

1. Introdução

1.1. Identificação e autenticação de espécies pesqueiras

A identificação e autenticação de espécies pesqueiras tornou-se fundamental, não só devido à globalização e à introdução de novas espécies pesqueiras no mercado europeu como também, ao aumento do consumo de produtos da pesca essencialmente produtos que foram processados, como os produtos congelados, os enlatados e os filetados. Nestes produtos em que as suas características morfológicas foram adulteradas ou eliminadas, devido aos processos de fabrico, torna-se necessário a existência de métodos capazes de autenticar e comprovar que as espécies que foram embaladas são realmente as indicadas no rótulo [1, 2, 3, 4].

Outro fator que influencia e leva à necessidade de desenvolvimento destes métodos é a pesca excessiva de certas espécies com a consequente diminuição de *stocks* e venda de espécies filogeneticamente próximas. Caso que se pode verificar na comercialização do bacalhau (*Gadus morhua*), onde este pode ser substituído por espécies morfológicamente muito próximas e de menor valor comercial constituindo uma fraude para o consumidor [2, 5].

Um outro problema que pode dificultar a correta rotulagem de produtos da pesca é o facto de existirem diferentes nomes para uma espécie num mesmo país, o que se complica quando os produtos são exportados ou importados. Para contornar este problema foram criadas listas de espécies onde se encontra o nome da espécie, código da FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*), nome da família a que pertence e o nome comum dado em várias línguas [6].

Por estes motivos, surgiu a necessidade de estabelecer normas e legislação que regulem esta atividade tanto a nível nacional como internacional [2].

1.1.1. Legislação Europeia e Portuguesa

Com as recentes crises no sector alimentar, desde a “doença das vacas loucas” na década de 90, passando pelas dioxinas na Bélgica, a *Escherichia coli* no Reino Unido, a febre aftosa que teve origem no Reino Unido mas também se verificou na República da Irlanda e Holanda e os nitrofuranos a nível nacional, até ao mais recentemente problema relacionado com a utilização de carne de cavalo em preparados de carne de suíno e bovino, a confiança dos consumidores tem vindo a ser abalada. Atualmente, os consumidores têm maior consciência dos perigos relacionados com a alimentação o que

veio aumentar as exigências no processo de produção, processamento e preparação de produtos alimentares com vista a assegurar elevados padrões de segurança alimentar. Das primeiras crises resultaram, também, a necessidade de estabelecer e fazer cumprir normas de segurança alimentar rigorosas ao longo de toda a cadeia alimentar. Assim, da Comissão Europeia, em Janeiro de 2000, surgiu o Livro Branco que estabelece uma política preventiva contra eventuais riscos alimentares e estratégias de melhoria em caso de risco comprovado, aumentando a capacidade de resposta das entidades. Estabeleceu, ainda, as bases em matéria de segurança alimentar que estão inerentes no regulamento (CE) n.º 178/2002 de Janeiro de 2002, que determina os princípios e normas gerais da legislação alimentar, cria a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos e estabelece procedimentos em matéria de segurança dos géneros alimentícios [7, 8, 9, 10].

Atualmente, com o aumento da oferta global de produtos da pesca destinados ao consumo humano associado ao aumento das exigências dos consumidores na garantia de controlos de qualidade e sanitários e, também, as mudanças dos padrões consumo alimentar por motivos de saúde e nutricionais levaram ao aumento de consumo de peixe e conseqüentemente à necessidade de estabelecer regras de controlo de qualidade, sanitárias, de rotulagem e até à necessidade de existência de métodos adequados para a identificação de espécies pesqueiras de modo a, não só estar de acordo com as regras de rotulagem, qualidade e preços impostos pelos próprios países para as diversas espécies de peixe como, também evitar a substituição de espécies pesqueiras de elevado valor comercial por espécies de valor inferior, quer seja por fraude quer seja por rotulagem inadequada dos produtos [4, 11, 12]. Para tal, a Comissão Europeia elaborou o regulamento (CE) n.º 104/2000 de 17 de Dezembro de 1999 que estabelece a organização comum de mercado no sector dos produtos da pesca e da aquicultura e, no qual, estabelece que os produtos da pesca não podem ser postos para venda a retalho ao consumidor final sem possuírem na sua rotulagem a denominação comercial da espécie, o método de produção (captura no mar ou em águas interiores ou piscicultura) e a zona de captura [1, 4, 13]. Por consequência surgiu o regulamento (CE) n.º 2065/2001 de 22 de Outubro que estabelece as regras de execução do regulamento (CE) n.º 104/2000 no respeitante à informação fornecida ao consumidor no sector dos produtos da pesca e da aquicultura. E ao abrigo do regulamento (CE) n.º 104/2000, Portugal estabeleceu a lista das denominações comerciais autorizadas no seu território para os produtos da pesca e da aquicultura, primeiro pela Portaria n.º 1378/2001, de Dezembro, passando pelas Portarias n.ºs 1083/2002, 1428/2004, 473/2005 e pela Declaração de Retificação n.º 45/2005, de 9 de Junho e depois devido a alterações nas espécies já

contempladas ou inclusões de novas espécies, as denominações comerciais foram atualizadas através da Portaria n.º 587/2006, de 22 de Junho tendo o seu anexo I sido alterado pela Declaração de Retificação n.º 52/2006, de 18 de Agosto. Por fim, as alterações posteriores foram consolidadas pela Direção-Geral de Recursos Naturais (DGRM), Segurança e Serviços Marítimos na tabela em anexo e, também, definiu e traduziu a lista de zonas e subzonas de pesca da FAO [14, 15, 16, 17].

A nível nacional desenvolveu-se o Decreto-Lei n.º 134/2002 de 14 de Maio que estabelece o sistema de rastreabilidade e de controlo das exigências de informação ao consumidor a que está sujeita a venda a retalho dos produtos da pesca e da aquicultura, alterado pelo Decreto-Lei n.º 243/2003 de 7 de Outubro. O Decreto-Lei n.º 25/2005 de 28 de janeiro que veio atualizar o regime aplicável à comercialização do bacalhau e espécies afins, salgados, verdes, semi-secos ou secos e estabelece as denominações comerciais para estes [18, 19, 20].

Com a recente evolução dos mercados da União Europeia e mundial e, mais propriamente, das atividades de pesca e aquicultura, tornou-se essencial rever e atualizar as disposições presentes no regulamento (CE) n.º 104/2000. Por este motivo, entre outros, surgiu o regulamento (UE) n.º 1379/2013 de 11 de dezembro de 2013 que estabelece a organização comum dos mercados dos produtos da pesca e da aquicultura, altera os regulamentos (CE) n.º 1184/2006 e (CE) n.º 1224/2009 do Conselho e revoga o regulamento (CE) n.º 104/2000 do Conselho. No que diz respeito à informação dos consumidores o regulamento (UE) n.º 1379/2013 veio atualizar e especificar as informações obrigatórias que devem constar no rótulo dos produtos de pesca e aquicultura, sem prejuízo das disposições presentes no regulamento (UE) n.º 1169/2011 de 25 de Outubro de 2011 relativo à prestação de informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios [21, 22].

Cada vez mais as espécies pesqueiras são industrialmente processadas (fisicamente, termicamente, entre outras) o que dificulta a sua correta identificação e consequentemente a sua rotulagem, que é um requisito legal. No rótulo devem constar para além de outras informações obrigatórias exigidas pelo regulamento (UE) n.º 1379/2013, a denominação comercial da espécie e o seu nome científico. Este requisito é de igual modo importante para garantir a rastreabilidade, que também é um requisito legal, em toda a cadeia alimentar não só para o consumidor final como também para a indústria pesqueira que compra o peixe cru para utilizar na produção diversos produtos [23]. Deste modo, torna-se extremamente importante a existência de métodos que permitam a identificação de espécies pesqueiras que tenham sofrido algum tipo de processamento e que impeça a correta identificação morfológica. Para colmatar este

problema e evitar a substituição fraudulenta de espécies pesqueiras de elevado valor comercial por outras de valor inferior, criou-se métodos baseados na análise de proteínas e métodos imunológicos para a identificação de produtos da pesca. Contudo estes métodos apresentam algumas desvantagens, não são adequados para análises rotineiras pois as proteínas perdem atividade biológica depois da morte do animal e as suas características e presença dependem do tipo de célula [4]. Além disto, utilizam a fração da proteína que é solúvel em água e que pode muitas das vezes ser modificada pela ação de processos que impliquem a presença de calor [1]. Para evitar este problema recorreu-se a ferramentas moleculares, ou seja, a métodos genéticos que possuem vantagens sobre as proteínas uma vez que, o ADN é estável a altas temperaturas, está presente em todo o tipo de células, tem maior variação genética e permite a análise direta de sequências de nucleótidos de ADN nuclear ou mitocondrial. Acoplados a estes métodos estão, muitas vezes, os métodos de reação de polimerização em cadeia (*PCR*) devido à sua simplicidade, especificidade e sensibilidade em inúmeras ocasiões foram utilizados com sucesso na identificação de espécies de peixe e para evitar fraudes na rotulagem [1, 4, 12]. Assim e segundo o regulamento (UE) n.º 1379/2013 e passando a citar o ponto 23 do mesmo regulamento, “Para proteger os consumidores, as autoridades nacionais competentes responsáveis pela monitorização e a aplicação do cumprimento das obrigações estabelecidas no presente regulamento deverão usar plenamente a tecnologia disponível, incluindo testes de ADN, a fim de impedir que os operadores falsifiquem os rótulos das capturas.”.

1.2. Identificação morfológica e classificação taxonómica de gadídeos

A família dos gadídeos encontra-se dividida em centenas de espécies e pertence ao grupo de peixes bentónicos. É caracterizada pelo corpo comprido, estreitando-se de forma gradual até à cauda. As barbatanas dorsais e anais normalmente não possuem espinhos e podem estar divididas em várias partes. São peixes que se alimentam no fundo do oceano e estão unicamente dependentes das suas capacidades natatórias para caçar e fugir [24]. O bacalhau ou bacalhau-do-Atlântico (*Gadus morhua*) é um peixe pertencente à família dos gadídeos, entre outras espécies. Existem, porém, de acordo com o Decreto-Lei n.º 25/2005 de 28 de Janeiro, apenas três espécies que se podem considerar como bacalhau que são, o bacalhau ou bacalhau-do-Atlântico (*Gadus morhua*), o bacalhau-da-Gronelândia (*Gadus ogac*) e o bacalhau-do-Pacífico (*Gadus macrocephalus*), as restantes espécies são consideradas espécies afins como, o

escamudo (*Pollachius virens*), o lingue (*Molva molva*), o paloco ou juliana (*Pollachius pollachius*), o paloco-do-Pacífico ou escamudo-do-Alasca (*Theragra chalcogramma*).

Quanto à taxonomia os gadídeos classificam-se da seguinte forma [25]:

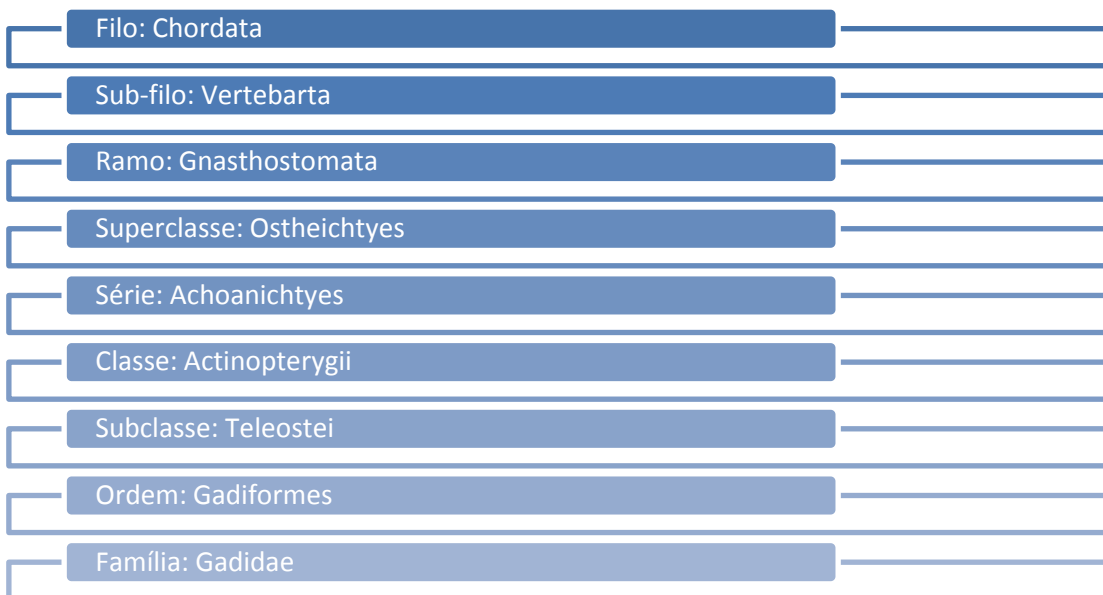


Figura 1.1 – Taxonomia dos gadídeos.

1.2.1. Caracterização morfológica e taxonômica do Bacalhau (*Gadus morhua*)

O bacalhau caracteriza-se pelo seu corpo robusto, levemente achatado de lado e estreitando para a cauda, cabeça grande que pode atingir $\frac{1}{4}$ do seu comprimento total, boca larga e com o ângulo do maxilar rasgado a atingir a parte anterior do olho, tendo o maxilar superior mais saliente do que o inferior e este possui um grande barbilho mentoniano munido de células sensoriais. Quanto às barbatanas, a dorsal é constituída por três lobos diferentes e separados, a anal com dois lobos distintos situados por baixo da segunda e terceira dorsais e as pélvicas são de dimensões pequenas. O bacalhau apresenta uma cor verde azeitona ou acastanhada, normalmente com inúmeras manchas negras arredondadas e com uma linha lateral sempre mais clara. No entanto, a coloração pode adaptar-se ao ambiente em que vive [25]. Os olhos são grandes e revestidos por uma membrana transparente. Os dentes estão presentes nos dois maxilares e no vômer, em várias camadas e não existem nos ossos palatinos. E os opérculos são angulares e os bordos livres unidos [26].

É um peixe de águas frias, capaz de viver em águas em que a temperatura varia entre 0° e 20°C mas mais abundantemente em águas com temperaturas inferiores 10°C. Habita nos mares do Hemisfério Norte, perto do círculo polar, circulando em regiões que vão desde a Terra Nova para a Islândia e Noruega. Alargando-se, ainda, para sul até ao

Golfo do Biscaia, chega a Nordeste e vai até ao cabo Hateras, a Noroeste. No estado adulto é considerado como um peixe de águas profundas, um batipelágico ou demersal. Porém, pode viver em águas de superfície, ou seja ser pelágico, devido a condições hidrográficas adversas, quando se alimenta ou desova.

Quanto à taxonomia o bacalhau (*Gadus morhua*) classifica-se da seguinte forma [25]:

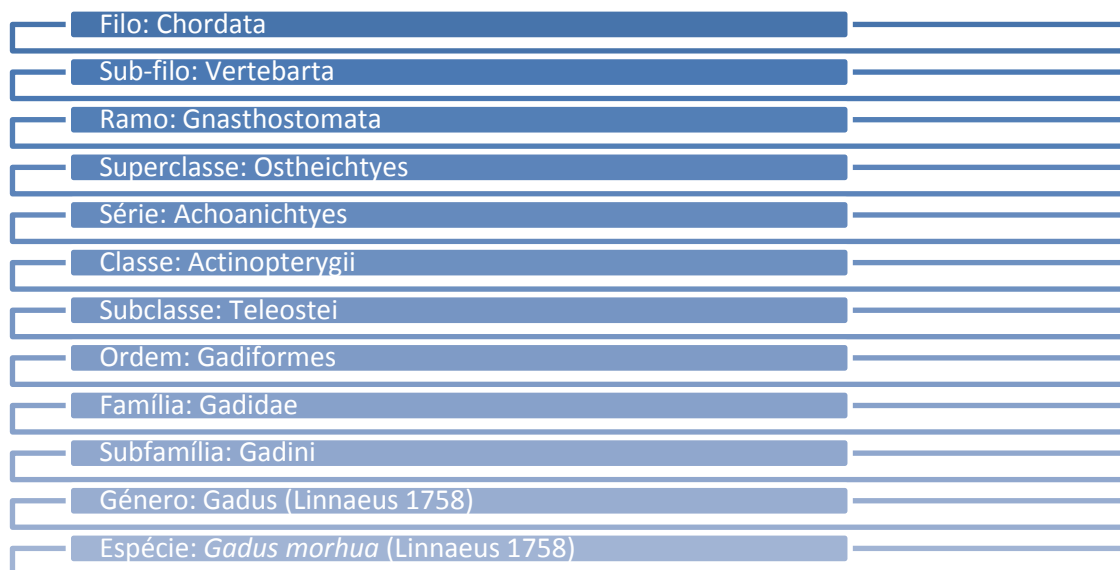


Figura 1.2 – Taxonomia do bacalhau (*Gadus morhua*).

1.3. Importância económica do Bacalhau

Não se sabe ao certo em que época os portugueses começaram a pesca do bacalhau, mas pelo tratado de 1353, assinado entre Portugal e Inglaterra, permitindo os residentes de Lisboa e Porto a pescar em Inglaterra por 50 anos é uma prova que os portugueses já pescavam o bacalhau no Atlântico Norte, na vizinhança dos mares da Noruega ricos em bacalhau, mais propriamente na Terra Nova [27]. Porém em 1748 as autoridades dinamarquesas decidiram vedar aos estrangeiros o acesso aos bancos pesqueiros da Islândia, por consequência desta medida muitos armadores faliram o que levou à falta de recursos na Europa e consequentemente a uma acentuada crise. Por este motivo, os pescadores viram-se forçados a rumar para outros territórios no Atlântico Norte que não eram controlados pelos dinamarqueses. E devido ao facto de na Terra Nova e Costa do Labrador existirem reservas abundantes de bacalhau, e também devido ao aumento da população e expansão económica que se verificou no início do século XVI na Europa, esta estava preparada para novas importações de bacalhau. Pois graças ao

desenvolvimento do sector da agricultura e das pequenas indústrias havia possibilidade de financiamento para novas expedições a zonas distantes de pesca. Associado a estes, está o facto de o bacalhau ser uma boa fonte alimentar, de fácil preservação e transporte e, também, pelo facto do comércio de produtos da pesca já estar implementado na economia europeia o que facilitou a distribuição e venda do bacalhau proveniente da Terra Nova [26].

Portugal nos séculos XVI e XVII, como vários países europeus, tinha grande interesse no comércio de bacalhau, sendo que a Coroa estabeleceu direitos alfandegários e tentou regulamentar o negócio. Apesar disso a Coroa não estava muito interessada em manter estas expedições à Terra Nova, pois estas representavam um elevado custo e risco. E a suspensão da pesca por parte de Portugal acabou por acontecer devido à perda de independência, ao assoreamento das barras de Aveiro e Viana, à pirataria e ao aumento do domínio dos mares por parte dos britânicos, esta interrupção durou até à primeira metade do século XIX. Oficialmente só em 1713, com o tratado de Utrecht, é que termina as rotas portuguesas da pesca ao bacalhau. Neste a França cedia à Inglaterra a Terra Nova e ilhas adjacentes [26]. Outro fator que levou à cessação da pesca por parte dos portugueses foi o afundamento da frota de pesca longínqua no desastre da “Invencível Armada”, após este acontecimento a pesca ao bacalhau mergulhou num vazio até 1830, ano em que se deu a anulação temporária do imposto sobre a pesca longínqua e que durou até 1842 e que a Companhia de Pescarias Lisbonense iria aproveitar para dar início à sua atividade e renascer a pesca do bacalhau, contudo viria a encerrar em 1857 [27].

Em 1866 recomeça a pesca ao bacalhau com duas empresas açorianas, Bensaúde & C.^a e Mariano & Irmãos, a monopolizarem esta atividade até 1901 por terem sido as únicas beneficiadas da redução do “imposto de pescado” prevista na portaria de 1886 e em 1903 liberalizou-se a construção e armamento de navios bacalhoeiros, dando um novo impulso a esta indústria. Contudo, até ao fim dos anos 30 a captura nacional contribuía com pouco mais de 10% para o consumo nacional de bacalhau [27].

Por altura de 1934 é criada a Comissão Reguladora do Comércio de Bacalhau (CRCB) com o objetivo de garantir ao produto, pescado por navios nacionais, uma defesa contra a concorrência excessiva do produto estrangeiro [26].

No intervalo de anos entre 1936 e 1967 o Estado Novo procurou a reorganização corporativa da indústria, que se denominou como “campanha do bacalhau” onde foi importante o Decreto-Lei n.º 2396/34. Com esta “campanha” o estado procurou estimular o aumento da oferta, controlar o crescimento das importações e dos preços de modo a evitar a sua subida e duplicou o número de navios que seguiam para a pesca do

bacalhau. No final dos anos 60 até 1982 verificou-se um declínio acentuado da pesca do bacalhau por causa da escassez do pescado e a procura do alargamento da jurisdição dos países costeiros. Mas foi em 1974 com a III Conferência das Nações Unidas sobre o Direito do Mar que se deu o maior revés na pesca longínqua [26].

Em 1986 Portugal entra na CEE e dá-se a extinção da CRCB e em concordância com isso a Política Comum de Pescas, onde Portugal fazia valer aos seus “direitos históricos” e o seu importante mercado de consumo, são transferidos para o quadro comunitário o que levou a uma quebra nas quotas e conseqüente redução das capturas e da frota bacalhoeira. Aliado a este facto, está a progressiva substituição da salga a bordo pela congelação o que tornava injustificável a existência desta frota [27].

Nos anos seguintes a 1992 a pesca ao bacalhau foi determinada pelo agravamento dos recursos e pela reorganização geográfica da atividade em 1993 quando foi criado o EEU onde a Noruega concedeu à UE uma quota de pesca na sua zona económica exclusiva (ZEE), de que Portugal usufruiu cerca de metade. Devido à escassez do bacalhau em certas zonas, como na Terra Nova e no Cabo do Labrador, o governo Canadano decidiu encerrar a pesca nestes locais [27].

Recentemente foi retirada uma prorrogação existente desde 1998 na Organização de Pesca do Atlântico Noroeste (NAFO) que permitiu retomar a pesca ao largo da ZEE do Canadá. E, de acordo com informações do Instituto Nacional de Estatística (INE) no que respeita ao estado de reservas e possibilidades de pesca em águas internacionais, verificou-se um aumento das quotas de bacalhau na Noruega e Svalbard [26].

1.4. Técnicas de autenticação e identificação de espécies

Os métodos geralmente utilizados para a identificação de espécies pesqueiras baseiam-se nas características morfológicas, quando o peixe está inteiro e fresco, como a forma do corpo, o padrão de cores, o tamanho e contagem de escamas, o número e a posição relativa das barbatanas, o número e o tipo de raios da barbatana e várias medidas relativas de partes do corpo. Contudo nem sempre as características morfológicas garantem uma identificação correta, pois as espécies podem mostrar variações intraespecíficas ou pequenas diferenças entre espécies ou podem, mesmo as características, estar ausentes devido a processos industriais como por exemplo, a filetagem e a preparação de produtos pré-cozinhados que dificultam ou tornam impossível a identificação [6].

Por este motivo, surgiu a necessidade de se desenvolver e recorrer a novos métodos para superar esta limitação. Deste modo, foram desenvolvidos métodos que se

baseiam na análise de proteínas e métodos genéticos [2]. Pois a correta identificação do pescado é muito importante, porque dela depende a sua valorização comercial como, também, o cumprimento dos requisitos legais impostos.

1.4.1. Métodos baseados na análise de proteínas

Estes métodos utilizam-se especialmente em produtos frescos e pouco processados, pois a eficiência destes métodos diminui com elevadas temperaturas visto que a estas temperaturas a integridade estrutural das proteínas é afetada e consequentemente as suas propriedades bioquímicas [2].

No músculo do pescado podem distinguir-se três grupos principais de proteínas, as sarcoplasmáticas, as miofibrilares e as do tecido conjuntivo. Onde as proteínas sarcoplasmáticas são as mais utilizadas devido a apresentarem maior variação intraespecífica, inclusive entre espécies estritamente relacionadas. Contudo, estas proteínas sofrem desnaturação por ação do calor, pelo que análise destas proteínas para a identificação de espécies em produtos que sofreram um tratamento térmico pode ser inadequada [3]. Do mesmo modo, a eficiência dos métodos baseados na análise de proteínas diminui quando se trata de produtos preparados a partir de espécies filogeneticamente próximas [2].

1.4.1.1. Eletroforese em gel de poli(acrilamida) com SDS (*SDS-PAGE*)

Esta técnica baseia-se na separação de proteínas num gel de poli(acrilamida) com dodecil sulfato de sódio (SDS) em função da sua massa molecular [2]. O SDS provoca uma carga negativa nas proteínas e interage com as regiões hidrofóbicas dividindo-as em subunidades que se separam consoante o tamanho [3].

É uma técnica simples, pouco dispendiosa e que não requer conhecimento prévio da amostra. Pode aplicar-se em produtos que tenham sofrido um processo que altere as suas propriedades físico-químicas, como a cozedura e em espécies filogeneticamente não muito próximas. Contudo não pode ser utilizada numa mistura de amostras e tem de se conhecer sempre o padrão de pesos moleculares introduzidos no gel. Sendo esta uma técnica de eletroforese unidimensional não resolve mais do que 80-100 componentes proteicos distintos num mesmo gel. Apenas é possível encontrar diferenças entre amostras com concentrações de acrilamida que separem a baixas gamas de peso molecular (67-14 kDa) [2].

1.4.1.2. Focalização isoeétrica (IEF)

Técnica onde se separa as proteínas em função do seu ponto isoeétrico. Nesta técnica consegue-se separar componentes que diferem entre si 0,001 unidades de pH, o que faz dela, provavelmente, a técnica eletroforética com melhor capacidade de distinguir proteínas [28]. É um método oficial para a identificação de espécies descrito pela AOAC (*Association of Official Agricultural Chemists*) nos anos 80. Tem uma vasta área de aplicação como, identificação de espécies pesqueiras em produtos fumados, diferenciação de espécies de gadídeos, identificação de espécies de água doce como a perca, entre outras. Apesar disto, esta técnica não pode ser utilizada em produtos que tenham sofrido tratamento térmico pois altera a estrutura das proteínas [2].

1.4.1.3. Eletroforese em gradiente de gel

Método que utiliza géis que contêm um gradiente de concentração de poli(acrilamida) e nos quais as moléculas carregadas se separam por tamanho. O gel atua como um filtro molecular e os melhores resultados obtiveram-se com gradientes de 3-40% [3].

1.4.1.4. Eletroforese capilar

Este método baseia-se nas diferenças de mobilidade eletroforéticas das substâncias analisadas dentro de uma coluna capilar muito fina de sílica a uma alta tensão elétrica [28].

Esta técnica permite analisar simultaneamente moléculas de diferente natureza química numa mesma amostra como, vitaminas, aminoácidos, glícidos, proteínas, polifenóis, etc., a única exceção são os lípidos onde não é possível analisar por eletroforese capilar. Devido ao formato da coluna e às condições verificadas nesta, os cátions de uma amostra migram para o cátodo em função da sua relação carga/massa. A presença de grupos ionizados na superfície do capilar gera um fluxo electro osmótico, como consequência produz-se um pico de moléculas neutras que migram, transportadas pelo fluxo electro osmótico, enquanto que cada molécula negativa se move para o cátodo a uma velocidade determinada pelo rácio entre o fluxo electro osmótico e a sua atração anódica.

A eletroforese capilar possui a vantagem de detetar e quantificar simultaneamente moléculas distintas e o equipamento está dotado de um sistema que elimina e limpa de

automaticamente o tampão de enchimento da coluna, permitindo analisar os vários componentes de uma amostra sem aumentar o número de manipulações. Outras vantagens são, a rapidez da análise e o pequeno volume de tampão necessário para a análise. Atualmente com a melhoria dos sistemas de detecção a sensibilidade também tem vindo a aumentar [3].

1.4.1.5. Eletroforese bidimensional (2-DE)

Combina a técnica de focalização isoeétrica com a de *SDS-PAGE*, primeira e segunda dimensão, respetivamente [2]. Este método consiste em separar as moléculas através do ponto isoeétrico e de acordo com o tamanho das moléculas. Esta técnica requer alguns cuidados com certos pré-requisitos que afetam a qualidade dos resultados como, a solubilidade das proteínas, a prevenção da degradação e modificação por atividade endógena proteolítica e remoção de substâncias interferentes se necessário [28].

1.4.1.6. Métodos cromatográficos

Baseiam-se nas diferenças de afinidade de um analito para com a fase móvel e estacionária. O princípio geral deste método é baseado nas diferentes qualidades hidrofóbicas das proteínas associado com a composição dos aminoácidos [28].

A técnica mais utilizada é a cromatografia líquida de alta eficiência (*HPLC*) mais propriamente em fase reversa (*RP-HPLC*), para a separação de proteínas solúveis e de seguida a deteção dos picos eluídos através de luz ultravioleta (UV). Separa as moléculas em função da sua hidrofobicidade e é sobretudo utilizada para analisar proteínas de baixo peso molecular (aminoácidos, péptidos e etc.) [3]. Pode, ainda, revelar diferenças significativas em proteínas sarcoplasmáticas usadas na identificação de espécies pesqueiras.

É um método que não exige muito tempo e pode ser totalmente automatizado. Por outro lado, muitas amostras podem ser danificadas durante a preparação devido à degradação ou aglutinação pela absorção de raios UV pelas proteínas sarcoplasmáticas, o seu uso é limitado a produtos frescos e não processados [28].

1.4.1.7. Espectrometria de massa (MS)

Técnica analítica de elevada sensibilidade, porém a interpretação dos espectros de massa, nos quais é possível a obter a sequência de aminoácidos, é difícil e na maioria dos casos tem de se recorrer a bases de dados de proteínas previamente caracterizadas para comparar com a informação obtida [2].

1.4.1.8. Métodos imunológicos

Métodos que se baseiam na interação antígeno-anticorpo, o que confere especificidade e sensibilidade a estas técnicas [2]. Outras das vantagens são, a simplicidade, a precisão, a capacidade de analisar simultaneamente um grande número de amostras [28], a rapidez, o baixo custo e a utilização de quantidades reduzidas de amostras [3]. Por outro lado as desvantagens são, a possibilidade de ocorrer reação cruzada entre proteínas de espécies de peixes relativamente próximos e o facto de ser necessário preparar um elevado número de anticorpos específicos torna estes métodos menos aplicáveis para avaliar uma ampla gama de espécies de peixes [28].

As técnicas mais utilizadas para a identificação de espécies pesqueiras são, a imunoelectroforese, a imunodifusão e também a ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) com diferentes modificações, são atualmente as mais aplicadas na autenticação em alimentos e, podem ser aplicada a produtos que sofreram tratamento térmico elevado. No entanto, os imunoenaios podem ser ineficazes com espécies filogeneticamente muito próximas e é necessário o desenvolvimento de anticorpos monoclonais contra a proteína específica de interesse e os anticorpos policlonais podem dar origem a reações cruzadas não específicas [2].

1.4.2. Métodos genéticos

Apesar de os métodos supracitados serem ferramentas com valor considerável em certas análises, eles não são adequados para análises rotineiras. Isto porque as proteínas perdem atividade biológica depois da morte do animal e a sua presença e características dependem do tipo de célula. Além disto, como referido anteriormente, as proteínas são termolábeis e tornam-se irreversivelmente desnaturadas quando a carne é cozinhada o que torna impossível a sua análise. Como alternativa a estes métodos foram desenvolvidos métodos de identificação baseados no ADN, visto possuir algumas vantagens sobre as proteínas como: é mais resistente e termostável, pode ser

amplificado por PCR pequenos fragmentos de ADN, está presente em quase todas as células de um organismo. Além disto, devido à degenerescência do código genético e à presença de várias regiões não codificadoras o ADN proporciona maior informação do que as proteínas [6].

Os métodos genéticos atualmente mais utilizados são aqueles que estão associados à técnica de PCR, pois com esta é possível amplificar um fragmento específico de ADN num grande número de cópias num curto espaço de tempo [2]. Podem ser utilizados para a amplificação ADN nuclear ou mitocondrial. No entanto, o ADN mitocondrial (mtADN) é mais usado pois possui vantagens sobre o ADN nuclear (nADN) como: maior quantidade de ADN e maior número de cópias em comparação com o nADN; maior resistência a tratamentos térmicos devido à sua forma esférica; mtADN é geralmente herdado da mãe pelo que os indivíduos possuem normalmente um único alelo e deste modo ambiguidades na sequência de genótipos heterozigóticos podem ser evitadas; a taxa de mutação relativamente alta, em comparação com os genes nucleares, tende a resultar na acumulação de vários pontos de mutação capazes de diferenciar até espécies muito próximas [4]. Contudo, é de realçar que o mtADN também apresenta um grau de variabilidade intraespecífica que deve ser tida em conta quando se estuda diferenças entre organismos com base num único polimorfismo.

A seleção de cada um dos métodos depende do tipo da amostra, o custo da técnica, equipamento necessário, a reprodutibilidade, a fiabilidade e a viabilidade em produtos, etc. [3]

1.4.2.1. PCR espécie-específica

Técnica que consiste no desenho de *primers* específicos que permitem a amplificação unicamente do ADN da espécie alvo, isto é, a espécie para qual se desenhou os *primers*. Desta forma só existirá amplificação se o ADN da espécie em questão estiver presente. Para tal é necessário conhecer a sequência alvo para conceber os *primers*, tanto da espécie de interesse assim como de espécies filogeneticamente relacionadas, o que pode ser uma desvantagem para o método, e verificar se existem diferenças na sequência correspondente à ligação dos *primers* entre a espécie alvo e o resto das espécies [2, 28]. Além disto, deve-se incluir controlos apropriados para evitar a possibilidade de se obter resultados falsos positivos ou falsos negativos [6].

Por outro lado, é uma técnica de relativo baixo custo, não necessita de muito equipamento e permite combinar vários *primers* espécie-específicos numa mesma reação – PCR multiplex – permitindo a identificação de várias espécies simultaneamente [2].

1.4.2.2. PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

O método consiste em cortar um fragmento amplificado em fragmentos mais pequenos de diferentes tamanhos, através de endonucleases que reconhecem sítios específicos de restrição. Estes fragmentos são depois separados por eletroforese em gel de agarose. É um método simples, robusto, fácil de utilizar e barato. Além disto, um único par de *primers* pode dar origem a um fragmento que pode ser usado para a identificação de várias espécies através da escolha criteriosa das enzimas de restrição.

Contudo, este método também possui algumas desvantagens que são, ocasionalmente pode ocorrer a digestão incompleta, a variação intraespecífica pode apagar ou criar zonas de restrição adicionais e a sua dependência em enzimas de restrição requer conhecimento prévio da amostra a analisar [6].

1.4.2.3. PCR-SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*)

Baseia-se na relação entre a mobilidade eletroforética de uma cadeia simples de ADN e as suas conformações dobradas, ou seja, a sequência de nucleótidos. O produto amplificado é desnaturado numa cadeia simples e processado por eletroforese num gel não desnaturante de poliacrilamida. É uma técnica rápida e fácil de utilizar. Para além disto, porque alterações numa única base de uma sequência podem resultar em conformações diferentes até espécies relativamente próximas podem ser discriminadas com precisão, mesmo utilizando fragmentos muito pequenos [6]. E ainda possui as seguintes vantagens: a possibilidade de analisar ADN degradado; ao contrário de técnicas como RAPD ou RFLP apenas algumas bandas precisam ser examinadas por esta técnica; e apesar de ser uma técnica muito sensível a alterações de bases, a variabilidade intraespecífica de padrões é menos problemática do que a obtida por outros métodos.

Contudo, há que ter em conta vários fatores para a utilização desta técnica como, a utilização de *amplicons* mais curtos (< 300 bp) em detrimento dos mais longos, pois possui duas vantagens sobre estes: diferenças na sequência de nucleótidos resultam em alterações significativas de conformação e a variabilidade intraespecífica dos padrões de ADN é expectável que seja inferior no entanto o tamanho do fragmento e a sequência contexto (a sequência de ADN adjacente) podem ter efeitos imprevisíveis nas mudanças de mobilidade associados com alterações de base; a temperatura, a concentração de glicerol, o tipo de solução desnaturante, a concentração de tampão, a concentração do gel e etc. são outros fatores a ter em conta. Além disto, a eficiência deste método

depende muito da sequência e por isso pode variar significativamente de fragmento para fragmento [4]. Assim, este método apresenta 3 grandes desvantagens: a necessidade de correr referências e amostras lado a lado no mesmo gel, variabilidade intraespecífica pode resultar em diferentes conformações que levam uma identificação incorreta, e por vezes são visíveis mais de duas bandas, diferindo na intensidade [6].

1.4.2.4. *PCR-RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)*

Esta técnica consiste na amplificação de fragmentos aleatórios de ADN genómico por *PCR* utilizando para tal um *primer* de sequência curta e arbitrária [6]. E a informação obtida por este vai da diferenciação a nível individual ou das espécies [4].

As vantagens de usar este método são, não necessita de conhecimento prévio da sequência de ADN, atinge várias sequências no ADN da amostra produzindo padrões de ADN que permitem a comparação de vários *loci* simultaneamente, a simplicidade, relativo baixo custo e não requer grande quantidade de amostra.

Por outro lado, apresenta as seguintes desvantagens: pode não ser prático para identificar espécies de origem em produtos com várias espécies e não é adequado para analisar material severamente degradado, o que pode limitar a sua aplicação na análise de alimentos [4].

1.4.2.5. *PCR-DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)*

Técnica que se baseia na separação de fragmentos amplificados por *PCR* do mesmo tamanho mas de diferentes sequências. Isto ocorre pois estes fragmentos podem ser separados num gel de gradiente de desnaturação baseado no seu perfil diferencial de desnaturação. Neste gel, fragmentos de ADN de cadeia-dupla são sujeitos a um aumento do ambiente de desnaturação à medida que vai aumentando a concentração de agentes de desnaturação (como a ureia) e vão encontrando regiões de fusão (*melting*). A temperatura de *melting* nestas regiões é sequência-específica. E uma vez alcançada a temperatura de *melting* da região de fusão mais baixa, uma parte do fragmento fica parcialmente derretida criando moléculas ramificadas. Por consequência isto reduz a mobilidade do ADN no gel de acrilamida. Deste modo, fragmentos de ADN com o mesmo tamanho mas diferentes composições nos pares de base vão mostrar respostas distintas ao gradiente de desnaturação. As diferentes sequências dos fragmentos de ADN possuem regiões de *melting* com diferentes valores de temperatura de *melting*, que vão correr distâncias diferentes no DGGE [6].

1.4.2.6. AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*)

Esta técnica define-se como uma combinação das técnicas RFLP e RAPD. E começa por fazer a digestão completa do ADN genómico utilizando duas enzimas de restrição, uma com uma sequência mais curta que corta mais frequentemente e outra com sequência mais longa que corta com menor frequência. As enzimas usualmente mais usadas nesta técnica são a MseI (sequência de reconhecimento de 4 bp) e a EcoRI (sequência de reconhecimento de 6 bp) [29]. Às extremidades dos fragmentos resultantes unem-se sequências de nucleótidos de menor dimensão conhecidas, designadas por adaptadores. Isto permite, posteriormente, a amplificação por PCR com primers cuja sequência é compatível com os adaptadores e com a sequência das enzimas de restrição. Para finalizar, analisam-se os produtos de PCR num gel de agarose ou poliacrilamida.

A maior vantagem da técnica AFLP é o grande número de polimorfismos que se pode detetar e o facto de não ser necessário um conhecimento prévio das sequências a analisar [2].

1.4.2.7. FINS (*Forensically Informative Nucleotide Sequencing*)

A identificação de espécies através desta técnica realiza-se através da amplificação por PCR de um fragmento específico de ADN, onde a sequência de nucleótidos é determinada e, em seguida, comparada com sequências relacionadas numa base de dados através da análise filogenética. A sequência que apresentar menor distância genética ou menor número de substituições de nucleótidos do fragmento alvo representa o grupo de espécies ao qual a amostra original pertence. Usualmente para fazer a análise filogenética combina-se dois modelos matemáticos: o método Tamura-Nei para o cálculo das distâncias genéticas entre sequências e o método Neighbor-Joining para construir a árvore filogenética com base em diferenças genéticas.

Uma vez que, a técnica FINS, baseia-se na substituição de nucleótidos na sequência é importante escolher um fragmento que exiba alta variabilidade inter-espécies e baixa intra-espécies de modo a evitar ambiguidades na identificação de espécies [29].

1.4.2.8. *Microarrays*

Método, também conhecido por *DNA chips*, que usa lâminas microscópicas de vidro onde são colocadas sondas de oligonucleótidos que são complementares com a

sequência de ADN-alvo a ser analisada. O ADN-alvo, que normalmente é marcado com fluoróforo durante a amplificação por PCR, hibrida com a sonda de oligonucleótidos e pode ser detetado após lavagem através do fluoróforo. Esta técnica permite a análise de misturas complexas de produtos de PCR e, possivelmente, a identificação de centenas ou, mesmo, milhares de espécies em simultâneo [6].

1.4.2.9. PCR a tempo real

É um método de amplificação e quantificação simultânea de ADN, onde uma molécula repórter fluorescente é inserida na mistura de ensaio o que vai possibilitar a quantificação dos produtos da reação de PCR após cada ciclo uma vez ultrapassado um limiar. Esta molécula é um oligonucleótido que possui corante fluorescente ligado à extremidade 5' e um inibidor fluorescente ligado à extremidade 3' e é desenhado para ligar-se a uma posição entre dois *primers*. Ao longo da amplificação, a atividade exonuclease 5'-3' da polimerase Taq digere a sonda e liberta a molécula repórter e, em seguida, emite fluorescência. A fluorescência produzida é proporcional à quantidade do produto amplificado durante o PCR [6]. A utilização da fluorescência para a deteção elimina a necessidade de procedimentos pós-PCR, como a eletroforese em gel, entre outros.

A técnica de PCR a tempo real em comparação com as técnicas de PCR convencionais qualitativa apresenta uma série de vantagens. Das quais se podem destacar, o facto de a fluorescência poder ser medida ao longo do PCR, fornecendo uma análise a tempo real da cinética da reação e possibilitando deste modo a quantificação de alvos específicos de ADN; menor potencial de contaminação da mistura de PCR com o ADN alvo, pois a reação ocorre em tubos fechados; além disto, o ciclo limiar é observado quando a amplificação por PCR está ainda na fase exponencial e nenhum dos componentes da reação está limitado [4].

1.5. Identificação/autenticação através da utilização da técnica PCR – RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

Técnicas baseadas no método de PCR, como *multiplex PCR*, *FINS*, *PCR-RFLP*, *PCR-RAPD*, *PCR-AFLP* e *PCR-SSCP*, têm sido utilizadas com sucesso na identificação de espécies pesqueiras de entre as quais se pode enumerar os gadídeos, os salmonídeos, os escombrídeos, os bivalves, entre outras, devido ao facto de esta

metodologia ser rápida, sensível e específica [5]. Para além disto, testes baseados na técnica de PCR podem ser realizados com quantidades inferiores de material às utilizadas noutras técnicas baseadas na análise de ADN, como a hibridação do ADN, isto deve-se ao passo de amplificação que ocorre nesta técnica. E, ainda, ao facto de normalmente não ser necessário amostras de ADN altamente purificado, contudo as amostras devem ser isentas de contaminantes que possam inibir a reação [4]. Por estes motivos, métodos baseados nesta metodologia são usados em determinação de outros (como os métodos proteicos, os cromatográficos ou mesmo métodos baseados na análise de ADN) para a identificação de espécies em produtos termicamente processados e amostras conservadas em condições desfavoráveis [30].

Entre as diversas técnicas disponíveis baseadas na metodologia de PCR, a técnica de PCR-RFLP constitui uma opção fiável para controlos de qualidade e para os laboratórios das indústrias do sector alimentar, pois é uma metodologia útil e que pode ser utilizada numa gama de cenários distintos como, a autenticação de espécies em produtos termicamente processados, a deteção de componentes alimentares e, também, a identificação de indivíduos cujas características morfológicas, que permitem a diferenciação entre a espécie ou grupos de espécies, foram removidas. Por estes motivos, esta técnica tem sido utilizada com sucesso na identificação/autenticação de várias espécies pesqueiras [5].

A técnica de *PCR-RFLP* baseia-se na amplificação de uma sequência conhecida de ADN através de dois *primers* (oligonucleótidos) específicos, conseqüentemente os fragmentos amplificados são cortados pelas endonucleases que reconhecem locais específicos de restrição. Estes fragmentos são, de seguida, separados em gel de agarose por eletroforese e comparados [6]. Atualmente é um dos métodos mais utilizados para a identificação de espécies pesqueiras devido ao facto de ser um método simples, robusto, fácil de usar e barato quando comparado com outros métodos, como o *PCR-sequencing*. Outra vantagem associada a esta técnica é, que um único par de *primers* pode produzir um fragmento que pode ser utilizado na identificação de diversas espécies de forma criteriosa pelas enzimas de restrição. Um fator importante para o sucesso da identificação de espécies de peixes através deste método é o número de espécies incluídas na análise [5].

Contudo, este método também possui algumas desvantagens como a possibilidade de ocorrer a digestão incompleta, a variabilidade intraespecífica poder apagar ou adicionar sítios de restrição e a qualidade do ADN necessária para efetuar análises de identificação de espécies. Para além disto, é necessário um conhecimento prévio da amostra a analisar devido à dependência de enzimas de restrição [6].

Como referido na literatura a maioria dos estudos realizados nesta área foram efetuados através das técnicas anteriormente referidas, onde a técnica de PCR-RFLP está incluída [6,29]. Esta quando utilizada com o citocromo *b* mitocondrial (mt cyt *b*) identificou com sucesso diversos peixes e produtos da pesca como, os escombrídeos [43], os gadídeos [5, 31], os salmonídeos [6], entre outros. Isto porque a sequência do cyt *b* apresenta uma relativamente elevada variação inter-espécie e baixa variação intra-espécie o que permite a diferenciação mesmo entre espécies relativamente próximas.

Como exemplos de estudos que utilizaram a técnica de PCR-RFLP temos na literatura, entre outros, a publicação de Aranishi, Okimoto, e Izumi (2005) que identificaram 3 espécies de gadídeos, *Theragra chalcogramma*, *Gadus macrocephalus* e *Gadus morhua*, através do método PCR-RFLP. Para a amplificação por PCR de um fragmento de 558 pb do citocromo mitocondrial *b* foram desenhados *primers* universais para os gadídeos e para a análise por PCR-RFLP foram utilizadas as enzimas de restrição Eco321I e Eco105I dando origem a padrões específicos de restrição para cada espécie, observando-se assim 3 fragmentos (106 pb, 161 pb e 291 pb) para o *Theragra chalcogramma*, 2 fragmentos (106 pb e 452 pb) para o *Gadus macrocephalus* e nenhuma clivagem foi observada para o *Gadus morhua*. O método aplicado neste estudo permitiu a correta identificação das 3 espécies [31]. Calo-Mata e colaboradores (2003) identificaram espécies da família dos gadídeos com base em técnicas genéticas, entre as quais o PCR-RFLP. Neste caso utilizou-se os *primers* descritos por Kocher e colaboradores (1989) para amplificar a uma região de 464 pb do citocromo *b* e na análise de restrição usaram-se as enzimas Dde I, Hinc II e Nla III para identificação das 17 espécies de gadídeos, o que permitiu a diferenciação de todas espécies em estudo excepto o *Gadus ogac* e o *Gadus macrocephalus* uma vez que as sequências eram idênticas [5]. Comi e outros investigadores (2005) utilizaram métodos baseados na técnica de PCR, entre as quais a PCR-RFLP, para diferenciar espécies utilizadas na produção de produtos de bacalhau. As oito espécies utilizadas neste estudo foram, *Gadus morhua*, *G. macrocephalus*, *G. ogac*, *Molva molva*, *Melanogrammus aeglefinus*, *Brosmi brosme*, *Pollachius virens* e *Theragra chalcogramma*. Os *primers* utilizados para a amplificação do fragmento do citocromo *b* foram os descritos por Barlet e Davidson (1991) (cytB1: 5'-CCATCCAACATCTCAGCATGAGAAA-3 e cytB2: 5'-CCCCTCAGAATGATATTTGTCCTC-3'), para as análises de restrição utilizaram-se as seguintes enzimas: NlaIII, NlaIV, RsaI, TaqI, FokI, AluI e EcoRV contudo, aquando a realização das análises por RFLP, só com as enzimas de restrição NlaIII e RsaI foram obtidas diferenciações adequadas. A combinação destas enzimas permitiu a diferenciação de 6 das 8 espécies em estudo neste trabalho. As espécies não

identificadas foram as pertencentes ao género *Gadus* e *T. chalcogramma*, pois apresentaram sempre o mesmo padrão de restrição não permitindo assim a identificação com base no protocolo utilizado [11]. Di Finizio e colaboradores (2007) aplicaram a técnica PCR-RFLP para identificar sete espécies da família dos gadídeos, nomeadamente *Gadus morhua*, *Trisopterus minutus capellanus*, *T. minutus minutus*, *Molva elongata*, *Phycis blennoides*, *Micromesistius poutassou* e *Theragra chalcogramma*. A amplificação por PCR dos fragmentos pertencentes ao gene mitocondrial 12S e 16S rRNA, de tamanhos entre os 430 e 630 pb respetivamente, foi levada a cabo utilizando os seguintes primers: 5'-AAACTGGGATTAGATACCCCACTAT-3' (12Sa) e 5'-GAGGGTGACGGGCGGTGTGT-3' (12Sb) para o gene 12S rRNA e 5'-GCCTGTTTATCAAAAACAT-3' (16Sar) e 5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3' (16Sbr) para o gene 16S rRNA. Os produtos obtidos da amplificação por PCR foram sujeitos a digestão pelas enzimas de restrição. Para os produtos amplificados a partir dos genes 16S rRNA usaram-se as enzimas MvaI e Bsh1285I e para os amplicons do gene 12S rRNA as enzimas SmaI, HpaI e Bsh1636I. Na identificação das sete espécies em estudo, as enzimas utilizadas na análise de restrição para o gene 16S rRNA demonstraram resultados mais fiáveis e convincentes quando comparados com os resultados obtidos pelas enzimas de restrição do gene 12S rRNA [32]. Dooley e outros (2005) identificaram 10 espécies de “peixes brancos” (*Gadus morhua*, *Gadus macrocephalus*, *Pollachius virens*, *Melanogrammus aeglefinus*, *Merluccius merluccius*, *Merluccius paradoxus*, *Pleuronectes platessa*, *Merlangus merlangus*, *Theragra chalcogramma*, *Macruronus novaezelandiae*) utilizando a técnica PCR-RFLP para o citocromo mitocondrial b, os primers utilizados para a amplificação por PCR foram os seguintes: L14735 (5'-AAAACCCACCGTTGT TATTCAACT A-3') e H15149 (5'-GCICCTCARAATGAYATTTGTCCTCA-3') e as enzimas de restrição utilizadas foram a DdeI, a NlaIII e a HaeIII. A primeira (DdeI) permitiu diferenciar 8 espécies, quando combinada com a NlaIII e a HaeIII obtiveram perfis específicos para todas as 10 espécies [33]. Wolf e colaboradores (2000) amplificaram uma parte específica do genoma mitocondrial (tRNA^{Glu}/citocromo b) através da técnica de PCR e identificaram várias espécies de peixes, incluindo *Gadus morhua*, *Pollachius virens* e *Melanogrammus aeglefinus*, a partir do método de PCR-RFLP. A amplificação foi conseguida com auxílio dos primers L14735 (aaa aac cac cgt tgt tat tca act a) e H15149ad [adaptado para o peixe] (gcN cct caR aat gaY att tgt cct ca) e a distinção entre as diversas espécies, dos fragmentos de 464 pb obtidos por PCR, foi realizada utilizando 10 diferentes enzimas de restrição, das quais 8 permitiram obter padrões de restrição razoáveis e a aplicação de 4

enzimas de restrição (NlaIII, DdeI, HaeIII e MboII) permitiram a diferenciação das 23 espécies em estudo [34].

Estes estudos demonstraram que o *PCR-RFLP* é adequado para autenticação de espécies e espécies relativamente próximas, amostras com várias espécies e amostras que sofreram diversos processos de transformação, incluindo a esterilização por calor [30].

1.6. Problemática da identificação de espécies em alimentos por PCR – RFLP

Tal como mencionado anteriormente, esta técnica possui alguns aspetos que se revelam menos vantajosos durante o processo de identificação de produtos da pesca. Uma das maiores dificuldades verificadas é a possibilidade de variação intra-espécie, na qual indivíduos da mesma espécie exibem diferentes padrões de restrição devido à degenerescência existente no fragmento a ser analisado. De modo a evitar estes falsos negativos, deve-se analisar uma grande quantidade de indivíduos da mesma espécie para verificar que não há polimorfismo intra-espécies nos locais alvos. Outro problema verificado é que não há garantia de que em todas as espécies vão resultar padrões únicos de restrição. Por consequência, amostras desconhecidas que contenham espécies que ainda não foram analisadas, por PCR-RFLP, podem ser falsamente identificadas se o seu perfil de restrição coincidir com o de uma espécie previamente analisada.

Para mitigar estas limitações, que o método de PCR-RFLP apresenta na identificação de espécies, é aconselhável verificar se existe informação considerável sobre polimorfismo na sequência da espécie ou entre grupos de espécies. E uma das soluções aplicadas para minimizar os problemas, anteriormente referidos, é o uso de pelo menos dois sítios diagnóstico de restrição [29].

Para além disto, a identificação de espécies em produtos da pesca transformados também é considerada como um dos fatores que contribuem para o insucesso da técnica, pois a qualidade do ADN necessária para a autenticação de produtos alimentares é um fator muito importante no desenvolvimento deste tipo de análises. E as temperaturas elevadas utilizadas durante o processo de transformação, como por exemplo nas conservas, degradam o ADN o que pode reduzir o tamanho do fragmento de ADN desses produtos. Consequentemente torna-se mais difícil obter um fragmento superior a 120bp, o que se deve ter em conta aquando o processo de desenvolvimento de testes para analisar produtos transformados e adaptar-se o tamanho do fragmento amplificado de acordo com esta situação [35]. Acrescentando, a estas desvantagens, o método de PCR-

RFLP consiste em executar vários passos, incluindo uma separação por eletroforese, o que torna este método dispendioso em termos de tempo.

A necessidade de recorrer a sequências de bancos de dados internacionais, como o *GenBank*, pode também contribuir para o fracasso da técnica pois as sequências depositadas nestes bancos de dados podem ser erradas ou falsas, devido a erros de sequenciação e de identificação das espécies-alvo, por problemas laboratoriais pois as reações de PCR são facilmente contaminadas por ADN de outros organismos ou ADN presente no laboratório e, também, por identificação incorreta de tubos o que pode levar à atribuição de sequências erradas a espécies. Estas falsas sequências podem também ter origem nos pseudogenes mitocondriais nucleares aquando do desenvolvimento de métodos de identificação com base no genoma mitocondrial. Estes pseudogenes são cópias de origem mitocondrial inseridos no núcleo com elevado grau de similaridade com sequências de ADN mitocondrial, que podem ser amplificados inadvertidamente por PCR em conjunto com o ADN mitocondrial alvo ou mesmo no lugar deste, o que leva a erros. Outro problema pode ser que um mesmo nome científico possa referir-se a grupos moleculares muito divergentes [6].

Concluindo, esta técnica não é adequada para análises simultâneas de um vasto número de diferentes nucleótidos de polimorfismo único (*SNPs* – estão, normalmente, associados à criação ou remoção de locais de reconhecimento de enzimas de restrição), devido à necessidade de haver um par específico de *primers* e uma enzima de restrição para cada *SNP*, o que limita a sua utilidade em análises de alto rendimento [36].

Em resumo, a técnica de PCR-RFLP exhibe algumas desvantagens que constituem problemas para a identificação de espécies entre as quais podemos enumerar, a possibilidade de variação intra-espécie, a falta de garantia de que em todas as espécies vão resultar padrões únicos de restrição, a qualidade do ADN necessária para a autenticação de espécies em produtos alimentares, é um método relativamente dispendioso em termos de tempo, sequências retiradas de bancos de dados internacionais podem ser falsas e conduzir a resultados erróneos e não é adequada para análises simultâneas de um vasto número de diferentes nucleótidos de polimorfismo único.

1.7. Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese consiste na separação de moléculas ionizadas de acordo com a carga elétrica e o peso molecular. Moléculas carregadas negativamente migram para o polo positivo (ânodo) e moléculas com carga positiva migram para o polo negativo

(cátodo). Esta migração ocorre devido a um desequilíbrio elétrico provocado nas extremidades de um meio constituído por uma substância que tem o potencial para migrar, isto porque a corrente elétrica ao passar é conduzida pelos iões presentes na solução e estimula o deslocamento das moléculas. Neste caso, por se tratar de ácidos nucleicos e por estes terem carga negativa, devido ao grupo fosfato, migram sempre para o polo positivo.

Na eletroforese em gel de agarose o sistema tampão utilizado é constituído pelo tampão usado na preparação do gel e o tampão da cuba eletrolítica, aquando da seleção do tampão há que ter em conta a capacidade de tamponamento. Para a separação de moléculas de ADN através de eletroforese os tampões mais utilizados são o TAE (tampão tris-acetato-EDTA) e o TBE (tampão tris-borato-EDTA), que são diferenciados pelo efeito que causam na mobilidade das moléculas de ADN. Para além disto, o TAE consome-se mais rapidamente em reações longas ou com alta voltagem e o TBE possui melhor capacidade tampão, mas deve ser evitado para purificação de ADN de géis [37].

A separação das moléculas de ADN em gel ocorre com base nas diferenças de peso molecular, pois todos os ácidos nucleicos, de um modo geral, possuem aproximadamente uma densidade de carga por base apesar da conformação da molécula ser, geralmente, semelhante [37]. Daqui advém que a penetração no gel é proporcional ao peso molecular, ou seja, moléculas com um peso molecular maior migram mais lentamente que as moléculas de peso molecular inferior [3]. Enquanto a mobilidade é inversamente proporcional ao logaritmo do peso molecular [37].

Além do peso molecular existem outros parâmetros que afetam a migração do ADN no gel de agarose que são a concentração de agarose no gel, a conformação do ADN e a intensidade de corrente aplicada. A concentração de agarose afeta de forma direta a migração eletroforética, ou seja, quanto maior a concentração de agarose mais lenta é a migração, assim torna-se importante adaptar a concentração de agarose ao tamanho das moléculas de ADN a separar. Quanto à conformação do ADN por haver três conformações possíveis diferentes, estas também vão influenciar de formas diferentes a migração das moléculas de ADN no gel de agarose. As conformações podem ser ADN circular fechado (*cccDNA – covalently closed circular DNA*), ADN circular com uma quebra numa ligação fosfodiéster (*nicked*) ou ainda ADN linear em cadeia dupla (*dsDNA – double stranded DNA*). Em condições normais a forma de ADN circular fechado migra de uma forma mais rápida que fragmentos de tamanhos semelhantes de ADN linear em cadeia dupla, pelo facto da conformação circular possuir menor raio hidrodinâmico devido aos super-enrolamentos. Na forma de ADN com uma quebra numa ligação fosfodiéster devido a esta quebra o enrolamento desaparece o que leva a que esta forma seja a mais

em lenta em eletroforese [38]. Por outro lado, a intensidade da corrente aplicada no meio também é um fator importante na separação de moléculas de ADN, pois em geral as moléculas de ADN migram a uma velocidade proporcional à voltagem aplicada. Assim, ao aumentar a voltagem os fragmentos de maiores dimensões tendem a migrar mais rapidamente do que fragmentos menores. O que faz com que voltagens maiores sejam menos eficazes para separar fragmentos de ADN de grandes dimensões, deste modo para separar estes fragmentos o ideal é realizar uma eletroforese a baixa voltagem e com baixa concentração de agarose [37].

2. Alinhamento, desenho dos *primers* e identificação de enzimas de restrição para identificação de espécies de peixes da família dos gadídeos utilizando a técnica de PCR-RFLP

2.1. Alinhamento das sequências de ADN

Por forma a proceder-se ao desenho dos *primers* primeiramente foram analisadas várias sequências do gene que codifica o citocromo *b* mitocondrial pertencentes a diversas espécies da família dos gadídeos, de entre as quais foram escolhidas para este estudo as seguintes espécies: *Gadus morhua* (Bacalhau/Bacalhau-do-Atlântico), *Gadus macrocephalus* (Bacalhau-do-Pacífico), *Theragra chalcogramma* (Escamudo-do-Alasca/Paloco-do-Pacífico), *Pollachius virens* (Escamudo) e *Micromesistius poutassou* (Verdinho). Estas sequências foram retiradas da base de dados *GenBank* do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) e analisadas por forma a verificar as regiões mais adequadas para o desenho dos primers e a similaridade existente entre cada sequência. O fragmento escolhido corresponde a uma região de amplificação prevista de 332 pb. As sequências de ADN consideradas neste estudo foram as seguintes:

```
>gi|490673187|gb|KC128865.1| Gadus morhua cytochrome b (cytb) gene, partial cds;
mitochondrial
CAAGAACCTTAATGGCCAGCCTTCGGAAAACCCATCCAATCCTAAAAATTGCTA
ATAGCGCATTAGTTGA
TCTCCCCGCCCCCTCCAATATCTCAGTATGATGAAATTTGGCTCTCTTCTAGGC
CTTTGCTTAATTACT
CAACTTCTAACAGGACTATTTCTAGCCATACACTATACCTCAGACATCGAGACA
GCCTTCTCATCCGTAG
TCCACATCTGTCGTGATGTAAACTACGGCTGACTAATTCGGAATATACATGCTA
ATGGTGCCTCTTTCTT
TTTCATTTGTCTTTATATGCACATTGCCCGAGGTCTCTATTATGGTTCCTATCTTT
TTGTAGAGACATGA
AACATCGGGGTTGTCCTTTTCTTTTAGTAATAATAACCTCTTTCGTAGGTTACG
TCCTTCCC
```

>gi|99653703|dbj|AB248658.1| Gadus macrocephalus mitochondrial Cytb gene for cytochrome b, partial cds, isolation_source: East Sea of Hokkaido

ATGGCCAGCCTTCGGAAAACCCATCCAATCCTAAAAATTGCTAATAGCGCATTAGTTGATCTCCCCGCC
CCTCCAATATTTAGTATGATGAAATTTTGGCTCTCTTCTAGGCCTTTGCTTAATTACTCAACTTCTAAC
AGGACTATTTCTAGCTATACTACACCTCAGACATCGAGACAGCCTTCTCATCCGTAGTCCACATCTGT
CGTGATGTAAATTACGGTTGACTTATTCGGAATATACATGCTAACGGTGCCTCTTCTTTTTTATTTGTC
TCTATATACATATTGCCCGAGGCCTCTATTATGGCTCTTATCTTTTTGTAGAAACATGAAACATCGGGGT
TGTCCTTTTCCTTTTAGTAATAATAACCTCTTTTCG

>gi|239938950|gb|GQ148785.1| Theragra chalcogramma cytochrome b (CYTB) gene, partial cds; mitochondrial

AAAACCACCGTTGTTATTCAACTACAAGAACCTTAATGGCCAGCCTTCGGAAAACCCATCCAATCCTAAA
AATTGCTAATAGCGCATTAGTTGATCTCCCCGCCCCCTCCAATATTTAGTATGATGAAATTTCCGGCTCT
CTTCTAGGCCTTTGCTTAATTACTCAACTTCTAACAGGACTATTTCTAGCCATACACTATACCTCAGATA
TCGAAACGGCCTTCTCATCCGTAGTTCACATCTGTTCGTGATGTAAATTACGGCTGACTAATTCGGAATAT
ACATGCTAATGGTGCCTCTTTCTTTTTTCATTTGTCTTTACATGCATATTGCCCGAGGTCTCTATTACGGC
TCTTATCTTTTTGTAGAAACATGAAACATCGGAGTTGTTCTTTTCCTTTTAGTAATAATGACCTCTTTTCG
TAGGTTACGTTCTTCCCTGAGGACAAATATCATTCTGAGG

>gi|6318646|gb|AF165082.1| Pollachius virens cytochrome b gene, partial cds; mitochondrial gene for mitochondrial product

CAAGAACCTTAATGGCCAGCCTTCGGAAAACCCATCCAATCCTAAAAATTGCTAATGACGCACTAGTTGA
TCTCCCCACCCCCTCTAATATCTCAGTATGATGAAACTTTGGCTCCCTTTTAGGCCTTTGCTTAATTACT

CAACTTCTAACAGGACTATTTCTAGCCATACACTACACTTCAGACATTGAGACA
GCCTTTTCGTCTGTGG
TTCATATTTGCCGTGATGTAAATTACGGCTGATTAATTCGAAATATGCACGCCAA
TGGCGCTTCTTTCTT
CTTTATTTGCCTTTATATGCATATTGCTCGAGGACTTTATTACGGCTCTTATCTCT
TTGTAGAAACATGA
AATATCGGGGTTGTTCTCTTCTTTAGTTATAATAACCTCTTTCGTAGGTTACGT
TCTCCCTGAGGAC
AAATATCATTCTGAGGGGCTACCGTAATTACAAACCTAATGTCCACTGTCCCCTAT
GTAGGTGATGCCTT
AGTCCAATGAATCTGGGGAGGTTTCTCAGTAGATAACGCCACCCTGACGCGGTTTC
TTTGCATTCCATTTT
TTATCCCCTTTGTTGTTGCTGCTTTTACAATACTCCATCTGCTTTTTCTCCATGAA
ACAGGCTCAAATA
A

>gi|490673207|gb|KC128872.1| Micromesistius poutassou cytochrome b (cytb) gene,
partial cds; mitochondrial

CAAGAACCTTAATGGCCAGCCTTCGGAAAACCCACCCAATCCTAAAAATTGCTA
ATGACGCACTAGTTGA
TCTCCCGCCCCCTCTAACATCTCAGTATGATGAACTTTGGCTCTCTCCTAGGC
CTTTGCTTGGCTACT
CAGCTTCTAACAGGGCTCTTTCTAGCCATACACTATACTTCAGATATCGAAACA
GCTTTCTCGTCCGTAG
TCCACATCTGCCGCGATGTAAATTACGGCTGATTAATCCGAAATATGCACGCTA
ACGGTGCCTCTTTCTT
CTTTATTTGCCTTTATATACATATCGCCCGAGGGCTCTACTACGGCTCTTATCTTT
TTGTGGAGACATGA
AATATCGGAGTTGTTCTTTCTTCTAGTAATAATAACCTCTTTCGTAGGCTACGT
CCTCCCC

Depois de analisadas as várias sequências, estas foram alinhadas através do programa *Clustal Omega*. As regiões onde as sequências são homólogas e conhecidas estão assinaladas a negrito, tendo sido alinhadas para permitir os procedimentos subsequentes de desenho dos oligonucleótidos de iniciação (primers) e seleção de enzimas de restrição.

2.2. Desenho dos oligonucleótidos de iniciação (*primers*)

A obtenção de *primers* que possibilitem a amplificação do ADN e assim a correta identificação de espécies torna-se muito importante quando se trata de rotulagem inadequada, quer seja por engano quer seja por rotulagem fraudulenta intencional, ou seja, substituição de espécies de valor comercial superior por espécies de valor inferior o que permite ganhos económicos através de uma via ilegal. Por exemplo, o bacalhau-do-Atlântico possui um valor económico superior ao bacalhau-do-Pacífico [45], logo possui maior suscetibilidade para ser substituída por outras espécies de valor comercial inferior isto é, substituído por espécies afins do bacalhau mas que são rotulados como se tratassem de uma espécie com maior importância comercial. Portanto, é essencial garantir que os *primers* desenhados permitam que a reação de PCR ocorra e amplifique a amostra de ADN.

A sequência de nucleótidos anteriormente obtida através do alinhamento foi introduzida no programa de desenho OligoCalc e serviu de base para o desenho dos seguintes pares de *primers*:

Hip1_FWD: GAAAACCCACCCAATCCTAAA

Hip1_REV: CCGATATTTTCATGTCTCCACAA

Hip2_FWD: CACCCAATCCTAAAAATTGCT

Hip2_REV: CCGATATTTTCATGTCTCCACA

2.3. Enzimas de restrição

Após amplificação por PCR das amostras de ADN o próximo passo é a escolha de enzimas de restrição apropriadas para o corte do fragmento, com uma região de amplificação prevista de 332 pb, do citocromo *b* mitocondrial de modo a permitir o reconhecimento e corte de sequências específicas de ADN e resultando assim um padrão de fragmentos de restrição que varia com as espécies. Consequentemente, uma vez que a sequência do fragmento já foi estabelecida, o passo inicial de sequenciamento deixa de ser necessário, pois os produtos resultantes da amplificação por PCR são submetidos a digestão com as enzimas de restrição previamente selecionadas e, de seguida, os padrões de restrição são comparados com amostras de referência para fazer a identificação das espécies [29].

Para a escolha das enzimas de restrição apropriadas para o corte e identificação das espécies tem de se analisar uma a uma as sequências de nucleótidos de cada espécie. Para tal, recorre-se a ferramentas que permitam identificar quais as endonucleases de restrição mais adequadas para o estudo em causa. Por exemplo, pode-se recorrer à ferramenta *online* NEBcutter V2.0 da New England Biolabs inc. para deste modo através da análise de mapas de restrição obtidos para cada sequência e com base nas regiões a que cada enzima corta poder selecionar as endonucleases de restrição mais apropriadas ao estudo, ou seja, tendo em consideração a zona em que o fragmento selecionado para o estudo em causa amplifica.

3. Material e Métodos

3.1. Espécies analisadas

As espécies analisadas neste estudo de entre as cinco utilizadas anteriormente, para o alinhamento, desenho dos primers e escolha de enzimas de restrição, foram *Gadus morhua*, *Gadus macrocephalus* e *Theragra chalcogramma*. As amostras destas espécies provêm de produtos no estado desfiado, seco e salgado, fresco ou ultracongelado (*Gadus macrocephalus* e *Theragra chalcogramma*), postas ultracongeladas (*Gadus morhua*) ou produtos prontos a consumir ultracongelados (*Gadus morhua*), como bacalhau à Brás, bacalhau com natas e lasanha de bacalhau. De referir que as espécies indicadas para os produtos analisados correspondem ao indicado na rotulagem dos mesmos. Todas as espécies analisadas foram obtidas em três grandes superfícies comerciais denominadas, neste trabalho, por A, B e C deste modo os produtos da marca própria dessas superfícies comerciais serão identificados do mesmo modo e os produtos de diferentes fornecedores por X, Y e Z.

3.2. Extração de ADN

Para a extração de ADN de amostras de bacalhau ou produtos à base de bacalhau utilizou-se o método modificado do fenol-clorofórmio descrito por Bardakci e Skibinski (1994) [39]. Para tal, pesou-se 50 mg de músculo para um *ependorf* de 2 ml, adicionou-se 500 µl de tampão STE (50mM Tris-HCl (Fisher Scientific), pH 8,0; 10mM EDTA (Panreac), pH 8,0; 0,1M NaCl (VWR Prolabo)), 15 µl de SDS (Riedel-de Haën) a 20% e 15 µl de Proteinase K (20,2 mg/ml). Homogeneizou-se a solução no vortex e incubou-se a 50°C durante 1h. De seguida centrifugou-se a solução durante 5 min a 10000g (=10400rpm) e no fim adicionou-se 250 µl de fenol (Sigma-Aldrich) e homogeneizou-se a solução por inversão. Centrifugou-se novamente a 10000g durante 5 min e no fim adicionar 250 µl de fenol:clorofórmio (Scharlau):álcool isoamílico (Panreac) (25:24:1). Procedeu-se a nova centrifugação (10000g durante 5 min) por forma a recolher a fase aquosa, que contém o ADN, para um novo *ependorf* e adicionou-se o mesmo volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), de seguida centrifugou-se (10000g durante 5 min) e recolheu-se a fase aquosa para um novo *ependorf* e adicionou-se 750 µl de etanol em gelo. Depois de centrifugar durante 10 min a 10000g, rejeitou-se o sobrenadante e adicionou-se 100 µl de etanol a 70%. Por fim, centrifugar (10000g

durante 5 min) e rejeitar o sobrenadante, secar à temperatura ambiente e ressuspender em 100 µl de água estéril.

3.3. Amplificação do material genético pela técnica de reação polimerização em cadeia (PCR)

A amplificação por PCR das amostras de ADN extraídas foi levada a cabo no termociclador da Biorad (My Cycler-Thermal Cycler) recorrendo ao conjunto dos *primers*, anteriormente descritos, Hip1_FWD: GAAAACCCACCCAATCCTAAA, Hip1_REV: CCGATATTTTCATGTCTCCACAA, Hip2_FWD: CACCCAATCCTAAAAATTGCT e Hip2_REV: CCGATATTTTCATGTCTCCACA. A mistura de volume final igual a 15 µl, era constituída por 7,5 µl Taq PCR master mix (Qiagen), 4,5 µl H₂O estéril, 2 µl ADN e 0,5 µl de cada conjunto de *primers* (Hip1 e Hip2). Devido à existência de dois conjuntos de *primers*, Hip1 Fwd e Hip1 Rev e Hip2 Fwd e Hip2 Rev, é necessário preparar duas misturas de solução para desenvolver o PCR, ou seja, uma das misturas com os *primers* Hip1 e os reagentes e a outra com o *primers* Hip2 e as restantes soluções reacionais.

Foi ainda incluída uma “amostra controlo” sem ADN de modo a averiguar se houve algum tipo de contaminação. O procedimento encontra-se esquematizado na figura 3.4.1 abaixo:

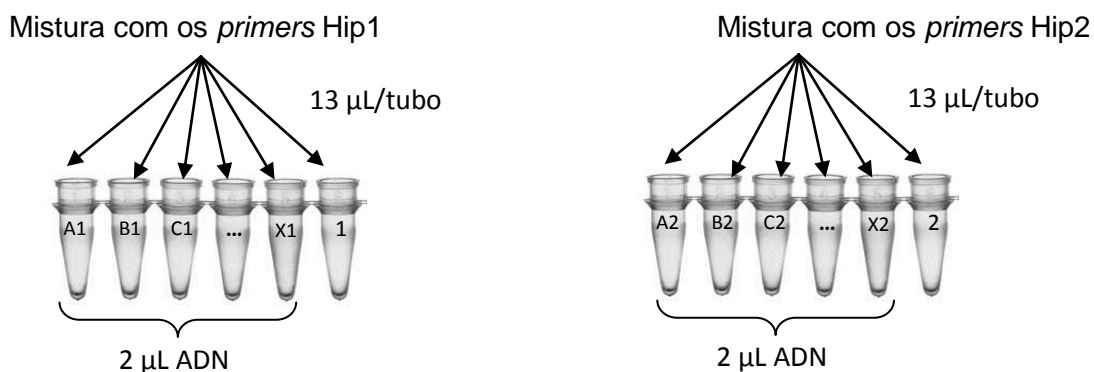


Figura 3.1 – Esquema da divisão de volumes de cada mistura com os respetivos pares de *primers* por cada tubo de PCR. Onde as letras A, B e C correspondem a amostras de ADN e X ao número total de amostras e os números 1 e 2, à mistura com os *primers* Hip1 e à mistura com os *primers* Hip2, respetivamente.

Para a amplificação do ADN o ciclo de temperaturas utilizado foi o seguinte: 94°C durante 3 minutos, seguido de uma desnaturação a 94°C durante 30 segundos repetida 35 vezes, para a hibridação ou *annealing* usou-se uma temperatura de 49°C durante 30 segundos e para a extensão foi utilizada uma temperatura de 72°C durante 1 minuto para finalizar, fez-se uma extensão a 72°C durante 7 minutos.

3.4. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR

Os produtos obtidos da amplificação por PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose para verificar e estimar o tamanho dos fragmentos amplificados [3]. Para tal, preparou-se um gel com uma concentração de agarose (Sigma) de 1,5% para 100 ml de TAE 1x e 8 µl de GelRed (4 µl por cada 50 ml de agarose). Este gel é depois imerso numa solução de TAE 1x e em cada poço coloca-se, consoante o número de amostras, 2 µl de loading dye (Fermentas) e 5 µl da amostra amplificada por PCR, para o marcador (PCR MW Ruler, BioRad) coloca-se 3 µl deste e 2 µl de loading dye. A corrida fez-se a 90V durante, aproximadamente, 50 minutos.

3.5. Identificação de sítios de restrição

A identificação de sítios de restrição e a escolha das respetivas enzimas de restrição para a identificação das espécies escolhidas para este estudo foi feita através da ferramenta *online* NEBcutter V2.0 da New England Biolabs inc., utilizando as sequências retiradas da base de dados GenBank.

Como o tamanho expectável para os fragmentos era de 332 pb, da análise dos mapas de restrição obtidos através do NEBcutter para cada uma das sequências das espécies estudadas e verificando todos os sítios de restrição possíveis para cada sequência tendo em conta o tamanho esperado para os fragmentos, selecionou-se com base neste parâmetro e nos sítios de corte de cada enzima as seguintes endonucleases de restrição: EcoRV, Sspl e Alul. Como se pode verificar na tabela abaixo:

Fragmentos	<i>G. morhua</i>	<i>G. macrocephalus</i>	<i>T. chalcogramma</i>	<i>P. virens</i>	<i>M. poutassou</i>
EcoRV			120+209		150+185
XhoI				36+296	
Sspl		63+270	63+270		
TaqI	160+170	160+170	160+170	50+60+220	160+170
AcuI				137+195	137+195
AluI	140+190				50+117+160
DdeI	66+90+180	150+180	150+180	66+266	50+66+220

Tabela 3.1 – Sítios de restrição com base no tamanho espectável para o fragmento do citocromo *b* mitocondrial (332 pb) para sete enzimas de restrição, EcoRV, XhoI, Sspl, TaqI, AcuI, AluI e DdeI.

Optou-se por estas enzimas pois em conjunto permitem diferenciar as espécies em estudo com base nos sítios de corte, ou seja, ao utilizar-se a enzima EcoRV consegue-se distinguir a espécie *Theragra chalcogramma* das restantes espécies, pois para o tamanho esperado dos fragmentos esta enzima só corta duas espécies, na qual está incluída a *T. chalcogramma*. Usando a enzima Sspl na zona de corte em que atua, 63 pb e 270 pb, consegue-se diferenciar a espécie *Gadus macrocephalus* das restantes, apesar de cortar em sítios semelhantes a sequência da espécie *T. chalcogramma*, esta é diferenciada pela enzima EcoRV. Por fim, com a enzima Alul diferencia-se a espécie *Gadus morhua* com base no sítio de restrição a que a enzima corta, pois das sete enzimas em análise na tabela 3.6.1 é a única que só atua em duas espécies para o tamanho dos fragmentos esperados o que permite a sua utilização para diferenciar a espécie *G. morhua* das outras.

3.6. Utilização da técnica PCR – RFLP

As análises por RFLP foram realizadas com as enzimas escolhidas com base no padrão específico que cada enzima iria produzir no fragmento de região de amplificação prevista de 332 pb, daí selecionaram-se as seguintes enzimas: EcoRV, Sspl e Alul (Thermo Scientific Inc.). Para as análises de restrição das amostras amplificadas por PCR as endonucleases de restrição escolhidas foram digeridas separadamente em cada produto de PCR com os seguintes volumes para cada componente da reação: 17 µl de água estéril, 2 µl de 10x FastDigest Green Buffer (fornecido pela Thermo Scientific juntamente com as enzimas), 10 µl do produto de PCR e 1 µl de cada enzima de restrição perfazendo um volume final de 30 µl. De seguida, misturou-se suavemente cada mistura e incubou-se segundo indicação do fabricante a 37°C. Os tempos de incubação para as enzimas Sspl e EcoRV foram de 15 minutos e para a enzima Alul foi de 45 minutos.

A verificação dos padrões de restrição obtidos foi feita por eletroforese em gel de agarose, com a mesma concentração de agarose indicada anteriormente e a mesma velocidade de corrida, utilizando 15 µl dos produtos da digestão em cada poço do gel. De referir que, como foi utilizado o FastDigest Green Buffer na reação, pode-se aplicar alíquota diretamente no gel.

4. Resultados e Discussão

4.1. Métodos de extração de ADN utilizados

Na fase inicial do trabalho começou-se por utilizar o método Ureia-SDS-Proteinase K, descrito por Aranishi e Okimoto (2004), para a extração de ADN de gadídeos a partir do músculo (≈ 100 mg). As amostras foram imersas em 400 μ L de tampão extração (10mM Tris-HCl pH 8, 20 mM EDTA pH 8, 2% Dodecil sulfato de sódio (SDS), 4 M Ureia, 25 μ g Proteinase K) e incubadas a 55°C durante 1 hora com agitação. Seguidamente adicionou-se um décimo do volume de 5 M NaCl e misturou-se, de seguida adicionou-se igual volume de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1). Depois centrifugou-se a 10000 g durante 5 minutos e recolheu-se a fase aquosa que continha o ADN e submeteu-se a precipitação com etanol seguida de nova precipitação. Por fim, lavou-se o *pellet* de ADN uma vez com etanol a 70%, secou-se e ressuspendeu-se em 10T0.1E (10 mM Tris-HCl pH 8; 0,1 EDTA pH 8) [31].

Após uma extração de ADN a partir de bacalhau (*Gadus morhua*) ultracongelado da marca “X”, procedeu-se à sua visualização por eletroforese em gel de agarose, na concentração de 1,5% e a uma velocidade de 90V, onde se verificou que o ADN estava “partido”, pelo que resolveu-se proceder a alterações no método utilizado para a extração. As alterações foram as seguintes, pesar uma maior quantidade de amostra (≈ 1000 mg), depois de secar adicionar 50 μ l de água destilada e 3 μ L de RNase e incubar 37°C/45 min, adicionar 1/5 do volume de 5M de Acetato de Amónia (NH₄Ac) e duas vezes o volume de etanol absoluto, congelar a -80°C/30 min, centrifugar 13000 rpm/15 min e retirar todo o sobrenadante, adicionar 1 ml de etanol a 70%, centrifugar a 11000 rpm/2 min e retirar todo o sobrenadante, por fim secar na estufa e adicionar 50 μ l de água destilada. Do mesmo modo que no método anterior o ADN encontrava-se “partido”, depois da sua visualização em gel de agarose. Ao verificar isto, decidiu-se alterar a quantidade de massa da amostra a pesar para efetuar a extração para três concentrações diferentes, 200, 500 e 1000 mg, para determinar a partir de qual concentração se obteria uma melhor visualização da banda de ADN. A figura abaixo demonstra através da eletroforese em gel de agarose o sucedido quando aplicadas estas alterações ao método Ureia-SDS-Proteinase K para as massas de 200, 500 e 1000 mg.

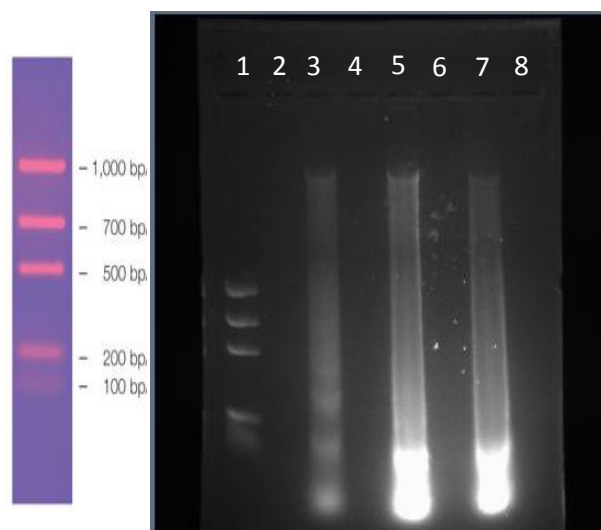


Figura 4.1 – Eletroforese em gel de agarose para a extração de ADN genómico de *Gadus morhua* pelo método Ureia-SDS-Proteinase K, poços: 1 – Marcador (PCR MW ruler, BioRad); 3 – ADN genómico *Gadus morhua* 200mg marca “X”; 5 – ADN genómico *Gadus morhua* 500mg marca “X”; 7 – ADN genómico *Gadus morhua* 1000mg marca “X”.

Da observação da figura 4.1 verifica-se que, uma vez mais, as alterações aplicadas não melhoraram a qualidade do ADN extraído, só aumentaram a concentração de ADN presente. Por esse motivo, decidiu-se testar o *kit* de extração *G-spin* (Qiagen) e preparar novas soluções *stock* de Tris-HCl e EDTA nas concentrações 1 e 0,5M, respetivamente, de modo a preparar um novo tampão de extração. Seguidamente procedeu-se à extração de ADN de bacalhau utilizando os dois métodos (método Ureia-SDS-Proteinase K e o *kit* de extração *G-spin*) e à sua visualização por eletroforese em gel de agarose, onde se verificou (figura 4.2) que a partir da extração realizada pelo *kit* não se obteve qualquer produto e pelo método Ureia-SDS-Proteinase K o material genético continuava “partido”.

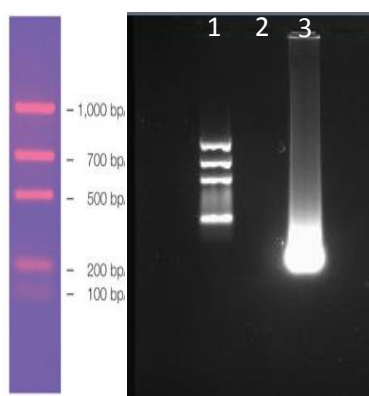


Figura 4.2 – Eletroforese em gel de agarose para a extração de ADN genómico de *Gadus morhua* pelo método Ureia-SDS-Proteinase K e pelo *kit* de extração *G-spin*, poços: 1 – marcador; 2 – ADN genómico *Gadus morhua* kit; 3 – ADN genómico *Gadus morhua* Ureia-SDS-Proteinase K.

Após a verificação destes resultados recorreu-se a três métodos diferentes de extração de ADN, para testar a eficácia da extração e qualidade do material genético obtido. Os métodos utilizados foram, o método modificado Ureia-SDS-Proteinase K, o método de extração com sal (SALT) e o método modificado do fenol-clorofórmio (PC), para a extrair ADN de bacalhau (*Gadus morhua*) ultracongelado da marca "X", descritos em Cawthorn e colaboradores (2011). O método modificado Ureia-SDS-Proteinase K que consiste na recolha de 50 mg de músculo de bacalhau para um microtubo estéril e adicionar 500 µl de tampão TESU6 (10mM Tris-HCl, pH 8,0; 20mM EDTA, pH 8,0; 2% (m/v) SDS; 6M ureia) juntamente com 20 µl de Proteinase K (10mg/ml). De seguida homogeneizar no vórtex e proceder a incubação a 55°C durante 15 minutos com agitação. Seguidamente adiciona-se 0,1 volume de NaCl a 5M, mistura-se por inversão e adiciona-se igual volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamilico (25:24:1). Após a uniformização da solução por inversão centrifugou-se a 10000 g durante 5 minutos, recolheu-se a fase aquosa para um microtubo estéril e adicionou-se 0,6 volume de isopropanol. Depois de centrifugar durante 10 minutos a 10000 g descartou-se o sobrenadante e lavou-se o pellet com etanol a 70%. Por fim centrifugou-se durante 5 minutos a 10000 g rejeitou-se o sobrenadante e procedeu-se a uma secagem à temperatura ambiente. Após a secagem ressuspendeu-se o ADN em 100 µl de água estéril. O método de extração com sal baseia-se na recolha de 50 mg de músculo de bacalhau para um microtubo estéril e na adição de 400 µl de tampão de lise (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 2 mM EDTA pH 8.0; 0.4 M NaCl), de 40 µl de SDS a 20% e 10 µl de proteinase K (20mg/ml). De seguida homogeneizou-se a solução no vórtex e incubou-se durante 1 hora a 65°C. Após a incubação adicionaram-se 300 µl de 6M NaCl e uniformizou-se no vórtex durante 30 segundos, seguidamente centrifugou-se durante 30 minutos a 10000 g. Depois da centrifugação recolheu-se a fase aquosa para um novo microtubo estéril, adicionou-se o mesmo volume de isopropanol e misturou-se a solução no vórtex. Seguidamente incubou-se durante 1 hora a -20°C, depois centrifugou-se a 10000 g durante 20 minutos, descartando-se no fim o sobrenadante e lavou-se o pellet com etanol a 70%. Posteriormente procedeu-se a uma centrifugação a uma velocidade de 10000 g durante 5 minutos. Após esta, descartou-se o sobrenadante e deixou-se o pellet a secar à temperatura ambiente e no fim adicionou-se 100 µl de água estéril. Por fim, utilizou-se o método modificado do fenol-clorofórmio onde as amostras (50 mg) foram imersas num tubo *ependorf* de 2 mL em 500 µl de tampão STE (50 mM de Tris-HCl, pH 8; 10 mM de EDTA, pH 8; 0,1 M de NaCl), 15 µl de 20% de Dodecil sulfato de sódio e 15 µl de Proteinase K (20,2 mg/mL), depois homogeneizou-se a solução no vórtex e incubou-se a 50°C durante 1 hora. De seguida centrifugou-se a solução durante 5 minutos

a 10000 g (\approx 10400 rpm) e no fim adicionou-se 250 μ l de fenol e homogeneizou-se por inversão. Centrifugou-se novamente a 10000 g durante 5 minutos e no fim adicionou-se 250 μ l de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1). Procedeu-se a nova centrifugação (10000 g/5 min), recolheu-se a fase aquosa que contém o material genético para um novo tubo e adicionou-se igual volume, ao que foi retirado da fase aquosa, de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Depois, centrifugou-se (10000 g/5 min) e recolheu-se a fase aquosa para um novo tubo e adicionou-se 750 μ l de etanol. Centrifugou-se durante 10 minutos a 10000 g, rejeitou-se o sobrenadante e adicionou-se 100 μ l de etanol a 70%. Por fim, centrifugou-se (10000 g/5 min), rejeitou-se o sobrenadante, secou-se na estufa, aproximadamente, a 30°C e ressuspendeu-se em 100 μ l de água estéril. Depois das extrações utilizando estes três métodos diferentes observou-se, por eletroforese em gel de agarose, como tinham decorrido as três extrações e verificou-se que, uma vez mais, o ADN estava danificado. Após a obtenção destes resultados, decidiu-se verificar se o ADN apesar de estar danificado haveria amplificação através da reação de polimerização em cadeia (PCR). Para isso testou-se cinco amostras de diferentes extrações, duas extraídas com o método Ureia-SDS-Proteinase K com modificações no protocolo descrito por Aranishi e Okimoto (2004) e as restantes extraídas a partir dos seguintes métodos, método modificado Ureia-SDS-Proteinase K, método de extração com sal e o método modificado do fenol-clorofórmio. Deste teste e da análise da figura 4.3, verificou-se que a melhor amplificação tinha resultado da extração realizada com o método modificado do fenol-clorofórmio (poços 6 e 12) pois, comparando com os outros métodos foi o único em que se obteve uma única banda de amplificação e na região de amplificação prevista para este estudo. Consequentemente, este foi o método selecionado para realizar todas as extrações seguintes.

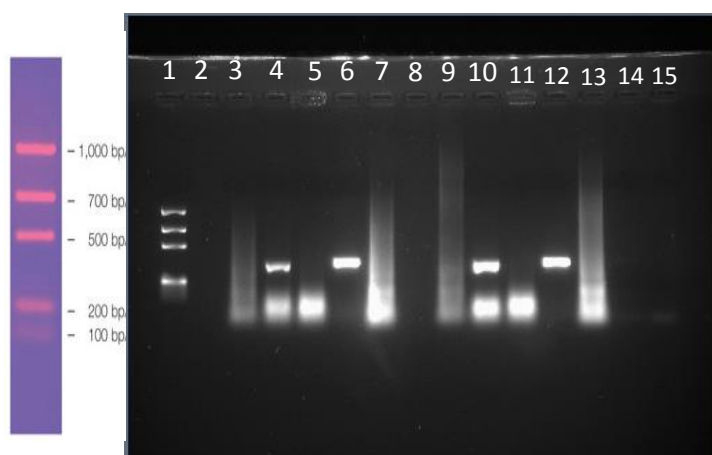


Figura 4.3 – Eletroforese em gel de agarose para os produtos amplificados por PCR derivados da extração de ADN genómico de *Gadus morhua* utilizando vários métodos de extração, poços: 1 – Marcador (PCR MW ruler, BioRad); 2 – Intervalo; 3 – ADN genómico *Gadus morhua* método Ureia-SDS-Proteinase K com mistura 1; 4 – ADN genómico *Gadus morhua* método modificado

Ureia-SDS-Proteinase K com mistura 1; 5 – ADN genómico *Gadus morhua* método SALT com mistura 1; 6 – ADN genómico *Gadus morhua* método PC com mistura 1; 7 – ADN genómico *Gadus morhua* método Ureia-SDS-Proteinase K com mistura 1; 8 – Intervalo; 9 – ADN genómico *Gadus morhua* método Ureia-SDS-Proteinase K com mistura 2; 10 – ADN genómico *Gadus morhua* método modificado Ureia-SDS-Proteinase K com mistura 2; 11 – ADN genómico *Gadus morhua* método SALT com mistura 2; 12 – ADN genómico *Gadus morhua* método PC com mistura 2; 13 – ADN genómico *Gadus morhua* método Ureia-SDS-Proteinase K com mistura 2; 14 – Mistura 1; 15 – Mistura 2.

Após identificado o método de extração a utilizar procedeu-se às extrações de ADN de amostras provenientes de diversos produtos alimentares de bacalhau ou das suas espécies afins e produtos preparados à base destes. Para tal identificou-se uma série de produtos à venda no mercado nacional de entre os quais seleccionou-se, postas de bacalhau ultracongeladas, bacalhau desfiado seco salgado ultracongelado e fresco, refeições pré-cozinhadas ultracongeladas como, bacalhau à Brás, bacalhau com natas, lasanha de bacalhau e outras para se analisarem neste estudo.

Procedeu-se então a diversas extrações utilizando o método modificado do fenol-clorofórmio, de entre as quais de bacalhau (*Gadus macrocephalus*) desfiado e ultracongelado e verificou-se o resultado da mesma pela eletroforese em gel de agarose (figura 4.4), onde se verificou que o ADN estava danificado porém, as bandas observadas nos poços 3 e 4 aparentavam estar na região de amplificação prevista para os fragmentos (332 pb). Por isso, decidiu-se proceder com as extrações de ADN de produtos pré-preparados.

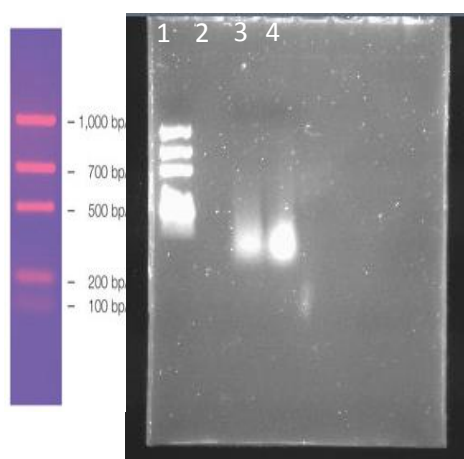


Figura 4.4 – Eletroforese em gel de agarose para a extração de ADN genómico de bacalhau desfiado (*Gadus macrocephalus*) pelo método fenol-clorofórmio, poços: 1 – Marcador; 2 – Intervalo; 3 – ADN genómico de bacalhau (*Gadus macrocephalus*) desfiado ultracongelado; 4 – ADN genómico de bacalhau (*Gadus macrocephalus*) desfiado duplicado ultracongelado.

Nas extrações de ADN a partir de refeições pré-preparadas, para além das dificuldades anteriormente encontradas nas extrações realizadas, acresce-se o facto de estes produtos terem sofrido processamento térmico aquando do seu processo de transformação o que danifica a qualidade e quantidade de ADN extraído que é

necessário para se proceder à identificação de espécies. Fator este que pode ser observado na figura 4.5, onde as bandas correspondentes às amostras de ADN extraídas de produtos alimentares processados (poços 3 a 6) são praticamente inexistentes, o que demonstra a dificuldade associada à extração de ADN de alimentos processados termicamente, ou seja, estes processos podem ser de tal forma agressivos que danificam a qualidade e quantidade de ADN necessária para proceder a uma identificação por métodos genéticos [35].

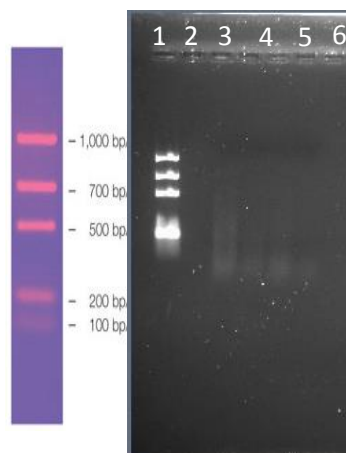


Figura 4.5 - Eletroforese em gel de agarose para a extração de ADN genómico de amostras de alimentos processados a partir do método modificado fenol-clorofórmio, poços: 1 – Marcador; 2 – Intervalo; 3 – ADN genómico extraído de Bacalhau à Brás (*Gadus morhua*); 4 – ADN genómico extraído de Bacalhau c/ natas (*Gadus morhua*); 5 – ADN genómico extraído de Bacalhau c/ natas e grelos (espécie não identificada); 6 – ADN genómico extraído de Lasanha de bacalhau c/ espinafres (*Gadus morhua*).

Quando comparados os géis das figuras 4.4 e 4.5 observou-se que a concentração de ADN presente na figura 4.5, correspondente às amostras processadas termicamente, estava em menor quantidade, o que vai ao encontro do que está referido na literatura sobre os processos de transformação, como o tratamento térmico, degradarem a qualidade e diminuir a quantidade do ADN extraído [30, 35, 43].

Contudo, os efeitos precisos que os processos de transformação têm na integridade do ADN de amostras de produtos da pesca ainda são pouco conhecidos pois, de uma forma geral, o ADN presente nestas amostras está alterado e presente em pouca quantidade o que dificulta o passo posterior de amplificação por PCR, devido a este método ser muito sensível. Deste modo, é aconselhável que as amostras degradadas sejam manipuladas, antes do PCR, de tal modo que permitam evitar o máximo possível as contaminações e por forma a garantir a fiabilidade dos resultados deve-se fazer controlos negativos em todas as corridas. Além disto, para evitar a inibição da amplificação por PCR, os métodos de extração devem possibilitar a remoção destes inibidores porém, ainda nenhum método geral de extração revelou-se útil para todas as diferentes matrizes existentes. Por isso, para cada novo estudo é necessário o

desenvolvimento de novos métodos de extração e de amplificação ou adaptar os métodos existentes ao estudo em causa. O ADN obtido de amostras degradadas é, também, conhecido por em alguns casos apresentar modificações químicas, ou seja, a molécula de ADN pode apresentar quebras ou mutações. Estas modificações podem levar à identificação inadequada de espécies uma vez que a sequência de nucleótidos obtida é diferente da sequência de referência. Por consequência, antes de utilizar métodos baseados apenas em alguns sítios de variação deve-se verificar a ausência de ADN degradado [6, 40].

Concluindo, a obtenção e posteriores análises ao ADN de amostras que sofreram processos de transformação requer uma análise aprofundada de vários fatores para garantir, tanto quanto possível, a fiabilidade dos resultados [6].

4.2. Amplificação do material genético pela técnica de PCR

A amplificação do material genético por PCR, das amostras utilizadas neste estudo, utilizando as condições anteriormente descritas e os primers desenhados (Hip1 Fwd e Rev e Hip2 Fwd e Rev) originaram resultados pouco concretos, mais propriamente quando se procedeu à amplificação de ADN proveniente de amostras termicamente processadas. Como se pode observar na figura abaixo.



Figura 4.6 – Eletroforese em gel de agarose para a extração de ADN genómico de amostras de alimentos processados e consequente PCR, poços: 1 – Marcador; 7 – Intervalo; 8 – Produto do PCR de Bacalhau à Brás (*Gadus morhua*) marca “A” c/ mistura 1; 9 – Produto do PCR de Bacalhau c/ natas (*Gadus morhua*) marca “A” c/ mistura 1; 10 – Produto do PCR de Bacalhau c/ natas e grelos (espécie não identificada) marca “Y” c/ mistura 1; 11 – Produto do PCR de Lasanha de bacalhau c/ espinafres (*Gadus morhua*) marca “A” c/ mistura 1; 12 – Mistura 1; 13 – Intervalo; 14 – Produto do PCR de Bacalhau à Brás (*Gadus morhua*) marca “A” c/ mistura 2; 15 – Produto do PCR de Bacalhau c/ natas (*Gadus morhua*) marca “A” c/ mistura 2; 16 – Produto do PCR de Bacalhau c/ natas e grelos (espécie não identificada) marca “Y” c/ mistura 2; 17 – Produto do PCR de Lasanha de bacalhau c/ espinafres (*Gadus morhua*) marca “A” c/ mistura 2; 18 – Mistura 2.

Da análise da figura 4.6, mais propriamente os poços 8-12 e 14-18, verificou-se que as amplificações com a mistura contendo os primers Hip 1 não ocorreram, o que pode estar relacionado com a região de amplificação prevista para este estudo ser de 332 pb e em amostras termicamente processadas ser complicado obter fragmentos superiores a 120 pb. Por exemplo, Quinteiro e colaboradores (1998) ao utilizarem primers desenhados para amplificar um fragmento de 350 pb, de uma forma geral, essa amplificação falhou em amostras de atum em conserva contudo, quando utilizaram primers com uma região de amplificação prevista de 176 pb a amplificação foi obtida.

Para as amplificações com a solução que continha os primers Hip 2 observou-se duas bandas de amplificação nos poços 14 e 15, porém essas bandas são constituídas por duas bandas de tamanho semelhante o que não é desejável e, ainda, verificou-se amplificação no poço 18 o que não era expectável pois neste poço não se adicionou qualquer amostra de ADN, o que sugere que a contaminação da reação de PCR ou a ocorrência de amplificação inespecífica com estes primers. As extrações foram repetidas para os seguintes produtos, bacalhau com natas, lasanha de bacalhau com espinafres e bacalhau à Brás, com o intuito de compreender se a falta de amplificações teria sido derivado do processo de extração ou de outros fatores relacionados com a reação de PCR ou com os primers utilizados. Depois de realizadas as extrações fez-se um novo PCR com estas novas extrações e as anteriormente extraídas e observou-se por eletroforese em gel de agarose (figura 4.7).

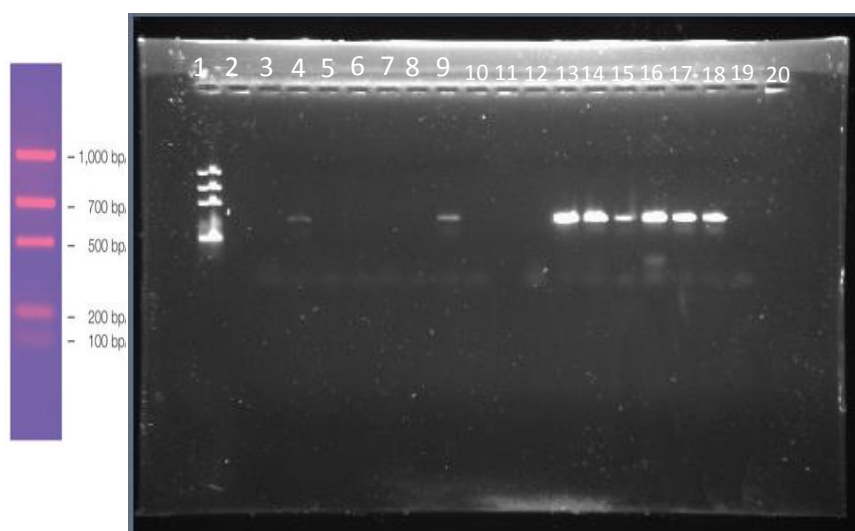


Figura 4.7 – Eletroforese em gel de agarose para o PCR de amostras de alimentos processados, poços: 1 – Marcador; 2 – Intervalo; 3 – Produto do PCR de Bacalhau à Brás (*Gadus morhua*) marca “A” c/ mistura 1; 4 – Produto do PCR de Bacalhau c/ natas (*Gadus morhua*) marca “A” c/ mistura 1; 5 – Produto do PCR de Bacalhau c/ natas e grelos (espécie não identificada) marca “Y” c/ mistura 1; 6 – Produto do PCR de Lasanha de bacalhau c/ espinafres (*Gadus morhua*) marca

“A” c/ mistura 1; 7 – Produto do PCR de Bacalhau c/ natas (*Gadus morhua*) marca “A” c/ mistura 1 (repetição); 8 – Produto do PCR de Lasanha de bacalhau c/ espinafres (*Gadus morhua*) marca “A” c/ mistura 1 (repetição); 9 – Produto do PCR de Bacalhau à Brás (*Gadus morhua*) marca “A” c/ mistura 1 (repetição); 10 – Mistura 1; 11 – Intervalo; 12 – Produto do PCR de Bacalhau à Brás (*Gadus morhua*) marca “A” c/ mistura 2; 13 – Produto do PCR de Bacalhau c/ natas (*Gadus morhua*) marca “A” c/ mistura 2; 14 – Produto do PCR de Bacalhau c/ natas e grelos (espécie não identificada) marca “Y” c/ mistura 2; 15 – Produto do PCR de Lasanha de bacalhau c/ espinafres (*Gadus morhua*) marca “A” c/ mistura 2; 16 – Produto do PCR de Bacalhau c/ natas (*Gadus morhua*) marca “A” c/ mistura 2 (repetição); 17 – Produto do PCR de Lasanha de bacalhau c/ espinafres (*Gadus morhua*) marca “A” c/ mistura 2 (repetição); 18 – Produto do PCR de Bacalhau à Brás (*Gadus morhua*) marca “A” c/ mistura 2 (repetição); 19 – Mistura 2.

Comparando os géis obtidos nas figuras 4.6 e 4.7 verifica-se que no segundo gel, apesar de haver amplificação com os primers Hip1 esta é mínima e só se observa em dois poços. Curiosamente uma amplificação corresponde à primeira extração e a outra à segunda, mas de amostras diferentes. Pelo facto de ter havido amplificação à segunda vez numa amostra da primeira extração isto pode estar relacionado com existência de inibidores da amplificação aquando da realização da primeira reação. Estes inibidores podem ter várias origens entre as quais se podem destacar os materiais e reagentes que entraram em contacto com o ADN durante o processo de extração como o NaCl, o SDS, o etanol, o fenol, entre outros contaminantes presentes no ambiente do laboratório e ainda os constituintes de vários alimentos que podem em simultâneo serem purificados com a molécula de ADN alvo [40].

Por outro lado, a amplificação com os primers Hip2 gerou bandas em quase todos os poços o que sugere que a mistura 2 pode ser mais adequada para este tipo de amostras. Apesar de se verificar amplificações, aparentemente na região prevista, estas estão em alguns poços acompanhadas de outras bandas.

Tendo estes resultados como base, ou seja, as limitações que se verificaram nas amplificações anteriores, resolveu-se proceder a extrações de ADN de novas amostras e conseqüentemente a um novo PCR para estas amostras como demonstra o gel das figuras 4.8 e 4.9.

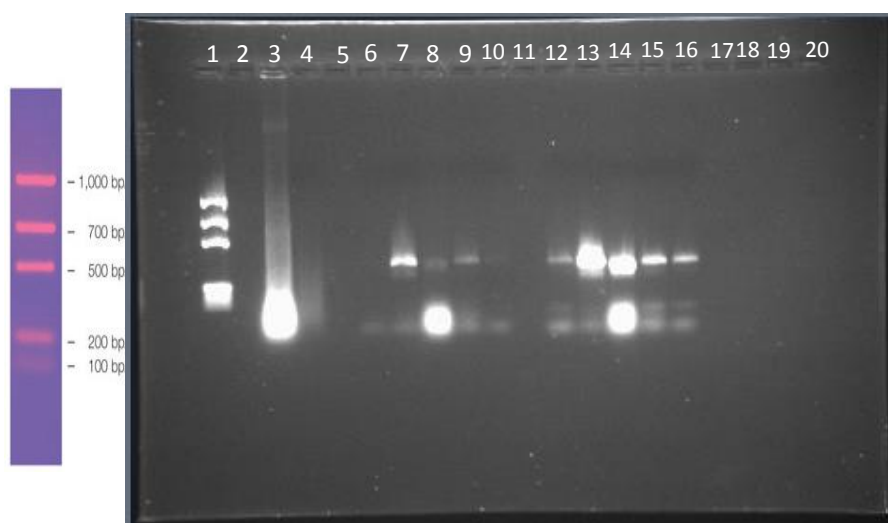


Figura 4.8 – Eletroforese em gel de agarose para o PCR de amostras de alimentos processados, poços: 1 – Marcador; 6 – Produto do PCR de Bacalhau c/ natas (espécie não identificada) marca “B” c/ mistura 1; 7 – Produto do PCR de Bacalhau c/ natas (*Gadus morhua*) marca “C” c/ mistura 1; 8 – Produto do PCR de Bacalhau Paloco-do-Pacífico marca “B” c/ mistura 1; 9 – Produto do PCR de bacalhau à Brás (*Gadus morhua*) marca “C” c/ mistura 1; 10 – Mistura 1; 11 – Intervalo; 12 – Produto do PCR de Bacalhau c/ natas (espécie não identificada) marca “B” c/ mistura 2; 13 – Produto do PCR de Bacalhau c/ natas (*Gadus morhua*) marca “C” c/ mistura 2; 14 – Produto do PCR de Bacalhau Paloco-do-Pacífico (*Theragra chalcogramma*) marca “B” c/ mistura 2; 15 – Produto do PCR de bacalhau à Brás (*Gadus morhua*) marca “C” c/ mistura 2; 16 – Mistura 2

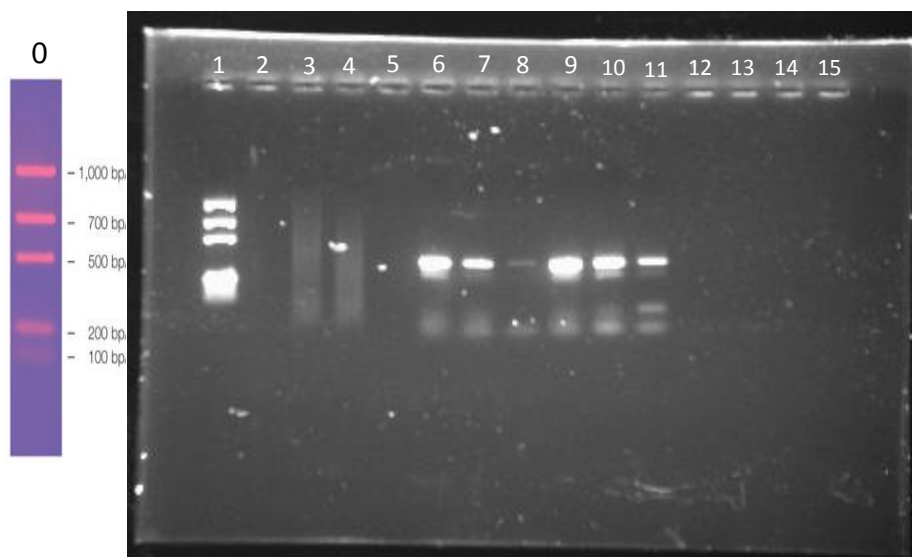


Figura 4.9 – Eletroforese em gel de agarose para o PCR de amostras de bacalhau, poços: 1 – Marcador; 6 – Produto do PCR de bacalhau desfiado seco salgado (*Gadus morhua*) marca “B” c/ mistura 1; 7 - Produto do PCR de bacalhau desfiado seco salgado (*Gadus morhua*) marca “Z” c/ mistura 1; 8- Mistura 1; 9 – Produto do PCR de bacalhau desfiado seco salgado (*Gadus morhua*) marca “B” c/ mistura 2; 10 – Produto do PCR de bacalhau desfiado seco salgado (*Gadus morhua*) marca “Z” c/ mistura 2; 11 – Mistura 2.

Analisando os géis das figuras 4.8 e 4.9 verificou-se que, de uma forma geral, os problemas verificados nas amplificações realizadas anteriormente se voltaram a observar, apesar das amplificações estarem em concordância com a região de amplificação prevista. Dos problemas verificados podem-se enumerar, a falta de amplificação em alguns poços (fig. 4.2.3), amplificações de duas ou mais bandas e amplificações onde não era suposto haver amplificações, como é o caso dos poços onde só há supostamente mistura 1 ou 2. Posto isto, decidiu-se proceder a alguns testes, neste caso, alterou-se o volume final para a reação de PCR de 15 para 25 microlitros e adicionou-se os dNTPs à mistura, para deste modo verificar se ocorreria formação de novas cadeias de ADN. E fez-se um PCR com gradiente de temperaturas de annealing (Ta) a 49°, 50° e 51°C utilizando esta mistura, de modo a averiguar a partir de qual das temperaturas os primers se iriam ligar de forma mais eficaz à sequência alvo e assim obter-se melhores amplificações. Os resultados podem-se verificar na figura abaixo.



Figura 4.10 – Eletroforese em gel de agarose para o PCR com gradiente de temperaturas de annealing a 49°, 50° e 51°C para uma amostra de lasanha de bacalhau, poços: 1 – Marcador; 2 – Intervalo; 3 – Produto de PCR de lasanha de bacalhau c/ mistura 1 a Ta de 49°C; 4 – Produto de PCR de lasanha de bacalhau c/ mistura 2 a Ta de 49°C; 5 – Mistura 1; 6 – Mistura 2; 7 – Intervalo; 8 – Produto de PCR de lasanha de bacalhau c/ mistura 1 a Ta de 50°C; 9 – Produto de PCR de lasanha de bacalhau c/ mistura 2 a Ta de 50°C; 10 – Mistura 1; 11 – Mistura 2; 12 – Intervalo; 13 – Produto de PCR de lasanha de bacalhau c/ mistura 1 a Ta de 51°C; 14 – Produto de PCR de lasanha de bacalhau c/ mistura 2 a Ta de 51°C; 15 – Mistura 1; 16 – Mistura 2.

Analisando o gel da figura 4.10 verificou-se, mesmo com alterações ao protocolo, as amplificações obtidas não tinham a melhor qualidade e que continuava a haver contaminações nas misturas que só continham os primers e onde, supostamente, não deveria haver qualquer amplificação pois não tinha qualquer amostra de ADN. Destes resultados decidiu-se, novamente, alterar as condições da reação de PCR, mais propriamente, alterou-se os reagentes e respetivos volumes utilizados para correr a

reação por considerar-se que os reagentes estavam a contribuir para o insucesso da técnica desenvolvida, pois poderiam ter perdido a sua atividade ao longo das utilizações, devido ao processo de descongelamento de alguns destes reagentes e possível contaminação, durante as várias utilizações, por más práticas laboratoriais. Os volumes e reagentes utilizados para o PCR foram os seguintes: 12,5 µl mix Taq, 5 µl reagente Q, 3 µl de ADN, 1 µl de cada par de primers (Hip1 e Hip2) e 2,5 µl de H₂O estéril, fazendo um total de 25 µl para cada tubo de PCR.

Após estas alterações realizou-se novas extrações das seguintes amostras:

- Bacalhau seco salgado desfiado (*Gadus morhua*) marca “Z”;
- Bacalhau desfiado (*Gadus macrocephalus*) ultracongelado marca “B”;
- Paloco-do-Pacífico desfiado (*Theragra chalcogramma*) ultracongelado marca “B”;
- Bacalhau com natas (espécie não identificada) ultracongelado marca “B”;
- Bacalhau com natas (*Gadus morhua*) ultracongelado marca “C”;
- Bacalhau com natas (*Gadus morhua*) ultracongelado marca “A”.

Concluídas as extrações efetuou-se o PCR seguindo as modificações ao protocolo e para um volume final de 25 microlitros. Como se pode verificar na figura 4.11.

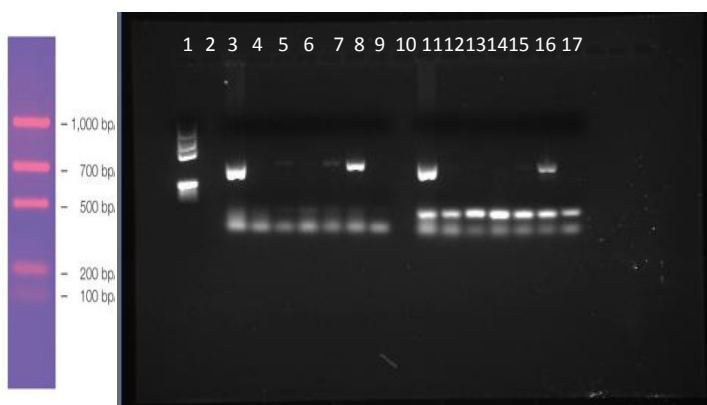


Figura 4.11 – Eletroforese em gel de agarose para o PCR de amostras de bacalhau e espécies afins, poços: 1 – Marcador; 2 – Intervalo; 3 – Bacalhau seco salgado desfiado (*Gadus morhua*) marca “Z” c/ mistura 1; 4 – Bacalhau desfiado (*Gadus macrocephalus*) ultracongelado marca “B” c/ mistura 1; 5 – Paloco-do-Pacífico desfiado (*Theragra chalcogramma*) ultracongelado marca “B” c/ mistura 1; 6 – Bacalhau com natas (espécie não identificada) ultracongelado marca “B” c/ mistura 1; 7 – Bacalhau com natas (*Gadus morhua*) ultracongelado marca “C” c/ mistura 1; 8 – Bacalhau com natas (*Gadus morhua*) ultracongelado marca “A” c/ mistura 1; 9 – Mistura 1; 10 – Intervalo; 11 – Bacalhau seco salgado desfiado (*Gadus morhua*) marca “Z” c/ mistura 2; 12 – Bacalhau desfiado (*Gadus macrocephalus*) ultracongelado marca “B” c/ mistura 2; 13 – Paloco-do-Pacífico desfiado (*Theragra chalcogramma*) ultracongelado marca “B” c/ mistura 2; 14 – Bacalhau com natas (espécie não identificada) ultracongelado marca “B” c/ mistura 2; 15 – Bacalhau com natas (*Gadus morhua*) ultracongelado marca “C” c/ mistura 2; 16 – Bacalhau com natas (*Gadus morhua*) ultracongelado marca “A” c/ mistura 2; 17 – Mistura 2

Da visualização da figura 4.11 verificou-se ampliações com as duas misturas, ou seja, com os primers Hip1 e Hip2. Contudo, continuou-se a observar bandas

inespecíficas de amplificação e contaminação na solução só contendo os primers, o que leva a crer que os primers ao longo do trabalho desenvolvido possam estar a amplificar sequências de ADN que não são as pretendidas, apresentando por isso reduzida especificidade para este fim. Apesar disto, optou-se por repetir um PCR com as amostras amplificadas nos poços 3 e 8 com um maior volume reacional ($v_f=50 \mu l$) e só com a mistura contendo os primers Hip 1, pois foi onde se verificou menos bandas inespecíficas de amplificação. Utilizou-se uma maior quantidade de reagentes para, conseqüentemente, ter-se volume suficiente para correr estas amostras com as enzimas de restrição. O resultado obtido pode ser verificado na figura 4.12, que se segue.

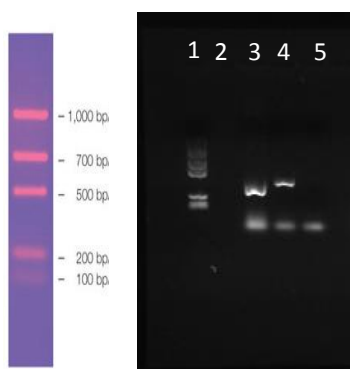


Figura 4.12 – Eletroforese em gel de agarose para o PCR de amostras de bacalhau e espécies afins, poços: 1 – Marcador; 2 – Intervalo; 3 – Bacalhau seco salgado desfiado (*Gadus morhua*) marca “Z” c/ mistura 1; 4 – Bacalhau com natas (*Gadus morhua*) ultracongelado marca “A” c/ mistura 1; 5 – Mistura 1.

Depois de obtidas as amplificações das amostras, anteriormente selecionadas, procedeu-se à digestão com as enzimas de restrição escolhidas para este estudo, AluI, SspI e EcoRV, para assim experimentar obter um padrão de restrição que permitisse a identificação das espécies nos dois produtos em causa e que, segundo o rótulo, tratavam-se de *Gadus morhua*.

De uma forma geral há uma série de fatores que podem condicionar a amplificação por PCR de ácidos nucleicos. Dos quais se podem enumerar os seguintes: primers inapropriados ao estudo, condições de tempo/temperatura impróprias, qualidade variável da polimerase e incorreta concentração de Mg^{2+} . Estes fatores devem ser otimizados através do desenvolvimento de vários perfis de temperaturas baseados nos cálculos dos pontos de melting dos primers e com reações à diluição em série do Mg^{2+} , antes da utilização específica e sensível por PCR para a identificação de espécies [41].

Tendo em conta as condicionantes, anteriormente descritas, para a técnica de PCR existem, ainda, outras particularidades que se devem considerar como é o caso, a possibilidade dos fragmentos de ADN serem de curta dimensão pois devido aos processos de produção de produtos alimentares como tratamentos térmicos são

degradados o que vai diminuir o fragmento. Por consequência, deve-se adaptar o método de identificação molecular com base nesta premissa, ou seja, desenvolver o método para a análise de fragmentos de ADN mais curtos, preferencialmente entre 100 e 200 pb [40]. Por exemplo, Velasco e outros (2013) desenvolveram um estudo com o objetivo de identificar um sistema curto (primers e sonda), específico para a identificação da espécie *S. scombrus* por RT-PCR e com sensibilidade para todos os tipos de amostras, incluindo as amostras fortemente processadas. O sistema desenhado consistia num fragmento de 60 pb, que era pequeno o suficiente para permitir a identificação de produtos comercializados que tinham sido processados por tratamentos que poderiam afetar a integridade do ADN [42]. Enquanto Quinteiro e colaboradores (1998) não conseguiram obter fragmentos amplificados superiores a 200 pb para amostras de conservas de atum com um primer que era suposto produzir fragmentos de 350 pb [43]. Do mesmo modo, Nebola e outros (2010) não conseguiram obter produtos de PCR de 3 amostras cozinhadas [46]. Contrariamente, Hold e outros investigadores (2001) conseguiram diferenciar 36 espécies de peixes por PCR-RFLP digerindo um fragmento do citocromo *b* de 464 pb com 6 enzimas de restrição diferentes. E demonstraram que o método foi útil em produtos processados (100°C durante 15 minutos) e também quando havia mistura de espécies [44]. O ADN pode também estar em pequenas quantidades o que reduz o número de fragmentos com tamanho adequado para a análise molecular. Uma forma de aumentar a quantidade de ADN amplificado é aumentar o número de ciclos de PCR para 45 ou 55 ciclos. Porém, ADN de outras espécies, fraudulenta ou acidentalmente adicionadas, e ingredientes minoritários podem estar presentes em pequenas quantidades que podem influenciar a identificação de espécies. Assim, os métodos utilizados para a identificação de espécies devem ser específicos para resultarem resultados fiáveis [40]. Outro fator que condiciona a amplificação por PCR são as contaminações, isto porque o PCR é um método extremamente sensível. Assim, as amostras alimentares devem ser manipuladas, antes do PCR, num laboratório adequado e controlos negativos devem ser executados em todas as corridas [35, 40]. De igual forma existem inibidores da reação de PCR presentes em diversos constituintes de um alimento e que podem ser purificados em simultâneo com a molécula de ADN alvo o que vai inibir a amplificação. Alguns destes inibidores são, compostos orgânicos e fenólicos, polissacarídeos, glicogénio, proteínas, entre outros. De um modo mais generalizado os inibidores incluem células bacterianas, ADN não específico e contaminantes exógenos. Portanto, a ausência de amplificação em amostras de alimentos pode ser explicada pela inibição da amplificação por PCR em vez de quantidade insuficiente ou ausência da molécula de ADN alvo. Deste modo, para identificar uma espécie num produto alimentar

os métodos de isolamento de ADN devem possibilitar a remoção destes inibidores. Contudo, não há ainda nenhum método geral que seja eficaz com todas as variáveis existentes. Assim, deve-se desenvolver para cada estudo novos métodos de extração e amplificação ou fazer-se a adaptação dos métodos existentes. Para além disto, ADN extraído de um produto alimentar é uma mistura de ADN com diversas origens: bacterial, vegetal, animal e de fungos. Além disso, diversos indivíduos da mesma espécie podem ser utilizados no fabrico de produtos alimentares o que constitui um desafio nesta área [40].

Da análise de todos os géis, pode-se afirmar que vários fatores podem ter condicionado a amplificação por PCR dos quais se pode destacar como fundamentais o desenho dos primers, a amplificação de amostras de produtos processados e a contaminação por inibidores da reação de PCR. Uma vez que o passo de desenho de primers é fundamental no processo de desenvolvimento de um qualquer estudo de identificação de espécies por PCR-RFLP, pois é a partir dos primers desenhados que se vai conseguir amplificar o fragmento escolhido para o estudo que, neste caso, correspondia a uma região de amplificação prevista de 332 pb do *cyt b*. Associado a este facto está a amplificação de material genético proveniente de amostras degradadas por processos térmicos ser mais delicada, isto porque a quantidade e qualidade do ADN diminui com a transformação por altas temperaturas. Por consequência, torna-se mais difícil obter fragmentos superiores a 120 pb [35]. Pelo que as análises a este tipo de amostras devem ser desenvolvidas com base em fragmentos mitocondriais de pequenas dimensões, preferencialmente entre 100 e 200 pb [40]. Posto isto, esta análise deveria ter sido feita neste estudo aquando do desenho dos primers, ou seja, deveria ter-se desenvolvido o estudo com base nos efeitos que os tratamentos alimentares podem ter no fragmento de ADN e deste modo, possivelmente, o mais indicado teria sido desenvolver-se um par de primers para o fragmento com uma região de amplificação prevista de 332 pb para todas as amostras que não foram processadas e outro par de primers para um fragmento de região de amplificação entre os 100 e 200 pb ou inferior a 100 pb para as amostras de refeições pré-preparadas. Outra resolução poderia passar pela adaptação deste estudo a outros desenvolvidos anteriormente e, deste modo, utilizar pares de primers já descritos na literatura como, por exemplo, os primers universais para os gadídeos descritos na publicação de Aranishi e colaboradores (2005) ou os primers descritos por Kocher e outros (1989) e os descritos por Barlet e Davidson (1991) [5, 11, 31]. Contudo, antes de se partir para uma qualquer solução deve ser realizada a sua validação.

4.3. Análises por PCR-RFLP

As análises por RFLP após amplificação dos produtos amplificados por PCR utilizando os pares de primers Hip 1 e Hip 2, desenhados pelo software OligoCalc a partir de sequências retiradas do GenBank e alinhadas posteriormente através do Clustal Omega, foram realizadas por digestão com as enzimas de restrição selecionadas através do NEBcutter V2.0. Da comparação de mapas de restrição obtidos com base na região de amplificação do fragmento do *cyt b* escolhido para este estudo ser de 332 pb, escolheu-se as endonucleases AluI, SspI e EcoRV como enzimas de restrição que possibilitam a obtenção de padrões de restrição e consequente identificação das espécies de gadídeos em estudo. A figura 4.13 demonstra a digestão com estas endonucleases de produtos amplificados por PCR, mais propriamente as amostras amplificadas anteriormente na figura 4.12.

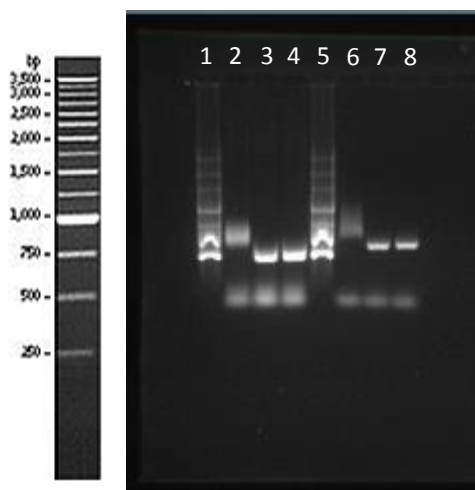


Figura 4.13 – Eletroforese em gel de agarose das digestões com as enzimas de restrição AluI, SspI e EcoRV dos produtos de PCR de amostras de bacalhau e espécies afins, poços: 1 – Marcador (DNA marker, low range, 250 pb ladder, AlfaAesar) ; 2 – Digestão de bacalhau seco salgado desfiado (*Gadus morhua*) marca “Z” c/ AluI; 3 – Digestão de bacalhau seco salgado desfiado (*Gadus morhua*) marca “Z” c/ SspI; 4 – Digestão de bacalhau seco salgado desfiado (*Gadus morhua*) marca “Z” c/ EcoRV; 5 – Marcador (DNA marker, low range, 250 pb ladder, AlfaAesar); 6 – Digestão de bacalhau com natas (*Gadus morhua*) ultracongelado marca “A” c/ AluI; 7 – Digestão de bacalhau com natas (*Gadus morhua*) ultracongelado marca “A” c/ SspI; 8 – Digestão de bacalhau com natas (*Gadus morhua*) ultracongelado marca “A” c/ EcoRV.

Comparando a figura 4.13 com a tabela 3.1, que corresponde às zonas de corte de cada enzima de restrição, os fragmentos obtidos por corte a partir de cada digestão não estão em concordância com o que está representado na tabela 3.1. Isto é, sabendo que as duas amostras utilizadas nesta análise, conforme rotulado, pertencem à espécie *Gadus morhua* era expectável obter dois fragmentos de 140 e 190 pb com a enzima AluI o que não se verificou nem no poço 2 nem no 6, ou seja, o que se verificou foi um padrão de digestão inespecífico o que não permite identificar se a espécie era realmente a que

estava rotulada ou se estamos na presença de mais do que uma espécie. Quanto às outras enzimas, Sspl e EcoRV, não era suposto obter-se padrões de restrição pois estas duas enzimas, espécie *Gadus morhua*, não cortam o fragmento de região de amplificação prevista de 332 pb em estudo, o que vai ao encontro dos resultados registados.

Para além do observado anteriormente é reconhecido que esta técnica possui algumas desvantagens para o processo de identificação de produtos da pesca. E uma das maiores dificuldades que se pode verificar é a possibilidade de variação intra-espécie, na qual indivíduos da mesma espécie exibem diferentes padrões de restrição devido à degenerescência existente no fragmento a ser analisado, criada por remoção ou adição de zonas de restrição. Para evitar estes falsos negativos, deve-se analisar uma grande quantidade de indivíduos da mesma espécie para verificar que não há polimorfismo intra-espécies nos locais alvos e de modo a validar o método. Assim, podia-se ter incluído a este estudo análises a mais espécies da família dos gadídeos e que são comercializadas no mercado nacional como, por exemplo, *Pollachius virens*, *Micromesistius poutassou*, *Gadus ogac*, *Merlangius merlangus*, *Eleginus navaga*, entre outras. Além disto, não há garantia de que em todas as espécies vão resultar padrões únicos de restrição. Por consequência, amostras desconhecidas que contenham espécies que ainda não foram analisadas, por PCR-RFLP, podem ser falsamente identificadas se o seu perfil de restrição coincidir com o de uma espécie previamente analisada, facto este que pode ser a causa do observado na figura 4.3.1 para as enzimas de restrição Sspl e EcoRV. A dependência em endonucleases de restrição faz com que seja necessário um conhecimento prévio das amostras que se quer analisar o que pode ser uma desvantagem. Deste modo, é aconselhável antes das análises por PCR-RFLP verificar se existe informação considerável sobre polimorfismo na sequência da espécie ou entre grupos de espécies. E uma das soluções aplicadas para minimizar os problemas, anteriormente referidos, é o uso de pelo menos dois sítios diagnóstico de restrição [6, 29].

5. Conclusão e Perspetivas Futuras

Analisando todos os resultados obtidos ao longo do trabalho desenvolvido pode-se afirmar que o método desenvolvido para a identificação de espécies de gadídeos não foi o mais indicado para confirmar a presença das espécies declaradas em produtos da pesca. Este facto pode ter estado diretamente ligado aos seguintes fatores: imprecisões nas sequências provenientes de base de dados internacionais, amostras degradadas por tratamentos industriais, desenho dos primers que necessita de maior refinamento, técnica de PCR ou enzimas de restrição. Um a um estes fatores podem ter contribuído para os resultados obtidos neste estudo.

As sequências de nucleótidos analisadas para este estudo foram todas retiradas da base de dados internacional GenBank e, estas, podem por vezes ser falsas devido, possivelmente, a erros de sequenciamento, identificação inadequada de espécies alvo ou outros problemas laboratoriais uma vez que, as reações de PCR são facilmente contaminadas por ADN de outros organismos ou por ADN presente no laboratório. A identificação incorreta de tubos pode, também, levar à atribuição incorreta de sequências a espécies [6, 40].

Para o desenho dos primers é necessário o conhecimento prévio da sequência e controlos adequados devem ser feitos de modo a evitar a possibilidade de obter-se falsos positivos ou resultados negativos. Existe também a possibilidade da amplificação ser confundida com variação intraespecífica, principalmente se os primers provêm de genes mitocondriais. Também pode ocorrer, devido à migração de cópias de genes mitocondriais para o genoma nuclear, a amplificação em simultâneo de pseudogenes nucleares com as sequências mitocondriais, o que pode levar ao redesenho de primers para ultrapassar este problema, julgando nós ser este um dos problemas registados neste estudo [35]. Para além disto, dever-se-ia ter analisado o efeito que os tratamentos térmicos têm na qualidade e quantidade do ADN obtido e desenvolver o método de identificação com base no pressuposto de que estes tratamentos degradam o ADN e, deste modo, direcionar a análise para fragmentos de ADN de curta dimensão, preferencialmente entre 100 e 200 pb [40]. Assim, devia-se ter desenhado os primers para esta zona de amplificação ou um par de primers para o fragmento mitocondrial de região de amplificação prevista de 332 pb e outro par para as amostras de ADN degradadas, recorrendo a uma dupla amplificação.

Como o PCR é um método com elevada sensibilidade podem ocorrer contaminações de diversas naturezas. Portanto, as amostras de produtos alimentares devem ser manipuladas, antes do PCR, num laboratório dedicado ou numa zona

separada das amostras em que o ADN não foi alterado e em todas as corridas deve haver controlos negativos. Além disto, existem inibidores da reação de PCR como é o caso de outros constituintes dos produtos alimentares que podem ser purificados com a molécula de ADN alvo e são conhecidos como inibidores da amplificação, pois podem atuar ao nível da inibição da polimerase e, assim, inibindo a ligação dos nucleótidos à cadeia de molde e por consequência não se dá amplificação.

Finalizando, as enzimas de restrição por terem sido selecionadas com base no tamanho previsto, para o fragmento do citocromo *b* mitocondrial, de 332 pb podem não atuar na região de corte para a qual estavam previstas cortar pois segundo Lockley e Bardsley (2000) em amostras com ADN altamente degradado pode ser complicado gerar produtos de tamanho superior a 120 pb e as enzimas escolhidas para cortar as espécies utilizadas neste estudo (*Gadus morhua*, *G. macrocephalus* e *Theragra chalcogramma*), excetuando a *SspI*, atuam numa região de corte compreendida entre os 120 e os 270 pb daí a possibilidade das enzimas de restrição selecionadas não serem as indicadas para amostras com ADN degradado pois cortam os fragmentos em regiões superiores ao fragmento produzido [35].

Para além destes fatores, existe também a possibilidade de amostras provenientes de alimentos processados conterem uma mistura de espécies, sendo que se amplificarmos por PCR vários fragmentos diferentes desses alimentos possivelmente seriam visíveis alguns fragmentos a 332 pb, mas quando submetidos a digestão com as enzimas de restrição o padrão verificado seria inconclusivo, pois existem várias sequências diferentes presentes nesse tipo de amostra. O que faz da identificação de espécies em simultâneo um dos grandes desafios desta área [40].

Em conclusão, por forma a utilizar métodos genéticos para análises de rotina de identificação de espécies pesqueiras estes fatores, anteriormente descritos, devem ser considerados aquando do desenvolvimento de um qualquer método baseado na análise de ADN e o tamanho do fragmento a ser amplificado deve ser adaptado em conformidade com isto. Apesar do verificado no presente estudo e o facto da obtenção e análise de ADN de produtos processados ser um desafio, atualmente existe numerosos métodos que permitem a identificação de espécies animais a partir de quase todos os substratos orgânicos [40].

Contudo, algumas extrações e consequentes amplificações realizadas neste trabalho foram conseguidas com o método desenvolvido como se verificou nas figuras 4.3 (poços 6 e 12), 4.6 (poços 14 e 15), 4.7 (poços 13 a 18) e 4.12 (poços 3 e 4). O que leva a crer que com algumas modificações o método desenvolvido possa num futuro próximo vir a comprovar-se como uma ferramenta útil em análises de rotina para a

identificação de espécies em produtos da pesca. Mais propriamente, deverá realizar-se um estudo mais aprofundado sobre quais os efeitos dos tratamentos térmicos na qualidade e quantidade de ADN obtido a partir de produtos que foram submetidos a essas temperaturas de processamento. Desenhar um novo par de primers ou adaptar os primers existentes na bibliografia, tendo em conta os efeitos dos tratamentos térmicos na molécula de ADN e adaptar de acordo com isto o tamanho dos fragmentos a serem amplificados. E realizar também uma simulação ou testar a que ciclo de temperaturas e tempos a reação de PCR terá um efeito ótimo na amplificação do ADN, para deste modo se conseguir proceder à correta identificação de espécies em produtos alimentares.

Por outro lado, o uso da técnica de PCR espécie-específica pode ser uma opção viável para este estudo, mais propriamente, para amostras processados onde o fragmento de ADN obtido é de menores dimensões e onde possivelmente existe mistura de espécies. Esta técnica consiste no desenho de *primers* específicos que permitem a amplificação unicamente do ADN da espécie alvo, deste modo só se verificará amplificação se o ADN da espécie em questão estiver presente. Este facto faz com que esta técnica quando seguida de sequenciação seja uma ferramenta adequada para a identificação de espécies [6].

6. Referências Bibliográficas

- [1] Pepe, T. et al. (2005). *Mitochondrial Cytochrome b DNA Sequence Variations: An Approach to Fish Species Identification in Processed Fish Products*. Journal of Food Protection, Vol. 68, N.º 2, págs. 421-425.
- [2] Díaz, A. C. S. *Identificación y Cuantificación de Especies del Género Merluccius Mediante la Utilización de PCR a Tiempo Real*. Vigo, 2012. Tese de Doutoramento.
- [3] Puerta, M^a. E. C. *Utilización de Técnicas Inmunológicas y genéticas en la Diferenciación de Salmón (Salmo salar), Trucha (Oncorhynchus mykiss) y Palometa (Brama raii) Ahumados*. Madrid, 1999. Tese de Doutoramento.
- [4] Gil, L. A. (2007). *PCR-based methods for fish and fishery products authentication*. Trends in Food Science & Technology, Vol. 18, págs. 558-566.
- [5] Calo-Mata, P. et al. (2003). *Identification of gadoid fish species using DNA-based techniques*. European Food Research and Technology, Vol. 217, págs. 259-264.
- [6] Teletchea, F. (2009). *Molecular identification methods of fish species: reassessment and possible applications*. Reviews in Fish Biology and Fisheries, Vol. 19, págs. 265-293.
- [7] Griffiths, A. M. et al. (2014). *Current methods for seafood authenticity testing in Europe: Is there a need for harmonization?*. Food Control, Vol. 45, págs. 95-100.
- [8] Bico, A. P. (2006) *Higiene dos Géneros Alimentícios – Rastreabilidade, Higiene e Segurança Alimentar*. Direção Geral de Veterinária, págs. 1-28.
- [9] *Segurança Alimentar – Síntese da Legislação*. Portal da Europa [em linha]. (Consultado a 4 de Junho de 2014). Disponível na <http://europa.eu.int> (sínteses de legislação).
- [10] Regulamento (CE) n.º 178/2002 de 28 de Janeiro de 2002. Jornal Oficial da União Europeia, L 31 (1.2.2002), 1-24.
- [11] Comi, G. et al. (2005). *Molecular methods for the differentiation of species used in production of cod-fish can detect commercial frauds*. Food Control, Vol. 16, págs. 37-42.
- [12] Ramella, M. S. et al. (2005). *Optimization of Random Amplified Polymorphic DNA protocol for molecular identification of Lophius gastrophysus*. Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Vol. 25, N.º 4, págs. 733-735.
- [13] Regulamento (CE) n.º 104/2000 de 17 de Dezembro de 1999. Jornal Oficial da União Europeia, L 17 (21.1.2000), 22-52.
- [14] Regulamento (CE) n.º 2065/2001 de 22 de Outubro de 2001. Jornal Oficial da União Europeia, L 278 (23.10.2001), 22-52.
- [15] Portaria n.º 1378/2001 de 6 de Dezembro de 2001. Diário da República, I Série-B – N.º 282, Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa.
- [16] Portaria n.º 587/2006 de 22 de Junho de 2006. Diário da República, I Série-B – N.º 119, Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa.
- [17] Declaração de Rectificação n.º 52/2006 de 18 de Agosto de 2006. Diário da República, 1.ª Série – N.º 159, Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa.
- [18] Decreto-Lei n.º 134/2002 de 14 de Maio de 2002. Diário da República, I Série-A – N.º 111, Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa.
- [19] Decreto-Lei n.º 243/2003 de 7 de Outubro de 2003. Diário da República, I Série-A – N.º 232, Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa.
- [20] Decreto-Lei n.º 25/2005 de 28 de Janeiro de 2005. Diário da República, I Série-A – N.º 20, Ministério da Agricultura, Pescas e Florestas. Lisboa.
- [21] Regulamento (UE) n.º 1379/2013 de 11 de Dezembro de 2013. Jornal Oficial da União Europeia, L 354 (28.12.2013), 1-21.
- [22] Regulamento (UE) n.º 1169/2011 de 25 de Outubro de 2011. Jornal Oficial da União Europeia, L 304 (22.11.2011), 18-63.

- [23] Pérez, M. et al. (2004). *Identification of South Atlantic Hakes (Merluccius australis and Merluccius hubbsi) in Processed Foods by PCR-RFLPs of Cytochrome b Gene*. Journal of Aquatic Food Product Technology, Vol. 13, N.º 2, págs. 59-67.
- [24] *Gadídeos*. Infopédia Dicionários Porto Editora, Língua Portuguesa com Acordo Ortográfico [em linha]. Porto: Porto Editora, 2003-2015. (Consultado a 19 de Junho de 2014). Disponível na [http://www.infopedia.pt/\\$gadideos?uri=lingua-portuguesa-aa0/Gad%C3%ADdeos](http://www.infopedia.pt/$gadideos?uri=lingua-portuguesa-aa0/Gad%C3%ADdeos)
- [25] Gonçalves, S. M. N. S. *Bacalhau Salgado Seco: Influência da Demolha e do Tratamento Culinário na sua Qualidade*. Lisboa, 2011. Tese de Mestrado
- [26] Dias, S. M. P. *Processo de Cura Amarela do Bacalhau: Dinâmica de Populações Microbianas, Indicadores Químicos e Descritores Sensoriais*. Lisboa, 2013. Tese de Doutoramento.
- [27] Dias, J. F. et al. (2001). *A saga do “fiel amigo”. As indústrias portuguesas do bacalhau*. Economia Global e Gestão. Lisboa: INDEG-ISCTE, Vol. VI, N.º 1, págs. 103-117.
- [28] Hubalkova, Z. et al. (2007). *Methods of gadoid fish species identification in food and their economic impact in the Czech Republic: a review*. Veterinarni Medicina, Vol. 52, N.º 7, págs. 273-292.
- [29] Rasmussen, R. S. e Morrissey, M. T. (2008). *DNA-Based Methods for the Identification of Commercial Fish and Seafood Species*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, Vol. 7, págs. 280-295.
- [30] Quinteiro, J. et al. (2001). *Identification of Hake Species (Merluccius Genus) Using Sequencing and PCR-RFLP Analysis of Mitochondrial DNA Control Region Sequences*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 49, págs. 5108-5114.
- [31] Aranishi, F. et al. (2005). *Identification of gadoid species (Pisces, Gadidae) by PCR-RFLP analysis*. Journal of Applied Genetics, Vol. 46, N.º 1, págs. 69-73.
- [32] Di Finizio, A. et al. (2007). *Identification of gadoid species (Pisces, Gadidae) by sequencing and PCR-RFLP analysis of mitochondrial 12S and 16S rRNA gene fragments*. European Food Research and Technology, Vol. 225, págs. 337-344.
- [33] Dooley, J. J. et al. (2005). *Fish Species Identification Using PCR-RFLP Analysis and Lab-on-a-Chip Capillary Electrophoresis: Application to Detect White Fish Species in Food Products and an Interlaboratory Study*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 53, págs. 3348-3357.
- [34] Wolf, C. et al. (2000). *PCR-RFLP Analysis of Mitochondrial DNA: Differentiation of Fish Species*. LWT-Food Science and Technology, Vol. 33, N.º 2, págs. 144-150.
- [35] Lockley, A. K. e Bardsley, R. G. (2000). *DNA-based methods for food authentication*. Trends in Food Science & Technology, Vol. 11, págs. 67-77.
- [36] Rasmussen, H. B. (2012). *Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified Fragments (PCR-RFLP) and Gel Electrophoresis - Valuable Tool for Genotyping and Genetic Fingerprinting*. Gel Electrophoresis - Principles and Basics, In Tech, págs. 315-334.
- [37] Oliveira, M. C. S. et al. *Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase*. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2007. 978-85-86764-12-7.
- [38] Sambrook, J. et. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2ª edição. Nova Iorque: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 0879695773.
- [39] Cawthorn, D.-M. et al. (2011). *Comparative study of different methods for the extraction of DNA from fish species commercially available in South Africa*. Food Control, Vol. 22, págs. 231-244.
- [40] Teletchea, F. et al. (2005). *Food as forensic molecular identification: uptake and challenges*. Trends in Biotechnology, Vol. 23, N.º 7, págs. 359-366.
- [41] Wilson, I. G. (1997). *Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification*. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 63, N.º 10, págs. 3741-3751.

- [42] Velasco, A. et al. (2013). *Development of a Real-Time PCR method for the identification of Atlantic mackerel (Scomber scombrus)*. Food Chemistry, Vol. 141, págs. 2006-2010.
- [43] Quinteiro, J. et al. (1998). *Use of mtDNA Direct Polymerase Chain Reaction (PCR) Sequencing and PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Methodologies in Species Identification of Canned Tuna*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 46, págs. 1662-1669.
- [44] Hold, G. L. et al. (2001). *Development of a DNA-based method aimed at identifying the fish species present in food products*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 49, págs. 1175-1179.
- [45] Rasmussen, R. S. e Morrissey, M. T. (2009). *Application of DNA-Based Methods to Identify Fish and Seafood Substitution on the Commercial Market*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, Vol. 8, págs. 118-154.
- [46] Nebola, M. et al. (2010). *PCR-RFLP Analysis of DNA for the Differentiation of Fish Species in Seafood Samples*. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy, Vol. 54, págs. 49-53.

7. Anexos

Anexo I – Lista Consolidada de Denominações Comerciais de Espécies de Pescado da Direção-Geral de Recursos Naturais, Segurança e Serviços Marítimos