



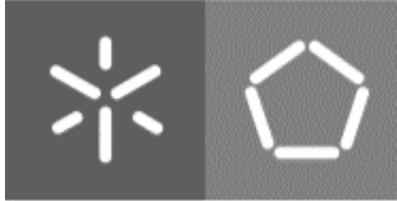
Carla Isabel Cunha Teixeira

**Extração e purificação de ADN de amostras vegetais de videira combinando microextração por fase sólida ( $\mu$ SPE) e microfluídica**

**Universidade do Minho**  
Escola de Engenharia







**Universidade do Minho**  
Escola de Engenharia

Carla Isabel Cunha Teixeira

**Extração e purificação de ADN de amostras vegetais de videira combinando microextração por fase sólida ( $\mu$ SPE) e microfluídica**

Tese de dissertação

**Mestrado em Tecnologia e Ciência Alimentar**

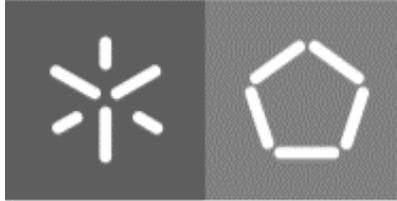
Trabalho efetuado sob a orientação da

**Professora Doutora Alcina Pereira**

Trabalho efetuado sob a supervisão da

**Doutora Marta Prado**

**Mestre Joana Carvalho**



**Universidade do Minho**  
Escola de Engenharia

Carla Isabel Cunha Teixeira

**Extração e purificação de ADN de amostras vegetais de videira combinando microextração por fase sólida ( $\mu$ SPE) e microfluídica**

Tese de dissertação

**Mestrado em Tecnologia e Ciência Alimentar**

Trabalho efetuado sob a orientação da

**Professora Doutora Alcina Pereira**

Trabalho efetuado sob a supervisão da

**Doutora Marta Prado**

**Mestre Joana Carvalho**



INTERNATIONAL IBERIAN  
**NANOTECHNOLOGY**  
LABORATORY

## Direitos de autor e condições de utilização do trabalho por terceiros

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos.

Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada.

Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho.

### Licença concedida aos utilizadores deste trabalho



**Atribuição-NãoComercial-SemDerivações**  
**CC BY-NC-ND**

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

## Agradecimentos

Ao Laboratório Ibérico e Internacional de Nanotecnologia (INL) e líder de grupo, Marta Prado, por me ter acolhido e disponibilizado as suas boas instalações e laboratórios.

Agradecer o apoio a este estudo por *Control of Port and Douro Wines authenticity using graphene DNA sensors project* (031069) co-fundado pela FCT e ERDF através de COMPETE2020. E à Sogrape pelo fornecimento das amostras de folhas de videira e uvas, fundamentais para o desenvolvimento do presente trabalho.

À minha orientadora Professora Alcina Pereira e supervisoras Doutora Marta Prado e Mestre Joana Carvalho com quem tive a oportunidade de aprender e melhorar as minhas capacidades de trabalho. Gostaria também de lhes agradecer toda a sua disponibilidade em ajudar-me sempre que fora necessário.

Em particular, agradeço à Joana Carvalho pela sua disposição e paciência em partilhar e ensinar as técnicas e métodos usados no presente trabalho e pelo seu apoio em laboratório. Agradeço-lhe também a sua simpatia e a ajuda na minha integração no INL.

Ao Andrey Ipatov pelo desenho do protótipo do dispositivo miniaturizado testado neste trabalho. Agradeço também a sua disponibilidade em ajudar na resolução das várias limitações que foram surgindo.

À equipa de Qualidade e Segurança Alimentar e outros funcionários do INL por me terem recebido tão bem e pelo seu apoio no que fosse necessário. Certamente ficarão na minha memória.

A todos os professores que durante toda a minha vida académica me foram transmitindo conhecimentos e me ajudaram no meu desenvolvimento pessoal e profissional. Em especial à Prof. Susan Duthie e Dr Elena Lendoiro que me ensinaram, inspiraram, motivaram e transmitiram a confiança necessária para seguir com o meu percurso.

Aos meus pais e irmãs que apoiaram e encorajaram a minha vida académica, aos quais estou eternamente grata pelo seu apoio incondicional e pela sua confiança em mim.

Aos meus amigos por me terem proporcionados bons momentos, pela motivação e apoio que me deram. Em especial àqueles que apesar da distância, se mantiveram por perto e me ouviram, compreenderam e apoiaram em tudo.

## **Declaração de integridade**

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração. Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

## Resumo

### Extração e purificação de ADN de amostras vegetais de videira combinando microextração por fase sólida ( $\mu$ SPE) e microfluídica.

A qualidade do vinho depende de fatores como o processo de vinificação, solo, condições climáticas e casta. Na sua produção podem ser usadas uma grande variedade de castas de *Vitis vinífera*, contudo apenas um pequeno número destas possuem importância comercial.

O desenvolvimento de métodos confiáveis para rastrear videiras e vinhos têm-se tornado um forte objetivo devido à crescente procura pela proteção de origem de produtos. Os métodos baseados em ADN têm-se demonstrado objetivos na diferenciação de castas. A extração e purificação eficaz de ADN é condição essencial para que estes métodos possam ser aplicados, sendo necessário obter ADN em quantidade suficiente e puro.

Este estudo teve o intuito de desenvolver um protocolo eficiente de extração e purificação de ADN de amostras vegetais de videira num novo protótipo de dispositivo microfluídico, comparando-o ao *kit* comercial DNeasy® PowerSoil® Pro Kit (Qiagen).

A performance fluídica e de diversos protocolos foram avaliados no protótipo para o otimizar. A extração e purificação de ADN foi realizada para 10 castas da região do Douro e 3 do Minho, seguindo o procedimento do *kit* selecionado e no dispositivo desenvolvido com o protocolo selecionado na otimização.

O protótipo de 15 mm usa menos volumes de soluções e é mais rápido relativamente ao de 21 mm. Ambos os protocolos 2.1 e 3 apresentam rendimentos aproximados de 50 %, contudo o protocolo P2.1 é preferível a este por possibilitar a integração e possuir menor variabilidade de resultados. Assim, o protótipo de 15 mm e o protocolo P2.1 foram usados no seguimento do estudo. O dispositivo miniaturizado demonstrou extração de ADN eficiente em folhas de videira e uvas em comparação ao *kit* comercial DNeasy® PowerSoil® Pro Kit (Qiagen).

Futuramente, são necessários estudos com matrizes mais complexas e melhorar a pureza das amostras obtidas, avaliar a amplificação do ADN extraído pelo sistema e, por fim, a sua integração com os módulos de amplificação e deteção para um sistema completo de análise de ADN ( $\mu$ TAS).

**Palavras chave:** Qualidade alimentar; rastreabilidade; autenticidade de produtos; videira; biologia molecular; microextração de ADN por fase sólida; dispositivos microfluídicos.

## **Abstract**

### **DNA extraction and purification from vegetable grapevine samples combining microscale solid phase extraction ( $\mu$ SPE) and microfluidics.**

Wine quality depends on several factors such as grape variety, the winemaking process, soil, and climatic conditions. Despite the wide range of *Vitis vinifera* varieties used in winemaking, only a small number of these have commercial importance.

The demands of protection to the product provenience lead to the development of reliable methods to track grapevines and wines becoming a growing objective. DNA-based methods are objective in differentiating grapevine varieties. Effective DNA extraction and purification is an essential condition for these methods to be applied. It is needed to obtain enough and pure DNA.

This study aimed to develop an efficient DNA extraction and purification protocol from vegetable grapevine samples in a new microfluidic device prototype, comparing it to the commercial kit DNeasy® PowerSoil® Pro-Kit (Qiagen).

Fluidics performance was evaluated in the prototype, as well, four protocols to optimize the extraction. DNA extraction and purification were performed in ten varieties from Douro region, and three from Minho. DNA extraction and purification were carried by the protocol from the kit selected and to the device developed.

The 15 mm prototype uses fewer volumes of solutions and it is faster than the 21 mm. Both protocols 2.1 and 3 show approximate yields of 50 %. However, the P2.1 protocol is preferable since it allows integration and has less variability in results. Thus, the 15 mm prototype and the P2.1 protocol were selected to carry on the study. The miniaturized device demonstrated efficient DNA extraction from grape leaves and grapes compared to the commercial kit DNeasy® PowerSoil® Pro-Kit (Qiagen).

In the future, it is needed studies with more complex matrices, to improve the purity of the samples obtained; evaluate the amplification of the DNA extracted by the system, and finally, its integration with the amplification and detection modules for a complete DNA analysis system ( $\mu$ TAS).

**Keywords:** Food quality; traceability; products authenticity; grapevine; molecular biology; microscale solid phase DNA extraction; microfluidics devices.

# Índice

Direitos de autor e condições de utilização do trabalho por terceiros.....	iii
Agradecimentos .....	iv
Declaração de integridade.....	v
Resumo .....	vi
Abstract .....	vii
Índice .....	viii
Lista de figuras .....	xi
Lista de Tabelas .....	xiii
Lista de Abreviaturas e Siglas .....	xiv
<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
1.1. Indústria alimentar e de bebidas.....	1
1.2. A viticultura.....	1
1.2.1. Importância económica .....	1
1.2.2. Importância cultural .....	3
1.2.3. Aspetos gerais sobre a produção de vinho em Portugal.....	4
1.3. Qualidade e Segurança Alimentar .....	6
1.3.1. Qualidade e segurança alimentar do vinho .....	7
1.4. Rastreabilidade .....	9
1.5. Fraude Agroalimentar.....	10
1.5.1. Autenticidade dos produtos de <i>Vitis vinifera</i> .....	10
1.6. ADN como biomarcador .....	12
1.6.1. Aplicação de técnicas moleculares na Qualidade e Segurança Alimentar... ..	12
1.6.1.1. Vantagens das técnicas moleculares .....	12
1.6.1.1.1. Vantagem para a autenticidade dos produtos de <i>Vitis vinifera</i> .....	13

1.6.1.2.	Limitações das técnicas moleculares.....	14
1.7.	<i>Extração e purificação de ADN</i> .....	15
1.7.1.	Extração e purificação de ADN em amostras vegetais e vinho .....	16
1.7.2.	Extração por fase sólida (SPE).....	16
1.7.3.	Microextração por fase sólida ( $\mu$ SPE) .....	19
1.7.4.	Extração e purificação de ADN através de <i>kits</i> comerciais .....	19
1.8.	<i>Pureza e Quantificação de ADN</i> .....	20
1.8.1.	Quantificação de ADN por fluorimetria.....	21
1.8.2.	Quantificação e pureza de ADN por espectrofotometria UV/Vis.....	21
1.9.	<i>Sistemas miniaturizados</i> .....	22
1.9.1.	Sistemas de microanálise total ( $\mu$ TAS).....	23
1.10.	<i>Objetivos</i> .....	24
<b>2.</b>	<b>Materiais e Métodos</b> .....	<b>25</b>
2.1.	<i>Dispositivo de Microfluídica</i> .....	25
2.1.1.	Produção de réplicas descartáveis em PDMS .....	26
2.1.2.	Montagem.....	26
2.1.3.	Avaliação da performance dos fluídos .....	26
2.1.4.	Otimização do protocolo de extração e purificação de ADN.....	27
2.2.	<i>Extração e Purificação de ADN de folhas de videira e uvas</i> .....	29
2.2.1.	Extração e Purificação com <i>kit</i> comercial .....	30
2.2.2.	Extração e Purificação com o dispositivo miniaturizado .....	31
2.3.	<i>Quantificação de ADN</i> .....	31
2.3.1.	Quantificação por fluorometria .....	31
2.3.2.	Quantificação por espectrofotometria UV/Vis.....	32

2.4.	<i>Tratamento de dados</i> .....	32
<b>3.</b>	<b>Resultados</b> .....	<b>33</b>
3.1.	<i>Avaliação da performance dos fluídos no dispositivo miniaturizado</i> .....	33
3.2.	<i>Otimização do protocolo de extração e purificação de ADN</i> .....	33
3.2.1.	Protocolo de extração e purificação 1 (P1) .....	33
3.2.2.	Protocolo de extração e purificação 2 (P2) .....	35
3.2.3.	Protocolo de extração e purificação 2.1 (P2.1) .....	36
3.2.4.	Protocolo de extração e purificação 3 (P3) .....	37
3.2.5.	Comparação de protocolos e protótipos .....	38
3.3.	<i>Extração e Purificação de ADN de folhas de videira e uvas</i> .....	40
3.3.1.	Extração e Purificação com <i>kit</i> comercial .....	40
3.3.2.	Extração e Purificação com o dispositivo miniaturizado .....	41
3.3.2.1.	Amostras de folhas de videira .....	41
3.3.2.2.	Amostras de uvas .....	43
3.3.3.	Comparação da performance entre dispositivo microfluídico e <i>kit</i> .....	45
<b>4.</b>	<b>Discussão de resultados</b> .....	<b>47</b>
<b>5.</b>	<b>Conclusão</b> .....	<b>50</b>
	<b>Referências</b> .....	<b>51</b>
	<b>Anexos</b> .....	<b>60</b>
	<i>Anexo I</i> .....	60

## Lista de figuras

Figura 1: Evolução global da produção de vinhos .....	1
Figura 2: Evolução global do consumo de vinho .....	2
Figura 3: Principais mercados da exportação de vinhos portugueses. ....	3
Figura 4: Mapa oficial de acordo com o IVV das DO e IG de vinhos em Portugal. ....	5
Figura 5: Preferências dos consumidores europeus e portugueses aquando a compra de um produto alimentício.....	6
Figura 6: Fatores que influenciam a qualidade de um vinho.. ....	8
Figura 7: Fluxo de informação no rastreamento de produtos alimentares. ....	9
Figura 8: Principais etapas da extração e purificação de ADN por SPE.....	17
Figura 9: Esquema comparando uma extração ideal e não ideal por SPE. ....	18
Figura 10: Série de Hofmeister. ....	19
Figura 11: Medição da Absorbância ao longo do espectro UV/Vis de uma amostra de ácidos nucleicos e possíveis contaminantes.....	22
Figura 12: Protótipo do dispositivo de microfluídica desenhado no INL. ....	25
Figura 13: Perfil de extração de $\lambda$ DNA do protocolo P1 no filtro de 15 mm. ....	34
Figura 14: Perfil de extração de $\lambda$ DNA do protocolo P1 no filtro de 21 mm. ....	34
Figura 15: Perfil de extração de $\lambda$ DNA do protocolo P2 no filtro de 15 mm. ....	35
Figura 16: Perfil de extração de $\lambda$ DNA do protocolo P2.1 no filtro de 15 mm. ....	36
Figura 17: Perfil de extração de $\lambda$ DNA do protocolo P2.1 no filtro de 21 mm. ....	37
Figura 18: Perfil de extração de $\lambda$ DNA do protocolo P3 no filtro de 15 mm. ....	38

Figura 19: Comparação dos protocolos testados (P1, P2, P2.1, P3) no filtro de 15 mm. ....	39
Figura 20: Comparação dos protocolos testados (P1 e P2.1) no filtro de 21 mm. ....	39
Figura 21: Extração e purificação de ADN de folhas de videira e uvas com DNeasy® PowerSoil® Pro Kit (Qiagen). ....	41
Figura 22: Extração e purificação de ADN de folhas de videira com o dispositivo microfluídico. ....	42
Figura 23: Variabilidade de pureza de ADN das amostras de folhas de videira de todas as castas testadas com o protótipo microfluídico. ....	43
Figura 24: Extração e purificação de ADN de uvas com o Dispositivo microfluídico. ....	44
Figura 25: Variabilidade de pureza de ADN das amostras de uvas de todas as castas testadas com o protótipo microfluídico. ....	44
Figura 26: Variabilidade das razões de pureza de ADN para as amostras de folhas de videira de todas as castas testadas com DNeasy® PowerSoil® Pro Kit (Qiagen) e com o dispositivo microfluídico. ....	46
Figura 27: Variabilidade das razões de pureza de ADN para as amostras de todas as castas testadas com DNeasy® PowerSoil® Pro Kit (Qiagen) e com o dispositivo microfluídico. ....	46

## Lista de Tabelas

Tabela 1: Principais exportadores mundiais de vinho.....	2
Tabela 2: Descrição e composição das soluções tampão testadas nos protocolos de extração e purificação de ADN.....	27
Tabela 3: Descrição detalhada dos protocolos testados para a otimização do sistema miniaturizado.....	28
Tabela 4: Amostras de folhas e uvas usadas, código e respetiva descrição da casta correspondente.....	29
Tabela 5: Comparação entre as quantidades de ADN recuperadas na eluição através do kit comercial e do dispositivo microfluídico para as amostras de folhas de videira. ....	45
Tabela 6: Comparação entre as quantidades de ADN recuperadas na eluição através do kit comercial e do dispositivo microfluídico para as amostras de uvas. ....	45

## Lista de Abreviaturas e Siglas

<b>μSPE</b>	Microextração por fase sólida;
<b>μTAS</b>	Sistemas de microanálise total;
<b>a.C</b>	antes de Cristo;
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico;
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico;
<b>ASAE</b>	Autoridade de Segurança Alimentar e Económica;
<b>AuNPs</b>	Nanopartículas de ouro;
<b>BB1</b>	Tampão de Ligação 1;
<b>BB2</b>	Tampão de Ligação 2;
<b>CAN</b>	Coleção Ampelográfica Nacional;
<b>CE</b>	Comissão Europeia;
<b>COC</b>	Copolímero de olefina cíclica;
<b>CTAB</b>	Brometo de cetrimónio;
<b>d.C</b>	depois de Cristo;
<b>DO</b>	Denominação de origem;
<b>DOC</b>	Denominação de origem controlada;
<b>DOP</b>	Denominação de origem Protegida;
<b>DTAB</b>	Brometo de dodeciltrimetilamónio;
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético;
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América;
<b>GuSCN</b>	Triacianato guanidina;
<b>IC</b>	Intervalo de confiança;
<b>IG</b>	Indicação geográfica;

<b>INE</b>	Instituto Nacional de Estatística;
<b>INL</b>	Laboratório Ibérico Internacional de Nanotecnologia;
<b>IVV</b>	Instituto da Vinha e do Vinho;
<b>KCl</b>	Cloreto de potássio;
<b>LOC</b>	<i>lab-on-a-chip</i> ;
<b>mhl</b>	milhões de hectolitros;
<b>OIV</b>	Organização Internacional da Vinha e do Vinho;
<b>P1</b>	Protocolo 1;
<b>P2</b>	Protocolo 2;
<b>P2.1</b>	Protocolo 2.1;
<b>P3</b>	Protocolo 3;
<b>PC</b>	Policarbonato;
<b>PCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase;
<b>PDMS</b>	Polidimetilsiloxano;
<b>PET</b>	Politereftalato de etileno;
<b>PMMA</b>	Polimetacrilato de metila;
<b>SAU</b>	Superfície Agrícola Utilizada;
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sódio;
<b>SPE</b>	Extração em fase sólida;
<b>TE</b>	Tampão de Eluição;
<b>UV/Vis</b>	Ultravioleta-Visível;
<b>VQPRD</b>	Vinho de Qualidade Produzido em Região Determinada;
<b>W1</b>	Tampão de lavagem 1.

# 1. Introdução

## 1.1. Indústria alimentar e de bebidas

Os alimentos são um bem essencial para a vida humana. A revolução industrial possibilitou que, no início do século XX, a indústria alimentar se desenvolvesse rapidamente. Atualmente, o processamento de carnes, frutas e legumes juntamente com a confeitaria, pastelaria, produção de vinho e derivados do leite são as suas áreas mais lucrativas (Sadiku *et al.* 2019).

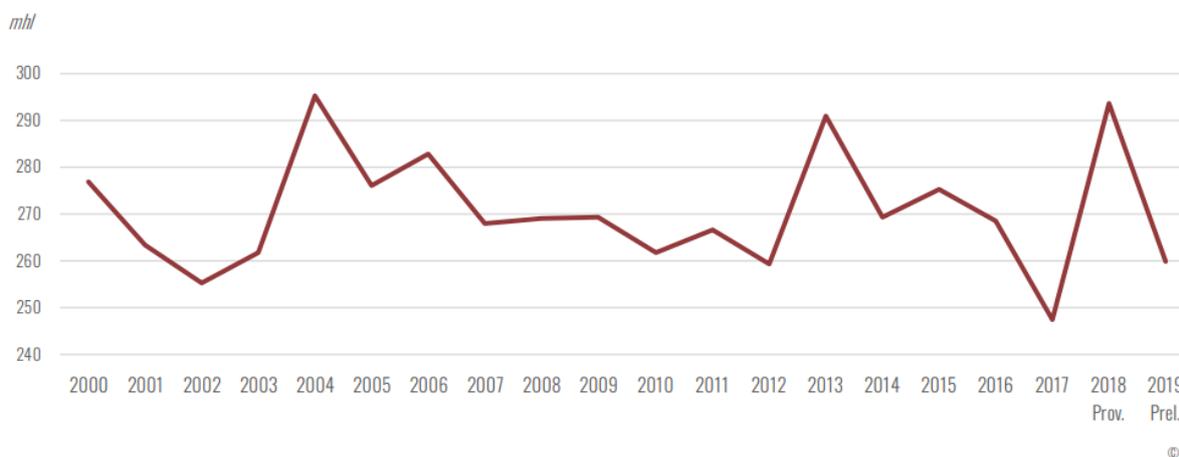
Além do seu papel fundamental na nutrição, a indústria alimentar também representa um papel importante na saúde pública e desenvolvimento social.

## 1.2. A viticultura

A produção vitivinícola é considerada uma das atividades mais antigas da civilização, remontando para os anos de 6 000 a.C. (Soleas *et al.* 1997). Ao longo dos anos a produção de vinho começou a ter cada vez mais importância na economia, bem como na vida cultural e social, dos países produtores de vinho.

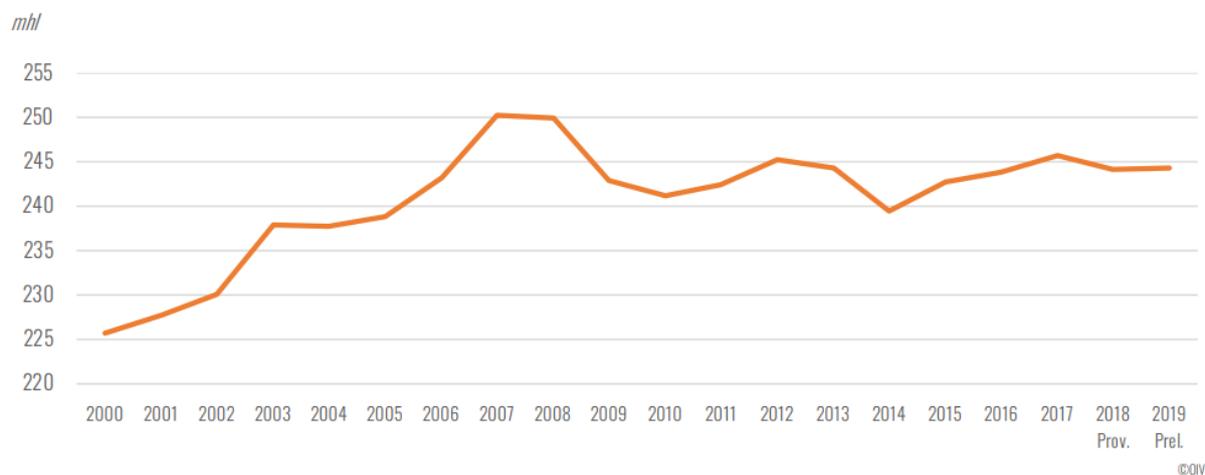
### 1.2.1. Importância económica

Segundo os mais recentes resultados divulgados pela Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV), em 2019, a produção global de vinhos foi de aproximadamente 260 mhl (figura 1), verificando-se uma descida na produção de 11,5 % relativamente a 2018. Contudo, os valores de produção de 2019 aproximam-se aos valores médios de produção de vinho dos últimos 20 anos. Portugal foi o 11º país com maior produção de vinho, sendo que esta cresceu 10 % comparativamente a 2018, sendo estimado o valor de 6,7 mhl (OIV 2020).



**Figura 1: Evolução global da produção de vinhos** (excluindo sumos e mostos) desde 2000 a 2019, em mhl (Fonte: OIV, 2020).

Em 2019 verificou-se um ligeiro aumento no consumo de vinho a nível mundial (+ 0,1 %), consumindo-se 244 mhl (figura 2), sendo que Portugal teve uma redução de 5,0 mhl relativamente a 2018. Segundo estes mesmos dados, Portugal é o 11.º país com maior consumo de vinho (OIV 2020).



**Figura 2: Evolução global do consumo de vinho** (excluindo sumos e mostos) desde 2000 a 2019, em mhl (Fonte: OIV, 2020).

Relativamente às exportações, os maiores exportadores mundiais (tabela 1) são a França, Espanha e Itália, que juntos exportam mais de 50 % do vinho. Portugal é o décimo maior exportador de vinhos, sendo o Reino Unido e os Estados Unidos da América (EUA) os principais compradores de vinho português (figura 3) (OIV 2020).

**Tabela 1: Principais exportadores mundiais de vinho** (Fonte: OIV 2020).

	Volume (mhl)		Valor (mil milhões de euros)	
	2018	2019	2018	2019
<b>Itália</b>	19,6	21,6	6,2	6,4
<b>Espanha</b>	20,0	21,3	2,9	2,7
<b>França</b>	14,2	14,2	9,3	9,8
<b>Chile</b>	8,4	8,7	1,7	1,7
<b>Austrália</b>	8,5	7,4	1,8	1,8
<b>Alemanha</b>	3,7	3,8	1,0	1,0
<b>EUA</b>	3,5	3,6	1,2	1,2
<b>África do Sul</b>	4,2	3,2	0,7	0,6
<b>Portugal</b>	3,0	3,0	0,8	0,8
<b>Argentina</b>	2,8	2,7	0,7	0,7
<b>Nova Zelândia</b>	2,6	2,7	1,0	1,1

## Vendas ao exterior

Milhões de euros

Total

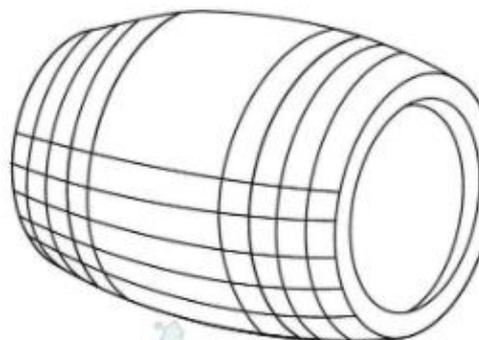
Varição 2018/2019



Para a União Europeia



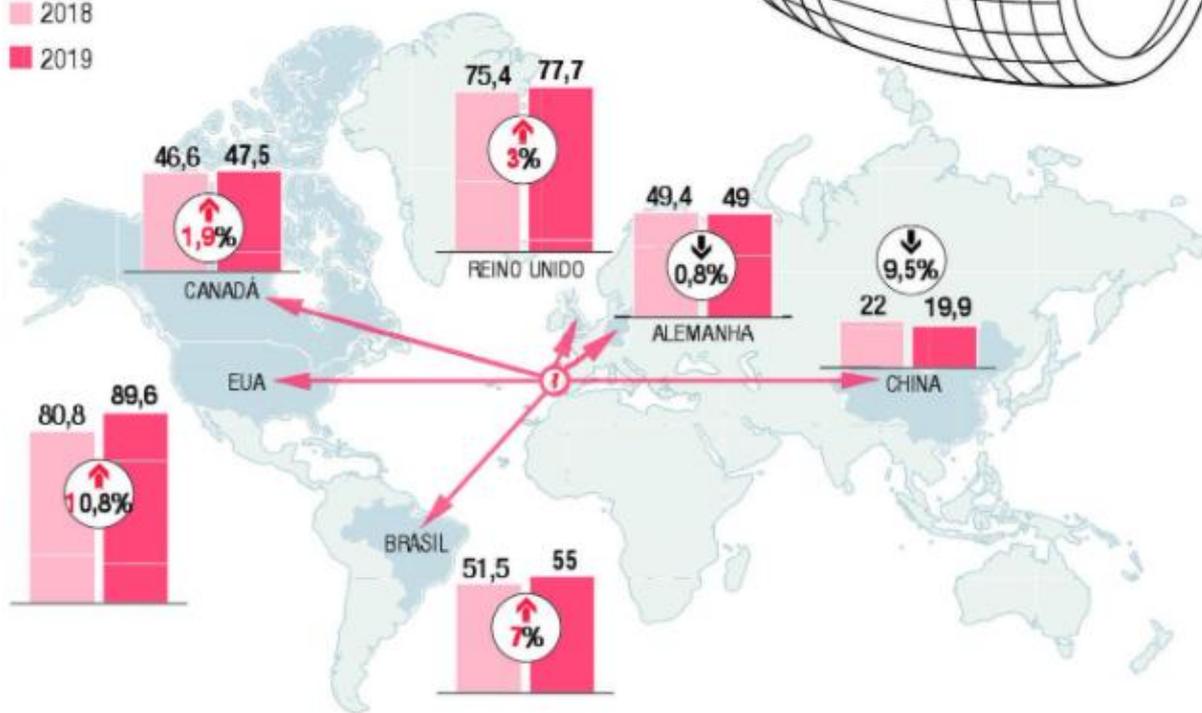
Para mercados extracomunitários



Mercados mais relevantes

2018

2019



FONTE: INE

Figura 3: Principais mercados da exportação de vinhos portugueses, as suas vendas em 2019, em milhões de euros, e a sua variação relativamente a 2018, em percentagem (Fonte: INE).

### 1.2.2. Importância cultural

A importância cultural do vinho é enaltecida e evidenciada por expressões como “dádiva de deuses”, “Sangue de Cristo” e “essência da própria vida” que são frequentemente atribuídas a esta bebida pela comunidade religiosa (ASAE 2016).

A expansão do Império Romano pelo Mediterrâneo é indicada como o principal fator para a importância do vinho na cultura e dieta europeia. Na antiguidade, o vinho foi considerado fundamental na dieta diária, visto que beber água não era seguro e este tornou-se a alternativa preferida para acompanhar as refeições. Foi também nestes tempos que se estabeleceram muitas das atuais principais zonas de produção vitivinícola (McGovern *et al.* 2003).

A importância do vinho na sociedade evoluiu ao longo dos tempos, sendo que deixou de ser uma fonte de nutrição para um complemento cultural da alimentação e convívio. A arte da viticultura também mudou na medida em que facilitara o processo de produção de vinho e o tornou mais seguro. Contudo, a tradição e a ênfase nas origens e herança da viticultura mantiveram-se (McGovern *et al.* 2003).

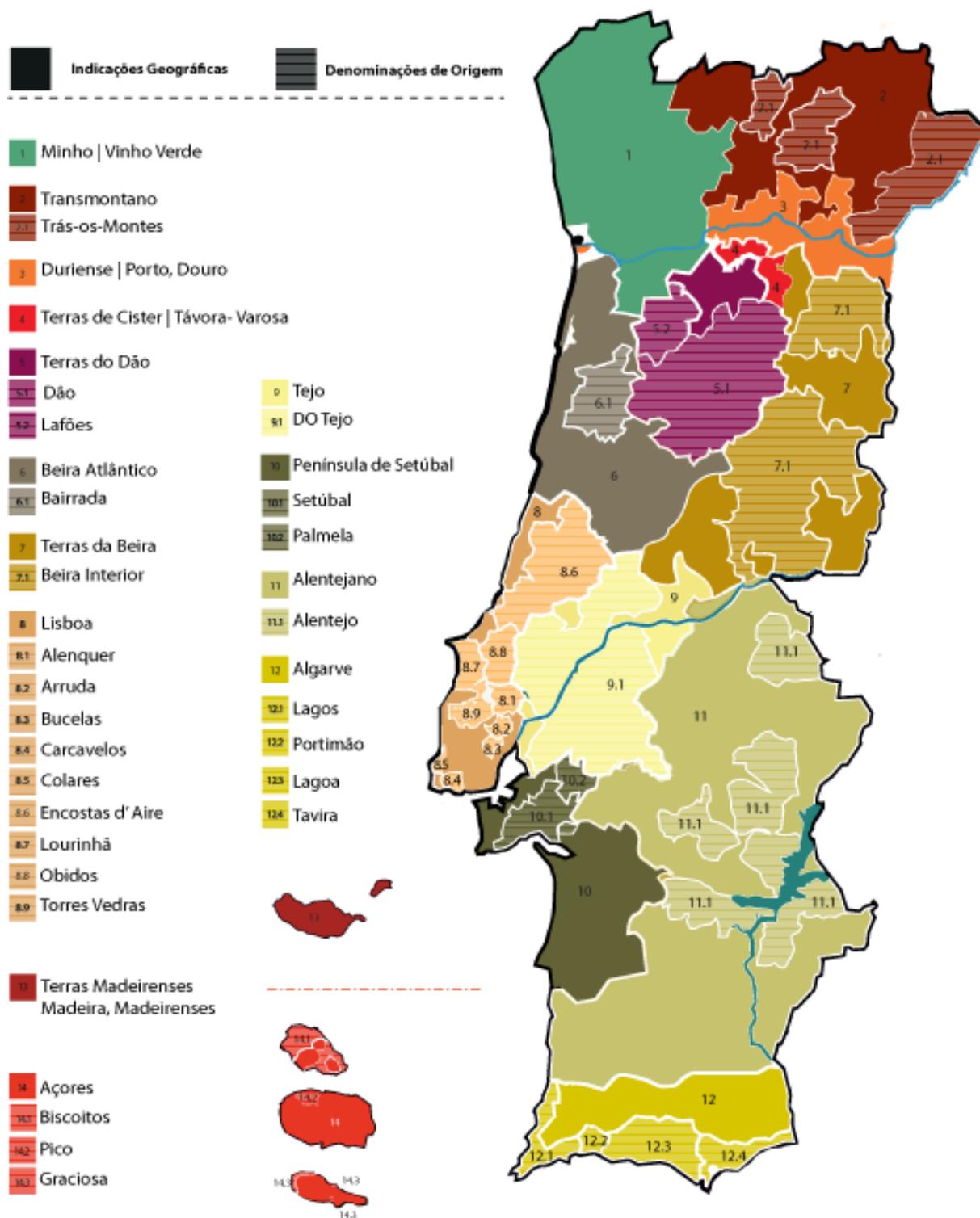
O vinho associou-se assim à gastronomia de qualidade, história e a ambientes sociais dignos, tornando-se cada vez mais um interesse turístico que tem levado ao desenvolvimento e aumento de Enoturismo (McGovern *et al.* 2003).

### **1.2.3. Aspetos gerais sobre a produção de vinho em Portugal**

Portugal é um dos países com mais forte e longínqua tradição vitivinícola, possuindo, em 2019, 179 mil hectares em superfície de vinha destinada à produção de vinho. É o 5.º maior produtor europeu e o 11.º a nível mundial com uma produção de mais de 6 mhl. De notar que Portugal é também o país com a maior densidade de vinha relativamente à superfície agrícola utilizada (SAU) e um dos maiores consumidores de vinho *per capita* (OIV 2020).

A cultura da vinha em Portugal remonta ao tempo dos Tartéssios (2 000 a.C.), muito antes da própria fundação do país. Existem evidências da introdução de castas e comercialização de vinho pelos Fenícios, Gregos e Celtas, contudo é com a ocupação romana que o vinho conquistou a sua importância na sociedade. Os Romanos são os responsáveis pelo cultivo em território português de novas castas provenientes do Mediterrâneo, práticas culturais como a poda e condução da vinha bem como de técnicas enológicas (Magalhães 2015).

Em 1988 e 1989 delimitaram-se 27 zonas geográficas com potencial vitivinícola para a produção de Vinho de Qualidade Produzido em Região Determinada (VQPRD). Posteriormente estas zonas foram elevadas à denominação de DOC/DOP através do reconhecimento da qualidade dos seus vinhos e pela constituição de Comissões Vitivinícolas Regionais (Magalhães 2015). Segundo o Instituto da Vinha e do Vinho (IVV), Portugal está atualmente subdividido em 14 Indicações Geográficas (IG) e 31 Denominações de Origem (DO) (figura 4).

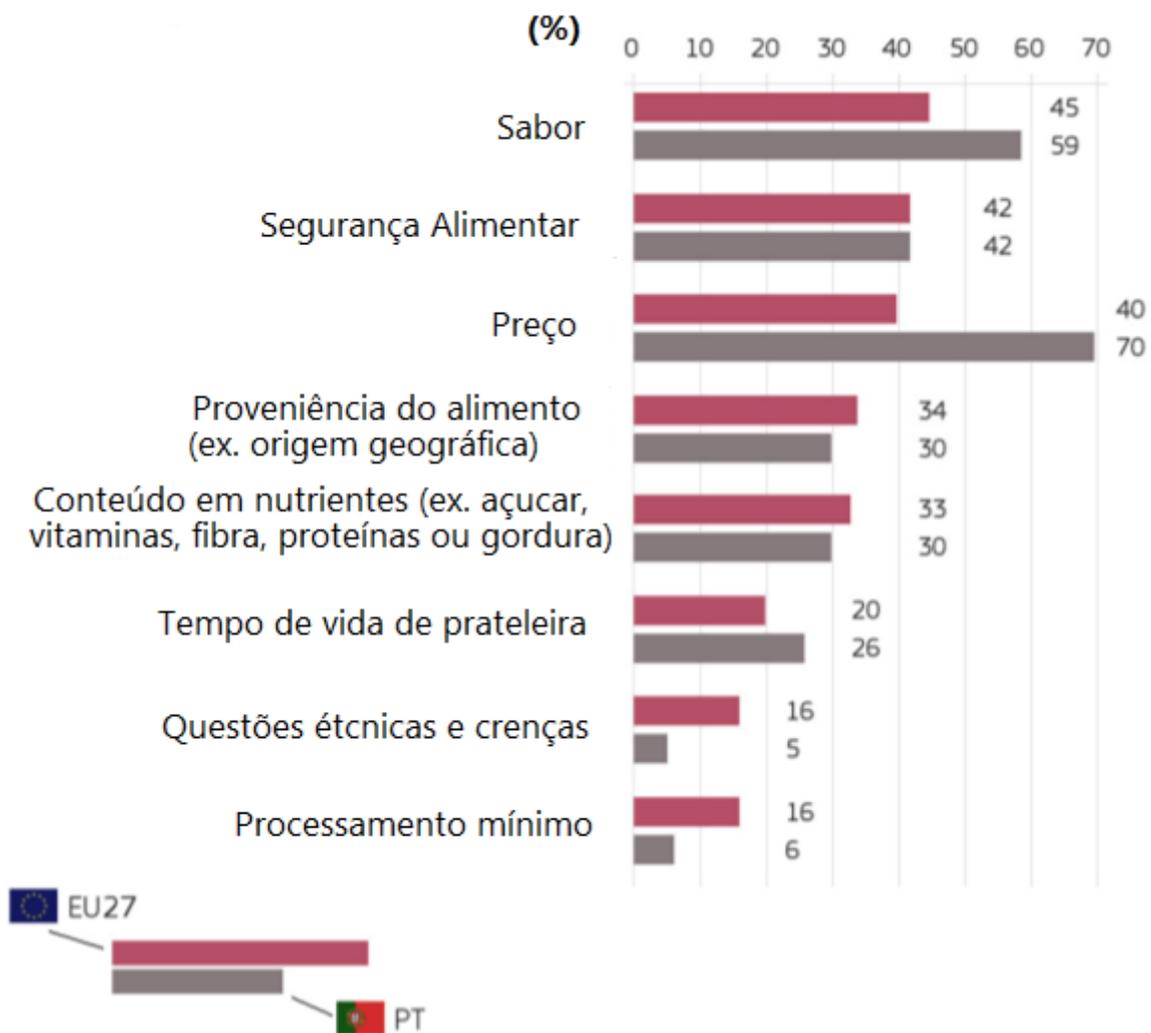


**Figura 4: Mapa oficial de acordo com o IVV das DO e IG de vinhos em Portugal.** No território português estão reconhecidas e protegidas, atualmente, 31 DO e 14 IG. Interessa referir que algumas áreas de produção de Vinho Regional, como «Minho» e «Duriense» coincidem geograficamente com a área de produção da respetiva DO «Vinhos Verdes» e «Douro/Porto» (Fonte: Instituto da Vinha e do Vinho, I.P.).

### 1.3. Qualidade e Segurança Alimentar

Atualmente, a população não procura apenas suprir as suas necessidades nutricionais através da alimentação, mas também a descoberta de novas sensações através desta. Assim, os produtos alimentícios deixaram de ser apenas uma necessidade, tornando-se também parte da cultura e uma fonte de prazer (McInemey 2002).

A qualidade alimentar define-se por um conjunto de características (origem, ingredientes, modo de fabrico, entre outras) focadas nas preferências dos consumidores (figura 5). Está também relacionada com o direcionamento de produtos alimentares para segmentos específicos de mercado com critérios de qualidade definidos pelos consumidores (Gordon 2017).



**Figura 5: Preferências dos consumidores europeus e portugueses aquando a compra de um produto alimentício.** Está representada a percentagem de pessoas que indicaram entre as várias propriedades dos alimentos como sendo uma das três mais importantes a ter em conta na compra de produtos alimentares (Fonte: *Special Eurobarometer 505*, 2020).

A segurança alimentar pretende prevenir a presença de perigos (físicos, químicos e biológicos) nos alimentos através do manuseamento, eliminação ou pelo controlo destes (Gordon 2017). Esta constitui um direito fundamental dos consumidores. Legalmente, é atribuída a responsabilidade ao produtor de produzir alimentos seguros (Campos *et al.* 2008).

Na segurança alimentar, o incumprimento das especificações requeridas conduzirá a danos na saúde do consumidor, doenças e, em casos mais críticos, a morte. Por outro lado, a qualidade alimentar relaciona-se mais com questões legais, rotulagem, certificação e/ou requerimentos do consumidor, envolvendo vários aspetos acerca do produto que não estão diretamente ligados à segurança deste. Assim, um produto seguro não é necessariamente um produto de qualidade. Contudo, nos produtos de qualidade é assumido que estes são seguros (Gordon 2017).

A implementação de sistemas de qualidade e segurança alimentar é fundamental em todas as empresas agroalimentares, sendo que estas devem cumprir todos os requisitos necessários. A apresentação de produtos seguros e competitivos, em conformidade com as especificações técnicas fixadas, legislação e com os parâmetros de qualidade definido é um fator importante para a competitividade destas no mercado (Campos *et al.* 2008).

### **1.3.1. Qualidade e segurança alimentar do vinho**

No despacho nº 284/1966, publicado a 9 de dezembro de 1966 no Diário da República Portuguesa, é evidenciada a importância do consumidor na definição, estímulo e exigência para a produção de vinhos de qualidade. Importa referir que a definição de qualidade acarreta um elevado grau de subjetividade, visto que a preferência de aromas, sabores, cor e aspeto é variável entre indivíduos (Garcia e Barros 2018).

Neste mesmo despacho referido no paragrafo anterior, define-se que a qualidade de um vinho (figura 6) se inicia na escolha da casta ou no conjunto de castas pelo vinicultor e/ou enólogo. Refere-se também a importância para a qualidade de um vinho da técnica de vinificação e do tratamento que estes sofrem até chegarem ao consumidor final. Além destes fatores mencionados no despacho, o solo, o clima, as condições de cultivo, a vindima e a fermentação também afetam a qualidade e o volume final de vinho produzido (Garcia e Barros 2018).

Em tempos primórdios, como 121 d.C., já era regulado por lei que certas castas fossem exclusivas a específicas regiões e as uvas destas regiões eram usadas para a produção de estilos precisos de vinho (Soleas *et al.* 1997).

A fermentação possui também uma forte influência na qualidade do vinho. A seleção de estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* a usar constitui uma metodologia relativamente recente para a garantia de qualidade neste produto. Fermentações parasitas, provocadas por microflora indígena, podem alterar as propriedades do vinho. Assim, é necessário que estas sejam eliminadas ou reduzidas a valores aceitáveis para que o nível de qualidade e estabilidade do vinho seja atingida. Daqui advém a necessidade de um controlo e de uma gestão de todo o processo de vinificação, visto que os resultados de uma análise microbiológica pode afetar o valor comercial de um vinho, podendo mesmo levar à rejeição deste no mercado (Campos *et al.* 2008, Duarte e Caldeira 2014).



**Figura 6: Fatores que influenciam a qualidade de um vinho.** A dimensão de cada circunferência representa o peso de cada fator na qualidade final de um vinho. Sendo eles, por ordem decrescente de importância, o enólogo/produtor de vinho; casta; modo de vinificação e qualidade das uvas (Fonte: Jackson 2009).

No que concerne à segurança alimentar do vinho, os perigos potenciais encontrados na produção de vinho são reduzidos relativamente a outros produtos alimentares. Contudo, tal como nos restantes produtos alimentícios, este deve respeitar e assegurar os critérios de segurança alimentar que protegem a saúde do consumidor (Campos *et al.* 2008).

Biologicamente, o vinho é uma bebida considerada segura. Os microrganismos comumente presentes no vinho não apresentam riscos para a saúde humana. Não existe limites legais para o número de microrganismos permitidos por garrafa, visto que a sua quantidade está dependente do pH, da concentração de açúcares, do grau alcoólico, das concentrações de SO<sub>2</sub> livre e total, da estabilização física escolhida e do destino final do vinho (Duarte e Caldeira 2014). Além disso, para se obter a esterilidade microbiológica deste, os tratamentos frequentes, tais como filtrações e tratamentos térmicos, prejudicariam as suas propriedades sensoriais (Campos *et al.* 2008).

Relativamente a substâncias químicas, estão definidas as concentrações máximas para algumas substâncias químicas. Qualquer adição de químicos ao vinho, com a finalidade de melhorá-lo ou de preservar as suas propriedades físico-químicas e/ou sensoriais, é regulamentada. Sendo que estes devem constar nos regulamentos que definem aqueles que podem ser usados e respetivas quantidades (Campos *et al.* 2008).

## 1.4. Rastreabilidade

Aliado ao aumento das preocupações acerca da qualidade e segurança alimentar, existe um crescimento no interesse pela rastreabilidade da proveniência dos produtos ao longo da cadeia de fornecimento destes.

A Diretiva 2000/13/CE do Parlamento Europeu (Comissão Europeia 2000), decretou que todas as fases da cadeia de fornecimento de produtos agroalimentares devem ser monitorizadas via sistemas de rastreabilidade. Em *Health & Consumer Protection - Directorate General*, 2007, a União Europeia (EU) aborda o conceito de rastreabilidade como uma ferramenta para assegurar altos níveis de segurança e qualidade alimentar dentro da EU.

A rastreabilidade consiste na capacidade de rastrear qualquer produto alimentar ou substância usada para consumo durante todas as etapas da sua produção, processamento e distribuição (figura 7). Esta estratégia, conhecida também pela citação “*from farm to fork*”, permite, no caso da ocorrência de uma eventual crise alimentar, facilitar a identificação da origem de um problema de forma a tornar mais rápida a tomada de decisões e medidas na atuação do problema. A rastreabilidade dos produtos é também crucial para ganhar a confiança dos consumidores no produto (Opara *et al.* 2003).



**Figura 7: Fluxo de informação no rastreamento de produtos alimentares (Goulart 2019).**

A necessidade de certificações, validações, informações e rótulos autoexplicativos visam a prover que os consumidores estejam informados e satisfeitos, visto que estes apreciam cada vez mais a transparência e leem cada vez mais a informação contida nos rótulos dos produtos alimentares. A rastreabilidade alimentar é também uma ferramenta a usar de forma a prevenir e identificar casos de fraude (Opara e Mazaud 2001).

## 1.5.Fraude Agroalimentar

Atividades fraudulentas são caracterizadas pela sua natureza intencional de violar questões legais relacionadas com os produtos, geralmente com propósitos de aumentar lucros. Esta tentativa de obter uma vantagem injusta em relação a empresas competidoras e a extensão de grupos criminosos organizados levaram a uma série de casos fraudulentos no setor agroalimentar (Comissão Europeia 2013).

Vários destes casos (Hnatio 2013; Casanova 2015; Tomás 2015) não tiveram efeitos na saúde pública, contudo existem casos em que a segurança alimentar foi posta em causa, como o caso “Metanol a Leste”, onde bebidas alcoólicas contaminadas com metanol foram vendidas no leste da Europa (*Euronews* 2012) ou o caso de 2008 em que bebés foram afetados severamente devido ao consumo de leite com melanina (Rolim 2009).

A necessidade da criação de legislação que proteja os consumidores de produtos fraudulentos tornou-se evidente. No relatório da Comissão Europeia (CE) de 2013 acerca deste assunto, foi apontado que o risco da ocorrência de fraude em produtos alimentares é tanto maior quanto menor é o risco de serem detetadas e maior for o lucro obtido.

Entre os diferentes tipos de fraude está a adulteração, substituição, rotulagem enganadora e uso indevido de certificações. Como produtos em maior risco de sofrerem fraude alimentar estão apontados o azeite, peixe, alimentos orgânicos, leite, grãos, mel e xarope de ácer, chá e café, especiarias, **vinho** e certos sumos de fruta (Comissão Europeia 2013).

### 1.5.1. Autenticidade dos produtos de *Vitis vinifera*

*Vitis vinifera* subsp. *vinifera* (ou *sativa*) é uma das mais antigas e valiosas plantas domesticadas pela civilização. Esta é usada na produção de uvas de mesa, passas, sumos, vinhos e bebidas espirituosas. Atualmente, há registo de 6 000 a 11 000 castas de videira cultivadas em todo o mundo, embora apenas um pequeno número destas apresenta importância comercial. A globalização dos mercados tem contribuído também para a redução do número de castas exploradas (Santos *et al.* 2014).

Praticamente todas as regiões tradicionais de cultivo de vinha têm as suas próprias castas indígenas de *Vitis vinifera* e constituíram os seus arquivos de registo destas de forma a preservar e gerenciar a biodiversidade. A Coleção Ampelográfica Nacional (CAN), portuguesa, regista aproximadamente 720 castas, das quais 343 são legalmente autorizadas para a produção de

vinho em Portugal. Destas, 107 são variedades internacionais e 236 são castas de cultivo tradicional português e 134 delas únicas em Portugal (Cunha *et al.* 2020).

O grande número de castas distribuídas por todo o país resultou em erros de nomenclatura. Um número significativo de sinonímias (mesma casta com nomes diferentes) e homonímias (diferentes castas identificadas sob o mesmo nome) já foram identificadas pela CAN através da caracterização morfológica, com base nos descritores da OIV (OIV 2009). A biologia molecular tem sido fundamental na comprovação de todos os casos identificados, bem como na identificação de outros casos de erros de nomenclatura (Cunha *et al.* 2020).

O controlo e certificação do material de plantio disponível para os produtores é útil tendo em conta que tanto a cepa como o porta enxertos têm influencia no crescimento da cepa exercitada e na qualidade das uvas produzidas. A autenticação do material vegetal da *Vitis vinifera* pode ser usada para proteger o viticultor da identificação incorreta das castas das quais é proprietário. Evitando assim casos de rotulagem incorreta e falsificação nestes produtos. (Santos *et al.* 2014).

O vinho é apontado como sendo um dos dez produtos em maior risco de ocorrência de fraude (Comissão Europeia 2013). A fraude mais comum em vinhos é a adulteração de vinho. Alguns exemplos deste tipo de fraude no vinho são: a sua diluição com água, a adição de álcool ou outras substâncias não autorizadas e a mistura (ou substituição) com vinho de menor qualidade. Além disto, esta fraude pode ser cometida simplesmente através de rótulos enganadores (Holmberg 2010).

Uma das razões apontadas para que a adulteração de vinho seja tão comum é que é difícil, mesmo para um profissional, identificar através das características sensoriais este tipo de fraude, sendo que o consumidor não se chegará a aperceber que foi enganado. A falta de testes laboratoriais rápidos e eficientes para a sua deteção são outro fator importante na ocorrência deste tipo de fraude (Ashenfelter 2006, Holmberg 2010).

O alto grau de imprecisão das informações fornecidas aos consumidores acerca das uvas e seus produtos derivados foi evidenciada numa pesquisa, realizada na Áustria, em que um terço da fruta (uvas de mesa e passas) testadas demonstraram ter sido rotuladas indevidamente no mercado em relação à sua casta (Sefc *et al.* 1998; Santos *et al.* 2014).

## **1.6. ADN como biomarcador**

O ácido desoxirribonucleico (ADN) está presente em todas as células e contém a informação biológica que torna cada ser vivo único.

O ADN consiste numa dupla-hélice de duas cadeias de ADN enroladas em torno de um eixo comum e ligadas entre si por pontes de hidrogénio entre os seus pares de bases. Cada cadeia é composta por nucleótidos, que são constituídos por três partes: um grupo fosfato, a desoxirribose e uma base nitrogenada – citosina (C), timina (T), adenina (A) e guanina (G) (Watson e Crick 1953).

### **1.6.1. Aplicação de técnicas moleculares na Qualidade e Segurança Alimentar**

No contexto do controlo da Qualidade e Segurança Alimentar, as principais aplicações dos métodos de análise de ADN incluem a deteção de organismos geneticamente modificados (GMOs) (Qian *et al.* 2018), deteção de microrganismos patogénicos (Rasooly e Herold 2008, Azinheiro *et al.* 2020), deteção de alergénicos (Prado *et al.* 2016) e autenticidade de produtos (Salihah *et al.* 2016, Böhme *et al.* 2019).

Em relação ao vinho, este contém uma matriz complexa de ADN. Este é proveniente das uvas usadas, microbiota espontâneo ou inoculado durante a fermentação alcoólica e malolática e proveniente de mostos concentrados adicionados. Assim, as análises moleculares permitem identificar a(s) casta(s) usada(s) e proveniência de mostos concentrados, permitindo avaliar a autenticidade do vinho. Também permite identificar as leveduras/bactérias usadas na sua produção, verificando, por exemplo, se leveduras GMO foram usadas (Marques *et al.* 2010; León *et al.* 2011; Kačániová *et al.* 2012).

Relativamente à deteção de microrganismos patogénicos no vinho, a sua aplicabilidade não é fundamental, visto que, como discutido no capítulo 1.3.1, o vinho é considerado uma bebida microbiologicamente segura. Contudo, técnicas moleculares podem ser bastante úteis na deteção de microrganismos indesejáveis que afetam a qualidade de vinhos (Duarte e Caldeira 2014).

#### **1.6.1.1. Vantagens das técnicas moleculares**

Metodologias baseadas no ADN como marcador em análises alimentares apresentam diversas vantagens como a sua presença em todas as células vegetais e animais, a sua alta especificidade e sensibilidade, a alta estabilidade e durabilidade, relativamente fácil

funcionalização, hibridização reversível e uma padronização simples destes métodos (Lockley e Bardsley 2000; Brereton 2013).

O ADN está presente em todas as células de qualquer ser vivo e este não é afetado por variações biológicas, climatéricas e/ou geográficas contrariamente às proteínas, cuja expressão pode ser afetada por fatores externos (Brereton 2013).

A maior estabilidade e durabilidade do ADN em relação às proteínas ou ácido ribonucleico (ARN) é outra das vantagens. O ADN desnatura a altas temperaturas, pela quebra das pontes de hidrogénio entre cadeias, contudo a sua dupla hélice é restaurada assim que as condições são normalizadas. As proteínas desnaturam a temperaturas mais baixas relativamente ao ADN e grande parte destas perdem a sua funcionalização. Relativamente ao ARN, este é mais propenso a desnaturação que o ADN devido à presença do grupo hidroxilo na posição 2' da ribose que o constitui (Khanna 2010).

A alta especificidade e sensibilidade dos métodos baseados em ADN deve-se às diferenças nas sequências de ADN entre diferentes espécies, o que o torna uma boa ferramenta para a autenticação de alimentos. Quando comparado com as proteínas, o ADN pode fornecer mais informações do que estas devido à redundância do ADN e da presença de zonas não codificadas. Além disso, a possibilidade de amplificar o número de cópias inicial de ADN, usando PCR ou outras técnicas de amplificação, aumenta a sensibilidade e também permite a quantificação através do qPCR (Lockley e Bardsley 2000).

A simples padronização de métodos baseados em ADN devido às suas características intrínsecas é outra vantagem comparando especialmente com métodos imunológicos, por exemplo. Anticorpos de diferentes fornecedores resultam em diferentes performances dos ensaios, o que não acontece usando ADN (Brereton 2013).

#### **1.6.1.1.1. Vantagem para a autenticidade dos produtos de *Vitis vinifera***

Os métodos científicos comumente usados para a identificação de castas e/ou determinação da origem geográfica são baseados na análise de perfis proteicos (Moreno-Arribas *et al.* 1999; Moreno-Arribas *et al.* 2002), antocianinas (Revilla e González-SanJosé 2001; García-Beneytez *et al.* 2003) e elementos químicos (Almeida e Vasconcelos 2003; Coetzee e Vanhaecke 2005).

Na identificação de origem geográfica, estes métodos têm demonstrado resultados promissores (Baxter *et al.* 1997; Moreno-Arribas *et al.* 1999; Le Bourse *et al.* 2010). Contudo,

estes métodos analíticos são morosos e influenciados por vários fatores como a composição do solo, condições climáticas, métodos de vinificação e envelhecimento do vinho (Catalano *et al.* 2016).

Os métodos baseados em ADN como marcador serão mais eficientes e precisos no controlo de castas, visto que o genótipo destas não é influenciado por estes diferentes parâmetros (Catalano *et al.* 2016). Assim, as técnicas moleculares tornaram-se uma ferramenta útil na autenticação destas.

Juntamente com métodos ampelográficos, as técnicas moleculares têm permitido a identificação de erros de nomenclatura, contribuindo para os objetivos da CAN na identificação e preservação das várias variedades cultivadas (Santos *et al.* 2014). A sequenciação e os bancos de dados genómicos destas permite a investigação da história de evolução da videira e o melhoramento desta, permitindo, por exemplo, melhorar a resistência destas a doenças comuns, reduzindo a necessidade do uso de produtos químicos na produção vitivinícola. Apesar do seu valor económico, este banco de dados possui pouca informação, sendo que apenas 36 castas foram sequenciadas totalmente até hoje (Liang *et al.* 2019)

#### **1.6.1.2.Limitações das técnicas moleculares**

As principais limitações dos métodos à base de ADN para as análises alimentares são referentes à complexidade dos produtos alimentares, a perda da integridade do ADN ao longo do processamento de alimentos (Hird *et al.* 2006), o risco de contaminação cruzada durante os vários passos da análise de ADN e a presença de compostos que impedem a deteção de ADN, como a presença de inibidores de PCR (Nolan *et al.* 2006).

Os produtos alimentares são compostos por diversas matérias primas com diferentes propriedades, sendo que a natureza de cada uma delas afeta de forma diferente a extração e purificação de ADN. Ter uma mistura de matérias primas, com diferentes contribuições e níveis de degradação de ADN, misturadas em proporções desconhecidas, fazem com que as análises quantitativas sejam dificultadas (Weighardt 2007). Visto que, por vezes, a informação completa da composição dos produtos é desconhecida, a escolha da técnica de extração é normalmente baseada em experiências com amostras similares. Os métodos de extração devem ser, por isso, desenvolvidos e validados para diferentes matrizes e o espectro de matrizes para qual o método pode ser aplicado deve ser definido (Cankar *et al.* 2006). O processamento dos alimentos pode provocar a degradação e fragmentação de ADN e assim limitar a quantidade de ADN que pode ser extraído.

As altas temperaturas do processamento alimentar podem causar a depurinação e/ou desaminação do ADN. Temperaturas acima dos 100 ° C podem causar a perda da estrutura do ADN, pelo que a cozedura, assamento, torragem e secagem são processos que degradam ADN. A autoclavagem de produtos alimentares a 121 ° C tem um efeito superior na degradação de ADN quando comparado com estes, o que pode ser explicado pela alta pressão que aumenta o efeito destrutivo (Prado *et al.* 2004; Gryson 2010).

O baixo pH provoca a lise das células e consequentemente a libertação de endonucleases que degradam o ADN. Porém, este efeito é limitado devido à falta de estabilidade destas enzimas em pH ácido. Apenas em condições extremamente acídicas a depurinação de ADN pode ocorrer, causando a falha da PCR (Gryson 2010).

A fermentação é outro dos processos que degradam a qualidade do ADN. Longos períodos de fermentação têm demonstrado uma forte degradação do ADN. Esta pode ser explicada pelas enzimas de restrição libertadas pelos microrganismos (Pan e Shih 2003).

Apesar das várias limitações com a aplicação de técnicas moleculares em análises alimentares, como a complexidade e o nível de processamento dos alimentos, em muitos casos esta continua a ser possível (Prado *et al.* 2002).

## **1.7.Extração e purificação de ADN**

A biologia molecular tem demonstrados avanços contínuos relacionados com o estudo e manipulação do material genético. Contudo, uma das dificuldades dos biólogos moleculares é em obter ADN genómico de elevada qualidade e livre de contaminantes (Varma *et al.* 2007).

Nas últimas três décadas têm sido desenvolvidos numerosos protocolos e procedimentos para extrair e purificar ADN de várias espécies de plantas e alimentos. Alguns dos protocolos mais usados são os desenhados por Murray e Thompson 1980, Doyle e Doyle 1987, Rogers e Bendich 1994 e Lodhi *et al.* 1994. Estes métodos têm obtido sucesso em várias extrações de ADN até agora, contudo, nenhum destes ou outros métodos publicados, demonstrou uma aplicação universal para todas as plantas. Assim, torna-se necessário modificar ou combinar protocolos de forma a obter a qualidade de ADN desejada (Varma *et al.* 2007).

Essencialmente, a extração e purificação de ADN genómico de qualquer célula procariota ou eucariota inclui três passos centrais: a remoção de envelopes (paredes celulares/membranas) em torno do ADN; a separação do ADN dos outros componentes celulares; a manutenção da

integridade do ADN durante o procedimento, como por exemplo, a proteção contra enzimas de restrição e destruição mecânica do ADN (Gilmartin e Bowler 2002; Varma *et al.* 2007).

### **1.7.1. Extração e purificação de ADN em amostras vegetais e vinho**

O desenvolvimento de métodos confiáveis para rastrear videiras e vinhos têm-se tornado um forte objetivo devido à crescente procura pela autenticidade dos produtos. Além deste fator, é interessante rastrear possíveis eventos de modificação genética do material vegetais usados na produção de vinho de forma a melhorar e/ou garantir a qualidade de vinhas e dos seus produtos derivados (Briciu *et al.* 2009).

Os métodos baseados em ADN têm-se demonstrado como um método objetivo na diferenciação de castas de vinho (Faria *et al.* 2000). A condição essencial para que estes métodos possam ser aplicados é a obtenção de um *template* de ADN em quantidade suficiente e puro. O ADN da videira pode ser extraído de qualquer parte da planta – folhas (Catalano *et al.* 2016), mosto (Faria *et al.* 2000) e vinhos experimentais ou comerciais (García-Beneytez *et al.* 2002) e vinhos envelhecidos (Nakamura *et al.* 2007). Não é conhecida a extensão a que os processos de vinificação afetam o rendimento do ADN extraído no vinho.

A deteção das variedades de *Vitis vinifera* com o uso de métodos baseados em PCR é dificultada pela degradação do ADN e contaminantes que interferem ou inibem a PCR como álcool, polissacáridos, polipéptidos e substâncias pigmentares (García-Beneytez *et al.* 2002, Siret *et al.* 2002, Pereira *et al.* 2011).

Estudos têm desenvolvido métodos com o intuito de melhorar a extração e purificação de ADN em amostras da espécie *Vitis vinifera* (Lodhi *et al.* 1994; Hanania *et al.* 2004; Baleiras-Couto e Eiras-Dias 2006; Briciu *et al.* 2009; Pereira *et al.* 2011; Piccolo *et al.* 2012; Marsal *et al.* 2013; Catalano *et al.* 2016). Os protocolos usados são frequentemente baseados nos métodos descritos por Doyle e Doyle 1987 e Lodhi *et al.* 1994, com uso de detergentes como SDS, CTAB e/ou DTAB na solução tampão de extração de ADN.

### **1.7.2. Extração por fase sólida (SPE)**

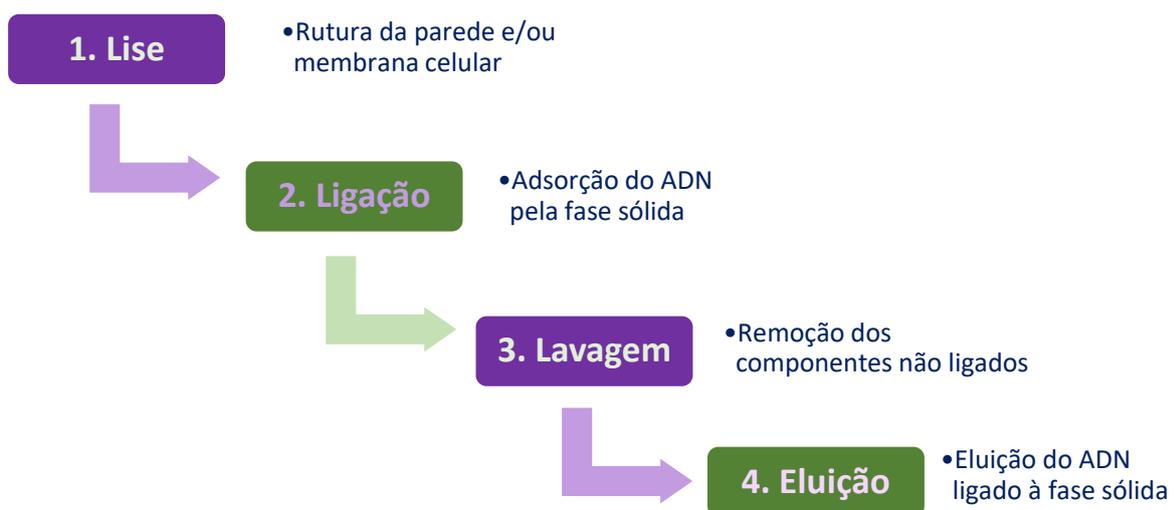
McCormick descreveu, em 1989, um método de extração em fase sólida (SPE) que usava materiais particulados para a remoção de proteínas dos ácidos nucleicos. Os princípios desta técnica são os mesmos da extração com fenol usada até então, com a exceção de que a fase líquida do fenol fora substituída por uma fase sólida insolúvel, onde uma camada de fenol fora

quimicamente ligada a partículas silicosas com alta afinidade para partículas, funcionando de forma análoga à extração líquida.

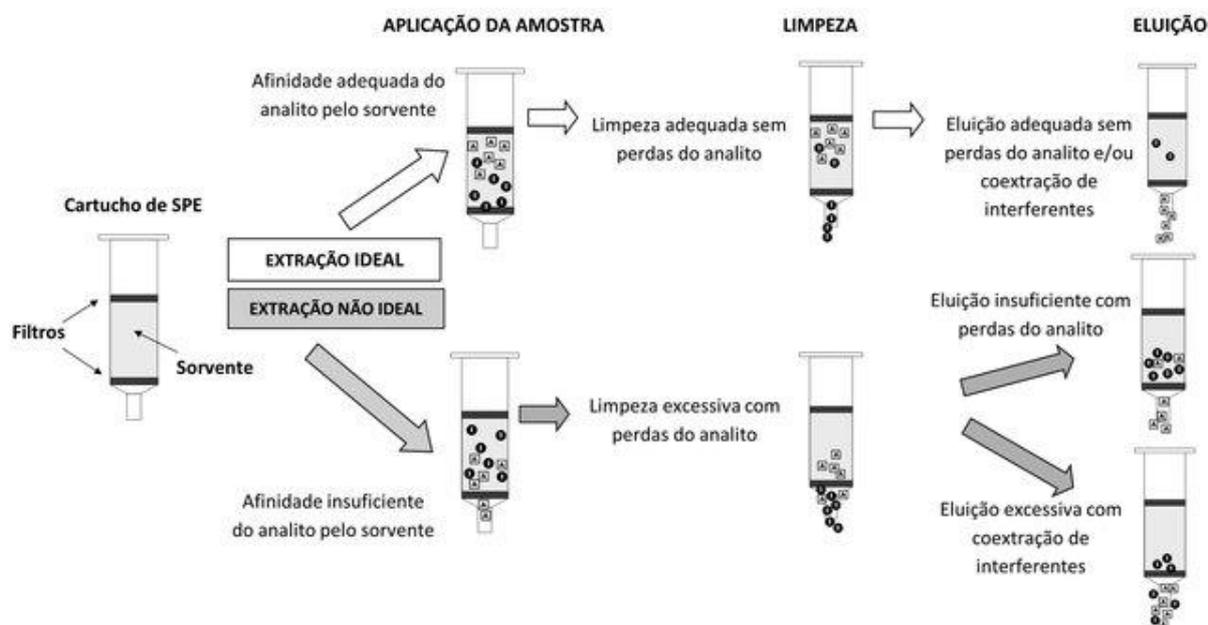
A SPE é semelhante à extração em fenol-clorofórmio, contudo veio melhorar a segurança e conveniência relativamente a esta, sem sacrificar a velocidade ou a recuperação de ADN. Além disso, o risco de contaminação do ADN foi significativamente reduzido, visto que a fase sólida não é solúvel nos tampões aquosos. Este método, descrito por McCormick 1989, difere da extração em sílica predominantemente usada em SPE, uma vez que neste o ADN era deixado na solução e as proteínas eram removidas pela sua ligação à fase sólida (Price *et al.* 2009).

Em 1979, Vogelstein e Gillespie usaram uma matriz de sílica para purificar ADN do gel de agarose, demonstrando que esta matriz se ligava eficientemente ao ADN. A matriz de sílica tem sido a mais comumente usada atualmente em SPE (Price *et al.* 2009).

Os métodos de SPE com matrizes de sílica seguem as seguintes três etapas: adsorção/ligação do ADN pela fase sólida na presença de sais e pH adequado, a remoção de proteínas e outras impurezas através da lavagem, a eluição do ADN com água ou com um tampão pouco rico em sais e pH adequado. Estas etapas são precedidas pela lise, onde há a rutura da parede e/ou membrana celular através de forças mecânicas e detergentes de forma a libertar o ADN do núcleo celular para a solução (figura 8) (Price *et al.* 2009). Idealmente, o ADN obtido possui um bom rendimento e não contém contaminantes (figura 9).



**Figura 8: Principais etapas da extração e purificação de ADN por SPE.** A SPE segue três etapas fundamentais (ligação, lavagem e eluição) precedidas pela lise celular.



**Figura 9:** Esquema comparando uma extração ideal e não ideal por SPE. Os círculos brancos, marcados com a letra A, correspondem ao ADN e os círculos pretos com a letra I correspondem às impurezas. Na extração não ideal, a remoção de interferentes é insuficiente e/ou ocorre perdas do analito durante uma ou mais etapas (Fonte: Campos *et al.* 2015).

As principais forças envolvidas na adsorção do ADN pela sílica são forças electroestáticas, desidratação e pontes de hidrogénio. Em pH básicos ou neutros a sílica é carregada negativamente levando a que nestas condições haja uma repulsão entre esta e o ADN, visto que, o ADN possui também ele uma grande superfície de cargas negativas (Melzak *et al.* 1996). Esta repulsão pode ser contornada pela criação de condições com altas forças iónicas, que protegem as cargas negativas nas superfícies do ADN e da sílica. A diminuição do pH promove a protonação dos grupos fosfato do ADN e dos grupos silanol da sílica o que intensifica a interação e ligação entre estes (Li *et al.* 2012). A desidratação acontece devido à formação de iões hidratados dos sais, levando a reação para a direita, promovendo a formação do complexo ADN/sílica. Esta reação foi descrita por Melzak *et al.* 1996 como representada na equação 1:



Embora se possa usar sais não-caotrópicos, este efeito é enaltecido pelos sais caotrópicos visto que estes quebram a rede de pontes de hidrogénio entre as moléculas de água, enfraquecendo o efeito hidrofóbico (Salvi *et al.* 2005). A classificação de iões caotrópicos está descrita na série de Hofmeister (figura 10).



Estes são normalmente equipados com disruptores mecânicos de células (microesferas), RNase, tampões e restante material necessário. As proteínas e polissacáridos são removidos por precipitação e centrifugação (Karakousis e Langridge 2003). A extração e purificação de ADN é normalmente realizada através de resinas de alta qualidade ou colunas cromatográficas descartáveis com diferentes protocolos de eluição entre eles (Varma *et al.* 2007). As membranas usadas baseiam-se na troca iónica / adsorção iónica que se ligam ao ADN de maneira reversível na presença de sais caotrópicos e o elui quando hidratado pelo uso de tampões aquosos. *Kits* baseados em sílica são amplamente usados (Sambrook e Green 2012).

Pereira *et al.* 2011, Marsal *et al.* 2013 e Catalano *et al.* 2016 testaram o uso de *kits* comerciais na extração e purificação de ADN em amostras de *Vitis vinífera*. O DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha) mostrou-se eficiente na extração e purificação de ADN em amostras de folhas de videira, contudo não obtivera sucesso em amostras mais complexas como o vinho. Em Catalano *et al.* 2016 foram testados e comparados onze *kits* comerciais na extração e purificação de ADN de amostras de vinho, onde apenas dois mostraram resultados aceitáveis - High Pure PCR template preparation kit (Roche) e Power Soil DNA isolation kit (MO-BIO).

Pode obter-se ADN puro em aproximadamente uma hora através do uso destes *kits*. Contudo, estes podem ser por vezes ineficientes, principalmente quando o material contém alto teor de polissacáridos e/ou polifenóis (Varma *et al.* 2007).

## **1.8. Pureza e Quantificação de ADN**

O ADN extraído a partir das diferentes matrizes deve ser avaliado adequadamente pela sua pureza, quantidade e qualidade (Lucena-Aguilar *et al.* 2016).

A quantificação fornece-nos a estimativa da concentração de ADN extraído, sendo que a sua quantidade tem impacto na sua deteção e nos limites de quantificação do processo de amplificação. A sua pureza refere-se à ausência de contaminantes no ADN eluído. Os contaminantes podem ser resultantes da matriz do alimento (lípidos, polissacáridos e/ou proteínas) ou resultantes dos solventes usados no protocolo da extração (fenol, etanol, isopropanol, entre outros). A qualidade do ADN depende do seu grau de fragmentação, que varia de acordo com o material examinado, grau de processamento e método de extração aplicado (Sambrook e Green 2012).

### 1.8.1. Quantificação de ADN por fluorimetria

A fluorimetria ou espectrofotometria de fluorescência é uma das técnicas que permitem a quantificação de ADN. Este método é baseado na análise de luz absorvida/emitida por moléculas fluorescentes (Gallagher 2017).

A amostra de ADN é marcada com um corante fluoróforo, podendo este ser: corantes intercalados (brometo de etídio), corantes que se ligam ao sulco menor de dsDNA (Corante Hoechst) ou fluoróforos especializados (corantes de cianina) (Gallagher e Desjardins 2007). Estes florescem apenas quando ligados à molécula de interesse – ADN, ARN ou proteínas (Gallagher 2017). A intensidade desta fluorescência seletiva a ADN pode ser medida por espectrofotometria de fluorescência permitindo estimar a sua quantidade. Esta estimativa é obtida através de uma curva de calibração (Invitrogen 2014).

A vantagem deste método é a sua maior sensibilidade comparativamente à análise espectrofotométrica, visto que este método é bastante útil em casos em que a concentração de ADN é muito baixa e em casos em que contaminantes que absorvem a 260 nm impossibilitam a quantificação por espectrofotometria. Contudo, este método é relativamente mais caro (Gallagher e Desjardins 2007).

### 1.8.2. Quantificação e pureza de ADN por espectrofotometria UV/Vis

Este método permite além de estimar a concentração de ácidos nucleicos, determinar a sua pureza, contrariamente à fluorimetria que apenas quantifica ADN, não avaliando a sua pureza.

A espectrofotometria de ultravioleta-visível (UV/Vis) mede a absorção de radiação eletromagnética nas regiões do visível e ultravioleta pelas moléculas ou iões (190 nm- 840 nm).

A quantificação de ADN é obtida pela medição da radiação absorvida no comprimento de onda de 260 nm. A relação entra a quantidade de radiação absorvida e a concentração de ADN que absorveu é descrita pela lei de Lambert-Beer (Thermo Scientific 2010).

A equação 2 descreve a lei de Lambert-Beer, sendo A absorvância em AU;  $\epsilon$  o coeficiente de absorção molar (ng-cm/ $\mu$ L), b a distância percorrida pela radiação (cm) e C a concentração de ácidos nucleicos (ng/ $\mu$ L):

$$A = \epsilon b C \quad (\text{equação 2})$$

A pureza da amostra (figura 11) é avaliada pela razão entre as absorvâncias a 260 nm e 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ), sendo que 280 nm corresponde à absorção máxima pelas proteínas. A absorvância a 230 nm pode ser também medida de forma a verificar a contaminação por compostos orgânicos ou sais caotrópicos (Matlock 2015; Lucena-Aguilar *et al.* 2016).

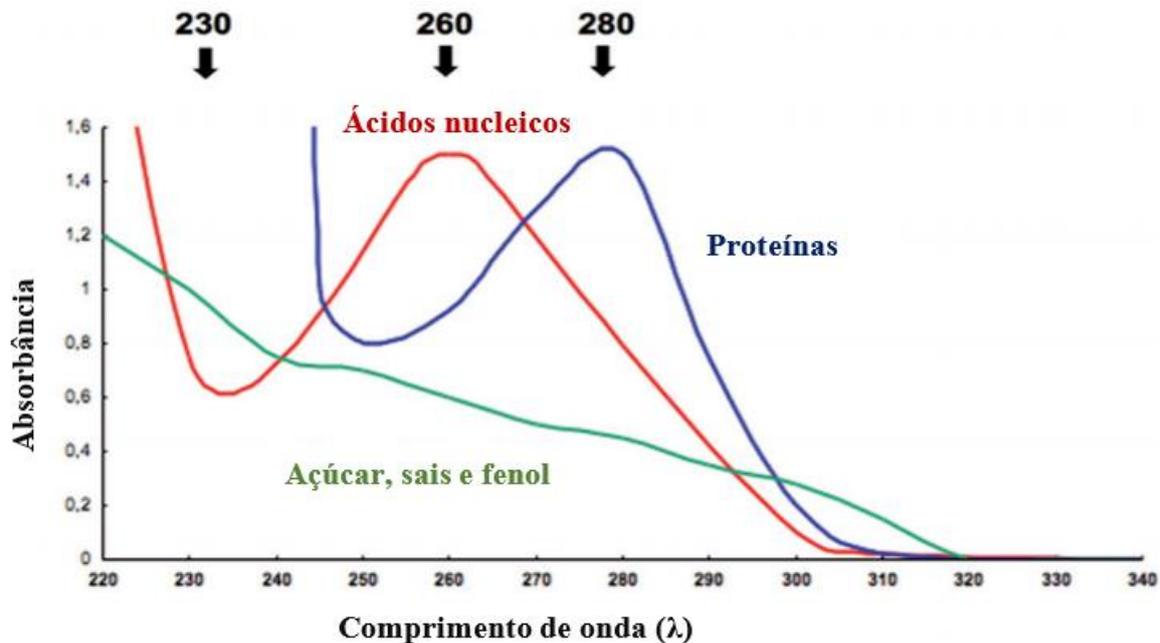


Figura 11: Medição da Absorbância ao longo do espectro UV/Vis de uma amostra de ácidos nucleicos e possíveis contaminantes (Fonte: Armbrecht 2013).

O ADN é considerado puro com uma razão  $A_{260}/A_{280}$  de aproximadamente 1,8. Valores abaixo deste valor normalmente indicam que esta estará contaminada com proteínas ou reagentes como fenol. Valores elevados podem indicar uma alta concentração em ARN. Apesar de um valor baixo de  $A_{260}/A_{280}$  indicar que amostra está contaminada, não significa que esta não é adequada para as análises subsequentes (por exemplo, PCR) (Matlock 2015).

## 1.9. Sistemas miniaturizados

A procura por métodos que permitam a redução do tempo de uso pelo manuseador, o aumento da sensibilidade, multiplexagem e rapidez tem levado ao desenvolvimento de novas técnicas analíticas e de diagnóstico. Métodos rápidos e confiáveis são essencialmente necessários no que concerne à segurança alimentar de forma a proteger a saúde do consumidor e aplicar medidas corretivas adequadas mais atempadamente (Soehartono *et al.* 2016).

A principal vantagem de sistemas miniaturizados para a análise de ADN é a sua portabilidade que permite deteções *in situ*. Além disso, estes sistemas são mais rápidos e sensíveis, requerem volumes mais pequenos e menos quantidade de reagentes, mais baratos e podem ser automatizados, reduzindo significativamente o risco de contaminações (Price *et al.* 2009).

A miniaturização permite também a multiplexagem, sendo que estes sistemas são capazes de lidar simultaneamente com várias amostras, fornecendo uma tecnologia com mais rendimento. Outra das vantagens, particularmente da  $\mu$ SPE, é a possibilidade de concentrar o ADN quando este está presente em poucas quantidades na amostra em análise (pelo uso de um volume inicial maior para a ligação com a fase sólida e a recuperação do ADN num volume menor na fase de eluição) (Reinholt e Baeumner 2014).

### **1.9.1. Sistemas de microanálise total ( $\mu$ TAS)**

Sistemas de microanálise total ( $\mu$ TAS), também conhecidos por *lab-on-a-chip* (LOC), é uma tecnologia que visa integrar completamente os múltiplos processos laboratoriais num único dispositivo microfluídico (Wang 2000).

O desenvolvimento de microssistemas que combinam funções elétricas com mecânicas e transformam informações químicas em sinais elétricos ou óticos possibilita a sua automatização (Coltro *et al.* 2007). Nos  $\mu$ TAS funções microfluídicas de micropoços, microcanais e outros elementos como elétrodos, fotodetetores, sensores químicos, válvulas e bombas interagem com os fluídos (Abgrall e Gué 2007).

A escolha do material a usar na sua fabricação é fundamental uma vez que o analito pode interagir com o material usado (absorvido/adsorvido nas paredes dos canais). Na sua fabricação têm sido usados materiais como silício, vidro, quartzo ou polímeros como polimetacrilato de metila (PMMA), policarbonato (PC), copolímero de olefina cíclica (COC), politereftalato de etileno (PET), poliuretana, polidimetilsiloxano (PDMS). Nos materiais procura-se propriedades elastoméricas, transparência ótica, permeabilidade gasosa, biocompatibilidade, fácil moldagem, manuseio e selagem, relativa alta resistência química e baixo custo de fabricação com boa resolução dos microcanais/micropoços (Stoytcheva e Zlatev 2016).

PDMS é dos materiais mais usados em  $\mu$ TAS pelo seu baixo custo e pelas suas propriedades compatíveis com a microfabricação. O PDMS é uma borracha de silicone, quimicamente inerte, termoestável, permeável a gases, exhibe propriedades isotrópicas e homogêneas, de fácil

manipulação e em conformidade para o desenvolvimento de microestruturas (Mata *et al.* 2005). Além disso, o PDMS é transparente, não-fluorescente, biocompatível e não-tóxico, tendo já sido tradicionalmente usado como biomaterial em cateteres, tubos de drenagem, isolamento para *pacemakers* e implantes de orelhas e narizes (Visser *et al.* 1996).

Estes dispositivos têm sido adaptados para a análises moleculares em matrizes alimentares, conforme descrito em Carvalho *et al.* 2018A que desenvolveu um dispositivo miniaturizado lavável e reusável para a extração e purificação de ADN de amostras de azeite; Azinheiro *et al.* 2020 para a captura multiplexada de patogénicos; Garrido-Maestu *et al.* 2017 um sistema de microfluídica para a amplificação isotérmica de ADN combinado com a deteção de patogénicos baseada em nanopartículas de ouro (AuNPs). Dispositivos para a eletroeluição baseada em *chip* para a extração de fragmentos de ADN (Li *et al.* 2007) e dispositivos altamente integrados para a amplificação de ADN (Liu *et al.* 2008) também se encontram descritos na literatura. Comercialmente, GeneXpert system por Cepheid (Sunnyvale, CA) e Liat Analyzer por IQuum (Allston, MA) são dois dispositivos miniaturizados completamente integrados de análises moleculares na área da medicina. Não existe conhecimento de dispositivos comerciais, apesar das suas evidentes vantagens, disponíveis e validados para este tipo de análise em matrizes alimentares.

A extração de ADN é uma etapa importante para a integração de análises de ADN em  $\mu$ TAS. Métodos de extração de ADN baseados em sílica são um dos mais adequados para adaptar para  $\mu$ TAS, visto que estes não necessitam de muitos passos de manuseamento (Price *et al.* 2009).

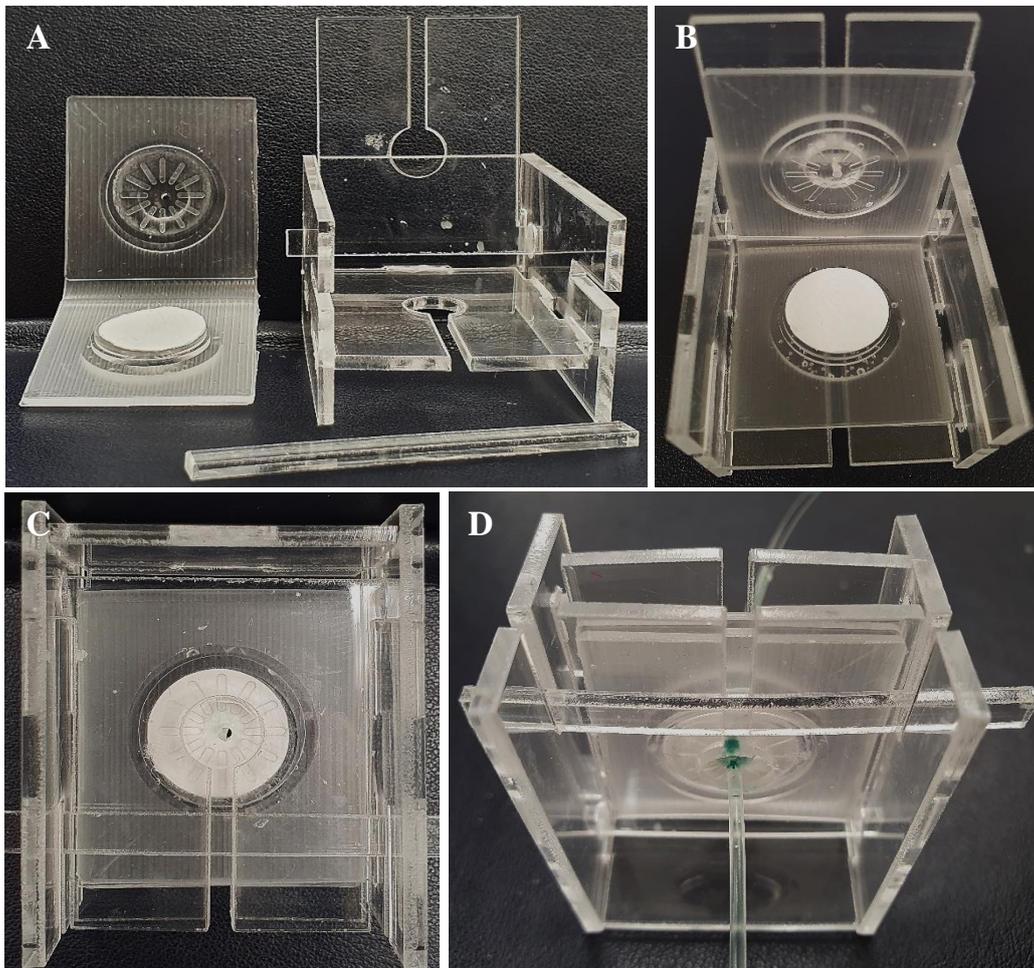
## 1.10. Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo o desenho e fabrico de um dispositivo microfluídico de extração e purificação de ADN, com base no dispositivo testado em Carvalho *et al.* 2018A para amostras de azeite. Pretende-se testar este dispositivo com protocolos adaptados a partir daqueles desenvolvidos em Carvalho *et al.* 2018A de forma a conferir a sua performance, efetuar a seleção de um protocolo adequado ao dispositivo e avaliar a sua performance comparativamente à de um *kit* comercial referido na literatura como eficiente na extração e purificação de ADN de amostras vegetais de videira e vinho - DNeasy® PowerSoil® Pro Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha).

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Dispositivo de Microfluídica

O protótipo do dispositivo miniaturizado (figura 12) fabricado no INL é composto por um suporte em PMMA (Prexiril, Braga, Portugal) reutilizável que no seu interior possui um cartucho/réplica em PDMS (Sylgard 184 Silicone elastomer kit, Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA) descartável entre cada utilização. A réplica em PDMS é onde se encontra a câmara que em seu interior segura o filtro de microfibra de vidro borossilicato (GF/A, Whatman Inc., EUA), a fase sólida da  $\mu$ SPE. Esta é vedada por pressão feita através do fecho do suporte de PMMA. O protótipo foi desenhado para que o fluido introduzido na parte superior, seja distribuído uniformemente na membrana, atravessando-a e saindo pelo canal de saída colocado na parte inferior deste.



**Figura 12: Protótipo do dispositivo de microfluídica desenhado no INL. (A)** Constituintes do protótipo – à esquerda, réplica/cartucho descartável em PDMS e filtro de microfibra de vidro (15 mm); à direita, suporte em PMMA. **(B)** Protótipo aberto com a réplica colocada com filtro no suporte. **(C)** Vista de topo do protótipo montado e fechado. **(D)** Vista na diagonal do protótipo montado e fechado com canais de entrada e saída de fluídos colocados.

### **2.1.1. Produção de réplicas descartáveis em PDMS**

O PDMS foi preparado na razão de 10:1 (base PDMS/agente de cura) e homogeneizado. A mistura foi submetida a vácuo, com o auxílio de um exsiccador, durante cerca de quarenta minutos para remover as bolhas de ar formadas durante a homogeneização.

O PDMS líquido foi colocado na parte inferior do molde e levado a vácuo por cerca de 20 minutos, de forma a garantir que possíveis bolhas não interferiram no desenho da câmara. O molde foi coberto com a parte superior e ambas foram presas uma à outra. O PDMS foi curado na estufa (Thermo Scientific™ Her-atherm™ OGS 60) a 65 °C durante um mínimo de 2 horas.

O molde foi desunido obtendo-se a réplica de PDMS com o desenho desejado. Esta réplica é descartável, sendo necessária a produção de uma por cada extração a realizar.

### **2.1.2. Montagem**

Ao centro da câmara da réplica foram abertos dois canais (entrada e saída) nos quais foram colocados um capilar com medidas de 1,5 mm x 2 mm x 15 mm (largura x altura x comprimento). No capilar de entrada foi colocado um conector para a seringa. A réplica de PDMS foi colocada no suporte em PMMA.

O filtro foi centralizado na câmara da réplica e esta foi selada. A seringa foi colocada na bomba de injeção (Havard Apparatus PHD ULTRA (v. 3.0.2), Massachusetts, EUA) e conectada ao canal de entrada.

A bomba foi programada para a injeção das soluções à velocidade e volume conforme o descrito no protocolo (tabela 3). Após atravessar o sistema/filtro, o líquido foi recolhido em *eppendorfs*.

### **2.1.3. Avaliação da performance dos fluídos**

De forma a verificar a performance dos fluídos no protótipo, este foi testado com soluções corantes. O protótipo foi montado, de acordo com o ponto 2.1.2, e fez-se travessar uma solução corante pelo sistema em diversas velocidades. A velocidade máxima testada foi de 100 µL/min de forma a verificar que fugas não ocorreriam a esta taxa de fluxo.

A capacidade em volume da câmara foi também medida através da verificação do volume de solução necessário para a preencher completamente.

#### 2.1.4. Otimização do protocolo de extração e purificação de ADN

Para o desenvolvimento e otimização do protocolo de purificação usou-se  $\lambda$ DNA (invitrogen<sup>TM</sup>, EUA) numa concentração inicial de 10 ng/ $\mu$ L, confirmada por quantificação de fluorimetria (ponto 2.3.1).

As soluções (tabela 2) e protocolos (tabela 3) testados foram baseados no trabalho realizado previamente num dispositivo semelhante descrito em Carvalho *et al.* 2018A. Os reagentes usados foram fornecidos por Sigma-Aldrich<sup>®</sup> (St. Louis, EUA).

Testou-se duas variações do dispositivo adaptadas para os filtros de microfibras de vidro borossilicato de diâmetros de 15 mm e 21 mm. Estes diferem entre si principalmente no diâmetro, espessura e tamanho de poro. O filtro de 21 mm possui a espessura de 0,26 mm e poro de 1,6  $\mu$ m enquanto que o de 15 mm possui 0,42 mm de espessura e poro de 0,7  $\mu$ m.

**Tabela 2: Descrição e composição das soluções tampão testadas nos protocolos de extração e purificação de ADN.**

Solução tampão		Descrição	Composição	pH
Ligação	BB1	Tampão de ligação 1	0.25 M Glicina, 400 mM KCl	5
	BB2	Tampão de ligação 2	6 M GuSCN, 20 mM EDTA pH 8, 10 mM Tris-HCl pH 6.4, 4 % (v/v) TritonX-100	7.3
Lavagem	W1	Tampão de lavagem 1	EtOH 85 % (v/v)	-
Eluição	TE	Tampão de eluição 1	Tampão TE (10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA)	8

Como descrito na tabela 3, diversos protocolos de extração e purificação de ADN foram testados e otimizados em função da composição dos tampões e volumes usados para a obtenção de maiores rendimentos de ADN, bem como pela sua aplicabilidade para a automatização do sistema.

O protocolo inicial (P1) foi baseado naquele que em Carvalho *et al.* 2018A obteve os melhores resultados, sendo os volumes usados adaptados ao novo sistema. Protocolos alternativos (P2, P2.1 e P3) foram testados de forma a melhorar o rendimento de ADN e ultrapassar limitações do protocolo inicial (P1).

Antes de iniciar o procedimento de extração e purificação, foi realizada uma etapa de condicionamento de forma a criar as condições ideais no sistema para as próximas etapas. Nesta foi usado o tampão de ligação do respetivo protocolo à velocidade de 100  $\mu$ L/min.

**Tabela 3:** Descrição detalhada dos protocolos testados para a otimização do sistema miniaturizado.

		Protocolo 1 (P1)		Protocolo 2 (P2)	Protocolo 2.1 (P2.1)		Protocolo 3 (P3)
Membrana		15 mm	21 mm	15 mm	15 mm	21 mm	15 mm
<b>Condicionamento</b> (caudal: 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ )	Tampão	BB1		BB2	BB2		BB2
	Volume total ( $\mu\text{L}$ )	300	400	300	300	400	300
	Número de amostras recolhidas	(1 × 300 $\mu\text{L}$ )	(1 × 400 $\mu\text{L}$ )	(1 × 300 $\mu\text{L}$ )	(1 × 300 $\mu\text{L}$ )	(1 × 400 $\mu\text{L}$ )	(1 × 300 $\mu\text{L}$ )
<b>Ligação</b> (caudal: 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ )	Tampão	BB1		BB2	BB2		BB2
	Volume total ( $\mu\text{L}$ )	1000	1000	1000	1000	1000	1000
	Número de amostras recolhidas	(5 × 200 $\mu\text{L}$ )					
<b>Lavagem I</b> (caudal: 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ )	Tampão	BB1		W1	W1		W1
	Volume total ( $\mu\text{L}$ )	500	1000	500	500	1000	500
	Número de amostras recolhidas	(5 × 100 $\mu\text{L}$ )	(5 × 200 $\mu\text{L}$ )	(5 × 100 $\mu\text{L}$ )	(5 × 100 $\mu\text{L}$ )	(5 × 200 $\mu\text{L}$ )	(5 × 100 $\mu\text{L}$ )
<b>Lavagem II</b> (caudal: 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ )	Tampão	-	-	BB1		BB1	-
	Volume total ( $\mu\text{L}$ )	-	-	300	100	200	-
	Número de amostras recolhidas	-	-	(3 × 100 $\mu\text{L}$ )	(1 × 100 $\mu\text{L}$ )	(1 × 200 $\mu\text{L}$ )	-
<b>Secagem (caudal: 100 <math>\mu\text{L}/\text{min}</math>)</b>		-	.	-	-	-	Passagem de ar
<b>Eluição</b> (caudal: 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ )	Tampão	TE		TE	TE		TE
	Volume total ( $\mu\text{L}$ )	500	1000	500	500	1000	500
	Número de amostras recolhidas	(5 × 100 $\mu\text{L}$ )	(5 × 200 $\mu\text{L}$ )	(5 × 100 $\mu\text{L}$ )	(5 × 100 $\mu\text{L}$ )	(5 × 200 $\mu\text{L}$ )	(5 × 100 $\mu\text{L}$ )

Para a etapa de ligação, foi preparada uma solução do tampão de ligação (BB1 ou BB2) com  $\lambda$ DNA com concentração de 10 ng/ $\mu$ L (conferida por fluorometria). Esta solução foi bombeada no sistema a uma velocidade de 10  $\mu$ L/min de forma a facilitar a interação entre o ADN e a membrana.

Nas etapas de lavagem, foi usada a velocidade de 20  $\mu$ L/min. Uma segunda lavagem (lavagem II) foi introduzida nos protocolos P2 e P2.1 de forma a remover a solução usada na lavagem I, visto que esta contém etanol, um inibidor da PCR. Em P3, a remoção do etanol foi feita através da secagem da membrana pela passagem de ar a 100  $\mu$ L/min.

Na eluição, a solução TE atravessou a membrana a uma velocidade de 10  $\mu$ L/min. Em cada etapa foram sido recolhidas várias alíquotas de forma a monitorizar as perdas de ADN e a evolução da recuperação deste na eluição.

Os protocolos foram testados em triplicado e encontram-se detalhados na tabela 3. As alíquotas recolhidas foram quantificadas por fluorimetria de acordo com o ponto 2.3.1.

Outros testes do sistema de filtro de 21 mm foram efetuados (anexo I) com o intuito de verificar a origem e ultrapassar limitações ocorridas.

## 2.2.Extração e Purificação de ADN de folhas de videira e uvas

Na extração e purificação de ADN de *Vitis vinifera* usou-se 10 amostras de folhas e uvas de castas do Douro (D1-D10) fornecidas por Sogrape Vinhos S.A. (Vila Nova de Gaia, Portugal) e 3 do Minho (M1-M3) fornecidas por produtores locais (tabela 4).

**Tabela 4: Amostras de folhas e uvas usadas, código e respetiva descrição da casta correspondente.** Foram testadas amostras de folhas e uvas de castas brancas e tintas, sendo dez destas da região do Douro codificadas de D1 a D10 e três da região do Minho codificadas de M1 a M3.

Código	Descrição/Casta	Região Geográfica	Cor da uva
D1	Tinta Barroca	Douro	Tinta
D2	Tinta Francisca	Douro	Tinta
D3	Tinta Roriz	Douro	Tinta
D4	Touriga Nacional	Douro	Tinta
D5	Tinto Cão	Douro	Tinta
D6	Alicante Bouchet	Douro	Tinta
D7	Touriga Franca	Douro	Tinta
D8	Bodega do Lavinho	Douro	Branca
D9	Touriga Fêmea	Douro	Tinta
D10	Sousão	Douro	Tinta
M1	Loureiro	Minho	Branca
M2	Arinto	Minho	Branca
M3	Borraçal	Minho	Tinta

### 2.2.1. Extração e Purificação com *kit* comercial

O *kit* comercial escolhido teve em atenção o descrito na literatura (Baleiras-Couto e Eiras-Dias 2006; Marsal *et al.* 2013; Işçi e Altindisli 2014; Catalano *et al.* 2016) acerca da eficiência destes na extração e purificação de ADN de folhas, uvas, mostos e vinhos. O DNeasy® PowerSoil® Pro Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha) foi um dos que obtivera os melhores resultados e, por isso, foi usado para comparação de resultados com os do dispositivo em teste neste trabalho.

As amostras de folhas e de uvas das várias castas (tabela 4) foram previamente reduzidas a pó com nitrogénio líquido e auxílio de um almofariz e pilão. O procedimento de extração e purificação de ADN foi seguido de acordo com o descrito no manual do *kit*, em triplicado. O material usado encontra-se incluído no *kit*.

Para a lise, adicionou-se 250 mg da amostra em pó ao PowerBead Pro Tube e 800 µL de solução CD1, misturando com o *vortex*. Colocaram-se os tubos horizontalmente no *vortex* à velocidade máxima por dez minutos. Estes foram centrifugados a 15 000 g por um minuto. Transferiu-se o sobrenadante para um 2 mL Microcentrifuge Tube e adicionou-se 200 µL de CD2 e fez-se *vortex* por 5 segundos. Centrifugou-se a 15 000 g por um minuto e transferiu-se o sobrenadante para um novo 2 mL Microcentrifuge Tube.

Para a ligação com a fase sólida, adicionou-se 600 µL de CD3 e fez-se *vortex* por 5 segundos. Carregou-se a MB Spin Column com 650 µL do lisado e centrifugou-se a 15 000 g por um minuto, descartou-se o líquido e repetiu-se o passo até todo o lisado atravessar a membrana da coluna. Transferiu-se a coluna numa nova 2 mL MB Collection Tube.

Para a fase de lavagem e secagem, adicionou-se 500 µL de solução EA na coluna e centrifugou-se a 15 000 g por um minuto. Descartou-se o líquido e colocou-se a coluna no mesmo tubo de coleção. Adicionou-se 500 µL da solução C5 e centrifugou-se a 15 000 g por um minuto. Descartou-se o líquido, colocou-se num novo tubo de coleção e centrifugou-se a 16 000 g por dois minutos.

Para a eluição do ADN, transferiu-se a coluna para um 1,5 mL Elution Tube e adicionou-se 100 µL de solução C6 no centro da membrana. Centrifugou-se a 15 000 g por um minuto e a coluna foi descartada.

O ADN recuperado em *eppendorf* foi quantificado por espectrofotometria UV/Vis (ponto 2.3.2), rotulado e armazenado a - 21 °C para posteriores utilizações.

## 2.2.2. Extração e Purificação com o dispositivo miniaturizado

A extração e purificação de ADN das amostras de folhas de videira e uvas das várias castas (tabela 4) realizou-se seguindo o protocolo P2.1 usando o dispositivo adaptado para o filtro de microfibras de vidro borossilicato de 15 mm (tabela 3), uma vez que este mostrou os melhores resultados durante a otimização de protocolos no ponto 2.1.4.

As amostras foram previamente reduzidas a pó com nitrogénio líquido e auxílio de um almofariz e pilão. Tendo em conta que ainda não fora desenvolvido um protocolo para a lise das amostras para o dispositivo e para efeitos de comparação, esta fora realizada usando o *kit* selecionado. O procedimento usado para a lise das amostras encontra-se descrito no ponto 2.2.1.

O dispositivo foi montado adequadamente como descrito no ponto 2.1.2 e seguiu-se o protocolo P2.1 (tabela 3). O sistema foi condicionado com 300  $\mu\text{L}$  da solução BB2 a 100  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Para a etapa de ligação, o lisado foi misturado numa razão de volume de com a solução de ligação BB2. Bombeou-se 1 000  $\mu\text{L}$  desta solução através do sistema a uma velocidade de 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Seguiu-se a lavagem com 500  $\mu\text{L}$  de EtOH 85 % (W1) a 20  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Para a remoção do etanol fez-se uma segunda lavagem com 100  $\mu\text{L}$  de solução BB1 a 20  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Não foram recolhidas alíquotas após estas etapas, contrariamente ao realizado na otimização de protocolo (ponto 2.1.4 e tabela 3). A recuperação de ADN fez-se com 500  $\mu\text{L}$ , divididos em cinco colheitas/alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  (E1 a E5), de tampão de eluição (TE) a 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

As cinco alíquotas (E1 a E5) colhidas após a eluição foram quantificadas por espectrofotometria UV/Vis (ponto 2.3.2), medindo-se também o seu grau de pureza. Estas foram devidamente rotuladas e armazenadas a - 21 °C para posteriores utilizações.

## 2.3. Quantificação de ADN

### 2.3.1. Quantificação por fluorometria

A quantificação por fluorometria foi realizada com o equipamento QUBIT<sup>TM</sup> 4 Fluorometer (Thermo Scientific<sup>TM</sup>, EUA) e o *kit* 1x dsDNA High Sensivity (Invitrogen<sup>TM</sup>, EUA).

Preparou-se uma solução de 190  $\mu\text{L}$  de solução mãe (*kit*) com 10  $\mu\text{L}$  da alíquota a quantificar e de #1 e #2 (*kit*) para a curva de calibração. Deixou-se atuar a temperatura ambiente por dois minutos e quantificou-se de seguida de acordo com as instruções do equipamento. As concentrações em ADN das alíquotas foram obtidas em ng/ $\mu\text{L}$ .

### 2.3.2. Quantificação por espectrofotometria UV/Vis

A quantificação por espectrofotometria UV/Vis das alíquotas foi realizada com o NanoDrop 2000c e respetivo *software* (versão: 1.4.2) (Thermo Scientific™, Waltham, EUA).

O teste branco realizou-se com 2 µL do tampão de eluição (C6 no caso do *kit* e TE para o dispositivo miniaturizado). Para a quantificação das alíquotas foram pipetados 2 µL da solução para o sensor do equipamento e as absorbâncias foram medidas ao longo do espectro.

Obteu-se o valor da concentração de ADN em ng/µL e respetivas razões A260/A280 e A260/A230 para verificação da pureza das alíquotas. Cada alíquota foi medida em triplicado.

## 2.4. Tratamento de dados

Na otimização do protocolo de extração e purificação de ADN, de forma a permitir a comparação entre os vários protocolos, o rendimento de ADN calculou-se pela percentagem do quociente entre a quantidade de ADN total recuperado na fase de eluição sob o ADN inicial. No protocolo P1, o valor da quantidade inicial de ADN foi aquele de acordo com a quantificação da solução de BB1 e λDNA introduzida no dispositivo em cada ensaio. Nos restantes protocolos (P2, P2.1 e P3), esta fora estimada a partir da média dos valores obtidos em P1, visto que o tampão usado (BB2) contém sais caotrópicos que interferem na sua quantificação adequada (Carvalho *et al.* 2018B).

Os resultados estão apresentados como média ± IC 90 %. O tratamento estatístico fez-se através do *software* IBM SPSS Statistics (versão 27.0.1.0). Na otimização de protocolos, a comparação entre protocolos fez-se por One Way ANOVA e Bonferroni Post Hoc test. A comparação na extração de ADN pelo *kit* fez-se, entre as castas, por One Way ANOVA e Bonferroni Post Hoc test e, entre as amostras - folhas de videira e uvas, por teste de Levene e teste-t. A comparação na extração de ADN pelo dispositivo, para ambas amostras, fez-se por One Way ANOVA e Bonferroni Post Hoc test, comparando as concentrações entre alíquotas da mesma casta e entre a mesma alíquota das várias castas. O p-value ≤ 0,05 foi tido como mínimo para atribuir significância.

## **3. Resultados**

### **3.1. Avaliação da performance dos fluídos no dispositivo miniaturizado**

A performance dos fluídos no protótipo foi avaliada com a passagem de soluções corantes através deste à velocidade máxima de 100  $\mu\text{L}/\text{min}$ . No protótipo adaptado para o filtro de 21 mm foi verificada uma ligeira fuga de fluídos, sendo corrigida pelo redesenho do suporte em PMMA que permitiu aumentar a capacidade vedante do dispositivo. Após estas correções não foram verificadas mais fugas de líquido para o protótipo de 15 mm e 21 mm. Observou-se a formação esporádica de pequenas bolhas de ar. A capacidade volúmica das câmaras é aproximadamente de 200  $\mu\text{L}$  para a câmara do filtro de 21 mm e de 100  $\mu\text{L}$  para a do 15 mm.

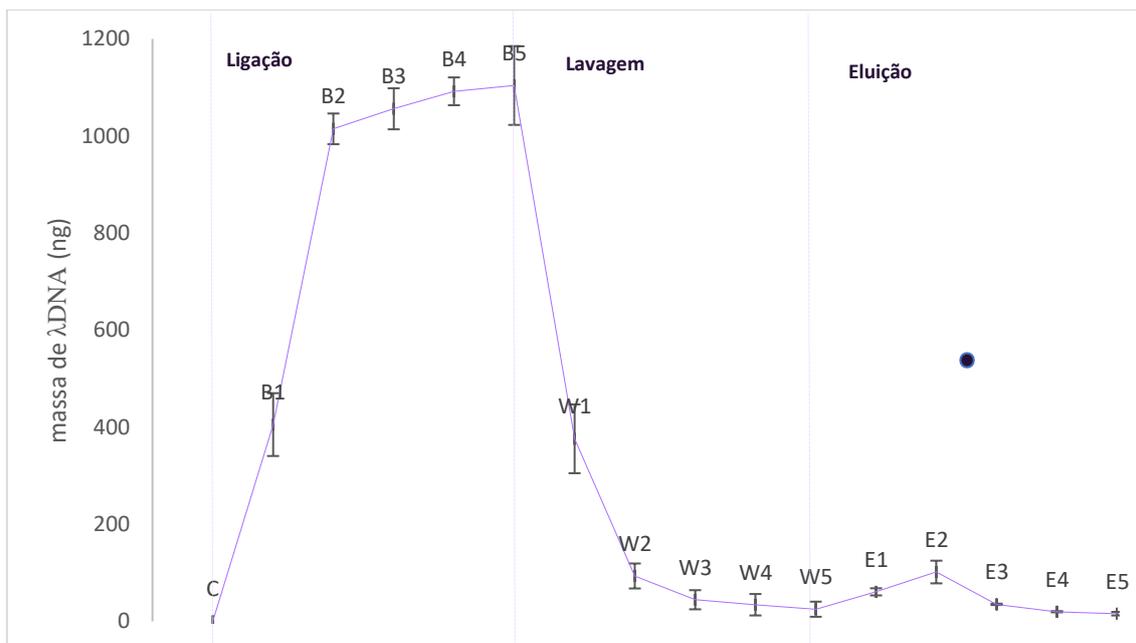
### **3.2. Otimização do protocolo de extração e purificação de ADN**

Alguma variabilidade foi observada entre triplicados nos protocolos testados que resultaram num maior erro padrão, principalmente no passo da eluição. Esta variação está relacionada com a observação de diferentes perfis de eluição entre réplicas. Os perfis observados na eluição variaram entre: a quantidade máxima de  $\lambda\text{DNA}$  eluído ocorrer em E1 e progressivamente decrescer; a quantidade máxima de  $\lambda\text{DNA}$  eluído ocorreu em E2, sendo em E1 relativamente baixo e a quantidade de  $\lambda\text{DNA}$  eluída entre alíquotas é relativamente semelhante (perfil menos observado). Estes diferentes perfis poderão estar relacionados com a maior ou menor adsorção do ADN pela membrana durante a ligação ou relacionado com a presença de bolhas de ar que diminuem a eficiência pela redução da área de contacto entre a superfície da membrana e o tampão de eluição.

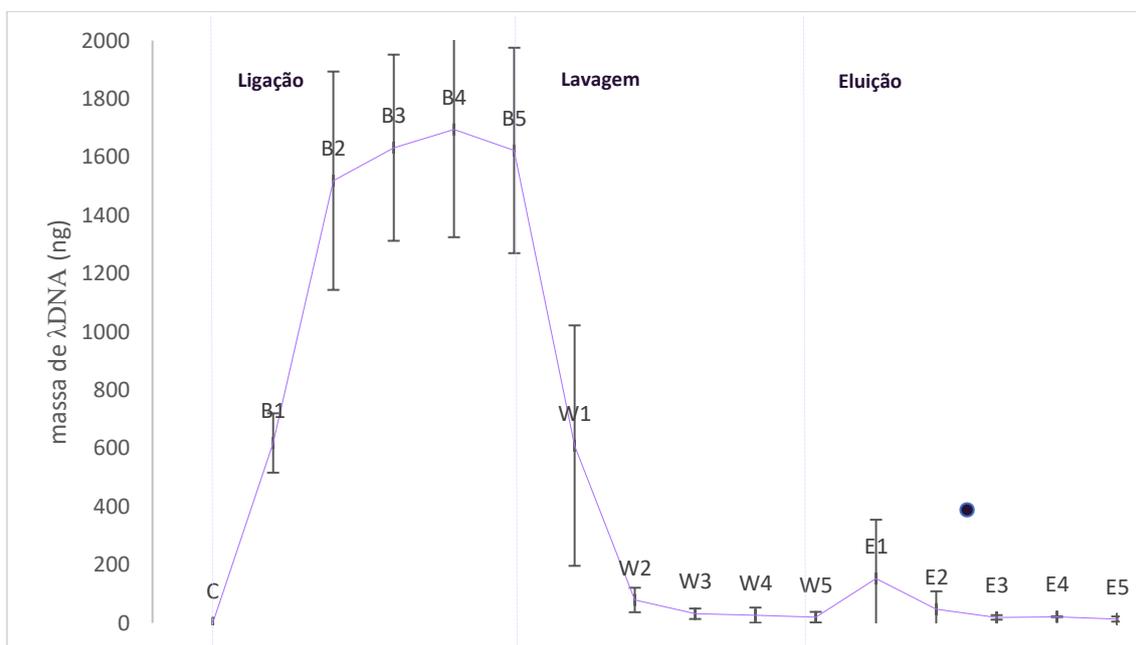
#### **3.2.1. Protocolo de extração e purificação 1 (P1)**

O protocolo P1 usa uma solução tampão sem sais caotrópicos (BB1). Além disso, o tampão de ligação (BB1) é usado não apenas para a etapa de ligação, mas também para o passo de lavagem. Por outras palavras, após a fase de ligação, os contaminantes não-ligados foram removidos pela passagem de BB1 em vez do etanol comumente usado. Assim, não é necessária uma segunda lavagem ou secagem, visto que neste protocolo não é usado etanol. Este protocolo fora baseado naquele que em Carvalho *et al.* 2018A obteve os melhores resultados.

Os resultados obtidos estão representados na figura 13 e na figura 14. Em ambos os protótipos se observaram perdas de ADN na etapa de ligação o que sugere que o ADN não fora adsorvido pela fase sólida. O rendimento obtido para os filtros de 15 mm (figura 13) e 21 mm (figura 14) foi, em média, de 3,81 %  $\pm$  0,26 e 2,22 %  $\pm$  1,39, respetivamente. Assim, este protocolo não se mostrou eficaz na extração e purificação de ADN.



**Figura 13: Perfil de extração de λDNA do protocolo P1 no filtro de 15 mm.** Está representada a massa de λDNA, em ng, nas respectivas alíquotas recolhidas em cada etapa – condicionamento (C), ligação (B1 a B5), lavagem (W1 a W5) e eluição (E1 a E5). O ADN de cada alíquota foi quantificado por fluorometria. Os resultados estão representados como média ± IC 90 %, n=3, triplicados independentes. O gráfico ilustra a perda de ADN na fase de ligação e a fraca recuperação de ADN na fase de eluição.

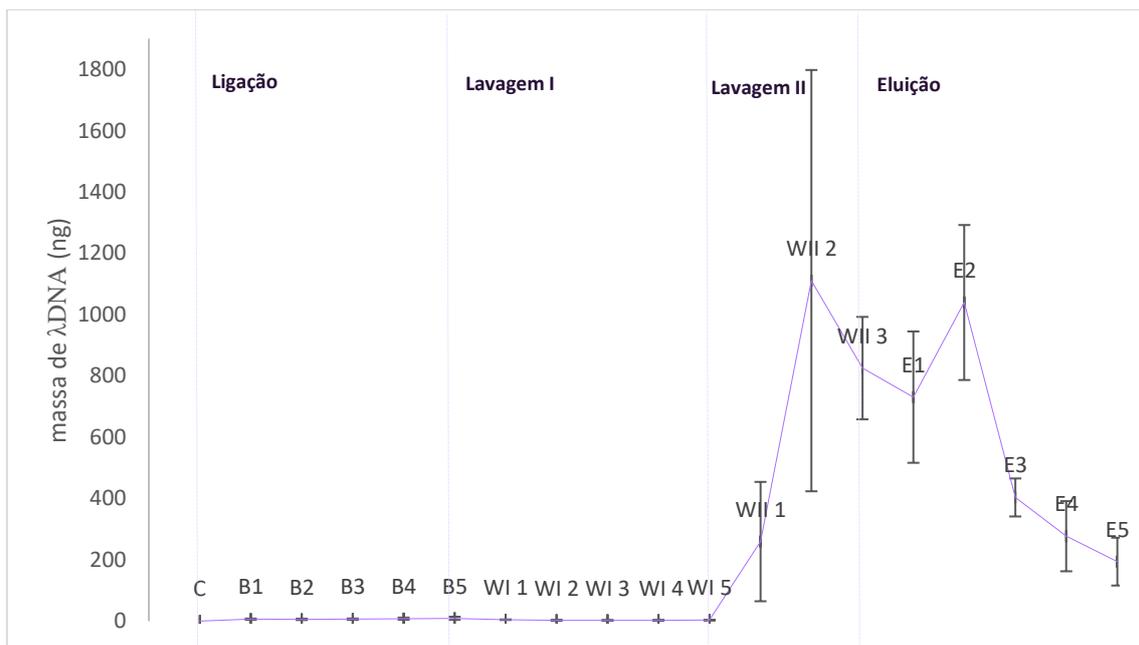


**Figura 14: Perfil de extração de λDNA do protocolo P1 no filtro de 21 mm.** Está representada a massa de λDNA, em ng, nas respectivas alíquotas recolhidas em cada etapa – condicionamento (C), ligação (B1 a B5), lavagem (W1 a W5) e eluição (E1 a E5). O ADN de cada alíquota foi quantificado por fluorometria. Os resultados estão representados como média ± IC 90 %, n=3, triplicados independentes. O gráfico ilustra a perda de ADN na fase de ligação e a fraca recuperação de ADN na fase de eluição.

### 3.2.2. Protocolo de extração e purificação 2 (P2)

O protocolo P2 usa um tampão caotrópico (BB2) para a fase de ligação. Este protocolo possui duas fases de lavagem, visto que a primeira lavagem (WI) é feita com etanol e este necessita de ser removido. A segunda lavagem (WII) foi realizada com a passagem de um tampão não caotrópico (BB1). Apenas foi testado o dispositivo com o filtro de 15 mm. Tendo em conta que neste filtro P2.1 mostrara-se mais eficiente em relação a P2, o teste do filtro de 21 mm com este protocolo não se realizou.

Os resultados obtidos encontram-se representados na figura 15. Não foi observada perda de ADN na ligação e na primeira lavagem. Contudo, as perdas na ligação poderão ser maiores do que as verificadas visto que a solução de ligação BB2 possui sais caotrópicos que interferem na quantificação. Durante a segunda lavagem foi observada a perda de ADN, principalmente na segunda alíquota recolhida. O rendimento da eluição foi de  $33,24 \% \pm 1,13$ .

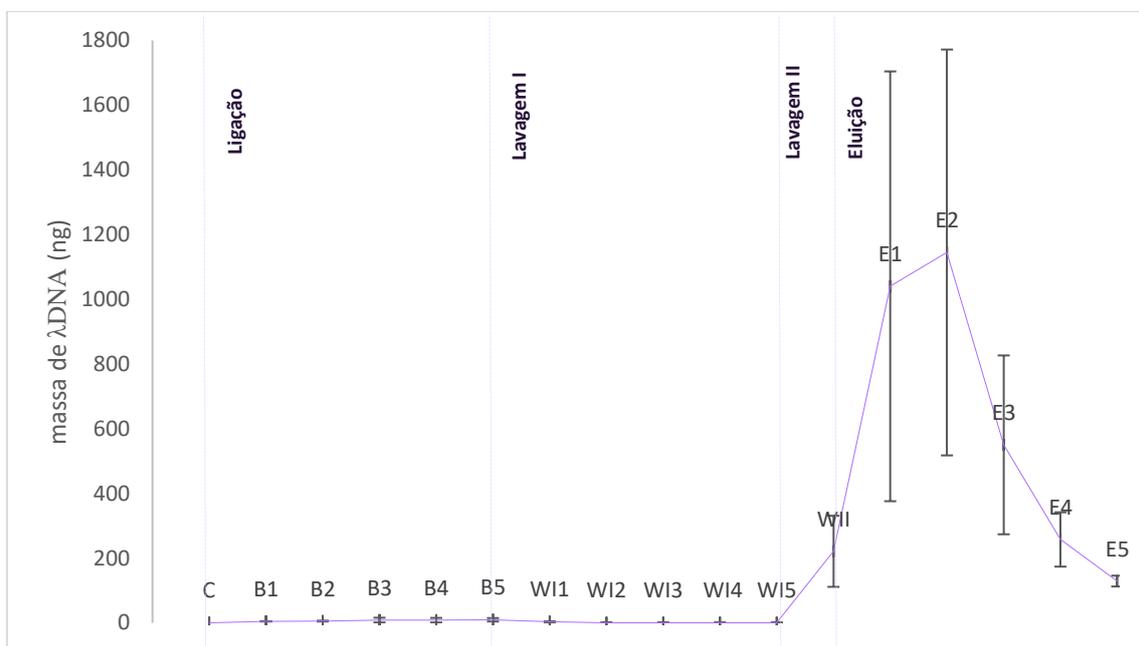


**Figura 15: Perfil de extração de λDNA do protocolo P2 no filtro de 15 mm.** Está representada a massa de λDNA, em ng, nas respetivas alíquotas recolhidas em cada etapa – condicionamento (C), ligação (B1 a B5), primeira lavagem (WI 1 a WI 5), segunda lavagem (WII 1 a WII 3) e eluição (E1 a E5). O ADN de cada alíquota foi quantificado por fluorometria. Os resultados estão representados como média  $\pm$  IC 90 %, n=3, triplicados independentes. O gráfico mostra a pouca ou nenhuma perda de ADN nas etapas iniciais, contudo as perdas na ligação podem ser maiores que as observadas, visto que BB2 interfere com a quantificação.

### 3.2.3. Protocolo de extração e purificação 2.1 (P2.1)

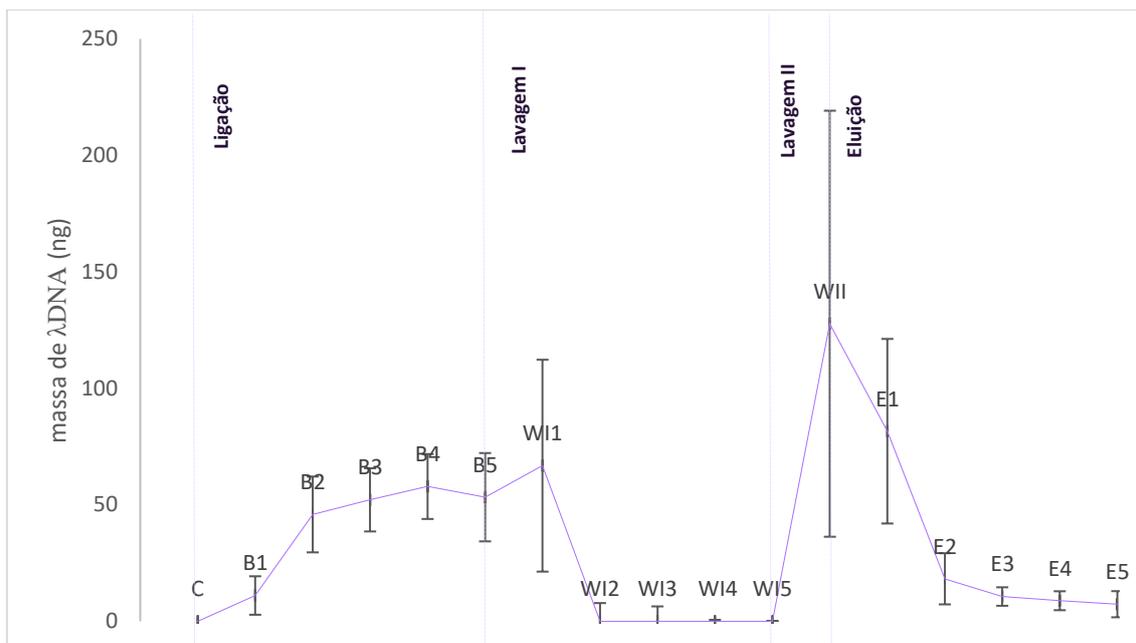
O protocolo P2.1 possui uma ligeira modificação do protocolo P2 na etapa da segunda lavagem, onde é usado menos volume de BB1. Esta modificação teve o intuito de reduzir as perdas de ADN verificadas nesta etapa em P2. Este foi testado com ambas as versões do protótipo. Os resultados obtidos encontram-se nas figuras 16 e 17.

Para a membrana de 15 mm (figura 16), tal como em P2, não se observou perda de ADN na ligação e na primeira lavagem, apesar de as perdas na ligação poderem ser maiores devido à interferência de BB2 na quantificação. Durante a segunda lavagem foi observada a redução da perda de ADN em relação a P2. O rendimento da eluição foi de  $51,17 \% \pm 1,30$ .



**Figura 16: Perfil de extração de λDNA do protocolo P2.1 no filtro de 15 mm.** Está representada a massa de λDNA, em ng, nas respetivas alíquotas recolhidas em cada etapa – condicionamento (C), ligação (B1 a B5), primeira lavagem (WI 1 a WI 5), segunda lavagem (WII) e eluição (E1 a E5). O ADN de cada alíquota foi quantificado por fluorometria. Os resultados estão representados como média  $\pm$  IC 90 %, n=3, triplicados independentes. O gráfico mostra a pouca ou nenhuma perda de ADN nas etapas iniciais, contudo as perdas na ligação podem ser maiores que as observadas, visto que BB2 interfere com a quantificação.

Em relação à membrana de 21 mm (figura 17), foi verificada a perda de λDNA na etapa de ligação (que poderá ser maior devido à interferência de BB2), pouca recuperação de ADN na fase da eluição e grandes desvios padrões. O rendimento da eluição foi de  $2,08 \% \pm 0,49$  o que sugere que a extração de ADN não fora eficiente.



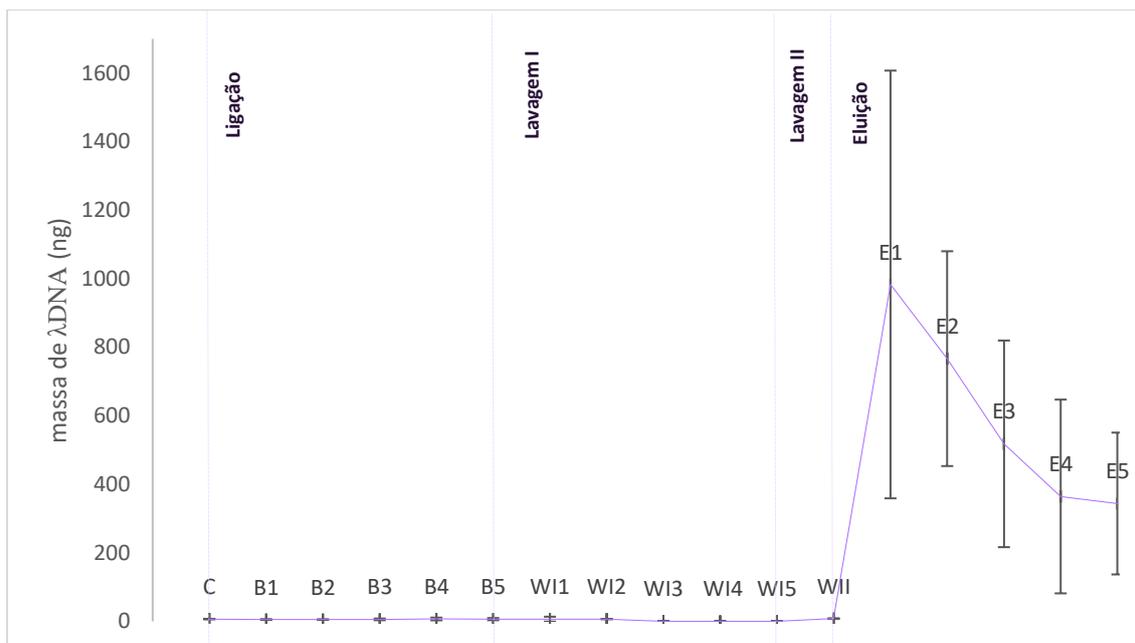
**Figura 17: Perfil de extração de λDNA do protocolo P2.1 no filtro de 21 mm.** Está representada a massa de λDNA, em ng, nas respetivas alíquotas recolhidas em cada etapa – condicionamento (C), ligação (B1 a B5), primeira lavagem (WI 1 a WI 5), segunda lavagem (WII) e eluição (E1 a E5). O ADN de cada alíquota foi quantificado por fluorometria. Os resultados estão representados como média ± IC 90 %, n=3, triplicados independentes. O gráfico mostra perda de ADN na ligação que poderão maiores que as observadas, visto que BB2 interfere na quantificação.

### 3.2.4. Protocolo de extração e purificação 3 (P3)

O protocolo 3 assemelha-se aos protocolos P2 e P2.1, sendo que este usa a secagem pela passagem de ar em vez da segunda lavagem com BB1 para remover o etanol usado na primeira lavagem. A secagem da membrana através da passagem de ar para remover o etanol usado na primeira lavagem assemelha-se ao procedimento usado nos *kits* comerciais.

Este protocolo foi testado apenas para o protótipo com a membrana de 15 mm, uma vez que a membrana de 21 mm não se mostrou eficiente em P2.1.

Os resultados obtidos encontram-se representados na figura 18. Não foi observada perda de ADN nas primeiras etapas, ligação, lavagem e secagem. Contudo, tal como em protocolos anteriores que usam BB2 na etapa de ligação, as perdas nesta fase poderão ser maiores do que as verificadas devido à interferência dos sais caotrópicos desta solução de ligação na quantificação de ADN. O rendimento de ADN na eluição foi, em média, de 48,79 % ± 3,55.



**Figura 18: Perfil de extração de λDNA do protocolo P3 no filtro de 15 mm.** Está representada a massa de λDNA, em ng, nas respectivas alíquotas recolhidas em cada etapa – condicionamento (C), ligação (B1 a B5), primeira lavagem (WI 1 a WI 5), secagem (WII) e eluição (E1 a E5). O ADN de cada alíquota foi quantificado por fluorimetria. Os resultados estão representados como média ± IC 90 %, n=3, triplicados independentes. O gráfico mostra pouca ou nenhuma perda de ADN nas etapas iniciais, contudo as perdas na ligação podem ser maiores que as observadas devido à interferência de BB2 na quantificação.

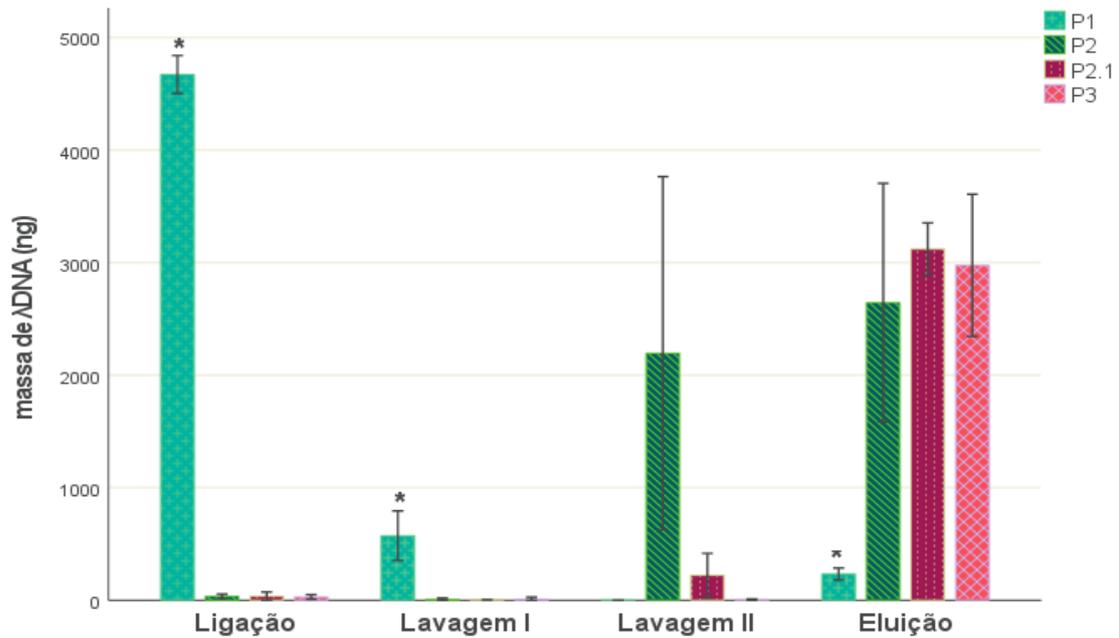
### 3.2.5. Comparação de protocolos e protótipos

Um protocolo eficiente na extração e purificação de ADN é aquele que possui pouca ou nenhuma perda de ADN nas etapas iniciais, ligação e lavagem/secagem, e um alto rendimento de ADN na eluição.

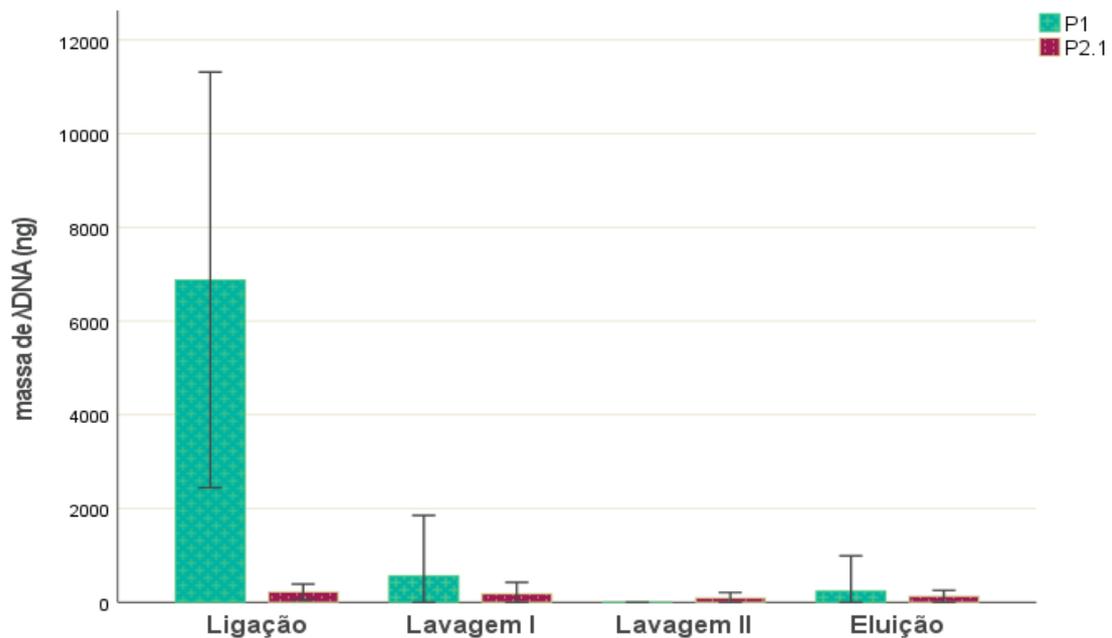
Nas figuras 19 e 20 encontram-se ilustrados a quantidade total de ADN extraída em cada etapa em todos os protocolos testados no presente trabalho. A integração dos resultados obtidos em todos os protocolos testados num único gráfico facilita a comparação entre estes.

Em relação aos testes realizados com o filtro de 15 mm (figura 19), o protocolo P1 foi o único no qual houve grandes perdas de ADN nas etapas iniciais da extração, indicando que o ADN não foi adsorvido pela membrana. Nos restantes protocolos, estas perdas não se verificaram e o ADN foi recuperado na eluição com sucesso.

Nos testes realizados com o filtro de 21 mm (figura 20) não foi obtido qualquer resultado satisfatório visto que, em ambos os protocolos, não ocorreu adsorção de λDNA pela fase sólida, resultando na sua perda. Outros testes (anexo I) realizados com o intuito de identificar o motivo do acontecido sugeriram que a sua origem estará no desenho do cartucho deste protótipo.



**Figura 19: Comparação dos protocolos testados (P1, P2, P2.1, P3) no filtro de 15 mm.** Está representada a massa total de  $\lambda$ DNA, em ng, recolhida após cada etapa da extração. O ADN foi quantificado por fluorometria. Os resultados estão representados como média  $\pm$  IC 90 %, n=3, triplicados independentes. O gráfico mostra a perda de ADN nas primeiras etapas em P1, enquanto que os restantes protocolos não tiveram grandes perdas.



**Figura 20: Comparação dos protocolos testados (P1 e P2.1) no filtro de 21 mm.** Está representada a massa total de  $\lambda$ DNA, em ng, recolhida após cada etapa da extração. O ADN foi quantificado por fluorometria. Os resultados estão representados como média  $\pm$  IC 90 %, n=3, triplicados independentes. O gráfico mostra a perda de ADN nas primeiras etapas em ambos os protocolos, sendo que em P2.1 esta perda será maior do que a verificada devido à interferência de BB2 na quantificação.

O protótipo de 15 mm usa menos volumes das soluções tampão e é mais rápido relativamente ao de 21 mm, além de que este último necessita de ser redesenhado e testado novamente para poder ser aplicado na extração de ADN. No protótipo de 15 mm, o protocolo P2, entre aqueles que recuperaram  $\lambda$ DNA eficientemente, é aquele que possui o menor rendimento na eluição. Os protocolos 2.1 e 3 são significativamente idênticos e ambos apresentam rendimentos aproximados de 50 %, porém, P3 elimina o etanol usado na primeira lavagem por secagem o que limita a possibilidade da integração deste protótipo num sistema de microanálise total ( $\mu$ TAS), visto que a passagem de ar não é conveniente neste tipo de sistemas. O protocolo P2.1 é preferível a este por possibilitar a integração e possuir menor variabilidade de resultados.

Tendo em conta os resultados, verificou-se que o protótipo de 15 mm e o protocolo 2.1 são aqueles que apresentam os melhores resultados e mais vantajosos. Assim, estes foram selecionados para prosseguir para a próxima fase do presente trabalho, a extração e purificação de ADN de folhas de videira e uvas.

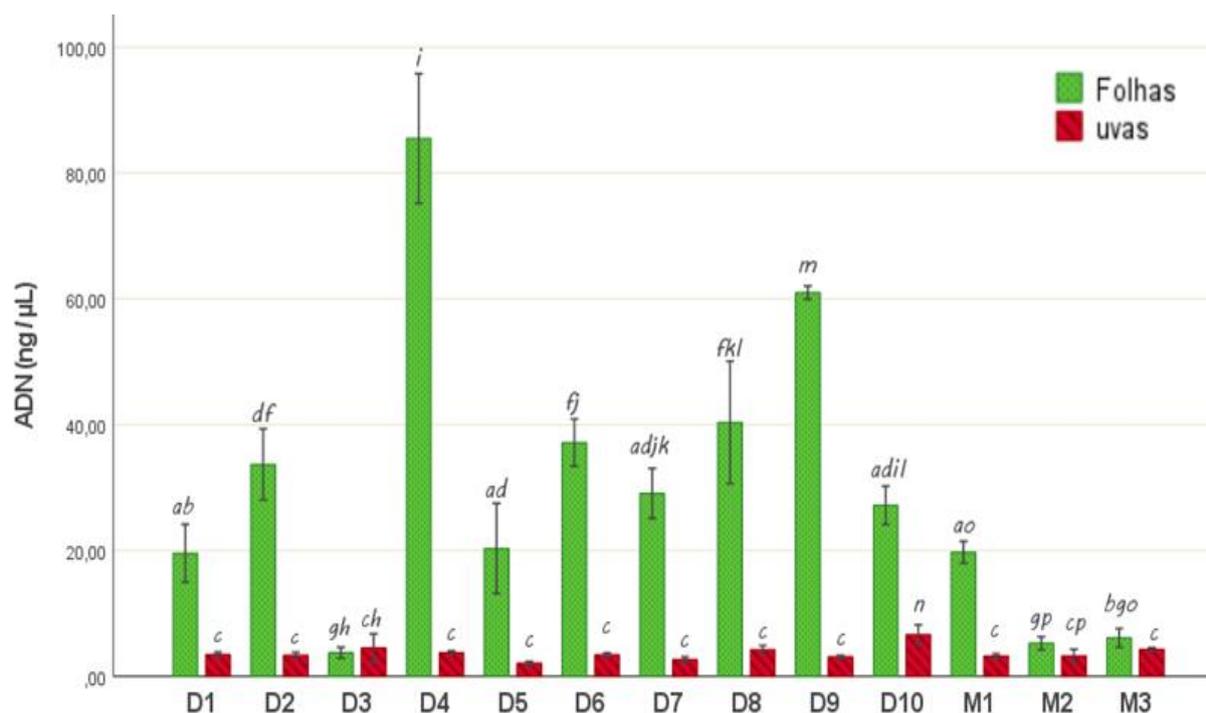
### **3.3.Extração e Purificação de ADN de folhas de videira e uvas**

#### **3.3.1. Extração e Purificação com *kit* comercial**

As amostras de folhas de videira e de uvas das várias castas (tabela 4) foram previamente reduzidas a pó. O procedimento de extração de purificação de ADN foi seguido de acordo com o descrito no manual do *kit* DNeasy® PowerSoil® Pro Kit (Qiagen), em triplicado. Quantificou-se o ADN recuperado e avaliou-se a sua pureza por espectrofotometria UV/Vis, em triplicado.

Na figura 21 encontra-se ilustrada a concentração de ADN extraída nas folhas de videira e uvas para cada casta testada. Este sugere que a concentração de ADN extraído a partir das folhas de videira é significativamente ( $p$ -value = 0,05) maior que a extraída a partir das uvas, com exceção de D3 e M2. Pode-se verificar que entre as castas, nas folhas, a concentração extraída é significativamente ( $p$ -value = 0,05) diferente entre si. Nas uvas, D10 foi a única que se mostrou significativamente diferente das restantes.

Os valores médios da razão de pureza A260/A280 variaram entre 1,15 a 1,66 para as folhas de videira (figura 26) e 1,09 a 1,61 para as uvas (figura 27), sendo semelhantes entre si. Esta indica a pureza em relação a proteínas e reagentes como fenol, sendo o valor de 1,8 que indica a pureza da amostra, ou seja, alguns destes contaminantes estão presentes.



**Figura 21: Extração e purificação de ADN de folhas de videira e uvas com DNeasy® PowerSoil® Pro Kit (Qiagen).** Está representada a concentração de ADN, em ng/μL, obtida na eluição para cada casta testada (D1-10 e M1-3). Foi seguido o protocolo do kit e o ADN foi quantificado por espectrofotometria UV/Vis. Os resultados estão representados como média ± IC 90 %, n=9, triplicados independentes e dependentes. O gráfico mostra a diferença significativa da concentração ADN extraído entre as folhas e uvas e diferentes castas.

### 3.3.2. Extração e Purificação com o dispositivo miniaturizado

A extração e purificação de ADN das amostras de folhas de videira e uvas realizou-se seguindo o protocolo P2.1 usando o dispositivo adaptado para o filtro de microfibra de vidro de 15 mm (tabela 3), em triplicado. As amostras foram previamente reduzidas a pó e fez-se a lise das amostras com o *kit* DNeasy® PowerSoil® Pro Kit (Qiagen). A ligação, lavagem e eluição foram de acordo com P2.1. O ADN foi recuperado em cinco alíquotas (E1-E5) na eluição. A quantificação destas e as respetivas razões de pureza (A260/A280 e A260/A230) foram medidas por espectrofotometria UV/Vis, em triplicado.

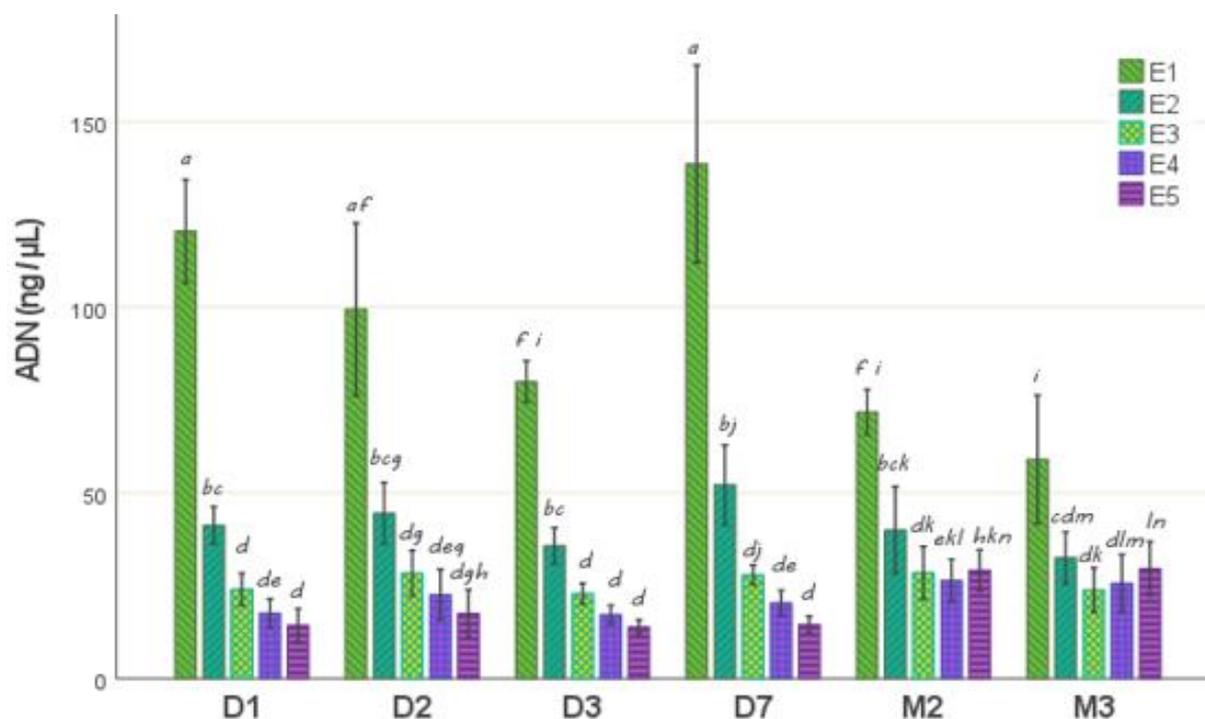
#### 3.3.2.1. Amostras de folhas de videira

Os resultados obtidos na extração e purificação de ADN com as amostras de folhas de videira encontram-se ilustrados nas figuras 22 e 23.

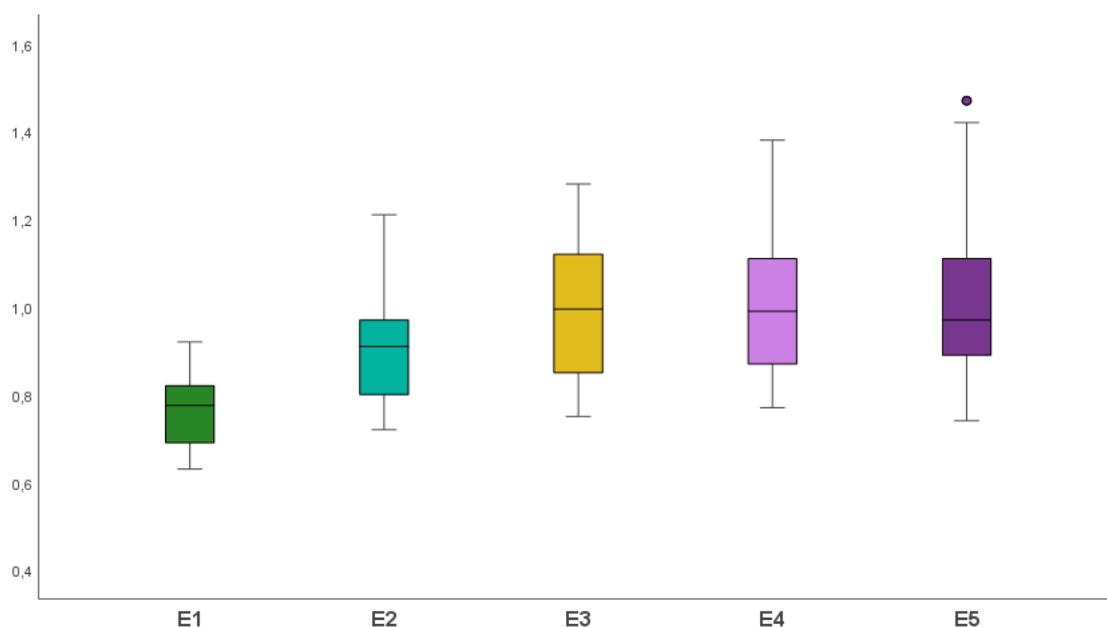
Na figura 22, está representada a concentração (ng/μL) das alíquotas (E1-E5) recolhidas na eluição para cada casta testada (D1, D2, D3, D7, M2 e M3). Este sugere que a maior quantidade de ADN é recuperada em E1, sendo a sua concentração variável entre castas. A segunda alíquota (E2) é a que contém a segunda maior quantidade de ADN, com algumas exceções na sua significância em relação às seguintes alíquotas. As E3, E4 e E5 não apresentam diferença significativa entre si, sendo as que possuem a menor concentração de ADN.

Na figura 23 encontra-se representada a frequência dos valores para a razão de pureza A260/A280 de todas as castas testadas para cada alíquota recolhida. Este sugere que as alíquotas de E1 são aquelas que possuem a menor pureza, sendo esta relativamente maior nas restantes alíquotas colhidas. Nenhuma destas possui o valor ideal de pureza de 1,8.

Combinando a informação obtida através das figuras 22 e 23, pode-se verificar que a alíquota E1 é aquela que possui a maior concentração de ADN, mas também a menor pureza. Nas restantes alíquotas E2 a E5, a concentração de ADN é menor, contudo a pureza destas é relativamente melhor que a de E1.



**Figura 22: Extração e purificação de ADN de folhas de videira com o dispositivo microfluídico.** Está representada a concentração de ADN, em ng/μL, obtida na eluição para cada casta testada (D1-10 e M1-3). Foi seguido o protocolo 2.1 e o ADN foi quantificado por espectrofotometria UV/Vis. Os resultados estão representados como média ± IC 90 %, n=9, triplicados independentes e dependentes. O gráfico mostra a evolução da recuperação de ADN ao longo da eluição (E1, E2, E3, E4, E5) em cada casta testada, comparando a concentração de ADN entre alíquotas da mesma casta e a mesma alíquotas nas diferentes castas testadas.



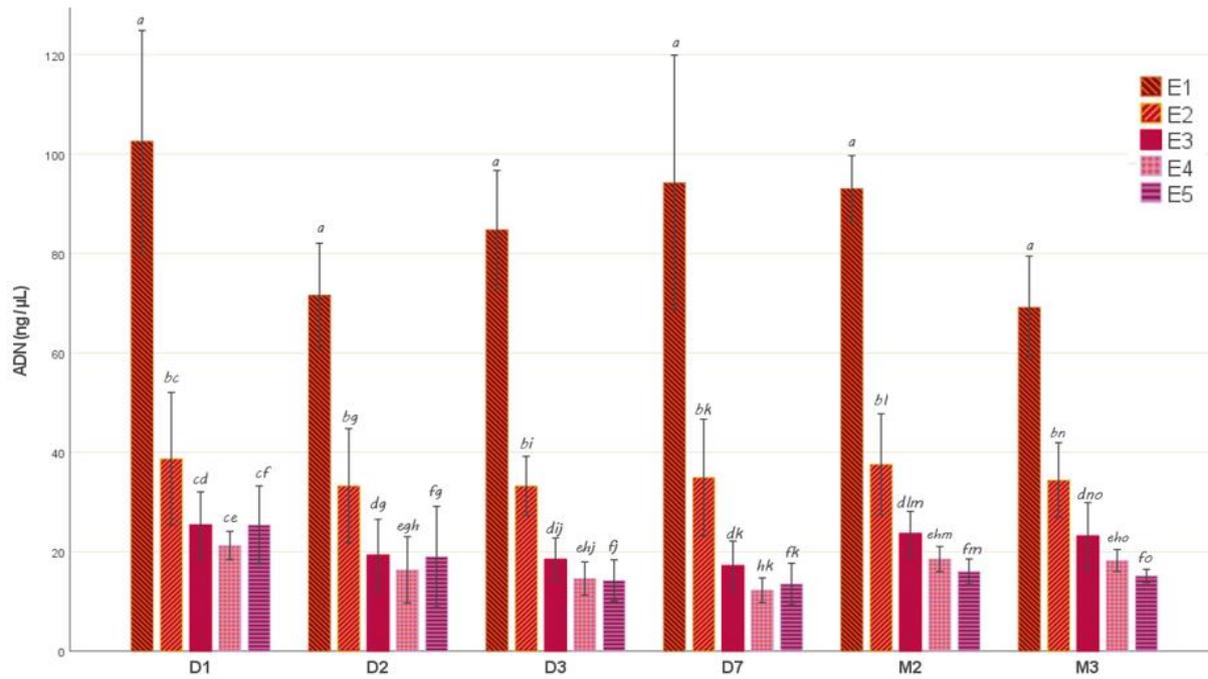
**Figura 23: Variabilidade de pureza de ADN das amostras de folhas de videira de todas as castas testadas com o protótipo microfluídico.** Está representada a frequência dos valores da razão A260/A280 de todas as castas testadas para cada alíquota da eluição (E1, E2, E3, E4, E5). Foi seguido o protocolo P2.1 para a extração e purificação de ADN. As razões de pureza foram determinadas por espectrofotometria UV/Vis. No gráfico pode-se observar o ligeiro aumento da pureza ao longo das alíquotas E1, E2 e E3, com tendência a estabilizar em E4 e E5.

### 3.3.2.2. Amostras de uvas

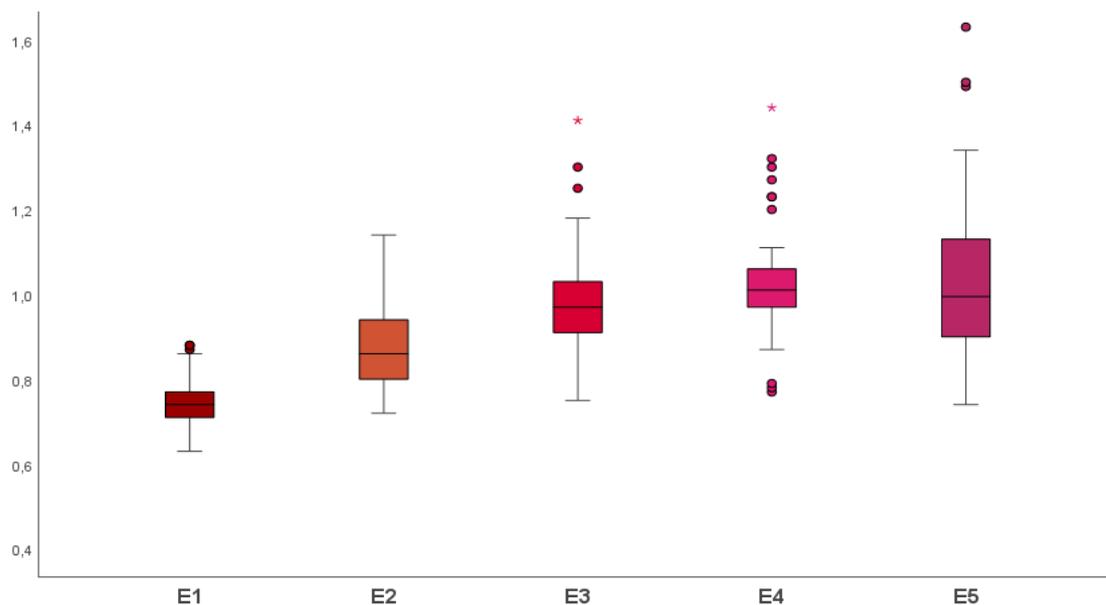
Na figura 24 está representada a concentração das alíquotas recolhidas na eluição para cada casta testada. A maior quantidade de ADN foi recuperada em E1, sendo que não existe diferença significativa na concentração de ADN entre castas para esta alíquota, ao contrário do que sucedera com as folhas de videira (ponto 3.3.2.1). A alíquota E2 é a que contém a segunda maior quantidade de ADN para as castas D3, M2 e M3, não apresentando diferença nas restantes. As alíquotas E3, E4 e E5 não apresentam diferença significativa entre si, sendo as que possuem a menor concentração de ADN. Estas não demonstraram diferença significativa entre castas, com exceção em E4 de D1/D7.

Na figura 25 está representada a frequência dos valores para a razão de pureza A260/A280 de todas as castas testadas para cada alíquota recolhida. Este sugere que as alíquotas de E1 são aquelas que possuem a menor pureza, sendo esta relativamente maior nas restantes alíquotas.

Integrando a informação obtida através das figuras 24 e 25, pode-se verificar que, tal como o que sucedera com as folhas de videira (ponto 3.3.2.1), a alíquota E1 é aquela que possui a maior concentração de ADN, mas também a menor pureza. Nas restantes alíquotas E2 a E5, a concentração de ADN é menor, contudo a pureza destas é relativamente melhor que a de E1.



**Figura 24: Extração e purificação de ADN de uvas com o Dispositivo microfluídico.** Está representada a concentração de ADN, em ng/μL, obtida na eluição para cada casta testada (D1-D10 e M1-M3). Foi seguido o protocolo 2.1 e o ADN foi quantificado por espectrofotometria UV/Vis. Os resultados estão representados como média ± IC 90 %, n=9, triplicados independentes e dependentes. O gráfico mostra a evolução da recuperação de ADN ao longo da eluição (E1, E2, E3, E4, E5) em cada casta testada, comparando a concentração de ADN entre alíquotas da mesma casta e a mesma alíquotas nas diferentes castas testadas.



**Figura 25: Variabilidade de pureza de ADN das amostras de uvas de todas as castas testadas com o protótipo microfluídico.** Está representada a frequência dos valores da razão A60/A280 de todas as castas testadas para cada alíquota da eluição (E1, E2, E3, E4, E5). Foi seguido o protocolo P2.1 para a extração e purificação de ADN. As razões de pureza foram determinadas por espectrofotometria UV/Vis. No gráfico pode-se observar o ligeiro aumento da pureza ao longo das alíquotas E1, E2 e E3, com tendência a estabilizar em E4 e E5.

### 3.3.3. Comparação da performance entre dispositivo microfluídico e *kit* comercial

O ADN das amostras de folhas de videira e de uvas foi extraído através do dispositivo microfluídico e do *kit* comercial Qiagen DNeasy® PowerSoil® Pro Kit, referido na literatura como eficiente na extração e purificação de ADN de amostras vegetais de videira e vinho. A performance do dispositivo em teste foi comparada ao *kit* comercial.

Os resultados da quantificação de ADN das alíquotas de eluição encontram-se descritos nas tabelas 5 e 6 para as folhas de videira e uvas, respetivamente. Embora o volume de eluição do protótipo do dispositivo microfluídico seja cinco vezes maior que o do *kit* comercial (Qiagen DNeasy® PowerSoil® Pro Kit), a quantidade de ADN recuperada com o dispositivo miniaturizado foi aproximadamente vinte vezes maior para nas folhas de videira e cinquenta vezes maior nas amostras de uvas do que aquela recuperada com o *kit* comercial. Pelo que, o dispositivo microfluídico permitiu a recuperação de ADN em maior quantidade e teve uma melhor performance em relação ao *kit* comercial.

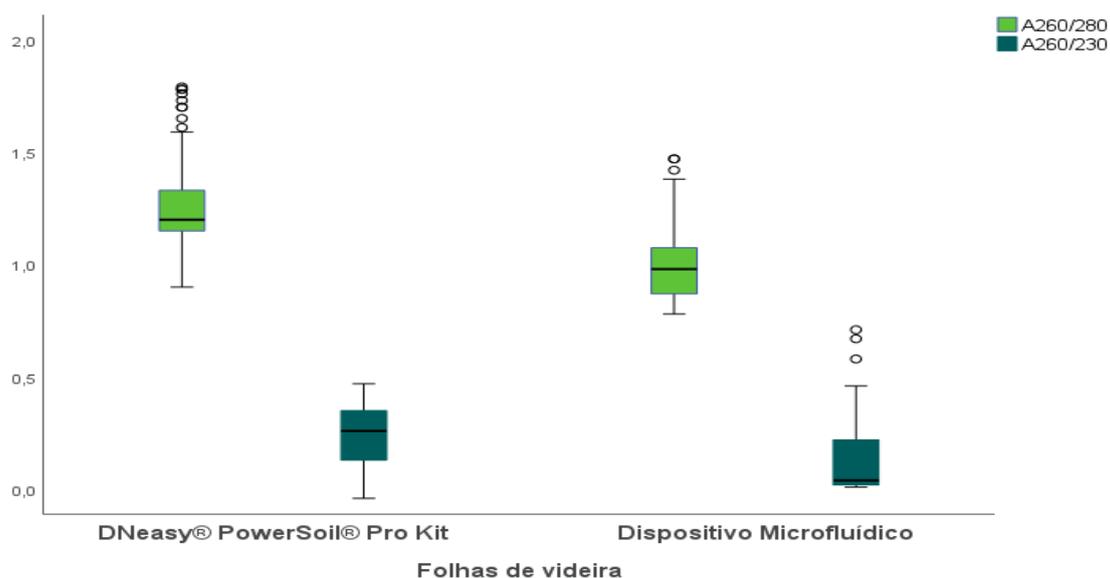
**Tabela 5: Comparação entre as quantidades de ADN recuperadas na eluição através do *kit* comercial e do dispositivo microfluídico para as amostras de folhas de videira.** Está representado o volume de eluição (E), em microlitros, a massa média de ADN com respetivo erro padrão (ADN ± EP), em microgramas e razão entre a massa eluída pelo dispositivo e *kit* comercial (j/i).

Folhas de videira					
	Qiagen DNeasy® PowerSoil® Pro Kit		Dispositivo microfluídico		(j/i)
	E (µL)	ADN (µg) ± EP (i)	E (µL)	ADN (µg) ± EP (j)	
<b>D1</b>	100	1,96 ± 0,23	500	21,76 ± 3,07	<b>11,11</b>
<b>D2</b>	100	3,37 ± 0,29	500	21,24 ± 2,62	<b>6,30</b>
<b>D3</b>	100	0,38 ± 0,04	500	16,96 ± 1,86	<b>44,77</b>
<b>D7</b>	100	2,91 ± 0,20	500	25,35 ± 3,72	<b>8,71</b>
<b>M2</b>	100	0,53 ± 0,05	500	19,57 ± 1,53	<b>36,99</b>
<b>M3</b>	100	0,61 ± 0,08	500	17,06 ± 1,48	<b>27,82</b>
<b>Média</b>		<b>1,63 ± 0,15</b>		<b>20,33 ± 2,38</b>	<b>22,62</b>

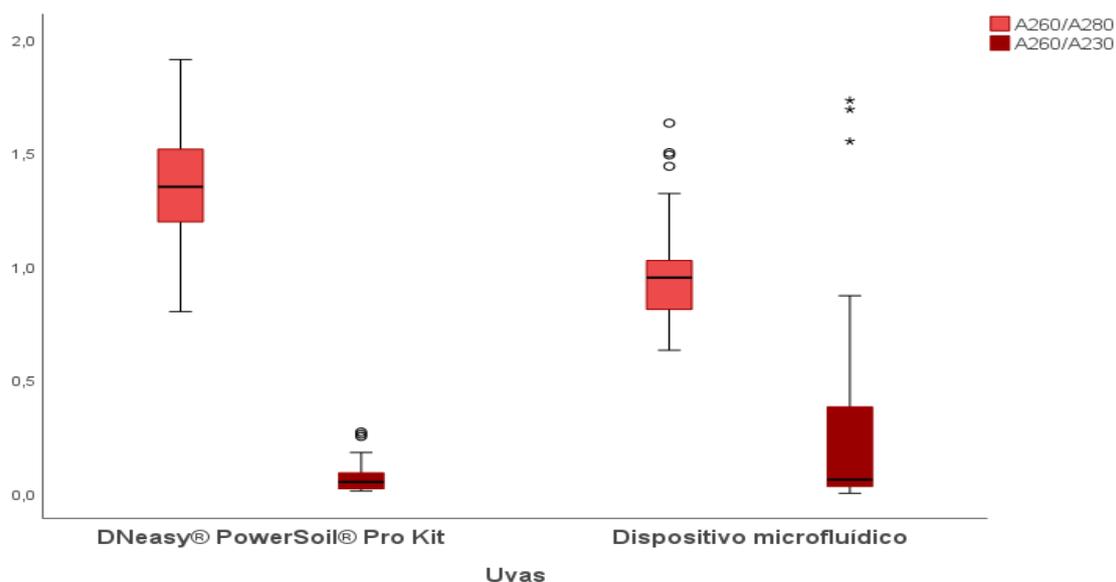
**Tabela 6: Comparação entre as quantidades de ADN recuperadas na eluição através do *kit* comercial e do dispositivo microfluídico para as amostras de uvas.** Está representado o volume de eluição (E), em microlitros, a massa média de ADN com respetivo erro padrão (ADN ± EP), em microgramas e razão entre a massa eluída pelo dispositivo e *kit* comercial (j/i).

Uvas					
	Qiagen DNeasy® PowerSoil® Pro Kit		Dispositivo microfluídico		Razão (j/i)
	Volume eluição (µL)	massa de ADN média (µg) ± EP (i)	Volume eluição (µL)	massa de ADN média (µg) ± EP (j)	
<b>D1</b>	100	0,35 ± 0,02	500	21,35 ± 2,68	<b>61,57</b>
<b>D2</b>	100	0,34 ± 0,03	500	15,97 ± 1,87	<b>47,43</b>
<b>D3</b>	100	0,45 ± 0,11	500	16,97 ± 1,98	<b>37,35</b>
<b>D7</b>	100	0,27 ± 0,02	500	17,23 ± 2,74	<b>64,35</b>
<b>M2</b>	100	0,33 ± 0,05	500	18,90 ± 2,24	<b>58,05</b>
<b>M3</b>	100	0,43 ± 0,01	500	16,03 ± 1,64	<b>37,18</b>
<b>Média</b>		<b>0,36 ± 0,04</b>		<b>17,74 ± 2,19</b>	<b>50,99</b>

As razões indicativas de pureza, A260/A280 e A260/A230, encontram-se representadas nas figuras 26 e 27. Os resultados obtidos para as razões de absorbância tanto para as alíquotas do *kit* comercial como do protótipo são semelhantes, embora as razões do *kit* sejam um pouco superiores. Os valores destas razões foram para ambos inferiores ao valor aceite para determinar a pureza de uma amostra, o que indica a presença de contaminantes nas alíquotas, tais como proteínas.



**Figura 26: Variabilidade das razões de pureza de ADN para as amostras de folhas de videira de todas as castas testadas com DNeasy® PowerSoil® Pro Kit (Qiagen) e com o dispositivo microfluídico.** Estão representadas as razões A60/A280 e A230/A260 de todas as castas testadas. As razões de pureza foram determinadas por espectrofotometria UV/Vis.



**Figura 27: Variabilidade das razões de pureza de ADN para as amostras de todas as castas testadas com DNeasy® PowerSoil® Pro Kit (Qiagen) e com o dispositivo microfluídico.** Estão representadas as razões A60/A280 e A230/A260 de todas as castas testadas. As razões de pureza foram determinadas por espectrofotometria UV/Vis.

## 4. Discussão de resultados

A maioria dos métodos de análise de ADN em plantas, inicia-se com a extração e purificação de ADN, sendo este um passo fundamental para o sucesso dos passos seguintes, como a PCR.

Segundo Reddy 2009, um protocolo eficiente na sua extração e purificação deve obter ADN puro, intacto e funcional, ter um bom rendimento, ser rápido e simples, ser económico e, por último, ser de confiança.

O presente estudo apresentou um protótipo de um dispositivo de extração e purificação de ADN aplicado a folhas de videira e uvas que demonstrou ter um bom rendimento e ADN relativamente puro.

Em relação ao protótipo descrito em Carvalho *et al.* 2018A para a extração de amostras de azeite, que obteve resultados eficazes e no qual o presente estudo teve base, o protótipo aqui descrito é mais *user-friendly* que o anterior, visto que a sua montagem é mais fácil e simples do que a do dispositivo de Carvalho *et al.* 2018A. Além disso, este protótipo possui uma câmara de extração mais pequena o que permitiu a redução relativa dos volumes de soluções tampões necessários ao procedimento. Consequentemente, o protocolo deste trabalho é mais rápido e económico relativamente àquele descrito em Carvalho *et al.* 2018A.

O protocolo P1 não obteve rendimentos satisfatórios contrariamente aos resultados de Carvalho *et al.* 2018A, onde este se demonstrara ser o mais eficiente. Esta diferença de resultados pode ser explicada pela diferença nos filtros usados. No artigo foi usado o filtro de 21 mm que neste trabalho não terá obtido bons rendimentos por motivos de desenho do protótipo. O filtro de 15 mm apenas foi testado no presente estudo.

Segundo Vandeventer *et al.* 2013, soluções tampão caotrópicas melhoram a eficiência da ligação do ADN a membranas baseadas em sílica, mas também dificultam a sua eluição. Neste estudo os protocolos com a solução tampão caotrópico (BB2) obtiveram melhores resultados que o tampão não caotrópico testado (BB1). Os rendimentos máximos obtidos de aproximadamente 50 % representam outra melhoria relativamente a Carvalho *et al.* 2018A.

Ji *et al.* 2007 e Huang *et al.* 2009 sugerem que maiores tempos de incubação e temperaturas durante o passo de eluição pode melhorar a sua eficiência e obter melhores rendimentos. O rendimento obtido neste estudo foi considerado satisfatório e assim estas modificações ao protocolo não se revelaram necessárias, visto que, estas além do aumento do rendimento, levariam ao aumento do tempo de extração e dos custos energéticos (aquecimento).

Em Comissão Europeia 2013 o vinho foi apontado como sendo um dos dez produtos em maior risco de ocorrência de fraude. Assim, o desenvolvimento de métodos confiáveis para rastrear videiras e vinhos têm-se tornado um forte objetivo visto que as demandas pela proteção de origem dos produtos têm crescido, bem como a necessidade de que o consumidor confie nos rótulos (Briciu *et al.* 2009).

Comercialmente, GeneXpert system por Cepheid (Sunnyvale, CA) e Liat Analyzer por IQuum (Allston, MA) são dois dispositivos miniaturizados completamente integrados de análises moleculares na área da medicina. Não existe conhecimento de dispositivos comerciais, apesar das suas evidentes vantagens, disponíveis e validados para este tipo de análise em matrizes alimentares. Até à corrente data, não foram também encontrados na literatura dispositivos microfluídicos adaptados para análises moleculares em amostras de *Vitis vinifera*.

Neste estudo, o ADN foi extraído de amostras de folhas de videira e uvas com o *kit* comercial DNeasy® PowerSoil® Pro Kit (Qiagen) e com o protótipo de dispositivo microfluídico desenvolvido. O dispositivo permitiu a recuperação de ADN em maior quantidade e teve uma melhor performance em relação ao *kit* comercial. As razões de absorvância são semelhantes, embora as do *kit* sejam relativamente superiores. Em ambos, estas foram inferiores ao valor aceite para determinar a pureza de uma amostra.

Caso se demonstre necessário, a pureza das amostras recolhidas poderá ser melhorada através do aumento do volume do tampão de lavagem para a melhor remoção dos contaminantes ou pela introdução de modificações como o tratamento com proteinase-K para a eliminação de proteínas e/ou adição de  $\alpha$ -amilase na remoção de polissacáridos.

A recolha de cinco alíquotas durante a eluição forneceu informações acerca do perfil de eluição no dispositivo possibilitando a seleção daquela que se demonstrar mais apropriada às análises posteriores. Se o interesse for apenas na quantidade de ADN, a alíquota E1 revela-se ser a mais adequada. As alíquotas seguintes possuem menor quantidade de ADN em relação a esta, conquanto usufruem de maior pureza.

O sistema e método aqui descrito oferece diversas vantagens em relação a outros métodos. Em primeiro lugar, o seu tamanho que permite a fácil portabilidade e reduz a necessidade de usar grandes equipamentos, bem como reduzir os volumes de amostra e de reagentes necessários. Consequentemente, reduz o custo e o tempo de duração do procedimento de extração e purificação de ADN comparativamente a métodos, como a SPE, que usam maiores volumes e equipamentos. A  $\mu$ SPE também permite a concentração de ADN quando este é

escasso em matrizes como a do vinho, através do uso de um maior volume inicial na fase ligação e a recuperação de ADN num volume menor durante a eluição.

Outras vantagens são a simplicidade de montagem do dispositivo que facilita o trabalho do utilizador. A sua relativa automatização que reduz o número de interferências por parte do operador, em relação a outros métodos, o que leva à redução do risco de contaminações e da ocorrência de erros sistemáticos ou grosseiros devidos às limitações humanas. Por último, este protótipo pode ser integrado num dispositivo completo e automatizado para a análise de ADN, envolvendo etapas como a amplificação e deteção dos fragmentos de interesse. Este poderá ser igualmente testado e validado para a sua aplicação em outras matrizes biológicas.

## 5. Conclusão

Um sistema eficiente na rastreabilidade de produtos é imprescindível. A conexão entre o produto final e castas de *Vitis vinifera* usadas, no comércio dos seus produtos (vinho, uvas, passas), pode ser estabelecida através de biomarcadores moleculares como o ADN, os quais necessitam de métodos de extração e purificação de ADN reproduzíveis e confiáveis.

Neste estudo os protocolos com a solução tampão caotrópica (BB2) obtiveram melhores resultados que o tampão não caotrópico testado (BB1), obtendo rendimentos máximos de aproximadamente 50 %. A extração e purificação de ADN, usando o filtro de diâmetro de 15 mm e o protocolo 2.1, demora cerca de cinco horas.

Este dispositivo miniaturizado demonstrou extração de ADN eficiente em folhas de videira e uvas em comparação ao *kit* comercial DNeasy® PowerSoil® Pro Kit (Qiagen). Além disso, apresenta diversas vantagens, entre as quais a portabilidade e possibilidade de integração em  $\mu$ TAS, pelo que poderá ser a base para uma metodologia de rastreabilidade eficaz e garantir a proveniência de produtos, bem como no combate à fraude neste produto alimentar.

Futuramente, são necessários estudos com matrizes mais complexas como mostos e vinho, melhorar a pureza das amostras obtidas, avaliar a possibilidade da redução do tempo necessário à extração através do teste com velocidades mais elevadas, testar a amplificação com o ADN extraído pelo sistema, avaliar a aplicabilidade deste sistema e protocolo com outras matrizes alimentares e, por fim, a sua integração com os módulos de amplificação e deteção para um sistema completo de análise de ADN ( $\mu$ TAS).

## Referências

- Abgrall, P. e Gué, A. 2007. «Lab-on-chip technologies: making a microfluidic network and coupling it into a complete microsystem: a review». *Journal of Micromechanics and Microengineering* 17 (5): R15-R49.
- Almeida, C.M., e Vasconcelos, M.T.. 2003. «Multielement composition of wines and their precursors including provenance soil and their potentialities as fingerprints of wine origin.» *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 4788–4798.
- Armbrecht, M. 2013. «Detection of contamination in DNA and protein samples by photometric measurements». *Application Note* 279.
- ASAE. 2016. «O vinho». *ASAEnews*, n. 104.
- Ashenfelter, O. 2006. «Tales from the crypt: auctioneer Bruce Kaiser tells us about the trials and tribulations of a wine judge.» *Journal of Wine Economics* 1 (2): 173-175.
- Azinhairo, S., Kant, K., Shahbazi, M. A., Garrido-Maestu, A., Prado, M. e Dieguez, L. 2020. «A smart microfluidic platform for rapid multiplexed detection of foodborne pathogens». *Food Control* 114 (Agosto): 107–242.
- Baleiras-Couto, M. M., e Eiras-Dias, J. E. 2006. «Detection and identification of grape varieties in must and wine using nuclear and chloroplast microsatellite markers». *Analytica Chimica Acta* 563 (1-2 SPEC. ISS.): 283–291.
- Baxter, M. J., Crews, H. M., Dennis, M. J., Goodall, I. e Anderson, D. 1997. «The determination of the authenticity of wine from its trace element composition.» *Food Chemistry* 60 (3): 443–450.
- Böhme, K., Calo-mata, P., Barros-Velázquez, J. e Ortea, I. 2019. «Review of Recent DNA-Based Methods for Main Food-Authentication Topics». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 67 (14): 3854–3864.
- Boom, R., Sol, J. A., Salimans, M. M. M., Jansen, C. L., Wertheim-Van, P. M .D., e Van Der Noordaa, J. 1990. «Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids Downloaded from». *Journal Of Clinical Microbiology* 28 (3) : 495–503.
- Bourse, D., Jégou, S., Conreux, A., Villaume, S. e Jeandet, P. 2010. «Review of preparative and analytical procedures for the study of proteins in grape juice and wine.» *Analytica Chimica Acta* 667: 33–42.
- Brereton, P. 2013. *New analytical approaches for verifying the origin of food*. Cambridge, Uk: Woodhead Publishing.

- Briciu, D., Pamfil, D., Briciu, A., Pop, I., Catalina, I., Curticiu, D., Balazs, E. e Ganea, S. 2009. «Two methods of DNA extraction from musts and leaves.» *Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology* 13 (April 2014): 21–23.
- Campos, C. D. M., de Campos, R. P. S., Silva, J. A. F., Jesus, D. P. e Orlando, R. M. 2015. «Preparo de Amostras assistido por campo elétrico: Fundamentos, Avnaços, Aplicações e tendências». *Quimica Nova* XY (00): 1–14.
- Campos, M. A. J., Fernando, A. L. e Oliveira, J. 2008. «Segurança Alimentar na produção de vinho branco , tinto e abafado – estudo de caso da Adega da Merceana». *Revista Lusófona de Humanidades e Tecnologia* 12: 75–88.
- Cankar, K., Štebih, D., Dreo, T., Žel, J. e Gruden, K. 2006. «Critical points of DNA quantification by real-time PCR – effects of DNA extraction method and sample matrix on quantification of genetically modified organisms». *BMC Biotechnology* 6 (1): 37.
- Carter, M. J., e Milton. I. D. 1993. «An inexpensive and simple method for DNA purifications on silica particles». *Nucleic Acids Research* 21 (4): 1044.
- Carvalho, J., Puertas, G., Gaspar, J., Azinheiro, S., Diéguez, L., Garrido-Maestu, A., Vázquez, M., Barros-Velázquez, J., Cardoso, S. e Prado, M. 2018 A. «Highly efficient DNA extraction and purification from olive oil on a washable and reusable miniaturized device». *Analytica Chimica Acta* 1020: 30–40.
- Carvalho, J., Negrinho, R., Azinheiro, S., Garrido-Maestu, A., Barros-Velázquez, J. e Prado, M. 2018 B. «Novel approach for accurate minute DNA quantification on microvolumetric solutions». *Microchemical Journal* 138: 540–549.
- Casanova, R. 2015. «Mais de 33 mil quilos de carne e peixe foram apreendidos.» *Diário de Notícias*, fevereiro de 2015.
- Catalano, V., Moreno-sanz, P., Lorenzi, S. e Grando, M. S. 2016. «Experimental Review of DNA-Based Methods for Wine Traceability and Development of a Single-Nucleotide Polymorphism (SNP) Genotyping Assay for Quantitative Varietal Authentication». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64: 6969–6984.
- Chen, C. W., e Thomas, C. A. 1980. «Recovery of DNA segments from agarose gels». *Analytical Biochemistry* 101 (2): 339–341.
- Coetzee, P. P., e Vanhaecke, F. 2005. «Classifying wine according to geographical origin via quadrupole-based ICP-mass spectroscopy measurements of boron isotope ratios.» *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 383: 977–984.

- Coltro, W. K. T., Piccin, E., Carrilho, E., de Jesus, D. P., da Silva, J. A. F., da Silva, H. D. T. e do Lago, C. L. 2007. «Microsistemas de análises químicas: introdução, tecnologias de fabricação, instrumentação e aplicações». *Química Nova* 30 (8): 1986–2000.
- Comunidade Europeia. 2000. Directive 2000/13/EC of the European Parliament and of the Council of 20 March 2000 on the approximation of the laws of the Member States relating to the labelling, presentation and advertising of foodstuffs.
- Cunha, J., Brazão, J., Baeta, F. e Eiras-Dias, J. E. 2020. «Coleção Ampelográfica Nacional: uma “ferramenta” indispensável à preservação e ao melhoramento de variedades autóctones de videira». *Viticultura*, 24–28.
- Doyle, J. J., e Doyle, J. L. 1987. «A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue». *Phytochemical Bulletin* 19 (1): 11–15.
- Duarte, F. L., e Caldeira, I. 2014. «Estabilidade microbiológica de vinhos». *Enologia 2014*, dezembro 2014: 36–46.
- Euronews. 2012. «Bebidas espirituosas com metanol estão a matar no leste da Europa.» *Euronews*, setembro de 2012.
- Faria, M. A., Magalhães, R. Ferreira, M. A., Meredith, C. P. e Monteiro, F. F. 2000. «*Vitis vinifera* must varietal authentication using microsatellite DNA analysis (SSR)». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (4): 1096–1100.
- Gallagher, S. R. 2017. «Quantitation of DNA and RNA with Absorption and Fluorescence Spectroscopy.» *Current Protocols in Immunology* 116 (fevereiro): A.3L.1-A.3L.14.
- Gallagher, S. R., e Desjardins, P. R. 2007. «Quantitation of DNA and RNA with Absorption and Fluorescence Spectroscopy.» *Current Protocols in Human Genetics* Appendix 3 (Abril): Appendix 3D.
- García-Beneytez, E., Cabello, F. e Revilla, E. 2003. «Analysis of Grape and Wine Anthocyanins by HPLC-MS.» *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 5622–5629.
- García-Beneytez, E., Moreno-Arribas, M. V., Borrego, J., Polo, M. C. e Ibáñez, J. 2002. «Application of a DNA analysis method for the cultivar identification of grape musts and experimental and commercial wines of *Vitis vinifera* L. using microsatellite markers». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (21): 6090–6096.
- García, S. C. e Barros, P. 2018. «Química Enológica — métodos analíticos. Avanços recentes no controlo da qualidade de vinhos e de outros produtos vitivinícolas».

- Garrido-Maestu, A., Azinheiro, S., Carvalho, J., Abalde-Cela, S., Carbó-Argibay, E., Diéguez, L., Piotrowski, M., Kolen'ko, Y. V e Prado, M. 2017. «Combination of Microfluidic Loop-Mediated Isothermal Amplification with Gold Nanoparticles for Rapid Detection of Salmonella spp. in Food Samples». *Frontiers in Microbiology*. 8: 2159
- Gilmartin, P. M., e Bowler, C. 2002. *Molecular Plant Biology*. 1.<sup>a</sup> ed. Oxford: Oxford University Press.
- Gordon, A. 2017. «Introduction: effective implementation of food safety and quality systems: prerequisites and other considerations». Em *Food Safety and Quality Systems in Developing Countries*, 1–19. Elsevier Inc.
- Goulart, L. J. 2019. «Tags e etiquetas adesivas para rastreabilidade de produtos». Promtec.
- Gryson, N. 2010. «Effect of Food Processing on Plant DNA Degradation and PCR-Based GMO Analysis: A Review.» *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 396 (6): 2003–2022.
- Hanania, U., Velcheva, M., Sahar, N. e Perl, A. 2004. «An improved method for isolating high-quality DNA from *Vitis vinifera* nuclei». *Plant Molecular Biology Reporter* 22 (2): 173–177.
- Hird, H, J C., Sanchez, A., Hernandez, M., Goodier, R., Schneede, K., Boltz, C. e Popping, B. 2006. «Effect of Heat and Pressure Processing on DNA Fragmentation and Implications for the Detection of Meat Using a Real-Time Polymerase Chain Reaction.» *Food Additives and Contaminants* 23 (7): 645–650.
- Hnatio, J. 2013. «Horsegate: Preventing Food Fraud in Europe».
- Holmberg, L. 2010. «Wine fraud». *International Journal of Wine Research* 2010 (2):105–113.
- Hosaka, K. 2004. «An easy, rapid, and inexpensive DNA extraction method, “one-minute DNA extraction,” for PCR in potato». *American Journal of Potato Research* 81 (1): 17–19.
- Huang, M. C., Ye, H., Kuan, Y. K., Li, M. e Ying, J. Y. 2009. «Integrated two-step gene synthesis in a microfluidic device». *Lab on a Chip* 9 (2): 276–285.
- Invitrogen. 2014. «Comparison of fluorescence-based quantitation with UV absorbance measurements».
- Işçi, B., Yildirim, H. K. e Altindisli, A. 2014. «Evaluation of methods for DNA extraction from must and wine». *Journal of the Institute of Brewing* 120 (3): 238–243.
- Ji, H. M., Samper, V., Chen, Y., Hui, W., Lye, H., Mustafa, F., Lee, A. C., Cong, L., Heng, C. e Lim, T. 2007. «DNA purification silicon chip» *Sensors and Actuators A: Physical* 139 (setembro): 139–144.

- Kačániová, M., Hleba, L., Pochop, J., Kádasi-Horáková, M., Fikselová, M. e Royná, K. 2012. «Determination of wine microbiota using classical method, polymerase chain method and Step One Real-Time PCR during fermentation process.» *Journal of Environmental Science and Health* 47 (6): 571–578.
- Karakousis, A. e Langridge, P. 2003. «A high-throughput plant DNA extraction method for marker analysis». *Plant Molecular Biology Reporter* 21 (1): 95.
- Khanna, P. 2010. *Essentials of Genetics*. I K International Publishing House.
- León, C., García-Cañas, V., González, R., Morales, P. e Cifuentes, A. 2011. «Fast and sensitive detection of genetically modified yeasts in wine.» *Journal of Chromatography A* 1218 (42): 7550–7556.
- Li, G., Ran, R., Zhao, J. L. e Xu, Y. S. 2007. «Design, simulation, and optimization of a miniaturized device for size-fractioned DNA extraction». *Electrophoresis* 28 (24): 4661–4667.
- Li, X., Zhang, J. e Gu, H. 2012. «Study on the adsorption mechanism of DNA with mesoporous silica nanoparticles in aqueous solution». *Langmuir* 28 (5): 2827–2834.
- Liang, Z., Duan, S., Sheng, J., Zhu, S., Ni, X., Shao, J., Liu, C. *et al.* 2019. «Whole-genome resequencing of 472 *Vitis* accessions for grapevine diversity and demographic history analyses». *Nature Communications* 10 (1): 1190.
- Liu, L., Cao, W., Wu, J., Wen, W., Chang, D. C. e Sheng, P. 2008. «Design and Integration of an All-in-One Biomicrofluidic Chip.» *Biomicrofluidics* 2 (3): 34-103.
- Lockley, A. K., e Bardsley, R. G. 2000. «DNA-based methods for food authentication». *Trends in Food Science & Technology* 11: 67–77.
- Lodhi, M. A., Ye, G. N., Weeden, N. F. e Reisch, B. I. 1994. «A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species». *Plant Molecular Biology Reporter* 12 (1): 6–13.
- Lucena-Aguilar, G., Sánchez-López, A. N., Barberán-Aceituno, C., Carrillo-Ávila, J. A., López-Guerrero, J. A. e Aguilar-Quesada, R. 2016. «DNA Source Selection for Downstream Applications Based on DNA Quality Indicators Analysis». *Biopreservation and Biobanking* 14 (4): 264–70.
- Magalhães, N. 2015. *Tratado de Viticultura - a videira, a vinha e o Terroir*. Esfera Poética.
- Marques, A. P., Zé-Zé, L., San-Romão, M. V. e Tenreiro, R. 2010. «A novel molecular method for identification of *Oenococcus oeni* and its specific detection in wine.» *International Journal of Food Microbiology* 142 (1–2): 251–255.

- Marsal, G., Boronat, N., Canals, J. M., Zamora, F. e Fort, F. 2013. «Comparison of the efficiency of some of the most usual DNA extraction methods for woody plants in different tissues of *Vitis vinifera L.*». *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 47 (4): 227–237.
- Mata, A., Fleischman, A. J. e Roy, S. 2005. «Characterization of Polydimethylsiloxane (PDMS) Properties for Biomedical Micro/Nanosystems». *Biomedical Microdevices* 7 (4): 281–293.
- Matlock, B. 2015. «Assessment of Nucleic Acid Purity». 52646. *Technical Bulletin NanoDrop Spectrophotometers*. Wilmington, MA, USA.
- McCormick, R. M. 1989. «A Solid-Phase Extraction Procedure for DNA Purification.» *Analytical Biochemistry* 181 (1): 66–74.
- McGovern, P. E., Fleming, S. J. e Katz, S. H. 2003. *The Origins and ancient history of wine: food and nutrition in history and antropology*. Routledge.
- McInemey, J. 2002. «The production of food: from quantity to quality». *Proceedings of the Nutrition Society* 61 (2): 273–279.
- Melzak, K. A., Sherwood, C. S., Turner, R. F. B. e Haynes, C. A. 1996. «Driving forces for DNA adsorption to silica in perchlorate solutions». *Journal of Colloid and Interface Science* 181 (2): 635–644.
- Moreno-Arribas, M. V., Cabello, M. C., Polo, F., Martín-Alvarez, P. J., Pueyo, E. e Martín-Alvarez, P. J. 1999. «Assessment of the native electrophoretic analysis of total grape must proteins for the characterization of *Vitis vinifera L.* cultivars.» *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47 (1): 114–120.
- Moreno-Arribas, M. V., Pueyo, E. e Polo, M. C. 2002. «Analytical methods for the characterization of proteins and peptides in wines.» *Analytica Chimica Acta* 458: 63–75.
- Murray, M. G. e Thompson, W. F. 1980. «Rapid isolation of high molecular weight plant DNA». *Nucleic Acids Research* 8 (19): 4321–4326.
- Nakamura, S., Haraguchi, K., Mitani, N. e Ohtsubo, K. 2007. «Novel preparation method of template DNAs from wine for PCR to differentiate grape (*Vitis vinifera L.*) cultivar». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (25): 10388–10395.
- Nolan, T., Hands, R. E., Ogunkolade, W. e Bustin, S. A. 2006. «SPUD: A quantitative PCR assay for the detection of inhibitors in nucleic acid preparations». *Analytical Biochemistry* 351 (2): 308–310.
- OIV. 2009. Descriptor List for Grapevine Varieties and *Vitis* Species, 2.<sup>a</sup> Ed (Organisation Internationale de La Vigne et Du Vin). Paris, France.

- OIV. 2020. «State of the world vitivincultural sector in 2019», abril: 1–15.
- Opara, L. U. 2003. «Traceability in agriculture and food supply chain : A review of basic concepts, technological implications, and future prospects». *Food, Agriculture & Environment* 1 (1): 101–106.
- Opara, L. U. e Mazaud, F. 2001. «Food Traceability from Field to Plate». *Outlook on Agriculture* 30 (4): 239–47.
- Pan, T. M. e Shih, T. W. 2003. «Detection of genetically modified soybeans in miso by polymerase chain reaction and nested polymerase chain reaction». *Journal of Food and Drug Analysis* 11 (2): 154–158.
- Pereira, L., Guedes-Pinto, H. e Martins-Lopes, P. 2011. «An enhanced method for *Vitis vinifera* L. DNA extraction from wines». *American Journal of Enology and Viticulture* 62 (4): 547–552.
- Piccolo, S., Alfonzo, A., Conigliaro, G., Moschetti, G., Burrano, S. e Barone, A. 2012. «A simple and rapid DNA extraction method from leaves of grapevine suitable for polymerase chain reaction analysis». *African Journal of Biotechnology* 11 (45): 10305–10309.
- Prado, M., Ortea, I. Vial, S., Rivas, J., Caio-Mata, P. e Barros-Velázquez, J. 2016. «Advanced DNA- and Protein-based Methods for the Detection and Investigation of Food Allergens». *Food Science and Nutrition* 56 (15): 2511–2542.
- Prado, M., Casqueiro, J., Iglesias, Y., Cepeda, A. e Barros-Velázquez, J. 2004. «Application of a polymerase chain reaction (PCR) method as a complementary tool to microscopic analysis for the detection of bones and other animal tissues in home-made animal meals». *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84 (6): 505–512.
- Prado, M., Franco, C. M., Fente, C. A., Cepeda, A., Vázquez, B. I. e Barros-Velázquez, J. 2002. «Comparison of Extraction Methods for the Recovery, Amplification and Species-Specific Analysis of DNA from Bone and Bone Meals.» *Electrophoresis* 23 (7–8): 1005–1012.
- Pray, L. 2008. «Descoberta da estrutura do DNA e Função: Watson e Crick». *Nature Education* 1 (1).
- Price, C. W., Leslie, D. C. e Landers, J. P. 2009. «Nucleic acid extraction techniques and application to the microchip». *The Royal Society of Chemistry* 9: 2484–2494.
- Qian, C., Wang, R., Wu, H., Ping, J. e Wu, J. 2018. «Recent advances in emerging DNA-based methods for genetically modified organisms (GMOs) rapid detection». *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. Elsevier B.V.

- Rasooly, A., e Herold, K. E. 2008. «Food Microbial Pathogen Detection and Analysis using DNA Microarray Technologies.» *Foodborne Pathogens and Disease* 5 (4): 531–550.
- Reddy, J. 2009. «A Comprehensive Method to Isolate High Quality DNA from the Cultivars of Hibiscus». *International Journal of Biotechnology Applications* 1 (dezembro).
- Reinholt, S. J., e Baeumner, A. J. 2014. «Microfluidic isolation of nucleic acids». *Angewandte Chemie - International Edition* 53 (51): 13988–14001.
- Revilla, I., e González-SanJosé, M. L. 2001. «Effect of different oak woods on aged wine color and anthocyanin composition». *European Food Research and Technology* 213: 281–285.
- Rogers, S. O., e Bendich, A. J. 1994. «Extraction of total cellular DNA from plants, algae and fungi.» Em *Plant Molecular Biology Manual*, 183–90. Springer, Dordrecht.
- Rolim, M. L. 2009. «China: 296 mil bebês contaminados por leite com melanina.» *Expresso*, janeiro de 2009.
- Ronald, S. J. 2009. *Wine Tasting: A Professional Handbook*. Elsevier's Science & Technology.
- Sadiku, M. N. O., Musa, S. M. e Ashaolu, T. J. 2019. «Food Industry: An Introduction». *International Journal of Trend in Scientific Research and Development* 3 (4): 128-30.
- Salihah, N. T., Hossain, M. M., Lubis, H. e Ahmed, M. U. 2016. «Trends and advances in food analysis by real-time polymerase chain reaction». *Journal of Food Science and Technology* 53: 2196–2209.
- Salvi, G., De Los Rios, P. e Vendruscolo, M. 2005. «Effective interactions between chaotropic agents and proteins». *Proteins: Structure, Function and Genetics* 61 (3): 492–499.
- Santos, S., Oliveira, M., Amorim, A. e van Asch, B. 2014. «A forensic perspective on the genetic identification of grapevine (*Vitis vinifera* L.) varieties using STR markers». *Electrophoresis* 35 (21–22): 3201–3207.
- Sefc, K., Guggenberger, S., Regner, F., Lexer, C., Glössl, J. e Steinkellner, H. 1998. «Genetic analysis of grape berries and raisins using microsatellite markers». *Vitis -Geilweilerhof-* 37 (3): 123–125.
- Sambrook, J., e Green, M. R. 2012. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Vol. 1. Nova Iorque: Cold Spring Harbor.
- Siret, R., Gigaud, O. Rosec, J. P. e This, P. 2002. «Analysis of grape *Vitis vinifera* L. DNA in must mixtures and experimental mixed wines using microsatellite markers». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (13): 3822–3827.

- Soehartono, A. M., Hong, L., Yang, G., Song, P., Yap, H. K. S., Chan, K. K., Chong, P. H. J. e Yong, K. 2016. «Miniaturized Fluidic Devices and Their Biophotonic Applications BT - Handbook of Photonics for Biomedical Engineering». Dordrecht: Springer Netherlands: 1–47.
- Soleas, G. J., Diamandis, E. P. e Goldberg, D. M. 1997. «Wine as a biological fluid: History, production, and role in disease prevention». *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 11 (5): 287–313.
- Stoytcheva, M. e Zlatev, R. 2016. *Lab on a chip fabrication and application*. Rijeka: InTech.
- Thermo Scientific. 2010. «Nucleic Acid». *Thermo Scientific NanoDrop Spectrophotometers*.
- Tomás, C. 2015. «Barca Velha e Pera Manca alvo de falsificação.» *Expresso*, janeiro 2015.
- Vandeventer, P. E., Mejia, J., Nadim, A., Johal, M. S. e Niemz, A. 2013. «DNA Adsorption to and Elution from Silica Surfaces: Influence of Amino Acid Buffers». *Journal Physics Chemistry B*. 117 (37): 10742–10749.
- Varma, A., Padh, H. e Shrivastava, N. 2007. «Plant genomic DNA isolation: An art or a science». *Biotechnology Journal* 2: 386–392.
- Visser, S. A., Hergenrother, R. W. e Cooper, S. L. 1996. «Polymers.» Em *Biomaterials Science*, 50–60. Academic Press.
- Vogelstein, B., Gillespie, D. 1979. «Preparative and analytical purification of DNA from agarose». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76 (2): 615–619.
- Wang, J. 2000. «Survey and Summary: From DNA biosensors to gene chips». *Nucleic Acids Research* 28 (16): 3011–3016.
- Watson, J. D., e Crick, F. H. C. 1953. «Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid». *Nature* 171 (4356): 737–738.
- Weighardt, F. 2007. «GMO quantification in processed food and feed». *Nature Biotechnology* 25 (11): 1213–1214.

## Anexos

### Anexo I

#### Resultados suplementares relativos à otimização do protótipo de 21mm

Nos testes realizados com o filtro de 21 mm (ponto 3.2) não foi obtido qualquer resultado satisfatório visto que se verificou a perda de  $\lambda$ DNA nas etapas iniciais e rendimentos de eluição muito baixos em todos os protocolos testados. Foram realizados os seguintes testes com o intuito de ajudar na identificação do motivo da baixa extração de ADN.

1. Usou-se o protocolo P1, mas em vez de  $\lambda$ DNA foi usado ADN de esperma de salmão (Sigma®, 31,149) de forma a verificar se o tamanho de ADN interferia na adsorção pela membrana. (Tendo em conta, que esta funcionou em Carvalho *et al.* 2018A com este ADN mais pequeno.) O rendimento da eluição foi de aproximadamente zero.

2. Usou-se o protocolo P4b de Carvalho *et al.* 2018A, correspondente ao protocolo P1 do presente trabalho, de forma a verificar se as limitações eram causadas pelos volumes/protocolo usado. O rendimento da eluição foi de aproximadamente zero.

3. Usou-se o protocolo P1 com a introdução de tempos de pausa de 10 minutos entre cada recolha de alíquotas nas etapas de ligação e eluição para verificar se com o aumento do tempo de contacto das soluções com a membrana, reduziria as perdas e aumentaria o rendimento da eluição. Este foi de 2,48 %.

4. Testou-se o dispositivo usado em Carvalho *et al.* 2018A e o seu protocolo P4b de forma a confirmar se a limitação ocorre devido ao desenho deste novo sistema ou se é outra a origem. O rendimento da eluição foi de 20,06 %, valor semelhante ao obtido em Carvalho *et al.* 2018A. Este resultado sugere que a fraca recuperação de ADN na eluição do protótipo de 21 mm deste trabalho será devida ao seu desenho.

5. Uma versão do sistema mais apertada, que aumentou a pressão na câmara de extração, foi testada. O rendimento da eluição foi de 2,70 %, sendo que o aumento da pressão neste caso não melhorou os resultados.

O cartucho necessita de ser redesenhado, suspeitando-se que o líquido poderá não estar a atravessar devidamente o filtro, deslocando-se pelos seus rebordos.