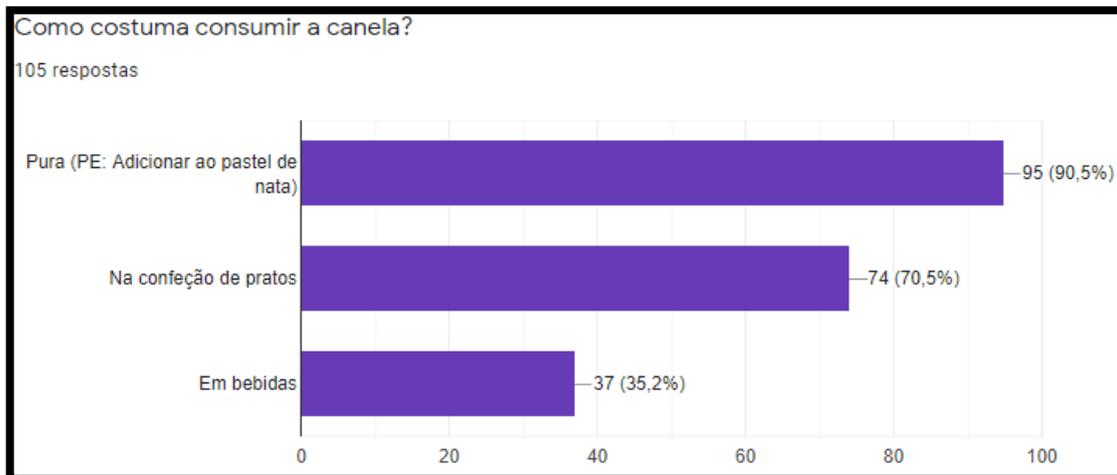


Figura 15- Resultados da resposta 4 do inquérito.

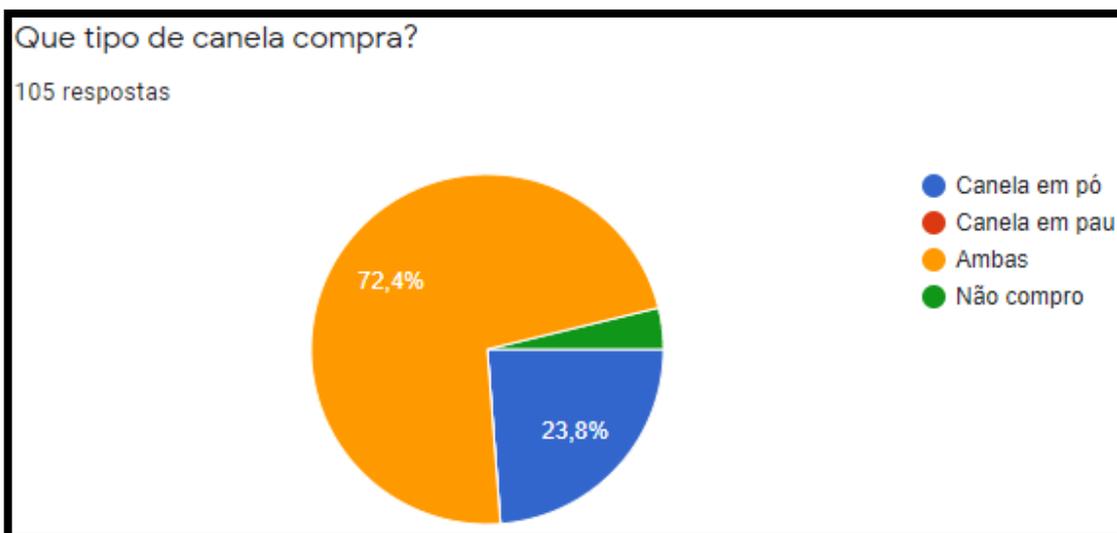


Figura 16- Resultados da resposta 5 do inquérito

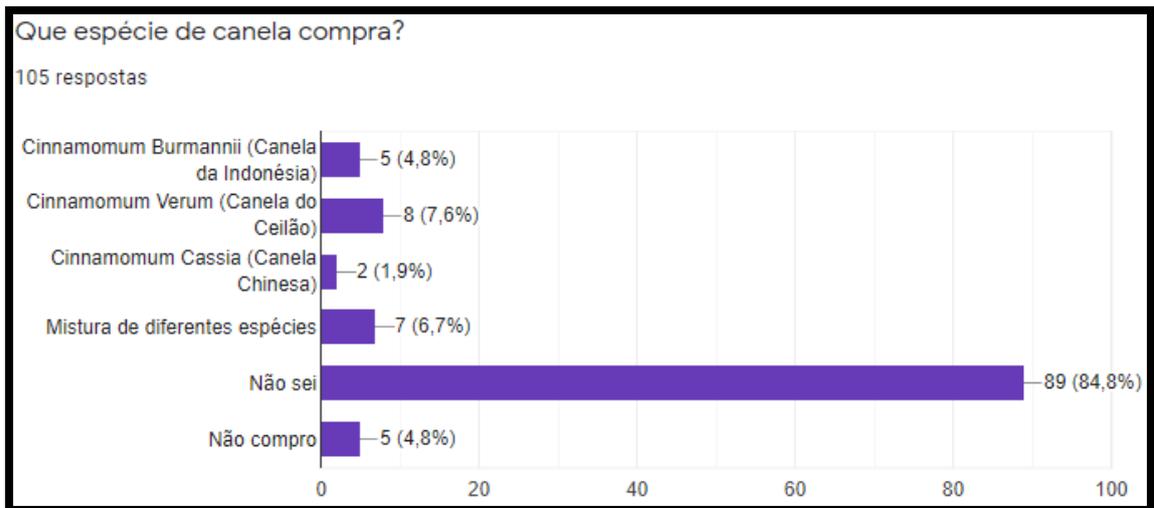


Figura 17- Resultados da resposta 6 do inquérito.

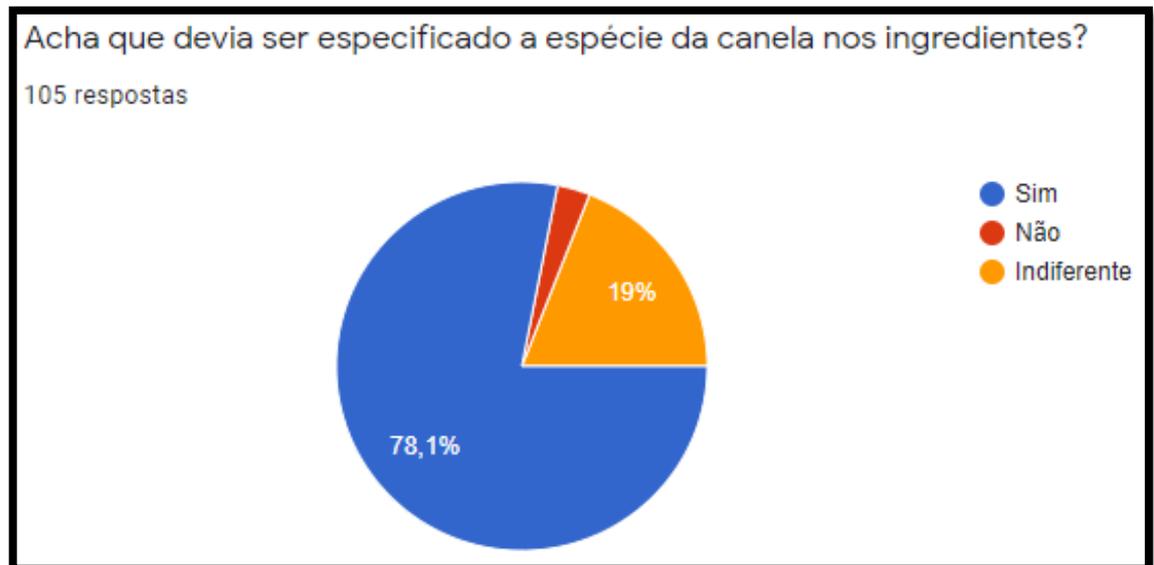


Figura 18- Resultados da resposta 7 do inquérito.



Figura 19- Resultados da resposta 8 do inquérito.

Discussão e conclusão

O tipo de alimentação e a segurança alimentar tem vindo a ganhar cada vez mais importância nos últimos anos. Com o aumento da necessidade de alimentos seguros foram desenvolvidos métodos capazes de autenticar alimentos e detetar produtos alimentares fraudulentos. Estes métodos tem vindo a evoluir ao longo do tempo e cada vez são mais confiáveis. Embora os métodos mais tradicionais ainda sejam bastante usados, os métodos moleculares têm vindo a ganhar peso na área da segurança alimentar e o seu uso têm vindo a aumentar.

As políticas da União Europeia têm vindo a incentivar e a assegurar a segurança dos alimentos dentro da União. A União Europeia desenvolveu ferramentas de prevenção disponíveis para todos os estados-membros e promove a cooperação entre eles quando existem suspeitas de fraudes que envolvam vários países.

As fraudes alimentares podem levar a perdas económicas enormes e problemas de saúde pública. Muitos foram os casos no passado que levaram a problemas de saúde graves e até à morte. Para que a história não se repita é necessário prevenir e investir em métodos que permitam garantir a segurança dos nossos alimentos da melhor forma.

Como já mencionado anteriormente a distinção da *C. verum* das suas espécies adulterantes com base nas características físicas é uma tarefa desafiante, principalmente quando esta se encontra em pó, isto incentiva o recorrer de um método molecular capaz de executar esta distinção entre as diferentes espécies.

No decorrer da construção desta proposta de método, foi tido em conta problemas mencionados em outros trabalhos realizados com diferentes espécies de canela. Estes problemas aparecem de imediato na fase inicial, sendo um dos maiores problemas a extração do ADN da canela, pois esta possui um grande número de metabolitos secundários que podem interferir na extração do ADN. Vários metabolitos como polissacarídeos e polifenóis dificultam o processo de purificação do ADN, ao interagirem de forma irreversível com o material genético e com a função de enzimas em análises posteriores.

É de considerar que embora existam múltiplos artigos onde é efetuada extração de ADN de espécies de canela, em muitos deles é usado o ADN dos cloroplastos dos espécimes, mas este não é o adequado ao objetivo desta dissertação visto que para a autenticação da canela o nosso produto é a especiaria em si, e esta provem da casca da planta. Todos estes fatores

combinados levam-nos a acreditar que este tema é de extrema importância tanto agora como para o futuro.

Embora o método proposto tenha maioritariamente como objetivo detetar fraudes para ganhos económicos, ao conseguir distinguir a *C. verum* da *C. cassia* podem ser evitados problemas de saúde relacionados com o consumo de cumarina em crianças e adultos mais sensíveis.

No mercado português existem várias marcas e tipos de canela, no entanto muitos dos rótulos não especificam a espécie de *Cinammomum* usada, descrevendo os ingredientes apenas como ‘Canela’. Devido à situação de rotulagem da canela encontrada em Portugal foi realizado um inquérito online para averiguar os conhecimentos dos consumidores sobre este produto. Com a realização de este inquérito foi possível perceber que a maioria dos inquiridos consumiam canela, no entanto apesar da grande taxa de consumo mais de metade não sabia que diversas espécies de canela eram comercializadas. Grande parte dos inquiridos não sabia que tipo de canela compra, mas apesar disso há quase consenso em relação aos rótulos, onde uma grande parte gostaria que a espécie de canela fosse identificada.

O inquérito realizado suportou a importância deste método visto que este deve ser capaz de autenticar e quantificar a canela do Ceilão nas amostras de canela comerciais. É ainda de notar que a maioria dos participantes gostaria que a espécie de canela usada fosse estipulada no rótulo.

Após a análise realizada concluiu-se ser possível a autenticação e quantificação da canela do Ceilão, desde que a extração do ADN seja realizada com sucesso e seja obtido ADN de boa qualidade. Para isso é crucial usar um protocolo concebido especificamente para a casca da canela como o apresentado nesta dissertação. É também necessário a determinação dos *primers* específicos da região ITS para ser possível aplicar o método de *Real-Time PCR*. O método proposto não foi testado em laboratório, no entanto deverá ser testado no futuro para garantir que este é adequado à autenticação da canela do Ceilão.

Referências

- Declaração Universal dos Direitos Humanos*. (s.d.).
- A., B. E., L., R. M., T.S., G. L., & A., F. (2014). Extraction of high-quality DNA from ethanol-preserved tropical plant tissues. *BMC Res Notes*, 268.
- A., N., A., P., & Meenatchi R. (2021). Emerging techniques for adulterant authentication in spices and spice products. *Food Control*, 108113.
- Asif M. J. (2005). DNA extraction from processed wood: A case study for the identification of an endangered timber species (*Gonystylus bancanus*). *Plant Molecular Biology Reporter*, 185-192.
- Autentika Global. (1 de 09 de 2020). *European initiatives to fight food fraud in the spices and herbs sector*. Obtido de Cbi: <https://www.cbi.eu/news/european-initiatives-fight-food-fraud-spices-and-herbs-sector>
- Autentika Global. (s.d.). *European initiatives to fight food fraud in the spices and herbs sector, CBI Ministry of Foreign Affairs*. Obtido de CBI Ministry of Foreign Affairs: <https://www.cbi.eu/news/european-initiatives-fight-food-fraud-spices-and-herbs-sector>
- Bansal, S., Thakur, S., Mangal, M., Mangal, A. k., & RK., G. (2018). DNA barcoding for specific and sensitive detection of *Cuminum cyminum* adulteration in *Bunium persicum*. *Phytomedicine*, 178-183.
- Bhau, B., Gogoi, G., Baruah, D., Ahmed, R., Hazarika, G., Ghosh, S., . . . Wann, S. (2015). Development of an effective and efficient DNA isolation method for *Cinnamomum* species. *Food Chemistry*, 264-270.
- Bhooma, V., Nagasathiya, K., Vairamani, M., & Parani, M. (2020). Identification of synthetic dyes magenta III (new fuchsin) and rhodamine Bas common adulterants in commercial saffron. *Food Chemistry*, 125793.
- Bio-Rad. (s.d.). *What is Real-Time PCR (qPCR)? Bio-Rad*. Obtido de Bio-Rad: <https://www.bio-rad.com/en-pt/applications-technologies/what-real-time-pcr-qpcr?ID=LUSO4W8UU>
- Böhme, K., Calo-Mata, P., Barros-Velazquez, J., & L., O. (2019). Review of Recent DNA-Based Methods for Main Food Authentication Topics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 3854-3864.
- C., I. M., A., H., & Nick P. (2020). Microscopic Authentication of Commercial Herbal Products in the Globalized Market: Potential and Limitations. *Frontiers in Pharmacology*, 876.

- C., M. J., J., S., & M., L. (2012). Development and application of a database of food ingredient fraud and economically motivated adulteration from 1980 to 2010. *Journal of food Science*.
- Cardoso, L., Freienstein, J., & Morehouse, J. (2010). Food Fraud in the Global Supply Chain. *Food Logistics*.
- Chao, K., Dhakal, S., Qin, S. W., Kim M., P. Y., & Huang, Q. (2020). Raman and IR spectroscopic modality for authentication of turmeric powder. *Food Chemistry*, 126567.
- Chen, C., Zheng, Y., Liu, S., Zhong, Y., Wu, Y., Li, J., . . . Xu, M. (2017). The complete chloroplast genome of *Cinnamomum camphora* and its comparison with related Lauraceae species. *PeerJ*.
- Compadre cooking school. (18 de Junho de 2020). *Most used seasonings in Portuguese cuisine Compadre cooking school*. Obtido de Compadre cooking school: <https://compadrecooking.pt/seasonings-used-in-portuguese-cuisine/>
- Costa, J., Mafra, I., & Oliveira, B. P. (2012). High resolution melting analysis as a new approach to detect almond DNA. *Food Chemistry*, 1062-1069.
- Cruz P. (01 de abril de 2015). *Marinha de Guerra Portuguesa*. Obtido de Marinha de Guerra Portuguesa: <http://marinhadeguerraportuguesa.blogspot.com/2015/03/ribeira-das-naus-xvi-xviii.html>
- Danezis, P. G., Tsagkaris, S. A., Camin, S., Brusic, V., & Georgiou, A. C. (2016). Food authentication: Techniques, trends & emerging approaches. *Trends in Analytical Chemistry*, 123-132.
- Demeke, T., & Adams, P. R. (1992). The effects of plant polysaccharides and buffer additives on PCR. *Biotechniques*.
- Dixit, S., KHANNA, K. S., & DAS, M. (2008). A Simple 2-Directional High-Performance Thin-Layer Chromatographic Method for the Simultaneous Determination of Curcumin, Metanil Yellow, and Sudan Dyes in Turmeric, Chili, and Curry Powders. *JOURNAL OF AOAC INTERNATIONAL*, 1387-1396.
- Doh, J. E., Kim, J., Oh, E. S., & Lee, G. (2017). Identification and monitoring of Korean medicines derived from *Cinnamomum* spp. by using ITS and DNA marker. *Genes Genom*, 101-109.
- Encyclopedia. (16 de 06 de 2021). *Laurel Family (Lauraceae)* . Obtido de Encyclopedia: <https://www.encyclopedia.com/science/encyclopedias-almanacs-transcripts-and-maps/laurel-family-lauraceae>
- European Commission. (15 de 3 de 2017). *Legislation on official controls*. Obtido de European Commission: https://ec.europa.eu/food/horizontal-topics/official-controls-and-enforcement/legislation-official-controls_en

European Commission. (11 de 06 de 2019). *Food Fraud Databases*. Obtido de European Commission: https://knowledge4policy.ec.europa.eu/publication/food-fraud-databases_en#fair

European Commission. (22 de 02 de 2021). *Food Fraud Summary January 2021*. Obtido de European Commission: https://knowledge4policy.ec.europa.eu/publication/food-fraud-summary-january-2021_en

European Commission. (s.d.). *Administrative Assistance and Cooperation System*. Obtido de European Commission: https://ec.europa.eu/food/food/agri-food-fraud/administrative-assistance-and-cooperation-system_en

European Commission. (s.d.). *EU coordinated actions*. Obtido de European Commission: https://ec.europa.eu/food/food/agri-food-fraud/eu-coordinated-actions_en

European Commission. (s.d.). *RASFF - Food and Feed Safety Alerts*. Obtido de European Commission: https://ec.europa.eu/food/food/rasff-food-and-feed-safety-alerts_en

European Commission. (s.d.). *Reference Laboratories and Centres*. Obtido de European Commission: https://ec.europa.eu/food/horizontal-topics/official-controls-and-enforcement/legislation-official-controls/reference_en

European Commission. (s.d.). *The EU Food Fraud Network*. Obtido de European Commission: https://ec.europa.eu/food/food/agri-food-fraud/eu-food-fraud-network_en

European Food Safety Authority. (s.d.). *About us*. Obtido de European Food Safety Authority: <https://www.efsa.europa.eu/en/aboutefsa>

European Spice Association. (2021). *Publications*. Obtido de European Spice Association: <https://www.esa-spices.org/index-esa.html/publications-esa>

European Spiece Association. (2021). *About us*. Obtido de European Spiece Association: <https://www.esa-spices.org/index-esa.html/about-us-esa>

Europol. (2020). *Operation Opson Europol*. Obtido de Europol: <https://www.europol.europa.eu/activities-services/europol-in-action/operations/operation-opson>

Farm to Fork strategy European Comission. (s.d.). Obtido de European Comission: https://ec.europa.eu/food/horizontal-topics/farm-fork-strategy_pt

Food fraud: What does it mean? European Comission. (s.d.). Obtido de European Comission: https://ec.europa.eu/food/safety/agri-food-fraud/food-fraud-what-does-it-mean_pt

- Food Safety and Standards Authority of India. (2015). Manual of methods for analysis of foods: Spices and condiments. *Fssai*, 378.
- FoodChain ID. (s.d.). *PDO PGI & TSG FoodChain ID*. Obtido de FoodChain ID: <https://www.foodchainid.com/certification/pdo-pgi-tsg/>
- FoodChain ID. (s.d.). *PDO PGI & TSG FoodChain ID*. Obtido de FoodChain ID: <https://www.foodchainid.com/certification/pdo-pgi-tsg/>
- FoodIntegrity. (2021). *Assuring quality and authenticity in the food chain*. Obtido de FoodIntegrity: <https://secure.fera.defra.gov.uk/foodintegrity/>
- Fraiture, M., Herman, P., Papazova, N., Loose, M., Deforce, D., Ruttink, T., & Roosens, H. N. (2017). An integrated strategy combining DNA walking and NGS to detect GMOs. *Food Chemistry*, 351-358.
- Galvin-King, P., Haughey, A. S., & Elliott, T. C. (2017). Herb and spice fraud; the drivers, challenges and detection. *Food Control*, 85-97.
- Ganie, H. S., P., P., Das, S., & Sharma, P. M. (2015). Authentication of medicinal plants by DNA markers. *Plant Gene*, 83-99.
- Gelpí, E., M., P. P., B., T., Abaitua, I., Cámara, G. A., E., K. M., . . . Stanislaw. (2002). The Spanish Toxic Oil Syndrome 20 Years after Its Onset: A Multidisciplinary. *Environmental Health Perspectives*, Volume 110 Number 5.
- GrandViewResearch. (Agosto de 2019). *Cinnamon Market Size & Share, Global Industry Report, 2019-2025 grandviewresearch*. Obtido de grandviewresearch: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/cinnamon-market>
- Graybeal J. D. (29 de Março de 2021). *Matter & Energy Britannica*. Obtido de Britannica: <https://www.britannica.com/science/spectroscopy>
- Haynes, E., Jimenez, E., Pardo, A. M., & Helyar, S. J. (2019). The future of NGS (Next Generation Sequencing) analysis in testing food authenticity. *Food Control*, 134-143.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., & Watson, R. (1993). Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions. *Nature Biotechnology*, 1026-1030.
- Huang, W., Li, F., Liu, Y., & Long, C. (2015). Identification of *Crocus sativus* and its Adulterants from Chinese Markets by using DNA Barcoding Technique. *Journal of Biotechnology*, 36-42.
- Hupfer, C., Waiblinger, H., & Busch, U. (2007). Development and validation of a real-time PCR detection method. *European Food Research and Technology* 225, 329-335.

- International Organization for Standardization. (2021). *About us*. Obtido de International Organization for Standardization: <https://www.iso.org/about-us.html#26>
- ISO, I. O. (22 de 08 de 2018). ISO 22380:2018 Security and resilience -- Authenticity, integrity and trust for products and documents -- General principles for product fraud risk and countermeasures.
- Khan Academy. (s.d.). *Polymerase chain reaction (PCR)* Khan Academy. Obtido de Khan Academy: <https://www.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/biotechnology/a/polymerase-chain-reaction-pcr>
- Kiani, S., van, R. S., van, R. L., & Minaei, S. (2019). Hyperspectral imaging as a novel system for the authentication of spices: A nutmeg case study. *LWT - Food Science and Technology*, 61-69.
- Marieschi, M., Torelli, A., & Bruni, R. (2012). Quality Control of Saffron (*Crocus sativus* L.): Development of SCAR Markers for the Detection of Plant Adulterants Used as Bulking Agents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
- Marieschi, M., Torelli, A., Poli, F., Sacchetti, G., & Bruni, R. (2009). RAPD-Based Method for the Quality Control of Mediterranean Oregano and Its Contribution to Pharmacognostic Techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
- Michetti, M. K., Cuadra, V. V., & N., C. V. (2019). Botanical quality control of digestive tisanes commercialized in an. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 137-146.
- Modupalli, N., Naik, M., Sunil, C. K., & Natarajan, V. (2021). Emerging non-destructive methods for quality and safety monitoring of spices. *Trends in Food Science & Technology*, 133-147.
- Oliveira T. M. S. (2010). *"Pcr Em Tempo Real: Métodos E Aplicações."* Universidade de Aveiro. Obtido de Universidade de Aveiro: <http://hdl.handle.net/10773/7230>
- Pavlović A. (24 de Janeiro de 2019). *The 5 biggest food fraud cases ever pulled off Ideagen*. Obtido de Ideagen: <https://www.ideagen.com/thought-leadership/blog/the-5-biggest-food-fraud-cases-ever-pulled-off>
- Perini, M., Pianezze, S., Strojnik, L., & Camin, F. (2019). C and H stable isotope ratio analysis using solid-phase. *Journal of Chromatography A*, 168-173.
- Publication Office of the European Union. (2020). *2020 Annual Report The EU Agri-Food Fraud Network and the Administrative Assistance*. Publication Office of the European Union.

- PwC. (2016). *Food fraud*. Obtido de pwc: <https://www.pwc.com/sg/en/industries/assets/food-fraud-vulnerability-assessment.pdf>
- Ramos-Gómez, S., Busto, M. D., Albillos, S. M., & Ortega, N. (2016). Novel qPCR systems for olive (*Olea europaea* L.) authentication. *Food Chemistry*, 447-454.
- Revathy, S. S., Rathinamala, R., & Murugesan, M. (2012). AUTHENTICATION METHODS FOR DRUGS USED IN AYURVEDA, SIDDHA AND UNANI SYSTEMS OF MEDICINE: AN. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2352-2361.
- Salihah, N. T., Hossain, M. M., Lubis, H., & Ahmed, M. U. (2016). Trends and advances in food analysis by real-time polymerase chain reaction. *Journal of Food Science and Technology*.
- Sandigawad, A. M., & Patil, C. G. (2011). Genetic diversity in *Cinnamomum zeylanicum* Blume. (Lauraceae) using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *African Journal of Biotechnology*, 3682-3688.
- Schumachera, S., Mayer, S., Sproll, C., Lachenmeier, D. W., & Kuballa, T. (2016). Authentication of saffron (*Crocus sativus* L.) using ¹H nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. *Magnetic Resonance in Food Science*, 13-16.
- Sebaei, A. S., Youssif, M. I., & Ghazi, A. A. (2019). Determination of seven illegal dyes in Egyptian spices by HPLC with gel permeation chromatography clean up. *Journal of Food Composition and Analysis*, 103304.
- Shahbandeh, M. (6 de Agosto de 2021). *Food & Nutrition Statista*. Obtido de Statista: <https://www.statista.com/statistics/876234/global-seasoning-and-spices-market-size/>
- Silvis, I., Ruth, S. v., Fels-Klerx, H. v., & Luning, P. (2017). Assessment of food fraud vulnerability chain: An explorative study. *Food Control*, 80-87.
- Sousa, A. I., Ferreira, I. M., & Faria, M. A. (2019). Sensitive detection of *Piper nigrum* L. adulterants by a novel screening approach based on qPCR. *Food Chemistry*, 596-603.
- Swetha, V. P., Parvathy, V. A., Sheeja, T. E., & Sasikumar, B. (2013). Isolation and amplification of genomic DNA from barks of *Cinnamomum* spp. *Turkish Journal of Biology*, 151-155.
- Taylor, S. (19 de Junho de 2019). *What Did We Learn from the Horsemeat Scandal and Should We Still Be Worried? High Speed Training*. Obtido de High Speed Training: <https://www.highspeedtraining.co.uk/hub/horsemeat-scandal-facts-and-effects/>

- Villa, C., Costa, J., Oliveira, M. B., & Mafra, I. (2017). Novel quantitative real-time PCR approach to determine safflower (*Carthamus tinctorius*) adulteration in saffron (*Crocus sativus*). *Food Chemistry*, 680-687.
- Wang, Z., Chen, P., Yu, L., & Harrington, P. d. (2013). Authentication of Organically and Conventionally Grown Basils by. *Analytical Chemistry*, 2945-2953.
- Xu, H., Zhang, J., Zheng, M., & Yuan, W. (2004). Isolation of genomic DNA from *Cinnamomum cassia* Presl. *Chinese*. PMID.
- Yalçinkaya, B., & Akgöz, M. (2015). Halal authenticity of sausage samples by qPCR analysis. *Journal of chemical metrology*, 16-21.
- Yang, B., Lee, M., Sun, F., Chao, H., Chang, W., Lin, M., . . . Lee, M. (2020). Rapid identification of the indigenous medicinal crop *Cinnamomum osmophloeum* from various adulterant *Cinnamomum* species by DNA polymorphism analysis. *Pharmacognosy Magazine*, 64-68.
- Zhang, M., Shi, Y., Sun, W., Wu, L., Xiong, C., Zhu, Z., . . . Liu, X. (2019). An efficient DNA barcoding based method for the authentication and. *Food Control*.
- Zhao, M., Shi, Y., Wu, L., Gu, L., Liu, W., Xiong, C., . . . Chen, S. (2016). Rapid authentication of the precious herb saffron by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) based on internal transcribed spacer 2 (ITS2) sequence. *Scientific Reports*.
- Zhu, H., & Zhao, M. (2014). Study on the Microscopic Identification of the. *Discourse Journal of Agriculture and Food Sciences*, 264-269.

Anexos:

I

(Atos legislativos)

REGULAMENTOS

REGULAMENTO (UE) N.º 1151/2012 DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO
de 21 de novembro de 2012
relativo aos regimes de qualidade dos produtos agrícolas e dos géneros alimentícios

TÍTULO II

DENOMINAÇÕES DE ORIGEM PROTEGIDAS E INDICAÇÕES
GEOGRÁFICAS PROTEGIDAS

Artigo 4.º

Objetivo

É estabelecido um regime de denominações de origem protegidas e indicações geográficas protegidas, a fim de ajudar os produtores de produtos ligados a uma área geográfica, mediante:

- a) A garantia de uma remuneração justa que corresponda às qualidades dos seus produtos;
- b) A garantia de uma proteção uniforme das denominações como direito de propriedade intelectual no território da União;
- c) A comunicação aos consumidores de informações claras sobre os atributos do produto que lhe conferem uma mais-valia.

Artigo 5.º

Requisitos das denominações de origem e das indicações
geográficas

1. Para efeitos do presente regulamento, entende-se por «denominação de origem» uma denominação que identifique um produto:

- a) Originário de um local ou região determinados, ou, em casos excecionais, de um país;
- b) Cuja qualidade ou características se devam essencial ou exclusivamente a um meio geográfico específico, incluindo os seus fatores naturais e humanos; e
- c) Cujas fases de produção tenham todas lugar na área geográfica delimitada.

2. Para efeitos do presente regulamento, entende-se por «indicação geográfica» uma denominação que identifique um produto:

- a) Originário de um local ou região determinados, ou de um país;
- b) Que possua determinada qualidade, reputação ou outras características que possam ser essencialmente atribuídas à sua origem geográfica; e
- c) Em relação ao qual pelo menos uma das fases de produção tenha lugar na área geográfica delimitada.

3. Não obstante o n.º 1, certas denominações são equiparadas a denominações de origem mesmo que as matérias-primas dos produtos em questão provenham de uma área geográfica mais vasta ou diferente da área geográfica delimitada, desde que:

- a) A área de produção das matérias-primas se encontre delimitada;
- b) Existam condições especiais para a produção das matérias-primas;

c) Exista um regime de controlo que garanta a observância das condições referidas na alínea b); e

d) As denominações de origem em questão tenham sido reconhecidas como denominações de origem no país de origem antes de 1 de maio de 2004.

Para efeitos do presente número, apenas são considerados como matérias-primas os animais vivos, as carnes e o leite.

4. A fim de ter em conta a especificidade da produção de produtos de origem animal, a Comissão fica habilitada a adotar atos delegados, nos termos do artigo 56.º, no que diz respeito a restrições e derrogações relativas à proveniência dos alimentos para animais no caso das denominações de origem.

Além disso, a fim de ter em conta a especificidade de determinados produtos ou zonas, a Comissão fica habilitada a adotar atos delegados, nos termos do artigo 56.º, no que diz respeito a restrições e derrogações relativas ao abate de animais vivos ou à proveniência das matérias-primas.

Essas restrições e derrogações têm em conta, com base em critérios objetivos, a qualidade ou os usos, e o saber-fazer reconhecido ou fatores naturais.

EU Agri-Food Fraud Network - Contact Points

Updated: September 2021

	Portugal	<p>Economic and Food Safety Authority National Unit of Enforcement (UNO) Rua Rodrigo da Fonseca, nº 73 1269-274 Lisboa</p> <p>General Directorate for Food and Veterinary Affairs Campo Grande 50 1700-093 Lisboa</p>
	Romania	<p>National Sanitary Veterinary and Food Safety Authority</p>
	Slovakia	<p>State Veterinary and Food Administration Botanická 17 842 13 Bratislava, Slovakia</p>
	Slovenia	<p>The Administration of the Republic of Slovenia for Food safety Veterinary sector and Plant protection Dunajska cesta 22, SI – 1000 Ljubljana</p>
	Spain	<p>Spain Deputy Directorate General of Food Quality Control and Agro-Food Laboratories (MAPA)</p> <p>Guardia Civil – SEPRONA –Environmental Protection Service</p> <p>Deputy Directorate for Alert Coordination and Official Control Programming. Spanish Agency for Food Safety and Nutrition Ministry of Consumer Affairs</p> <p>Subdirectorate-General of Coordination, Quality and Cooperation in Consumer Affairs Directorate-General of Consumer Affairs Ministry of Consumer Affairs</p>
	Sverige (Sweden)	<p>Livsmedelsverket / National Food Agency Box 662 751 26 Uppsala Sverige / Sweden</p>
	Norway	<p>Norwegian Food Safety Authority</p> <p>Head Office P.O. box 383</p>

Publicações da ESA

ESA Factsheet on ETO/ECH Residues in Culinary Herbs and Spices, Update September 2021

Technical Annex to the Factsheet on ETO/ECH Residues - Update September 2021

ESA White Paper on Plant Metabarcoding next Generation Sequencing (NGS) Analysis applied to Culinary Herbs and Spices; Version 2, June 2021

ESA Adulteration Awareness Document

ESA Allergen Risk Assessment Model for Dried Herbs and Spices

ESA Allergen Risk Assessment Model Calculator

H&S Sources of Variation - ISO

Authenticity Sample Submission Form

Dehydration Factors for Products of the Spice Industry

ESA List of Culinary Herbs and Spices

ESA Definitions of Culinary Herbs and Spices

ESA Position Statement on Allergen Labelling

ESA Product Information Standard

Metallic and Magnetic Contaminations in Herbs and Spices - Risk Evaluation

ESA Sustainability Statement

ESA Industry Statement

ESA Project Funding Procedure

European Spice Association Quality Minima Document (English)

Documento de Mínimos de Calidad de la Asociación Europea para las Especies (Spanish)

Association Européenne des Epices, Spécifications minimales de qualité (French)

General Guidelines for Good Agricultural Practices on Spices & Culinary Herbs, International Organisation of Spice Trade Associations (IOSTA), June 2013, Issue II

Comparison between different spectroscopy techniques.

Characteristics	Infra-red (IR) & Fourier transform IR spectroscopy	Raman spectroscopy	Hyperspectral imaging technique	Nuclear magnetic resonance spectroscopy
Spectral information	✓	✓	X	✓
Spatial information	X	X	✓	X
Data generation for analysis	Low	Low	Very high	High
Sensitivity to minor constituents	X	✓	✓	X
Suitability to develop portable systems	✓	✓	Not very feasible	Low
Type of sample	Solid (powder) or liquid form	Solid (powder, paste or gel), liquid (aqueous or emulsion)	Solid (whole spice, powder, paste or gel)	Liquid (solid extracted in continuous phase)
Strengths	Convenient operation; can reveal differences in structural changes in chemical compounds and macromolecules	Low sensitivity to O-H bonds; can establish chemical fingerprints; better sensitivity	Provides spatial characteristics by forming hypercube; high sensitivity; convenient operation	Absence of ionizing radiation; rapid data acquisition
Weaknesses	Can analyse only a smaller area	Can analyse only a smaller area; weaker scattering; baseline noise and interference	High cost; slow acquisition of data and hypercube	Presence of intrinsic/low sensitivity; mild selectivity of target compounds
Industrial applications	Highly suitable due to convenience, low cost and rapid analysis	Can be used in industries with very high sophistication	Not feasible for usage due to high maintenance cost and slow processing	Not feasible for all types of products due to weak selectivity

Retirado de Emerging non-destructive methods for quality and safety monitoring of spices (Modupalli, Naik, Sunil, & Natarajan, 2021).

7. Nos seguintes casos, os operadores das empresas do sector alimentar devem assegurar, nas empresas sob o seu controlo, que as menções obrigatórias nos termos dos artigos 9.º e 10.º constem da pré-embalagem ou de um rótulo a ela aposto, ou dos documentos comerciais referentes a esses géneros, se se puder garantir que tais documentos acompanham os géneros alimentícios a que dizem respeito ou foram enviados antes da entrega ou ao mesmo tempo que a entrega:

- a) Caso os géneros alimentícios pré-embalados se destinem ao consumidor final mas sejam comercializados numa fase anterior à da venda ao consumidor final e caso essa fase não corresponda à venda a um estabelecimento de restauração colectiva;
- b) Caso os géneros alimentícios pré-embalados se destinem a ser fornecidos a estabelecimentos de restauração colectiva para neles serem preparados ou transformados, fraccionados ou cortados.

Não obstante o disposto no primeiro parágrafo, os operadores das empresas do sector alimentar devem garantir que as menções referidas no artigo 9.º, n.º 1, alíneas a), f), g) e h), constem igualmente da embalagem exterior em que os géneros alimentícios pré-embalados são apresentados para comercialização.

8. Os operadores das empresas do sector alimentar que forneçam a outros operadores de empresas do sector géneros alimentícios, que não se destinem ao consumidor final ou a estabelecimentos de restauração colectiva, devem assegurar que esses outros operadores das empresas do sector alimentar recebam informações suficientes que lhes permitam, se for caso disso, cumprir as suas obrigações nos termos do n.º 2.

CAPÍTULO IV

INFORMAÇÃO OBRIGATÓRIA SOBRE OS GÉNEROS ALIMENTÍCIOS

SECÇÃO I

Conteúdo e apresentação

Artigo 9.º

Lista de menções obrigatórias

1. Nos termos dos artigos 10.º a 35.º, e sem prejuízo das excepções previstas no presente capítulo, é obrigatória a indicação das seguintes menções:

- a) A denominação do género alimentício;
- b) A lista de ingredientes;
- c) A indicação de todos os ingredientes ou auxiliares tecnológicos enumerados no anexo II ou derivados de uma substância ou produto enumerados no anexo II que provoquem alergias ou intolerâncias, utilizados no fabrico ou na preparação de um género alimentício e que continuem presentes no produto acabado, mesmo sob uma forma alterada;
- d) A quantidade de determinados ingredientes ou categorias de ingredientes;

- e) A quantidade líquida do género alimentício;
- f) A data de durabilidade mínima ou a data-limite de consumo;
- g) As condições especiais de conservação e/ou as condições de utilização;
- h) O nome ou a firma e o endereço do operador da empresa do sector alimentar referido no artigo 8.º, n.º 1;
- i) O país de origem ou o local de proveniência quando previsto no artigo 26.º;
- j) O modo de emprego, quando a sua omissão dificultar uma utilização adequada do género alimentício;
- k) Relativamente às bebidas com um título alcoométrico volúmico superior a 1,2 %, o título alcoométrico volúmico adquirido;
- l) Uma declaração nutricional.

2. As menções referidas no n.º 1 devem ser indicadas mediante palavras e números. Sem prejuízo do disposto no artigo 35.º, essas menções podem também ser expressas através de pictogramas ou símbolos.

3. Se a Comissão tiver adoptado os actos delegados e de execução referidos no presente artigo, as menções referidas no n.º 1 podem alternativamente ser expressas através de pictogramas ou símbolos em vez de palavras ou números.

A fim de assegurar que o consumidor possa beneficiar de outros meios de prestação de informações obrigatórias sobre os géneros alimentícios que não palavras e números, e desde que seja assegurado o mesmo nível de informação expressa em palavras e números, a Comissão, tendo em conta os dados comparativos de uma compreensão uniforme pelos consumidores, pode estabelecer - através de actos delegados nos termos do artigo 51.º - os critérios de expressão de uma ou mais das menções referidas no n.º 1 através de pictogramas ou símbolos, em vez de palavras ou números.

4. A fim de assegurar a execução uniforme do n.º 3 do presente artigo, a Comissão pode adoptar actos de execução acerca das regras de aplicação dos critérios definidos nos termos do n.º 3 para expressar uma ou mais das menções através de pictogramas ou símbolos, em vez de palavras ou números. Os referidos actos de execução são adoptados pelo procedimento de exame a que se refere o artigo 48.º, n.º 2.

Artigo 10.º

Menções obrigatórias complementares para tipos ou categorias específicos de géneros alimentícios

1. Para além das menções enumeradas no artigo 9.º, n.º 1, são estabelecidas no anexo III menções obrigatórias complementares para tipos ou categorias específicos de géneros alimentícios.

Regulamento (UE) n.º 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 25 de outubro de 2011