

U. PORTO



**FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DO PORTO**

Cláudia Patrícia Moreira Tomás

**Autenticação de bacalhau processado (*Gadus spp.*) por
análise de fusão de alta resolução de fragmentos de ADN
(HRMA)**

**Dissertação do 2º ciclo de Estudos Conducente ao Grau de Mestre em
Controlo de Qualidade na Especialidade de Água e Alimentos**

Orientador:

Doutor Miguel Ângelo Rodrigues Pinto de Faria

Coorientadora:

Professora Doutora Isabel Maria Pinto Leite Viegas Oliveira Ferreira

Julho 2015

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO
APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE
DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

PUBLICAÇÕES

Da realização deste trabalho resultaram as seguintes comunicações:

C. Tomás, M. A. Faria, I. M. P. L. V. O. Ferreira;

“Authentication of processed gadoid species by barcode sequencing and phylogenetic analysis” XX Encontro Luso-Galego de Química, Porto, Novembro 2014 (comunicação poster).

C. Tomás, M. A. Faria, I. M. P. L. V. O. Ferreira;

“Authentication of dried salted codfish by fast PCR HRMA” II Food Integrity Conference, Bilbao, Fevereiro 2015 (comunicação poster).

C. Tomás, M. A. Faria, I. M. P. L. V. O. Ferreira;

“Salted Codfish Authentication By Fast PCR-HRMA” Sessão pública de apresentação dos projetos de investigação científica (IJUP), Porto, Maio 2015 (comunicação poster).

AGRADECIMENTOS

Ao Doutor Miguel Faria, agradeço pela oportunidade que me ofereceu com este trabalho, pelos novos conhecimentos adquiridos, por toda a ajuda, apoio, pela disponibilidade constante, competência, empenho e dinamismo.

À Professora Doutora Isabel Ferreira por ter disponibilizado todos os recursos necessários ao longo da realização deste trabalho.

A todos os colaboradores que trabalham diariamente no Serviço de Bromatologia.

À Rita, pela amizade, pelas conversas, conselhos, desabafos, almoços, lanches... e muito mais.

À Bárbara, pela paciência, pelos momentos de descontração, pelas brincadeiras que fizeram o tempo passar mais rápido, pelos concelhos, desabafos, e principalmente pela tua amizade que cresceu neste ano de tese.

À Rosa, Joana, Tiago, pelos momentos de descontração e companhia nos almoços e lanches.

Aos meus pais, sem os quais todo o meu percurso escolar não teria sido possível, pela paciência e por acreditarem sempre em mim.

À minha família e amigos que me acompanharam neste percurso, que me apoiaram, que acreditaram e que me ajudaram a cumprir mais um dos meus objetivos.

Muito OBRIGADA a todos!!!

RESUMO

O Bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*) é um dos peixes mais consumidos na Europa, assumindo uma especial importância em Portugal quer pela quantidade consumida quer pela relevância gastronómica e mesmo cultural. O aumento do consumo mundial desta espécie provocou a diminuição dos *stocks* marinhos e, como consequência, a escassez e aumento de preços. Neste contexto, a comercialização de diferentes espécies de peixes, apresentando características organolépticas e morfológicas semelhantes, como se fossem *Gadus morhua*, é uma prática muito tentadora para os comerciantes sem valores morais. Hoje em dia, a autenticidade de alimentos, particularmente de peixe, assume uma importância crucial, devido ao número de casos de adulteração e impacto no consumidor. A autenticação de alimentos assume assim grande importância na comunidade científica como o demonstra o grande desenvolvimento de vários métodos analíticos, físico-químicos e biológicos, rápidos e precisos, que permitem distinguir espécies recorrendo a marcadores específicos como proteínas e ADN. Devido à estabilidade relativa deste último, os métodos de ADN desempenham um papel cada vez maior no controlo da segurança alimentar e na deteção de adulterações em alimentos.

Este trabalho consistiu no desenvolvimento de marcadores moleculares para a avaliação da autenticidade (identificação de espécies) de bacalhau em produtos conservados pelo sal e ultracongelados. Recorreu-se para tal à técnica de análise de fusão de alta resolução de fragmentos de ADN (HRMA). Foram adquiridas 33 amostras no mercado comercializadas sob a designação de espécie de *G. morhua*, *G. macrocephalus* e *G. Chalcogrammus* na forma de inteiro, desfiado e demolido ultracongelado. Procedeu-se, numa primeira fase, à identificação das espécies pela sequenciação da região *barcode* subunidade 1 do gene citocromo-oxidase (COI). Verificou-se que 93 % das amostras sequenciadas estavam corretamente rotuladas, contudo detetaram-se duas adulterações rotuladas como *G. morhua* mas identificadas como *G. macrocephalus*, de menor valor comercial. Na fase seguinte procedeu-se ao desenvolvimento de 7 novos marcadores no gene COI pelo desenho de *primers* para amplificação de fragmentos com um tamanho aproximado de 100 pb, em zonas onde foram detetados polimorfismos adequados à análise HRMA. Esta metodologia, utilizada com os marcadores desenvolvidos e selecionados, mostrou-se eficiente na discriminação de *Gadus morhua* das outras espécies, tendo permitido a identificação correta em 97 % das amostras. Este estudo demonstrou que a substituição de espécies pode ser avaliada por HRMA, de uma forma rápida e específica, configurando uma robusta ferramenta de autenticação alimentar.

Palavras-chave: Autenticidade, PCR, HRMA, *barcoding*, *Gadus*.

ABSTRACT

Atlantic cod (*Gadus morhua*, L.) is one of the most consumed and exploited white fish with gastronomic relevance in several European countries, particularly in Portugal where it is highly consumed and assumes a notorious gastronomic and cultural importance. As a consequence *G. morhua* is highly exploited provoking dramatic fish stock depletion. In this framework the commercialization of different fish species, presenting similar organoleptic and morphological characteristics, as if they were *G. morhua*, is a very attractive practice for unscrupulous traders.

Nowadays the authenticity of foods, particularly of fishes, assumes a crucial importance due to increasing cases of food fraud and its impact on consumers. Food authentication is therefore highly focused by researchers who had developed a high number of methodologies for species discrimination throughout the use of specific markers as proteins and DNA, being this last progressively more used in food authentication.

The main objective of the present work consisted in the development of molecular markers for the authentication (species identification) of codfish in salted and deep-frozen products using the High Resolution Melting Analysis technique. Thirty three samples were acquired in the markets commercialized under the designation of *G. morhua*, *G. macrocephalus* and *G. Chalcogrammus*, as whole fish, shredded and deep-frozen products. Species were firstly identified by sequencing de barcode region cytochrome-oxidase subunit I (COI) gene. We found that 93 % of the samples were correctly identified in the label however two adulterations were labeled as *G. morhua* but identified as *G. macrocephalus*, of less commercial value.

In the following step, 7 new HRMA markers were developed by *de novo* designing primer pairs for the amplification of short fragments (ca. 100 bp) in polymorphic regions of the COI gene. The chosen methodology, as well as the selected newly developed markers, proved to be very efficient in discriminating the species *Gadus morhua* from others, which permitted the correct identification of the specie in 97% of the samples.

The present study demonstrated that the species substitution can be detected by the HRMA methodology in a fast and specific way configuring thus a robust tool for food authentication.

Palavras-chave: Authenticity, PCR, HRMA, *barcoding*, *Gadus*.

ÍNDICE GERAL

	Páginas
Publicações	iii
Agradecimentos	iv
Resumo	v
Abstract	vi
Índice Geral	vii
Índice de Figuras	viii
Índice de Tabelas	x
Lista de Abreviaturas	xi
1.Introdução e Objetivos	2
1.1. A Importância do peixe na alimentação	3
1.2. A Importância ecológica do peixe	4
1.3. Espécies de peixes com relevância alimentar e comercial	6
1.3.1. Espécies de peixes mais comercializadas	6
1.4. Identificação e autenticação de espécies	8
1.4.1. Importância do controlo de espécies em produtos alimentares	8
1.4.2. Autenticidade do bacalhau (<i>Gadus spp.</i>)	11
1.4.3. Metodologias para a identificação de espécies de peixes	15
1.4.3.1. Marcadores moleculares clássicos: proteínas e ADN	16
1.4.3.2. Sequenciação de regiões do ADN <i>barcoding</i>	25
1.4.3.3. Análise de fusão de alta resolução (HRMA)	29
2.Materiais e Métodos	
2.1. Amostragem	33
2.2. Preparação das amostras e extração de ADN	35
2.3. Quantificação de ADN nos extratos	38
2.4. Amplificação por PCR e eletroforese dos produtos amplificados	39
2.5. Protocolo para purificação dos fragmentos amplificados para sequenciação	40
2.6. Análise das sequências e filogenia	41
2.7. Desenho de novos <i>primers</i>	42
2.8. Otimização das condições de amplificação dos novos <i>primers</i>	43
2.9. Protocolo da amplificação e análise de fusão em PCR em tempo real	43
3.Resultados e Discussão	
3.1. Quantificação de ácidos nucleicos, avaliação da pureza e estado de degradação de ADN nos extratos	46
3.2. Análise das sequências e filogenia	50
3.3. Desenho de novos <i>primers</i> para pequenos fragmentos polimórficos	54
3.4. Otimização das condições de amplificação dos novos <i>primers</i>	56
3.5. HRMA do gene COI	59
3.6. Otimização das condições analíticas em HRMA	60
3.7. Desempenho dos novos <i>primers</i> em HRMA	62
3.8. Aplicação dos marcadores desenvolvidos para a distinção HRMA da totalidade das amostras	66
4.Conclusão	73
5.Bibliografia	76

ÍNDICE DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1 – <i>Gadus morhua</i> .	11
Figura 2 - Produção mundial de captura da espécie <i>Gadus morhua</i> (Adaptado de http://www.fao.org/fishery/species/2218/en).	12
Figura 3 - Produção mundial de captura da espécie <i>Gadus macrocephalus</i> (Adaptado de http://www.fao.org/fishery/species/3011/en).	13
Figura 4 - Produção mundial de captura da espécie <i>Gadus chalcogrammus</i> (Adaptado de http://www.fao.org/fishery/species/3011/en).	13
Figura 5 - <i>Gadus macrocephalus</i> .	14
Figura 6 - <i>Gadus chalcogrammus</i> .	14
Figura 7 - Mapa das zonas de pesca da FAO (adaptado de http://www.fao.org/fishery/area/search/en).	15
Figura 8 - Esquema das diferentes etapas da técnica de polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP) (Adaptado de (Semagn et al. 2006)).	18
Figura 9 - Desenho esquemático de condições de reação para ADN polimórfico amplificado ao acaso (RAPD) (Adaptado de (Semagn et al. 2006)).	20
Figura 10 - Passos em análise AFLP (Adaptado de (Semagn et al. 2006)).	21
Figura 11 - Desenho esquemático de marcadores SSR. Os segmentos a azul indicam fragmentos repetitivos cujo número varia em diferentes indivíduos e as setas pretas os primers para amplificação da zona de repetição (Adaptado de http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/probe/doc/TechSTS.shtml).	22
Figura 12 - SNP descoberta por um alinhamento de traços de sequência obtida a partir de sequenciação direta de produtos de PCR genômicas (Adaptado de (Semagn et al. 2006)).	23
Figura 13 - Curva da diferença das espécies que mostram onde as amostras têm sido identificadas a partir da morfologia. Amostra de referência, <i>M. carinatus</i> (baseline vermelho), <i>M. carinatus</i> (vermelho) amostras incluídas <i>M. Halotrachys</i> (azul) (Adaptado de (Fitzcharles 2012)).	31
Figura 14 - Protocolo de extração de ADN pelo Kit NucleoSpin® Food.	36
Figura 15 - Adaptador para leitura de absorvência em pequenos volumes (min. 4 microlitros) num leitor de placas.	38
Figura 16 - Termociclador (C1000) e módulo ótico de PCR em Tempo Real (CFX96).	44
Figura 17 - Gel de agarose das amostras de bacalhau extraídas pelo KIT Nucleospin Food utilizando gel genômico. L: Ladder (Lambda DNA/HindIII Marker,2).	47
Figura 18 - Gel de agarose das amostras de bacalhau extraídas pelo método SDS/Ureia utilizando gel genômico. L: Ladder (Lambda DNA/HindIII Marker,2).	47
Figura 19 - Árvore filogenética Neighbor-Joining das 30 amostras sequenciadas para o gene COI.	52
Figura 20 - Gel de agarose dos produtos de amplificação em PCR convencional dos primers <i>Gadus_3</i> , <i>Gadus_4</i> e <i>Gadus_6</i> .	58

Figura 21 - Curvas diferenciais resultantes de HRMA de 600 pb do gene COI as amostras 10,15,21 da espécie <i>G.morhua</i> , 2,3,16 da espécie <i>G.macrocephalus</i> e 6,20,23 da espécie <i>G.chacogrammus</i> .	59
Figura 22 - Curvas diferenciais de fusão para três amostras de cada espécie amplificadas nas diluições 1:20 e 1:50 para o per de <i>primers</i> Gadus_7.	61
Figura 23 - Curvas diferenciais de fusão usando o par de <i>primers</i> Gadus_1 e Gadus_6 para 3 amostras de cada espécie.	62
Figura 24 - Curvas diferenciais de fusão usando os pares de <i>primers</i> Gadus_3, Gadus_4 e Gadus_5 para 3 amostras de cada espécie.	63
Figura 25 - Curvas diferenciais de fusão usando o par de <i>primers</i> Gadus_7 em três amostras de cada espécie.	64
Figura 26 - Curvas diferenciais de fusão usando o par de <i>primers</i> Gadus_2 em três amostras de cada espécie.	65
Figura 27 - Curva de fusão não processada dos sinais de amplificação de todas as amostras (<i>Primers</i> Gadus_2). A linha a preto representa um branco de amplificação.	66
Figura 28 - Curvas de fusão normalizadas ao longo do eixo de temperatura.	67
Figura 29 - Curvas diferenciais de fusão dos fragmentos amplificados pelo primer Gadus_2 para as 33 amostras, em duplicado.	68

ÍNDICE DE TABELAS

	Páginas
Tabela 1 - Captura Marinha: principais espécies e géneros.	6
Tabela 2 - Percentagens dos peixes mais comercializados no mundo.	7
Tabela 3 - Problemas de autenticidade que são encontrados nos produtos alimentares com base em peixe.	10
Tabela 4 - Vantagens e desvantagens dos diversos marcadores moleculares usados para a identificação de peixes.	24
Tabela 5 - Tipo de processamento, descrição e espécie indicadas no rótulo, zona de captura, origem e lote das 33 amostras estudadas.	34
Tabela 6 - Massa pesada, em miligramas, de todas as amostras de bacalhau.	35
Tabela 7 - Sequências utilizadas para o desenho de novos <i>primers</i> .	42
Tabela 8 - Condições de tempos e temperaturas de amplificação em PCR em tempo real e em análise HRM.	43
Tabela 9 - Razão de absorvência a 260/280 e quantificação de ácidos nucleicos das amostras extraídas pelo kit Nucleospin Food e método SDS/Ureia.	46
Tabela 10 - Razão de absorvência a 260/280 e quantificação de ácidos nucleicos da totalidade das amostras extraídas pelo kit Nucleospin Food.	49
Tabela 11 - Resultados da base de dados GenBank e BOLD de todas as amostras de bacalhau salgado inteiro, desfiado e demolhado/ultracongelado.	51
Tabela 12 - Regiões polimórficas dos sete <i>primers</i> desenhados.	54
Tabela 13 - <i>Primers</i> selecionados, respetiva sequência, tamanho, temperatura de <i>melting</i> e tamanho do fragmento amplificado.	55
Tabela 14 – Temperatura de hibridação otimizada para cada par de <i>primers</i> desenvolvidos e perfil de amplificação	57
Tabela 15 – Resultados obtidos das curvas de fusão de todas as amostras de bacalhau salgado inteiro, desfiado e demolhado/ultracongelado.	70

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
ARN	Ácido Ribonucleico
BOLD	Barcode of life database
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
COI	Cytochrome c oxidase I
Cyt b	Cytochrome b
dNTP	Desoxirribonucleótido trifosfato
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
HRMA	High Resolution Melt Analysis
IFPRI	International Food Policy Research Institute
IUCN	International Union for Conservation of Nature
mtDNA	DNA mitocondrial
nDNA	DNA nuclear
OSPAR	Convention for the Protection of the marine Environment of the North-East Atlantic
PCR	Polymerase Chain Reaction
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
Rnase	Ribonuclease
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SPAR	Single Primer Amplification Reaction
SSCP	Single-Strand Conformation Polymorphism
SSR	Simple sequence repeats
STR	Short Tandem Repeats
Th	Temperatura de hibridação
Tm	Temperatura de fusão (desnaturação)
UV	Ultravioleta
VNRT	Variable Number Tandem Repeat

1. Introdução e Objetivos

O peixe tem um grande impacto sobre a economia de muitos países, através da pesca e do fornecimento de uma quantidade significativa de alimentos, sendo ainda importante pela sua biodiversidade envolvendo, portanto, questões ecológicas.

Atualmente, há uma grande preocupação com a fraude comercial, dadas as práticas de substituição de espécies por outras de menor qualidade ou menor valor comercial e outros tipos de adulteração de produtos à base de peixe. O bacalhau é um dos peixes mais importantes de todos os peixes comerciais em todo o mundo. O aumento dos produtos processados e do comércio internacional, pode causar a substituição intencional ou acidental de espécies. Uma questão importante a ter em conta na identificação das espécies de peixes é a sua correta rotulagem. As normas de rotulagem para os produtos derivados da pesca são cada vez mais exigentes e a legislação indica a necessidade de rotular os produtos de peixe com a denominação comercial e científica, a fim de garantir a rastreabilidade ao longo da cadeia, e assim, evitar possíveis fraudes. Daí que o controlo alimentar e a identificação de espécies, tema central deste trabalho, venham adquirindo uma importância crescente nos últimos anos, a par do desenvolvimento de métodos específicos.

Metodologicamente, este trabalho baseou-se no desenvolvimento de um método rápido, para autenticação (identificação de espécies) em produtos processados de bacalhau (desfiado) recorrendo à técnica de PCR-HRMA (High Resolution Melting Analysis) após identificação de desenho de *primers* específicos para regiões polimórficas entre as espécies em questão.

Em termos de conteúdo, explora, em primeiro lugar, a importância do peixe, na alimentação e na ecologia; depois de abordar a importância do controlo de espécies em produtos alimentares, foca-se especificamente na identificação das mesmas e nos métodos utilizados nesse âmbito.

Esta dissertação teve como objetivo estudar a autenticação de produtos processados do género *Gadus* por um método rápido PCR-HRMA. Deste modo, para atingir este objetivo foram desenhados *primers* que foram previamente testados para aplicação do método HRMA. Como produtos processados do género *Gadus*, utilizou-se o *Gadus morhua*, *Gadus macrocephalus* e *Gadus chalcogrammus*. Foi escolhida esta matriz pois como o bacalhau é muito consumido em Portugal, foi interessante avaliar a sua autenticidade.

Uma prova em que os portugueses são muito consumidores deste peixe é a notícia no jornal Público de 19 de novembro de 2014, em que destacava um estudo de mercado, que concluía um crescimento de 4% no consumo de bacalhau em Portugal em relação ao ano anterior, ou seja, entre janeiro e outubro de 2014, os portugueses consumiram 40 mil

toneladas de bacalhau. Concluiu-se que os portugueses compram menos vezes bacalhau, mas em maior quantidade, aproveitando as campanhas de preços que os retalhistas utilizam para atrair os clientes¹.

1.1. A IMPORTÂNCIA DO PEIXE NA ALIMENTAÇÃO

O peixe é uma componente alimentar de grande importância e um elemento fundamental para uma alimentação saudável. Pode considerar-se uma fonte de proteínas animais de qualidade e preço relativamente baixo (Mohanty et al. 2013). Adicionalmente, a gordura que possui é um fator relevante na prevenção de diversas doenças. Trata-se, assim, de um alimento de excelente valor nutricional, fornecendo ainda uma grande variedade de vitaminas e minerais² incluindo as vitaminas B (no caso de espécies com maior teor de gordura), A e D, cálcio, fósforo, magnésio, ferro, cobre, selénio e no caso dos peixes de água salgada, iodo³ (Thilsted et al. 2014).

Com efeito, sendo o peixe uma excelente fonte de proteínas, gorduras com boas propriedades nutricionais, micronutrientes e vitaminas, a sua ingestão é essencial para o bom funcionamento do nosso organismo⁴ (Ederal et al. 2013).

O peixe está a ganhar importância como um alimento de saúde e a sua produção em 2020, terá que multiplicar sete vezes para atender à procura dos consumidores em todo o planeta caso se mantenham os atuais níveis de crescimento da procura (Mohanty et al. 2013).

Apesar da pressão dos consumidores e do mercado, subsistem ainda restrições ao aumento do consumo de peixe das quais a mais óbvia é a sua indisponibilidade, a preços acessíveis, para os que possuem menor capacidade económica. A escassez, como resultado do crescimento da procura, tem conduzido a um aumento dos preços e, embora a aquicultura venha contribuindo para reduzir o défice (Hall et al. 2013), o custo das espécies da aquicultura tende a ser mais elevado do que o das pequenas espécies de baixo valor, tradicionalmente consumidas pelos detentores de menor poder de compra (Thilsted et al. 2014).

¹Cf-<http://www.publico.pt/economia/noticia/consumo-de-bacalhau-em-portugal-cresceu-4-ate-outubro-1676770> (acedido em Janeiro de 2015).

² Cf. <http://www.fao.org/focus/e/fisheries/nutr.htm> (acedido em janeiro de 2014);

³Cf. <http://www.fao.org/fishery/topic/12318/en> (acedido em janeiro de 2014);

⁴ Cf. <http://www.fao.org/focus/e/fisheries/nutr.htm> (acedido em janeiro de 2014); http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/animalwelfare/Protein_Puzzle_web_1.pdf (acedido em dezembro de 2013).

Tendo em conta as restrições na quantidade de pescado disponível e, paralelamente, a pressão do aumento de consumo, manter os alimentos perigosos fora da cadeia alimentar requer um controlo eficaz. Enquanto a maioria dos países consegue aplicar um nível adequado de inspeção nas suas exportações, há muitos casos em que essa supervisão não abrange as pescas para os consumidores domésticos (Thilsted et al. 2014).

Nos últimos anos, tem havido muita publicidade sobre os potenciais riscos do consumo de peixe, relacionados com a presença de poluentes ou contaminantes. Grande parte das mensagens foi sensacionalista, mas é certo que existem problemas reais que precisam de ser enfrentados, não apenas relacionados com contaminantes químicos, mas, também, com doenças transmitidas por peixes e devidas à falta de higiene e de controlo alimentar eficaz (Thilsted et al. 2014).

As exigências dos consumidores em relação ao peixe, tanto a nível de quantidade como qualidade têm vindo aumentar nos últimos anos. Este facto acarreta, necessariamente, uma maior necessidade de garantir a segurança, rastreabilidade e autenticidade deste produto (Mohanty et al. 2013).

1.2. A IMPORTÂNCIA ECOLÓGICA DO PEIXE

A pesca é uma das atividades humanas que tem um grande impacto nos ecossistemas marinhos. Por isso, é fundamental a colaboração com as autoridades da pesca, a fim de preservar esses ecossistemas, uma vez que desempenham um papel importante no ciclo de vida dos organismos marinhos, nomeadamente na sua criação, reprodução e alimentação⁵. Num ambiente cada vez mais favorável ao comércio de peixes a nível global, a gestão das pescas deve incentivar práticas de pesca sustentáveis e uma indústria eficiente⁶.

O relatório “Fish to 2030: Prospects for fishery and aquaculture” amplia as projeções de oferta global, procura e comércio dos peixes e produtos pesqueiros para 2030, incorporando as previsões do “Fish to 2020” e os novos desenvolvimentos nos mercados globais de peixes. Este relatório, publicado pela FAO, com a colaboração do Banco Mundial e o Instituto Internacional de Investigação sobre Políticas Alimentares (IFPRI) prevê que, em 2030, 62% do peixe será proveniente da aquacultura, com um crescimento mais acelerado de espécies como a tilápia, a carpa ou o peixe-gato (Bank 2013).

⁵ Cf. <http://www.fao.org/fishery/topic/2889/en> (acedido em janeiro de 2014)

⁶ Cf. <http://www.fao.org/fishery/topic/2892/en> (acedido em janeiro de 2014)

Segundo a FAO, 38% de todo o peixe produzido atualmente no mundo é exportado e, em termos de valor, mais de dois terços das exportações de pescado dos países em desenvolvimento destinam-se aos países mais desenvolvidos. Neste contexto, em que a China assume um papel importante, por se estar a transformar num importante e crescente mercado de consumo de peixes, tem-se registado um aumento dos investimentos em aquacultura, a fim de responder à procura. O mesmo documento prevê que, em 2030, a Ásia venha a representar 70% do consumo mundial de peixe. No sentido contrário, a África vai registar uma diminuição do consumo de peixe per capita, de 1% ao ano, desde 2010 até 2030 (Bank 2013).

1.3. ESPÉCIES DE PEIXES COM RELEVÂNCIA ALIMENTAR E COMERCIAL

1.3.1. ESPÉCIES DE PEIXES MAIS COMERCIALIZADAS

A base de dados relativos à captura mundial da FAO inclui estatísticas para quase 1600 espécies marinhas, sendo que as 23 espécies e géneros cuja captura ultrapassou uma média anual de meio milhão de toneladas em 2011 e 2012 (Tabela 1) representam apenas cerca de 40 por cento do total de captura. Quase dois terços dessas espécies principais não dependem dos fundos marinhos para viverem, apresentando notórias transformações devidas às alterações ambientais. Em vários casos, elas são amplamente utilizadas como matéria-prima na transformação em farinha e óleo de peixe, caracterizando-se pelo seu baixo valor comercial (FAO 2014).

Tabela 1 – Captura Marinha: principais espécies e géneros.

Ranking 2012	Nome comum	Nome científico	2012 (toneladas)	Variação (percentagem)	
				2003– 2012	2011-2012
1	Anchoveta	Engraulis ringens	4 692 855	– 24.4	– 43.6
2	Escamudo-do-alasca	Theragra chalcogramma	3 271 426	13.3	2.0
3	Atum-bonito	Katsuwonus pelamis	2 795 339	28.0	5.7
4	Sardinela	Sardinella spp.	2 345 038	14.2	0.0
5	Arenque	Clupea harengus	1 849 969	– 5.6	3.9
6	Cavala	Scomber japonicus	1 581 314	– 13.4	– 7.8
7	Carapau	Decapterus spp.	1 441 759	0.2	4.2
8	Albacora	Thunnus albacares	1 352 204	– 9.8	9.1
9	Biqueirão-do-Indo- Pacífico	Engraulis japonicus	1 296 383	– 31.8	– 2.2
10	Chibata	Trichiurus lepturus	1 235 373	– 1.1	– 1.8
11	Bacalhau do Atlântico	Gadus morhua	1 114 382	31.3	6.0
12	Sardinha	Sardina pilchardus	1 019 392	– 3.1	– 1.7
13	Capelim	Mallotus villosus	1 006 533	– 12.0	17.9
14	Alabote	Dosidicus gigas	950 630	136.4	4.9
15	Serra do pacífico	Scomberomorus spp	914 591	30.3	– 0.4
16	Cavala	Scomber scombrus	910 697	32.1	– 3.7
17	Espadilha	Strangomera bentincki	848 466	179.1	– 4.4
18	Farolito	Acetes japonicus	588 761	8.4	7.0
19	Menhadem-escamudo	Brevoortia patronus	578 693	10.8	– 7.2
20	Falso-besugo-doirado	Nemipterus spp.	576 487	– 9.4	4.6
21	Anchova	Engraulis encrasicolus	489 297	– 21.1	– 19.4
22	Carapau-chileno	Trachurus murphyi	447 060	– 75.1	– 29.5
23	Sardinha australiana	Sardinops caeruleus	364 386	– 42.5	– 43.0

Fonte: Adaptada de FAO, 2014 (Adaptado de State & Fisheries, 2014).

Em relação aos peixes mais comercializados no mundo, a FAO refere diferentes percentagens de valor total dos produtos comercializados, e estas estão apresentadas na tabela 2.

Tabela 2 – Percentagens dos peixes mais comercializados no mundo.

Peixes	Percentagem (%)
Camarão	15
Salmão e Truta	14
Peixes de fundo (bacalhau, pescada, arinca e escamudo)	10
Atum	9
Cefalópodes (polvos, lulas e choccos)	3
Farinha de peixe	3
Óleo de peixe	1

Fonte: Adaptada de FAO, 2015 (<http://www.fao.org/news/story/pt/item/214518/icode/>).

Pelos dados apresentados pode atestar-se a importância quer ambiental quer económica do bacalhau como espécie de relevo na alimentação humana.

A alteração dos hábitos de consumo e de pesca, à escala global, tem posto em causa a sobrevivência de algumas espécies. A preservação da biodiversidade marinha implica evitar a captura em épocas de defeso, isto é, quando as espécies piscícolas estão em reprodução ou são espécies juvenis. Os produtos do mar apresentam períodos de abundância, que correspondem à maturidade das espécies, sendo durante os mesmos que o consumidor pode adquirir um produto melhor e a preços mais interessantes⁷.

⁷Cf. <http://www.docapesca.pt/pt/do-mar-ao-prato.html> (acedido em junho de 2014).

1.4. IDENTIFICAÇÃO E AUTENTICAÇÃO DE ESPÉCIES

1.4.1. IMPORTÂNCIA DO CONTROLO DE ESPÉCIES EM PRODUTOS ALIMENTARES

É talvez um reflexo da condição humana que a fraude de uma forma ou outra tem acompanhado as transações comerciais ao longo de muitos séculos.

Em questões de autenticidade não é só o consumidor final que sofre, também a indústria de alimentos é cada vez mais atingida e isso pode efetivamente significar a ruína para um fabricante de alimentos (Ashurst and Dennis 1996).

Normalmente, as questões de autenticidade de alimentos não representam uma ameaça para a saúde pública. No entanto, esta afirmação baseia-se fortemente sobre a moralidade das pessoas envolvidas em atividades ilícitas. Mas podem resultar consequências graves, se alguns fabricantes não tiverem consideração com a saúde humana, no intuito de ganhar dinheiro (Ashurst and Dennis 1996; Scarano and Rao 2014).

Esta questão da autenticidade é, portanto, de grande importância para os organismos fiscalizadores que precisam ter conhecimento não apenas como surgem os problemas, mas como eles podem ser monitorados e avaliados (Ashurst and Dennis 1996; Scarano and Rao 2014).

A identificação das espécies de peixes constituintes dos produtos alimentares é uma questão primordial para a verificação da veracidade da rotulagem do produto. Uma das formas mais comuns de adulteração de produtos à base de peixe envolve a substituição por outras espécies de menor valor económico, tendo em vista o aumento do lucro económico. A legislação, cada vez mais exigente, indica a necessidade de rotular produtos de peixe com a denominação comercial e científica que é regulada pelo regulamento da União Europeia N.º.1379/2013, a fim de garantir a rastreabilidade em toda a cadeia e, assim, evitar possíveis fraudes (Herrero et al. 2010; Lamendin et al. 2015; Pinto et al. 2013).

Foram assim implementadas algumas regulamentações para assegurar a informação completa e correta, garantindo assim a transparência do mercado. Como consequência, estes regulamentos exigem o desenvolvimento de ferramentas analíticas para tornar possível a distinção entre espécies estreitamente relacionadas (Mohanty et al. 2013).

A autenticação de espécies de peixes é um desafio particularmente difícil uma vez que se estima que mais de 800 espécies de peixes são internacionalmente comercializadas sob diferentes formas, marcas e preparações. Como os preços são diferentes, dependendo das preferências de produtos de diferentes espécies e de consumo, é importante que os mercados e o ambiente protejam devidamente os consumidores contra práticas dolosas

que consistem, nomeadamente, em substituir espécies de valor mais alto por outras espécies semelhantes de menor valor⁸.

A nível nacional, a legislação alimentar determina genericamente que o rótulo não deve induzir em erro os consumidores, mas o comércio internacional e o uso de diferentes produtos com termos semelhantes tornam o sistema de rotulagem bastante complicado⁸.

Espécies diferentes podem ter o mesmo nome em países diferentes (ou regiões de um mesmo país). Por outro lado, por vezes, a mesma espécie tem nomes diferentes na mesma língua, em diferentes locais do próprio país. Por exemplo, nos países nórdicos, os enlatados *Sprattus sprattus* são rotulados como *sardiner* ou *ansjos* e os não enlatados são chamados de *brisling*, no entanto, noutros países, referem-se à sardinha como *Sardina pilchardus* e à anchova como da espécie *Engraulidae*. O nome robalo é muito utilizado no comércio internacional, mas refere-se a diferentes espécies de várias famílias, sendo mesmo denominado de peixe-gato, podendo originar informação enganosa⁸.

Por outro lado, as empresas de produção de alimentos, associações comerciais e, até mesmo, países inteiros podem ser protetores de nichos de mercado para determinadas espécies de peixes e produtos. Isto acontece porque exigem um investimento significativo na pesquisa e desenvolvimento, publicidade, promoção e sensibilização dos consumidores para os atributos reclamados do produto específico que tentam proteger para a criação de tais nichos de mercado. Portanto, as empresas de sucesso, ou os países, não aceitam que outros produtos idênticos usem a mesma denominação, a mesma publicidade, e também não aceitam a competição no mercado. Isto pode ser uma fonte de disputas comerciais entre países, de que exemplos recentes mostram que a identificação de espécies de peixe é um problema recorrente no mundo. Embora esses conflitos envolvam geralmente um número limitado de países, têm um impacto direto sobre o comércio internacional de pescado⁸.

Os problemas de autenticidade que são detetados em produtos alimentares com base em peixe podem dividir-se em quatro grandes categorias: relativamente à origem (origem geográfica ou selvagem/aquicultura); por substituição, nomeadamente, de proteínas do peixe, gordura, a fim de intencionalmente enganar o consumidor; no tratamento, mormente se um produto congelado é passado a fresco ou um produto irradiado é vendido como não irradiado; e problemas diversos, que ocorrem, por exemplo, quando usados corantes artificiais que são referidos como naturais, o uso de conservantes não é referido no rótulo ou o nível de água adicionada é subdeclarado (Arvanitoyannis et al. 2005). Na tabela 3 estes são apresentados de uma forma resumida.

⁸ Cf. <http://www.fao.org/fishery/topic/14807/en> (acedido em janeiro de 2014).

Tabela 3 – Problemas de autenticidade que são encontrados nos produtos alimentares com base em peixe.

Origem	- Quanto a origem geográfica não é corretamente assinalada	- Quando consta que o produto é selvagem, sendo na realidade proveniente de aquicultura
Substituição	- Por outras proteínas de peixe ou por outra gordura	- Outras substituições, a fim de intencionalmente enganar o consumidor
Tratamento	- Congelado a ser passado a fresco	- Produto irradiado vendido como não irradiado
Diversos problemas	- Uso de corantes artificiais e serem identificados como naturais; ou de conservantes não referidos nos rótulos	- Nível de água adicionada que é subdeclarado

Fonte: Baseada em informação de Arvanitoyannis, 2005.

Verifica-se assim que para aumentarem o seu lucro, os fabricantes podem ser tentados a rotular incorretamente os respetivos produtos alimentares, substituindo espécies por outras de menor qualidade ou menor valor comercial e/ou adicionando ingredientes de menor qualidade nos mesmos (Druml and Cichna-Markl 2014; Herrero et al. 2010; Pinto et al. 2013). Daí a importância do controlo de espécies e alimentar, por forma a garantir que os consumidores não sejam defraudados nas suas escolhas alimentares (Galal-Khallaf et al. 2014). Nos últimos anos, foram desenvolvidos vários métodos analíticos para a identificação de espécies e controlo da autenticidade de alimentos. Métodos analíticos específicos e sensíveis são necessários para verificar a conformidade dos alimentos com a respetiva declaração, a fim de proteger os consumidores de práticas fraudulentas. Estes métodos desempenham, pois, um papel importante, indo desde os métodos físicos, alicerçados na microscopia, aos métodos baseados no ADN, passando pelas técnicas que recorrem à análise de proteínas (Druml and Cichna-Markl 2014; Galal-Khallaf et al. 2014; Scarano and Rao 2014).

1.4.2. AUTENTICIDADE DO BACALHAU (*Gadus spp.*)

O futuro do bacalhau em Portugal esteve em discussão num encontro onde reuniu produtores, importadores e exportadores de bacalhau, representantes da distribuição (retalho) e de outras empresas norueguesas ligadas à pesca e ao processamento de bacalhau. Durante o evento foram analisados dados concretos sobre a situação atual dos recursos, quotas, dados estatísticos sobre o consumo de bacalhau em Portugal durante o ano de 2013 e as respetivas previsões do consumo para os dois anos seguintes. Da análise disponível, concluiu-se que em Portugal no ano 2013 o bacalhau vendido através de retalho foi de 58 000 toneladas, o que resultou num aumento total de 11,4%. Devido ao crescimento da procura de bacalhau seco salgado, este teve um aumento de 14,7%, enquanto que a diminuição da procura do demolido / ultracongelado, verificou-se um decréscimo de 9%. Apesar das elevadas quotas de pesca de bacalhau do ano 2013, segundo as previsões científicas, estas irão normalizar no decorrer dos próximos anos⁹.

O Bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*, figura1) é um dos peixes mais consumidos em vários países europeus, assumindo uma especial importância em Portugal, quer pela quantidade consumida quer pela importância gastronómica e mesmo cultural. Como o consumo mundial aumentou, houve então a diminuição



Figura 1 – *Gadus morhua*.

nas capturas, e como consequência, provocou uma escassez desta espécie, como se pode observar na figura 2. As razões por esta escassez ou diminuição da captura deve-se ao aumento do consumo em todo o mundo desta espécie e aos seus altos níveis de exploração. Como existiu uma queda de volume das existências do bacalhau do Atlântico, a União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN) e a Convenção para a Proteção do Ambiente Marinho do Nordeste Atlântico (OSPAR) incluiu esta espécie na lista vermelha como uma espécie vulnerável com estatuto de ameaçada (<http://www.greenpeace.org/portugal/pt/O-que-fazemos/Campanha-Dos-Oceanos-Mercados-em-Portugal/lista-vermelha/>). Esta situação trouxe a procura e captura de espécies alternativas, aumentando o seu número no mercado para assim atender à demanda dos consumidores. Neste contexto, a comercialização de diferentes espécies de peixes, apresentando características organoléticas e morfológicas semelhantes, como se fossem *Gadus morhua*, é uma prática muito tentadora para os comerciantes sem

⁹Cf. <http://www.mardanoruega.com/Articles/Portugal/Saiba-mais/Artigos/O-Futuro-do-Bacalhau-volta-a-ser-tema-de-discuss%C3%A3o-em-Portugal> (acedido em junho de 2015).

escrúpulos. Além disso, o aumento dos produtos transformados e a existência de um mercado global, pode levar a substituições de espécies liberalmente ou acidentalmente. Alguns exemplos de substitutos para o bacalhau do atlântico são o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*), bacalhau da Gronelândia (*Gadus ogac*), maruca (*Molva molva*), juliana (*Pollachius pollachius*), escamudo (*Pollachius virens*), arinca (*Melanogrammus aeglefinus*), paloco do Alasca (*Theragra chalcogramma* ou *Gadus chalcogrammus*), verdinho (*Micromesistius poutassou*), pescada (*Merluccius spp*), e badejo (*Merlangius merlangius*) (Herrero et al. 2010; Lago and Vieites 2012; Pinto et al. 2013).

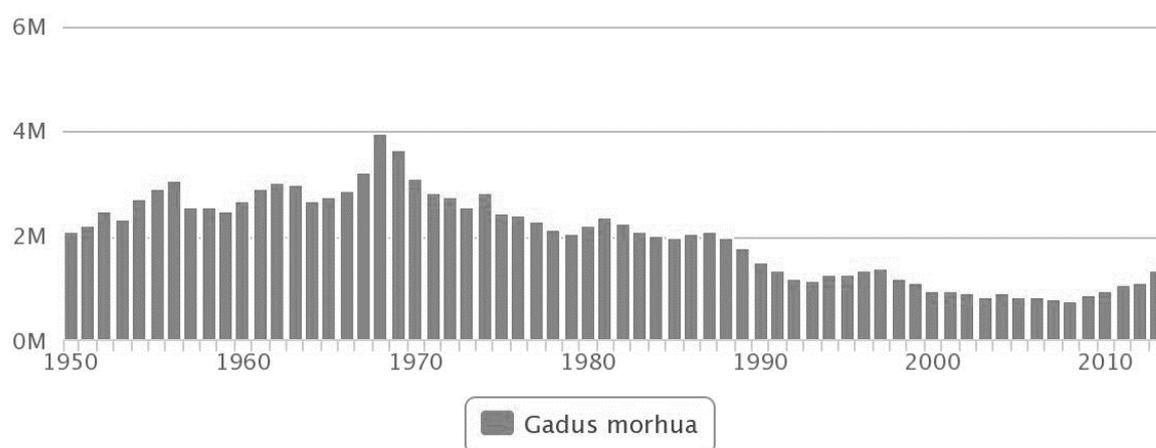


Figura 2 - Produção mundial de captura da espécie *Gadus morhua* (Adaptado de <http://www.fao.org/fishery/species/2218/en>).

O bacalhau da espécie *Gadus morhua* é pescado na zona da FAO 27 (figura 7) e tem origem no Atlântico Nordeste. É dos peixes mais nobres pescados na Noruega e na Islândia. Este Bacalhau poderá também aparecer identificado como Bacalhau do Atlântico. É comercializado fresco, refrigerado ou congelado, inteiro ou como filetes, secos e salgados, secos e sem sal, em salmoura ou fumados. Outros produtos obtidos a partir do bacalhau são caras de bacalhau salgadas, línguas de bacalhau em salmoura, óleo de fígado, entre outros¹⁰.

Em Portugal as espécies de gadoides mais comercializados e simultaneamente os mais prováveis substitutos para o bacalhau do Atlântico (*G. morhua*) são o bacalhau do Pacífico (*G. macrocephalus*) e o paloco do Alasca (*Theragra chalcogramma* ou *G. chalcogrammus*).

¹⁰Cf. http://correiogourmand.com.br/info_03_dicionarios_gastronomicos_alimentos_carnes_pescados_peixe_bacalhau_06_os_tipos.htm (acedido em Fevereiro de 2015).

Por isto, houve então um aumento nas capturas destas espécies, como se pode observar nas figuras 3 e 4.

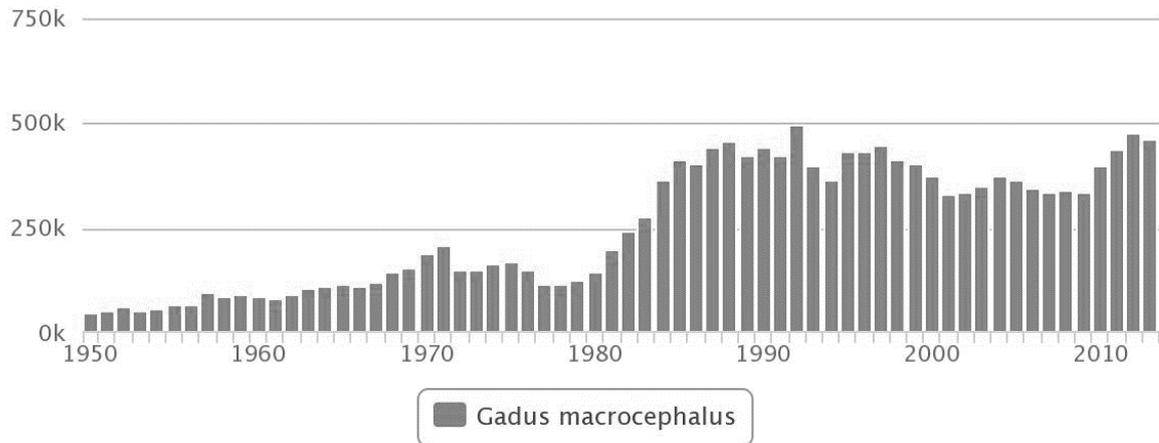


Figura 3 - Produção mundial de captura da espécie *Gadus macrocephalus* (Adaptado de <http://www.fao.org/fishery/species/3011/en>).

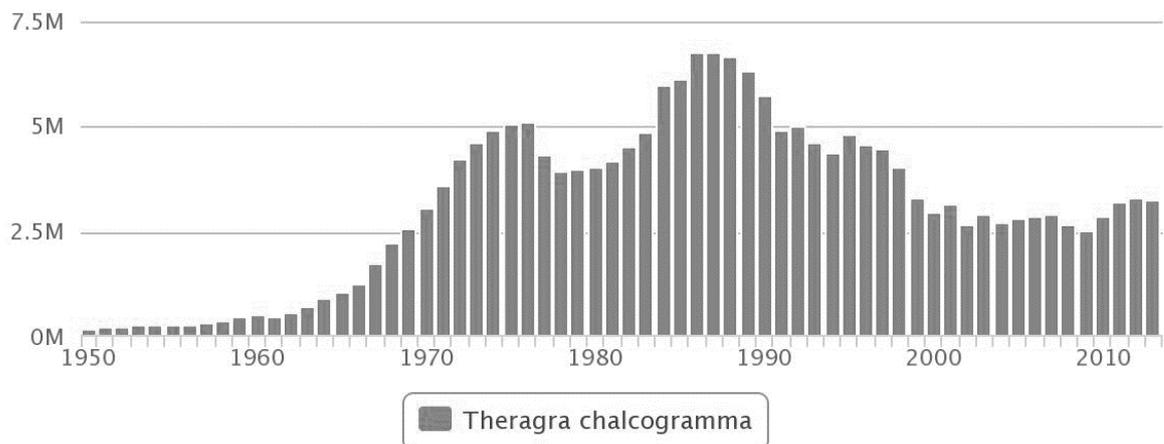


Figura 4 - Produção mundial de captura da espécie *Gadus chalcogrammus* (<http://www.fao.org/fishery/species/3017/en>).

O bacalhau da espécie *Gadus macrocephalus* (Bacalhau do Pacífico, figura 5) ordem dos Gadiformes, família Gadidae e gênero *Pollachius*, pode ser encontrado com alguma frequência tanto em Portugal como no Brasil. É um peixe de menor qualidade, mas é mais branco que o Bacalhau do Atlântico e não apresenta uma textura, nem sabor a que as pessoas estão habituadas. Houve uns anos em que o consumo do Bacalhau do Pacífico foi elevado, pois o seu preço era baixo comparativamente com o do Atlântico¹¹.



Figura 5 – *Gadus macrocephalus*.

O *Theragra chalcogramma* (figura 6), ordem dos Gadiformes, família Gadidae, gênero *Theragra* mais conhecido como paloco, é um parente bastante mais económico do Bacalhau, sendo que o mesmo é pescado tanto na zona do Alasca como nas zonas da



Figura 6 – *Gadus chalcogrammus*.

Rússia e China. Atualmente é classificado no género *Gadus*, espécie *G. chalcogrammus*. É um peixe de tamanho pequeno, e aparece normalmente no formato de migas, como substituto às migas de bacalhau. Em Portugal e no Brasil é fácil de encontrar, a maioria importado da China, com uma variabilidade enorme em termos de qualidade. Em Portugal, os desfiados de paloco aparecem com frequência mal identificados em termos de rotulagem, pois é muito vendido como paloco do Alasca, pescado na zona FAO 67 (figura 7), mas são importados da China e pescados em maioria na zona FAO 61 (figura 7). Gastronomicamente o paloco é mais macio, magro, de sabor suave, de cor branca e é considerado um peixe de alta qualidade. É muito usado na culinária coreana, japonesa e russa¹².

Como referido, estas duas espécies apresentam características morfológicas semelhantes ao bacalhau do Atlântico (mais escasso e de maior valor gastronómico) pelo que são aquelas que mais frequentemente são usadas na substituição fraudulenta nobre *G. morhua*. Desta forma, o desenvolvimento de metodologias para a autenticação de bacalhaus, com um maior foco na substituição da espécie *G. morhua*, deve focar estas referidas espécies.

¹¹Cf. http://correiogourmand.com.br/info_03_dicionarios_gastronomicos_alimentos_carnes_pescados_peixe_bacalhau_06_os_tipos.htm (acedido em Fevereiro de 2015).

¹²Cf. http://correiogourmand.com.br/info_03_dicionarios_gastronomicos_alimentos_carnes_pescados_peixe_bacalhau_06_os_tipos.htm (acedido em Fevereiro de 2015).

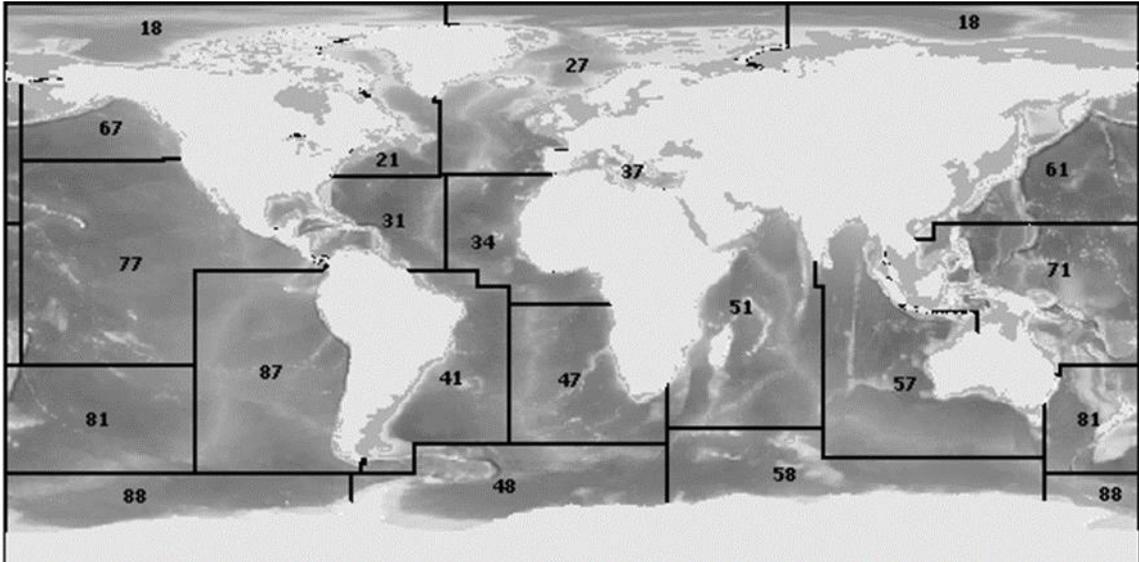


Figura 7 – Mapa das zonas de pesca da FAO (Adaptado de <http://www.fao.org/fishery/area/search/en>).

1.4.3. METODOLOGIAS PARA A IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE PEIXES

A identificação das espécies é atualmente realizada recorrendo a diversas metodologias, sendo o mais comum aquele que se baseia nas características morfológicas destas. No entanto, alguns tipos de produtos processados não podem ser identificados por métodos convencionais, como é o caso dos filetes de peixe e peixe desfiado, uma vez que as suas características morfológicas são removidas durante o processo de filetagem, dificultando a identificação da espécie da qual são provenientes (Alves da Silva et al. 2012). Para além disso a identificação morfológica é bastante subjetiva no caso da necessidade de distinção de espécies morfológicamente similares (como é o caso de algumas espécies do género *Gadus*). Pelas razões anteriormente apresentadas, a certificação de autenticidade de peixes processados necessita usualmente da aplicação de ferramentas mais avançadas como as que recorrem a marcadores moleculares quer baseados na análise de proteínas quer nos polimorfismos a nível do ADN (Carvalho et al. 2009).

Os primeiros métodos de identificação baseados em eletroforese de proteínas foram reconhecidos como métodos oficiais para identificação de espécies em peixes processados. No entanto, o facto de as proteínas serem estáveis em produtos frescos e congelados, mas desnaturadas e danificadas por calor ou processo de salga, torna tal metodologia inadequada para identificação de produtos de peixes fumados e enlatados (Wong and Hanner 2008).

A utilização de marcadores moleculares visa evitar essa e outras dificuldades do mesmo tipo pois estes marcadores são relativamente estáveis à temperatura e não se alteram por influência ambiental, isto porque, as diferenças encontradas nas sequências de ADN são fixadas no momento da fertilização, o que não se verifica nos marcadores morfológicos e proteicos (aloenzimas e isoenzimas) (Hilsdorf and Krieger).

Desde a década de 60 do século passado que se utilizam marcadores morfológicos e proteicos no estudo da variabilidade populacional de peixes. Com o passar dos anos, as técnicas de biologia molecular foram evoluindo, tendo vindo a ser localizados diversos marcadores nas regiões do genoma mitocondrial e nuclear, uma vez que havia características morfológicas que não estavam presentes e tornava-se necessário recorrer a outros métodos de identificação, como a análise molecular através do ADN (Hilsdorf and Krieger).

Os marcadores moleculares são desenvolvidos não só com o objetivo da verificação de autenticidade mas também para o estudo de populações de peixe com diferentes objetivos, nomeadamente para: identificação de híbridos e espécies, estabelecimento de relações filogenéticas, estimativa do tamanho efetivo de populações, identificação de populações-chave para conservação de recursos genéticos, determinação genética do impacto da introdução de populações e peixes cultivados em uma determinada área. Os marcadores desenvolvidos com os objetivos anteriores podem por vezes ser adaptados para marcadores de autenticidade usados na certificação de produtos processados (Wong and Hanner 2008) facto que disponibiliza um variado leque de marcadores disponíveis seguidamente descritos.

1.4.3.1. MARCADORES MOLECULARES CLÁSSICOS: PROTEÍNAS E ADN

Os marcadores moleculares mais utilizados nas últimas duas décadas podem dividir-se essencialmente em marcadores baseados no polimorfismo de proteínas (essencialmente enzimas) e marcadores baseados na variabilidade da sequência de determinadas regiões genéticas.

Os marcadores proteicos mais frequentes são as isoenzimas que podem ser definidas como um grupo de múltiplas formas moleculares de uma enzima, que resulta de variações dos genes codificadores. Têm como vantagens o baixo custo, a facilidade na obtenção de marcadores genéticos codominantes e o facto de se tratar de um método rápido e de fácil execução. O baixo número dos sistemas enzimáticos polimórficos constitui todavia uma

desvantagem quando se pretende identificar um grande número de espécies como no caso dos peixes (Faleiro 2007)

Testes de autenticidade são muitas vezes confrontados com o problema dos elevados custos e fiabilidade da técnica para a identificação de espécies. As isoenzimas mostraram ser uma técnica rápida e útil para avaliar a homogeneidade de espécies de peixes de bacalhau processados (Sussi et al. 2002) e espécies afins, como exemplo, a pescada, o verdinho, e o paloco (Piñeiro et al. 2000). Mesmo que, por vezes, esta técnica não seja sensível o suficiente, muitos autores descrevem-na com sucesso para análise de diferentes espécies de peixes marinhos (Lo Brutto et al. 1998).

Com o avanço das tecnologias modernas da Biologia Molecular, surgiram vários tipos de marcadores moleculares que detetam o polimorfismo genético diretamente no ADN, ou seja, possibilitam identificar as regiões do genoma que contêm diferenças genéticas entre indivíduos e populações (Faleiro 2007). Os métodos baseados na análise de ADN desempenham um papel cada vez maior no controlo da segurança alimentar e na deteção de adulterações em alimentos (Druml and Cichna-Markl 2014).

Estes últimos têm vindo a ser aplicados na identificação de uma grande variedade de espécies de peixes (Hubalkova et al. 2008), dado permitirem a avaliação das relações filogenéticas entre espécies, géneros, famílias e populações. Têm como principal vantagem não sofrerem influência ambiental, ou seja, as diferenças encontradas nas sequências de ADN não são alteradas pela ação do ambiente, como nos marcadores morfológicos e nos proteicos (aloenzimas e isoenzimas), pois são fixadas no momento da fertilização, mantidos durante a vida do animal e enquanto os tecidos e células não forem sujeitos a processos capazes de degradar completamente o ADN.

Como desvantagem, destaca-se a necessidade de equipamentos e técnicas mais complexas, sendo estes também mais dispendiosos (Hilsdorf 2010).

O desenvolvimento da técnica da reação em cadeia da polimerase – PCR, foi uma referência importante para o aperfeiçoamento e a globalização do uso de marcadores moleculares. Isto, porque a identificação de espécies baseada no ADN consiste na amplificação específica de um ou mais fragmentos de ADN por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR), o que permite a multiplicação exponencial da região do marcador possibilitando a análise com quantidades diminutas de matriz ou mesmo em matrizes algo degradadas (Mafra et al. 2007).

Estudos genéticos em populações de peixes, que implicam a comparação das diferenças a nível da sequência de algumas regiões genómicas, têm sido realizados utilizando marcadores proteicos como aloenzimas/isoenzimas (Faleiro 2007; Hilsdorf 2010) e

moleculares, como RAPD (polimorfismo de DNA amplificado ao acaso) (Faleiro 2007; Hubalkova et al. 2008; Semagn et al. 2006), SPAR (reação de amplificação com primer único) (Faleiro 2007; Hilsdorf 2010), RFLP (polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição) (Calo-Mata et al. 2003; Dudu et al. 2011; Faleiro 2007; Hubalkova et al. 2008; Mafra et al. 2007; Rasmussen Hellberg et al. 2010; Rehbein 2007; Scarano and Rao 2014; Semagn et al. 2006), AFLP (polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados) (Faleiro 2007; Semagn et al. 2006), VNTR (número variável de repetições em série – minissatélites) (Faleiro 2007; Hilsdorf 2010), STR (repetições curtas em série) (Dantas and Nodari; Faleiro 2007; Hilsdorf 2010) e SNP (Faleiro 2007; Scarano and Rao 2014; Semagn et al. 2006).

Um dos primeiros marcadores moleculares de ADN utilizados na identificação de peixes foram os RFLPs (figura 8). Caracterizam-se por serem fragmentos de ADN obtidos pela digestão do extrato com enzimas de restrição, separados por eletroforese, e visualizados por meio de hibridização com sondas de sequências homólogas marcadas com radioatividade ou fluorescência. As vantagens associam-se à alta reprodutibilidade dos marcadores e à sua codominância; e ao facto de não ser necessário o prévio conhecimento das sequências em análise enquanto que as principais desvantagens residem no facto de este marcador ser mais trabalhoso, demorado e dispendioso, à necessidade de sondas específicas para a hibridização e à grande exigência na quantidade e qualidade de ADN a ser analisado (Faleiro 2007; Scarano and Rao 2014).

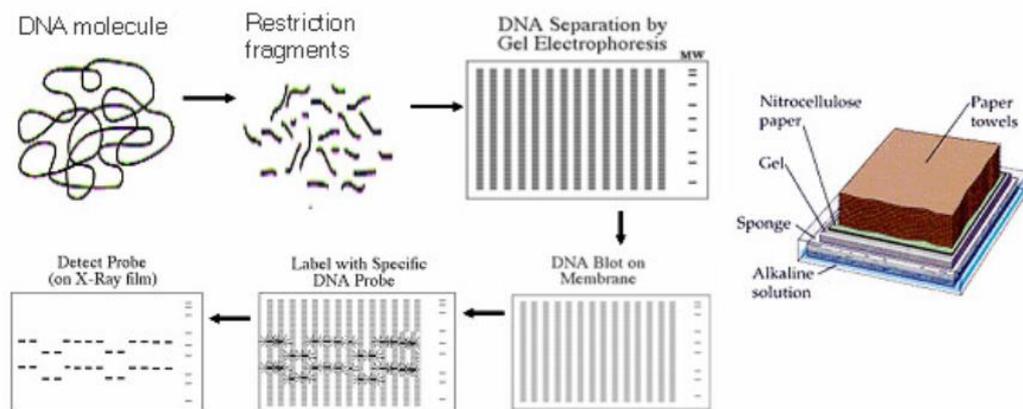


Figura 8 - Esquema das diferentes etapas da técnica de polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP) (Adaptado de (Semagn et al. 2006)).

Os RFLPs são utilizados para diferentes espécies de peixe, como bacalhau do Atlântico, paloco, arinca (Calo-Mata et al. 2003), salmonídeos (Dudu et al. 2011), linguado, peixe vermelho, salmão, atum, enguia, pescada, badejo, truta arco – íris, verdinho, entre outros (Hubalkova et al. 2008; Mafra et al. 2007; Rasmussen Hellberg et al. 2010; Rehbein 2007).

Estes marcadores foram eficientes para a diferenciação da pescada e de outras espécies gadoid, pois fazem a análise com várias combinações de enzimas de restrição. Além disso, não requerem o uso de padrões de referência comerciais, ao contrário das técnicas baseadas na análise de proteínas (Hubalkova et al. 2008).

Alguns autores descrevem este método como simples, baseando-se na técnica de PCR-RFLP para a diferenciação de diferentes espécies de peixes, tais como, salmão, atum e enguia. No entanto, quando se considera a diferenciação de uma determinada espécie numa mistura de espécies, os autores recomendam o uso de *primers* específicos para cada espécie. Este procedimento tem sido bastante utilizado em peixes e mariscos, para a investigação da sua autenticidade, pois é um dos métodos mais comuns, rápidos, reproduzíveis e robustos que oferece sobre outras técnicas. Mas este método continua a conter um certo número de inconvenientes e uma grande desvantagem é a possibilidade de variação intra-espécie, em que os indivíduos das mesmas espécies exibem diferentes padrões de restrição devido à degenerescência no fragmento de ADN a ser analisada (Rasmussen and Morrissey 2008).

Os RAPDs (figura 9) são fragmentos de ADN amplificados pela reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando *primers* curtos de sequência aleatória que hibridam em diversos pontos do genoma. Estes têm como vantagens a facilidade e rapidez na obtenção dos marcadores, a necessidade de quantidades mínimas de ADN e a generalização das análises. Com estes marcadores, pode-se trabalhar com qualquer espécie (por exemplo, pescada, verdinho, bacalhau do Atlântico, badejo, entre outros) (Hubalkova et al. 2008), uma vez que não existe a necessidade de conhecimento prévio de dados de sequência de ADN para a construção dos *primers* utilizados. A sua desvantagem prende-se com a baixa reprodutibilidade, devida à sensibilidade da técnica às condições experimentais (Faleiro 2007).

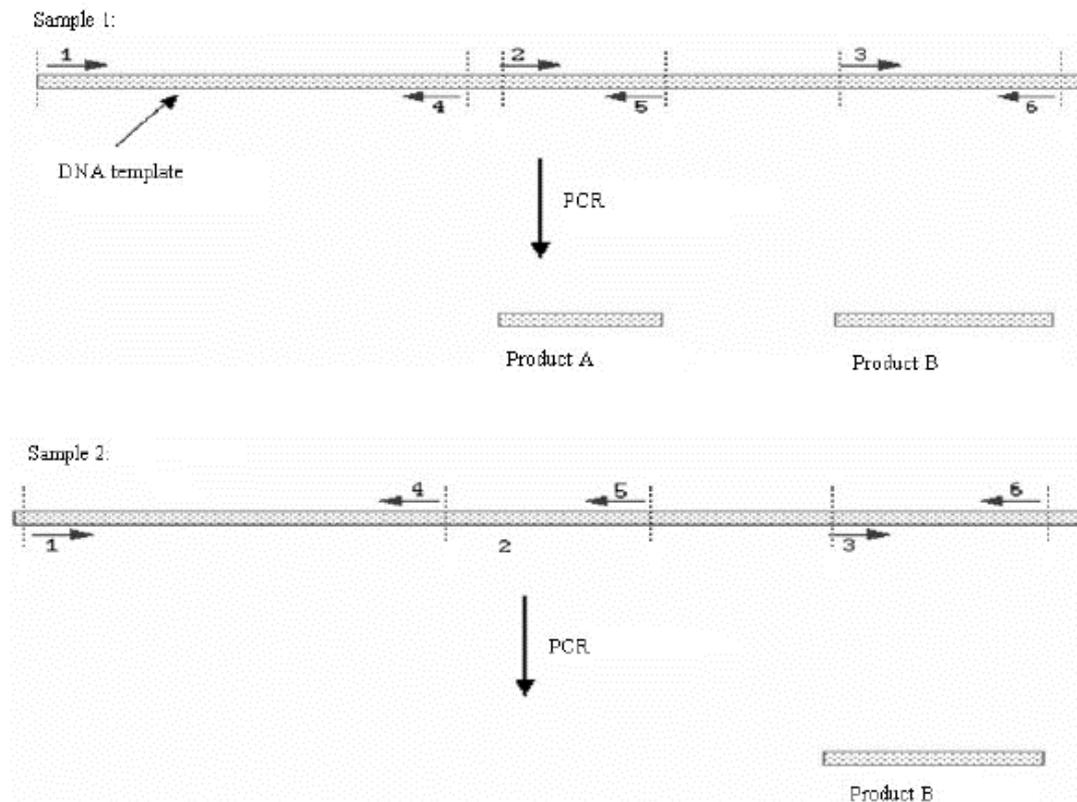


Figura 9 - Desenho esquemático de condições de reação para ADN polimórfico amplificado ao acaso (RAPD) (Adaptado de (Semagn et al. 2006)).

Nos últimos anos, um número de plantas, micróbios e diferentes espécies de animais foram caracterizados por análise RAPD. Estes marcadores também auxiliaram ao estudo da diversidade genética de espécies recém-descobertas ou modificados. Tornaram-se uma ferramenta comum e eficiente para a análise molecular ou caracterização genética de diferentes espécies (Fu et al. 2015).

Os marcadores AFLPs (figura 10) são fragmentos de ADN (80 a 500 pb) obtidos com a digestão do ADN com enzimas de restrição, seguidos da ligação de oligonucleotídeos adaptados e da amplificação seletiva dos fragmentos via PCR.

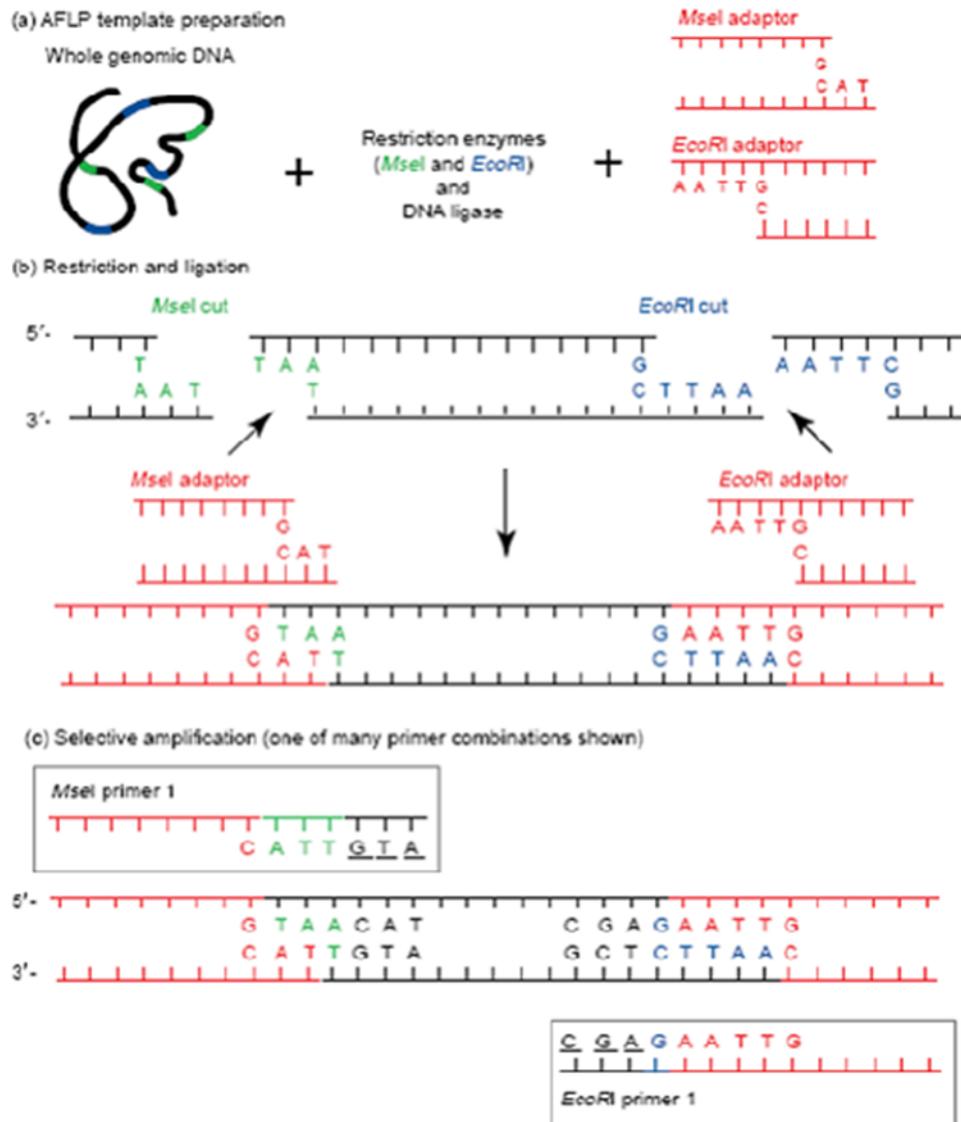


Figura 10 - Passos em análise AFLP (Adaptado de (Semagn et al. 2006)).

Com estes marcadores, não é necessário o conhecimento prévio de dados de sequência de ADN para a construção dos *primers* utilizados, mas a criação de grande número de polimorfismos por reação salienta-se como uma vantagem. O alto custo, as várias etapas e reagentes necessários à obtenção dos marcadores são algumas das desvantagens (Faleiro 2007).

Embora a análise de AFLP tem sido extensivamente utilizada para a pesquisa genética envolvendo plantas, fungos e bactérias, tem sido testada para um uso limitado na pesquisa de animais. Os marcadores AFLP foram desenvolvidos por algumas espécies aquáticas, incluindo o peixe-gato, ostras, truta e atum. Estes ainda não foram muito explorados na

investigação de fraudes de peixe porque são relativamente demorados e não são adaptados para aplicações de larga escala. Para superar esses contratempos, os pesquisadores utilizaram a análise com AFLP em truta arco-íris para desenvolver um marcador específico da espécie. Os *primers* foram desenhados para amplificarem um segmento desse marcador, que permitiu assim, a diferenciação da truta arco-íris e do salmão do Atlântico. Sendo assim, permitiu a confiabilidade e a facilidade do método para aplicações em detecção de fraude comercial (Rasmussen and Morrissey 2008).

SSRs (Simple Sequence Repeats), STR (Short tandem repeats) ou marcadores microssatélite (figura 11) são sequências de 1 a 6 nucleotídeos que se repetem no genoma de eucariotas. Estes marcadores SSRs baseiam-se no uso de *primers* que através da reação de PCR amplificam estas regiões e após separação dos fragmentos amplificados as variações de tamanho são detetadas. Estes marcadores têm vantagens em relação aos RFLPs como serem baseados em PCR, de menor custo e menos trabalhosos. Microssatélites são um sub grupo dos marcadores VNTRs (Variable Number Tandem Repeats) que incluem também os marcadores do tipo minissatélite cujo bloco repetitivo contém mais que 6 nucleótidos (Dantas and Nodari). Os microssatélites são marcadores relativamente curtos característica que permite que amostras e quantidades mínimas de ADN, ou com alto grau de degradação, possam ser tipadas (Dantas and Nodari).

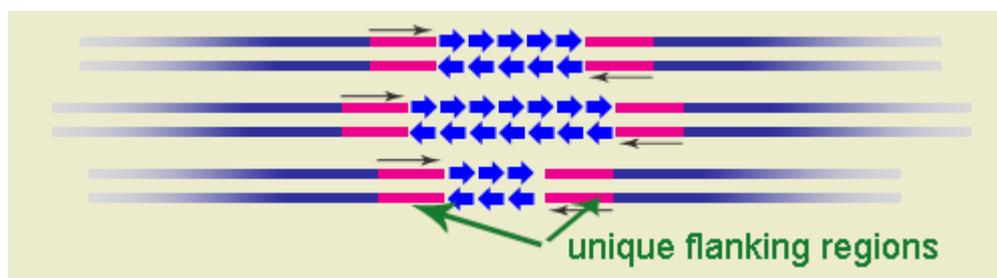


Figura 11 – Desenho esquemático de marcadores SSR. Os segmentos a azul indicam fragmentos repetitivos cujo número varia em diferentes indivíduos e as setas pretas os *primers* para amplificação da zona de repetição (Adaptado de

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/probe/doc/TechSTS.shtml>)

Os ensaios com SSRs são mais robustos do que com RAPDs e mais versáteis do que com AFLPs. Foram feitos estudos para a análise genética de duas espécies de carpa, *Cyprinus carpio* L. e *Ctenopharyngodon idella*, sendo utilizados os marcadores SSRs em conjunto com os AFLPs, pois a carpa é um peixe importante para a aquacultura.

Os marcadores SSRs ou microssatélites têm sido considerados como um dos marcadores moleculares eficientes que fornecem informação genética devido à sua codominância, alta taxa de mutação e apresentam alto polimorfismo. O desenvolvimento de marcadores microssatélites exigia um dispendioso esforço técnico, com procedimentos caros e demorados. Entretanto com os avanços da tecnologia, apareceram métodos mais eficientes e de baixo custo para desenvolver marcadores moleculares para espécies que não possuam dados disponíveis (Liu et al. 2011; Tavares et al. 2014).

Em relação aos marcadores SNPs (figura 12), estes são utilizados para identificar mutações em apenas um único nucleotídeo constituindo fontes abundantes de variação genética. O polimorfismo de sequência nucleotídica (SNP) é relevante para estudos filogenéticos de evolução dentro da espécie, no mapeamento genético e na diferenciação de alelos do mesmo gene. Em comparação com outros marcadores, tem como vantagem a possibilidade de detecção de grande quantidade de polimorfismos entre alelos de determinado gene; como desvantagens, salienta-se a necessidade de conhecimento prévio da sequência do gene de interesse e o custo da técnica envolvida nas etapas inerentes à sequenciação dos diferentes fragmentos do ADN de interesse. A elevada variabilidade dos marcadores SNP permitem, por exemplo, distinguir indivíduos originários de diferentes populações tendo grande importância no controlo ecológico destas (Faleiro 2007; Scarano and Rao 2014).

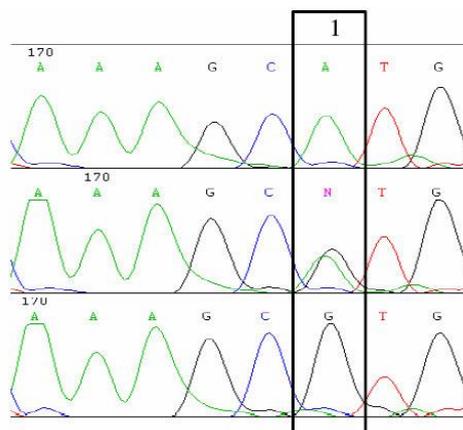


Figura 12 - SNP descoberta por um alinhamento de traços de sequência obtida a partir de sequenciação direta de produtos de PCR genómicas (Adaptado de (Semagn et al. 2006)).

A tabela 4 sintetiza as vantagens e desvantagens dos vários tipos de marcadores moleculares referidos anteriormente.

Tabela 4 – Vantagens e desvantagens dos diversos marcadores moleculares usados para a identificação de peixes

Marcadores	Vantagens	Desvantagens
Isoenzimas	- Baixo custo - Fácil e rápido	- Baixo número dos sistemas enzimáticos
RAPD	- Necessidade de quantidades mínimas de ADN - Fácil e rápido - Generalização das análises - Trabalha-se com qualquer espécie	- Baixa reprodutibilidade - Sensível
SPAR	- Amplificação via PCR utilizando um único <i>primer</i>	- Conhecimento prévio da sequência
RFLP	- Alta reprodutibilidade	- Demorado e caro - Necessidade de sondas específicas - Necessidade de grandes quantidades de ADN
AFLP	- Não é necessário o conhecimento prévio da sequência - Criação de grande número de polimorfismos	- Custo elevado - Utilização de várias etapas
SNP	- Possibilidade da deteção de grande número de polimorfismos	- Conhecimento prévio da sequência - Custo elevado

Fonte: Baseada em informação de Faleiro, n.d..

Os marcadores mencionados utilizam geralmente as informações contidas no genoma nuclear. Contudo, o polimorfismo encontrado no ADN mitocondrial, bem como as suas características genéticas (herança materna, genoma haploide, ausência de recombinação, sensibilidade aos efeitos da origem genética e alta taxa evolutiva) fizeram deste genoma uma excelente fonte de informações genéticas para estudos taxonómicos e populacionais (Hiltsdorf 2010). Embora o ADN nuclear (nDNA) e o ADN mitocondrial (mtDNA) possam ambos servir na identificação de espécies, a análise do ADN mitocondrial oferece inúmeras vantagens relativamente à identificação de ADN nuclear (Cawthorn et al. 2011).

Assim, o genoma mitocondrial têm sido recentemente alvo de desenvolvimento de marcadores moleculares não só pelas vantagens apresentadas mas também pelo facto de existir num elevado número de cópias em cada célula correspondente ao elevado número de mitocôndrias presentes. Este facto permite uma maior sensibilidade nas metodologias, nomeadamente nas utilizadas na autenticação de alimentos processados, pois o maior

número de cópias das regiões alvo está diretamente relacionado com a quantidade de fragmentos amplificados obtidos após a reação de PCR (Hilsdorf 2010).

Todos os marcadores anteriormente referidos utilizam a eletroforese em gel para finalização da identificação de espécies, o que comporta alguns inconvenientes, como a mão-de-obra intensiva, a grande quantidade de tempo despendido, a sua baixa sensibilidade para a detecção de quantidades residuais de ADN e uma grande probabilidade de contaminação cruzada (Bréchon et al. 2013).

Surgiram assim novas estratégias para a autenticação de espécies em alimentos tentando contornar os inconvenientes anteriormente referidos. A sequenciação de fragmentos amplificados altamente polimórficos e a utilização da técnica de análise de fusão (HRMA – High Resolution Melting Analysis) na discriminação destes fragmentos são duas metodologias atualmente em desenvolvimentos e que serão descritas seguidamente pela sua importância na autenticação de alimentos por métodos moleculares recentemente desenvolvidos.

1.4.3.2. SEQUENCIAÇÃO DE REGIÕES DO ADN *BARCODING*

Apesar do considerável número de marcadores moleculares que têm sido usados para a discriminação de espécies de peixes, a sequenciação de regiões específicas e altamente variáveis entre espécies assume cada vez maior importância como técnica de referência de alta precisão. A comunidade científica tem desenvolvido esforços no sentido de uniformizar as regiões genómicas usadas para a identificação de espécies. Estes resultaram na definição de algumas zonas no genoma contendo simultaneamente zonas altamente polimórficas e zonas razoavelmente conservadas (num grande leque taxonómico) que permitem a utilização de *primers* universais ou pelo menos dedicados a grandes grupos taxonómicos. A estas regiões chamaram-se ADN *barcodes* a sua utilização tem-se generalizado em todas as áreas da ciência que necessitem de discriminar espécies (Ederal et al. 2013; Galimberti et al. 2013).

ADN *barcoding* é assim um método usado, entre outras aplicações, com a finalidade de identificar e discriminar espécies (Galal-Khallaf et al. 2014; Kalivas et al. 2014). Trata-se de um sistema recente, criado para proporcionar rápidas e precisas identificações de espécies, através da sequenciação de segmentos relativamente curtos de genes (Ederal et al. 2013; Hebert and Gregory 2005; Kim et al. 2010), ou seja, é um sistema de base molecular que permite aos cientistas identificar espécies, através da comparação de sequências no ADN da amostra, obtidas por sequenciação laboratorial, com as sequências

de referência presentes em bases de dados. O seu sucesso depende da variabilidade molecular entre espécies e da disponibilidade de repositórios de sequências de referência (sequências de ADN de espécies conhecidas) de alta qualidade (Galimberti et al. 2013).

O ADN *barcoding* veio também acelerar o ritmo da descoberta de novas espécies, permitindo que os taxonomistas as classifiquem rapidamente e que evidenciem diferentes características que possam representar novas espécies (Hebert and Gregory 2005; Scarano and Rao 2014).

Devido à elevada variação entre espécies e a baixa variação intra-espécies, o gene mtDNA mais comum e mais utilizado nas pesquisas de identificação de espécies tem sido o *cyt b*. Recentemente, foi desenvolvido e introduzido como uma ferramenta taxonómica para identificação de animais um sistema de identificação baseado na região do citocromo c oxidase subunidade I (COI). Portanto, este sistema de identificação baseado na região COI tem sido utilizado com sucesso como uma ferramenta confiável e universal para a identificação de espécies. O gene COI tem duas vantagens importantes, em primeiro lugar os *primers* universais utilizados para este gene são muito robustos, permitindo assim a recuperação final de mais de 50 representantes de filos animais e em segundo lugar, o COI parece ter uma maior amplitude de sinal filogenético do que qualquer outro gene mitocondrial. Com isto, alguns autores, referiram que uma sequência de um gene único seria suficiente para diferenciar todos, ou pelo menos, a grande maioria de espécies animais utilizando o gene mitocondrial do ADN citocromo-oxidase da subunidade I (COI) como um sistema global para a identificação de animais. A sequência é comparada a um código de barras (DNA *barcoding*), com espécies que estão a ser delineadas por uma sequência particular ou por um conjunto apertado de sequências muito semelhantes (Galal-Khallaf et al. 2014).

A sua utilidade como técnica de autenticação de alimentos, particularmente de peixes, é evidente e apresenta inúmeras vantagens pois pode ser utilizada para identificar espécies, com alta precisão, em peixe inteiro, filetes, barbatanas, peixe juvenil, ovos ou fragmentos de tecidos (Hanner et al. 2011). Daí que tenha evoluído recentemente como um instrumento molecular rápido e confiável na identificação de espécies (Geiger et al. 2014).

Vários genes têm sido estudados como possíveis região *barcoding* para os grandes grupos taxonómicos das plantas, fungos, animais, etc., tendo a comunidade científica chegado a acordo na definição de um gene ou grupos de genes como regiões *barcoding* para cada um desses grupos.

No caso dos animais vários estudos têm confirmado que, aproximadamente, 650 pb da região 5' da citocromo C oxidase subunidade I (COI) (Galal-Khallaf et al. 2014) pode ser usado como um código de barras de ADN para identificar a maioria das espécies de animais, ou seja, é como um sistema universal de identificação adequado para estas espécies (Cawthorn et al. 2011; Holmes et al. 2009; Keskin and Atar 2013; Kim et al. 2010; Lakra et al. 2011; Rasmussen Hellberg et al. 2010; Ribeiro et al. 2012; Wong and Hanner 2008).

O citocromo C oxidase I (COI) tem duas vantagens importantes: em primeiro lugar, os *primers* universais para este gene são muito robustos, permitindo no final a recuperação da maioria, se não de todos, dos filós animais; em segundo lugar, o gene COI tem uma maior gama de sinal filogenético do que qualquer outro gene mitocondrial (Hebert et al. 2003). Vários autores demonstraram que o gene COI é o apropriado para discriminar a diversidade de espécies em todo o filo animal, tendo vindo a ser utilizado para peixes marinhos e de água doce (Lakra et al. 2011). A utilização deste gene irá também fornecer uma solução confiável, de custo eficaz e acessível para o problema atual de identificação de espécies (Hebert et al. 2003). Esta região do gene citocromo c oxidase subunidade 1 (cox1 ou COI) tem tido utilidade para a identificação de espécies de animais e para a descoberta de novas espécies. Vários estudos destacaram o poder de resolução desta abordagem em vários grupos de animais, como aves, peixes, búzios, aranhas e répteis. Além de outros marcadores mitocondriais, o Citocromo b também sido usado, quer pela sua utilidade na filogenia ou para complementar o COI em código de barras de ADN, pois tem sido sugerido como um marcador para determinar espécies fronteiras. Em anfíbios e genes de moluscos, tem sido proposto como marcador de ADN *barcoding*, complementando o COI (Sarri et al. 2014).

Nos últimos anos, o ADN *barcoding* foi obtido para mais de 6000 espécies de peixes (Lakra et al. 2011). Hoje em dia, estão bem estabelecidos os critérios de um marcador para a sua aplicabilidade universal: um marcador genético precisa de ser suficientemente variável para discriminar diferentes espécies, ser menos variável dentro das espécies, ter locais suficientemente conservados para permitir uma amplificação confiável, trazer informação filogenética suficiente, produzir resultados reprodutíveis em condições de laboratório variáveis e possibilitar o alinhamento de sequências entre espécies de diferentes taxa (Sarri et al. 2014).

Esta estratégia tem sido particularmente aplicada para a construção de base de dados de sequências *barcoding* para espécies de peixes. Várias base de dados dedicadas a peixes têm sido publicadas sendo a mais importante a FISH-BIO (www.fishbol.org), para além das bases de dados generalistas como o GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)

onde também estão depositadas sequências de regiões *barcoding* e a base de dados BOLDSYSTEMS (<http://www.boldsystems.org/>) de milhares de espécies, continuamente atualizadas e acessíveis ao público (<http://www.barcodinglife.org>) (Sarri et al. 2014) ¹³.

Futuramente, o ADN *barcoding* vai ser muito importante e muito utilizado, pois a necessidade contínua de identificação de animais, mais precisa e segura, para fins taxonómicos, filogenéticos, forenses e de conservação, juntamente com os avanços da tecnologia e os baixos custos de sequenciamento de ADN têm contribuído para valorizar em muito o uso de sequências curtas de ADN. Um problema importante na identificação de espécies continua a residir na escolha de quais os genes a utilizar, devido ao ritmo acelerado de mudanças de sequência que resulta regularmente em divergências acentuadas, mesmo entre espécies estreitamente relacionadas. No entanto, o facto de diferentes partes do genoma mitocondrial evoluírem a taxas diferentes faz com que a decisão sobre o gene adequado sirva para avaliar a delimitação de espécies muito cruciais (Sarri et al. 2014).

A par dos taxonomistas, o ADN *barcoding* pode ser potencialmente útil para cientistas de outras áreas, nomeadamente ecologia, ciência forense, biotecnologia, indústrias de alimentos, alimentação animal e controlo da qualidade dos alimentos. Além disso, a identificação de espécies animais em alimentos está tornar-se numa questão muito importante para a avaliação da composição dos alimentos e a prestação de informação ao consumidor. No entanto, em algumas amostras, a qualidade do ADN pode ser gravemente atingida, evitando a amplificação de fragmentos por PCR de comprimento superior a 250 pb. Assim, o ADN *barcoding* convencional poderá ser problemático (Sarri et al. 2014). Desta forma um marcador genético deve ser curto o suficiente para permitir a amplificação, precisando também de amostras processadas, de abordagens não-invasivas (peles, penas, fezes, saliva, etc) e de ADN a partir de amostras de arquivo. Ademais, as sequências curtas podem permitir a identificação maciça inter e intraespecífica exata de mutações pontuais por meio da técnica de SSCP, evitando a sequenciação do ADN repetitivo das amostras analisadas. Para superar estes problemas, foi desenvolvido um conjunto universal de *primers*, através da amplificação de um fragmento de 130 pb do gene COI na região do código de barras. A bioinformática foi usada para projetar *primers* universais, especificamente dentro do gene de rRNA, de acordo com os critérios acima referidos, a fim de criar um marcador de "mini-barcode". Os *primers* desenhados foram

¹³Cf. <http://www.kapabiosystems.com/public/pdfs/kapa-express-extract>

kits/KAPA_Express_Extract_Fish_DNA_Barcoding_Note.pdf (acedido em dezembro de 2013).

testados com uma bateria de procedimentos experimentais, a fim de verificar se eles preenchem os critérios atribuídos (Sarri et al. 2014).

As análises moleculares baseadas em ADN *barcoding* vão ser uma das ferramentas mais poderosas na avaliação da identidade de espécies e no controlo alimentar (Ederal et al. 2013; Maralit et al. 2013).

1.4.3.3. ANÁLISE DE FUSÃO DE ALTA RESOLUÇÃO (HRMA)

A análise de fusão de alta resolução (HRM) é um novo método de análise, pós-PCR, utilizado para a identificação de variações genéticas nas sequências de ácidos nucleicos. É um método simples, rápido e pouco dispendioso. Esta análise começa com a amplificação por PCR da região de interesse na presença de um fluoróforo. Este fluoróforo tem uma alta fluorescência quando as cadeias de ADN estão ligadas e baixa fluorescência quando as cadeias de ADN se fundem (separam)¹⁴ (Druml and Cichna-Markl 2014; Erali and Wittwer 2010). Os dados de fluorescência gerada durante a fusão de ADN podem ser analisados com base na temperatura de fusão (T_m), ou sobre a forma da curva de fusão. As diferenças encontradas podem permitir a discriminação de diversos genótipos. O uso de pequenos fragmentos amplificados para genotipagem simplifica o desenho do ensaio uma vez que os *primers* são escolhidos para serem o mais próximos o quanto possível do polimorfismo alvo. À medida que o tamanho dos fragmentos amplificados é diminuída, as diferenças da temperatura de fusão entre os genótipos são aumentados, permitindo assim uma melhor diferenciação (Erali et al. 2009). Esta técnica é, pelas razões apontadas, muito interessante para a autenticação de produtos alimentares processados em que o ADN se encontra degradado e apenas pequenos fragmentos podem ser amplificados.

Alguns autores sugeriram a utilização da PCR com posterior análise de fusão de alta resolução (HRMA) dos fragmentos amplificados como processo final de discriminação de espécie em substituição do gel de eletroforese. As metodologias envolvendo grande parte dos marcadores anteriormente referidos podem ser potencialmente adaptadas para a técnica HRMA uma vez que qualquer variação na sequência pode assim ser detetada e mesmo, nalguns casos, substituir a sequenciação individual de ADN de cada amostra, processo demorado e pouco prático para estudos envolvendo um grande número de indivíduos (Fitzcharles 2012). Esta técnica tem vantagens em relação a outros métodos de PCR. É uma técnica de tubo único e fechado, de alto rendimento, que pode detetar

¹⁴ Cf. www.appliedbiosystems.com (acedido em Abril de 2015).

diferenças em sequências de ADN em apenas um nucleótido, em determinadas condições e temperatura¹⁵ (Bréchon et al. 2013).

Este método também foi estudado para produtos de pesca transformados, em casos de ADN degradado, mas revelou um baixo nível para uma falsa identidade. Esta degradação do ADN deve-se ao facto de os produtos terem sido danificados durante a recolha ou quando foram processadas industrialmente. Cada vez mais, tem sido utilizado técnicas com marcadores moleculares para permitir a identificação inequívoca das espécies. Por exemplo, usando a identificação genética, constatou-se que a maioria das amostras que se pensava ser de bacalhau (*Gadus morhua*), eram realmente de badejo (*Merlangius merlangius*) (Bréchon et al. 2013). Este método também foi aplicado para identificar outras espécies marinhas, como as anchovas e o arenque, por isso demonstrou um grande potencial de adequação de HRM na identificação destas espécies. (Bréchon et al. 2013). A reação de análise *melting* de alta resolução tem a capacidade de discriminar espécies geneticamente semelhantes, em que a identificação morfológica pode ser problemática devido a características de sobreposição (Fitzcharles 2012).

Anteriormente, a análise de HRM foi usada com sucesso em espécies de plantas ou genotipagem, utilizando microssatélites ou marcadores de código de barras (Kalivas et al. 2014). Os marcadores de espécies de genótipo de ADN são muito úteis para a identificação de plantas, produção e programas de preservação. O ensaio HRM desenvolvido neste estudo é um método rápido e simples para a identificação e a discriminação da identificação das sete espécies *Sideritis* que estão em crescimento na Grécia. Este ensaio é simples em comparação com outros métodos de genotipagem em que não requerem a sequenciação de ADN ou processamento pós-PCR. Por conseguinte, este método oferece uma nova alternativa para a deteção rápida destas espécies. Neste estudo, os autores utilizaram com sucesso o HRM juntamente com o PCR em tempo real para a deteção, quantificação e identificação rápida das *Sideritis*. Este método usa apenas as curvas de fusão, o que vai provocar uma redução do risco de contaminação e uma maior rapidez em comparação com outros métodos (Kalivas et al. 2014).

Na figura 13 é apresentado um exemplo da distinção de duas espécies de peixes do mesmo género, *Macrourus carinatus* e *M. Halotrachys*, pela análise de *melting* de um fragmento de 299 bp do gene COI (Fitzcharles 2012).

¹⁵ Cf. www.appliedbiosystems.com (acedido em Abril de 2015).

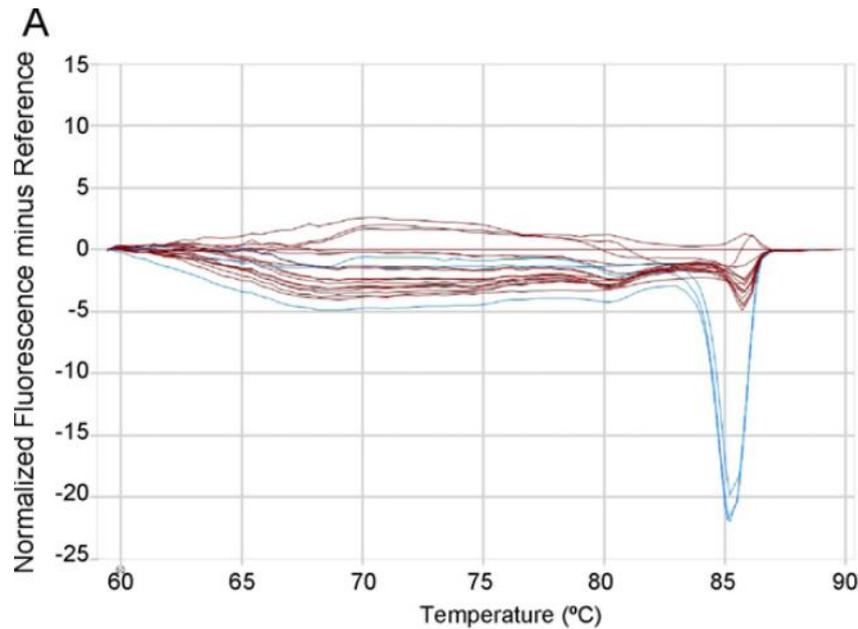


Figura 13 – Curva da diferença das espécies que mostram onde as amostras têm sido identificadas a partir da morfologia. Amostra de referência, *M. carinatus* (baseline vermelho), *M. carinatus* (vermelho) amostras incluídas *M. Halotrachys* (azul) (Adaptado de (Fitzcharles 2012)).

Estudos recentes indicam que a análise de HRM não é só aplicável à investigação clínica e de diagnóstico, mas é também uma ferramenta eficaz na análise de alimentos (Druml and Cichna-Markl 2014). A PCR em tempo real, utilizando as espécies fluorescentes, sondas marcadas específicas e é usualmente considerada uma técnica dispendiosa. Todavia, trabalhos recentes mostram ainda que a análise de HRM é um método de baixo custo, com rendimento eficiente na identificação e diferenciação de cultivares e espécies estreitamente relacionadas (Druml and Cichna-Markl 2014).

A análise de HRM apresenta assim muitas vantagens: é simples, flexível, de baixo custo, altamente sensível e específica, o que ajuda a que possa ser estabelecida como um método de escolha, a fim de rastrear sequências de variantes (Kalivas et al. 2014).

Como a técnica de PCR – HRMA apresenta muitas vantagens, e como foi eficiente em diferentes trabalhos, deve ser explorada prioritariamente em futuros trabalhos para estudo da autenticação de peixes.

2. Materiais e Métodos

2.1. AMOSTRAGEM

As amostras de bacalhau utilizadas para o presente estudo foram todas adquiridas em diferentes supermercados e em lojas tradicionais da região do grande Porto. Foram utilizadas amostras de bacalhau inteiro, desfiado e demolido ultracongelado rotuladas contendo apenas a espécie em questão, sal, zona de captura, lote e data de validade. Esta amostragem reflete a existência real deste tipo de produtos no mercado pois para a sua aquisição foram visitados todas as grandes superfícies comerciais e as representativas do comércio local.

Foram assim recolhidas 33 amostras, numeradas de 1 a 33, conforme apresentadas na tabela 5. Nesta tabela são também apresentados os dados constantes no rótulo para uma mais precisa caracterização das amostras.

Relativamente às espécies encontradas no mercado 9 amostras pertenciam à espécie *G. morhua*, 12 à *G. macrocephalus* e 12 à *G. Chalcogrammus*. Não se encontrou mais nenhuma espécie pertencente ao género *Gadus* no mercado.

Todas as amostras foram conservadas após compra a uma temperatura de - 20°C até ao momento de preparação da amostra para análise.

Tabela 5 – Tipo de processamento, descrição e espécie indicadas no rótulo, zona de captura, origem e lote das 33 amostras estudadas.

#	Tipo de Processamento	Descrição do rótulo	Espécie descrita no rótulo	Capturado	Zona FAO	Origem	Lote
1	Inteiro	Inteiro Graúdo	<i>Gadus morhua</i>	nd	-	-	-
2	Desfiado	Bacalhau do Pacífico	<i>Gadus macrocephalus</i>	Oceano Pacífico	-	-	850
3	Desfiado	Bacalhau Pacífico Salgado Seco Desfiado	<i>Gadus macrocephalus</i>	Oceano Pacífico	67	-	E010214279
4	Desfiado	Bacalhau desfiado	<i>Gadus morhua</i>	Atlântico Nordeste	27	-	3291
5	Desfiado	Migas de Paloco do Pacífico Salgado Seco	<i>Theragra chalcogramma</i>	Oceano Pacífico	-	-	E010214265
6	Desfiado	Paloco do Pacífico Salgado Seco Desfiado	<i>Theragra chalcogramma</i>	Oceano Pacífico	67	-	E010214265
7	Desfiado	Migas de Paloco do Pacífico Salgado Seco	<i>Theragra chalcogramma</i>	Oceano Pacífico	67	-	E010214237
8	Desfiado	Bacalhau desfiado salgado seco	<i>Gadus morhua</i>	Atlantic Northeast	27	-	E010214188
9	Desfiado	Paloco do Pacífico desfiado seco salgado	<i>Theragra chalcogramma</i>	Oceano Pacífico	61	China	1350
10	Inteiro	Inteiro Graúdo	<i>Gadus morhua</i>	nd	-	-	-
11	Desfiado	Bacalhau desfiado salgado seco	<i>Gadus morhua</i>	Atlântico Nordeste	27	-	V98
12	Demolhado e Ultracongelado	Paloco do Pacífico Desfiado	<i>Theragra chalcogramma</i>	Oceano Pacífico	-	-	E021114246
13	Demolhado e Ultracongelado	Bacalhau Graúdo/Crescido	<i>Gadus morhua</i>	Atlântico Nordeste/Noroeste	27 ou 21	-	-
14	Demolhado e Ultracongelado	Bacalhau do Pacífico Desfiado	<i>Gadus macrocephalus</i>	Oceano Pacífico	61 e 67	-	260/14
15	Desfiado	Migas de Bacalhau Salgado Seco	<i>Gadus morhua</i>	Atlântico Nordeste	-	-	190
16	Desfiado	Bacalhau do Pacífico Salgado Seco Desfiado	<i>Gadus macrocephalus</i>	Oceano Pacífico	61/67	-	E010214265
17	Desfiado	Paloco do Pacífico Salgado Seco Desfiado	<i>Theragra chalcogramma</i>	Oceano Pacífico	61/67	-	E010214265
18	Desfiado	Bacalhau do Pacífico Desfiado Salgado Seco	<i>Gadus macrocephalus</i>	Oceano Pacífico	-	-	V-97
19	Desfiado	Filetes Paloco sem pele, 99% sem espinhas	<i>Theragra chalcogramma</i>	Oceano Pacífico	-	-	14040
20	Desfiado	Desfiado Paloco do Pacífico Salgado Seco	<i>Theragra chalcogramma</i>	Oceano Pacífico	67	-	14039
21	Desfiado	Bacalhau desfiado salgado seco	<i>Gadus morhua</i>	Atlântico Nordeste	-	-	14037
22	Desfiado	Migas Paloco sem pele, 99% sem espinhas	<i>Theragra chalcogramma</i>	Oceano Pacífico	-	-	14013
23	Desfiado	Migas de Paloco do Pacífico Salgado Seco	<i>Theragra chalcogramma</i>	Oceano Pacífico	61	Prod. Rep. da china	0 54
24	Demolhado e Ultracongelado	Posta fina de Bacalhau do Alasca em vácuo	<i>Gadus macrocephalus</i>	Mar do Alasca	67	-	M22/11DE
25	Demolhado e Ultracongelado	Bacalhau do Pacífico Desfiado	<i>Gadus macrocephalus</i>	Oceano Pacífico	61 e 67	-	E021114276
26	Demolhado e Ultracongelado	Paloco do Pacífico Desfiado	<i>Theragra chalcogramma</i>	Oceano Pacífico	61 ou 67	-	E021114216
27	Demolhado e Ultracongelado	Bacalhau Desfiado	<i>Gadus macrocephalus</i>	Oceano Pacífico	-	-	E021114280
28	Desfiado	Migas de Paloco do Pacífico	<i>Theragra chalcogramma</i>	Oceano Pacífico	61	China	3458076111
29	Desfiado	Bacalhau Salgado Seco Desfiado	<i>Gadus morhua</i>	nd	-	-	-
30	Desfiado	Bacalhau do Pacífico Desfiado Salgado Seco	<i>Gadus macrocephalus</i>	Oceano Pacífico	61	-	E010214314
31	Desfiado	Bacalhau do Pacífico Desfiado Salgado Seco	<i>Gadus macrocephalus</i>	Oceano Pacífico	67	China	1438
32	Demolhado e Ultracongelado	Bacalhau Desfiado Demolhado Ultracongelado	<i>Gadus macrocephalus</i>	Oceano Pacífico	-	-	E021114316
33	Demolhado e Ultracongelado	Bacalhau Pacífico Desfiado Demolhado Ultracongelado	<i>Gadus macrocephalus</i>	Oceano Pacífico	-	-	E021114335

2.2. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS E EXTRAÇÃO DE ADN

Na preparação da amostra foi retirada uma alíquota representativa de diferentes amostras de bacalhau inteiro, bacalhau desfiado e bacalhau demolido ultracongelado para tubos de 10 mL. Congelou-se as amostras a - 20°C para uma posterior utilização.

Aquando a sua utilização, descongelou-se e pesou-se aproximadamente 200 mg de cada amostra (Tabela 6) em microtubos de 1,5 mL.

Tabela 6 – Massa pesada, em miligramas, de todas as amostras de bacalhau.

Amostra	Massa pesada (mg)	Amostra	Massa pesada (mg)	Amostra	Massa pesada (mg)
1	204	12	206	23	202
2	205	13	204	24	206
3	207	14	202	25	200
4	205	15	204	26	200
5	202	16	200	27	204
6	206	17	200	28	202
7	208	18	200	29	201
8	201	19	203	30	202
9	201	20	203	31	200
10	200	21	202	32	201
11	202	22	202	33	201

Para a extração de ADN foram utilizados dois métodos diferentes, o Kit comercial NucleoSpin® Food e um método manual baseado na utilização dos reagentes SDS (Dodecil sulfato de sódio) e ureia.

O protocolo utilizado para a extração usando o Kit NucleoSpin® Food baseou-se no referido pelo fabricante com pequenas adaptações requeridas pela natureza das amostras ou equipamento disponível encontra-se descrito na figura 14.

Em primeiro lugar homogeneizou-se a amostra (ca. 200 mg de bacalhau), seguidamente adicionou-se a cada microtubo de 1,5 mL já com a amostra, 550 µL de solução CF (fornecida no Kit) a 65°C e homogeneizou-se em vortex durante cerca de 1 minuto. Adicionou-se 10 µL de Proteinase K a 10 mg/mL e logo após, homogeneizou-se em vortex. Incubou-se num banho a 65°C durante uma hora. Seguidamente retiraram-se os microtubos do banho e adicionou-se 20 µL de Rnase (10 mg/mL). Decorridos os 30 minutos, centrifugaram-se os tubos a 10000xg durante 10 minutos. O sobrenadante resultante foi transferido para novos microtubos e o respetivo volume anotado. Adicionou-se seguidamente igual volume (1 volume) de solução C4 e 1 volume de etanol a cada microtubo com o sobrenadante e homogeneizou-se em vortex.

Seguidamente retirou-se 750 µL da solução anterior e fez-se eluir pela membrana de sílica das colunas fornecidas, centrifugou-se a 11000xg durante 1 minuto e rejeitou-se o filtrado. Procedeu-se à 1ª lavagem onde se adicionou 400 µL de solução CQW, centrifugou-se a 11000xg durante 1 minuto e rejeitou-se o filtrado. Na 2ª lavagem adicionou-se 700 µL de solução C5, centrifugou-se a 11000xg durante 1 minuto e rejeitou-se o filtrado. Na última lavagem adicionou-se 200 µL de solução de lavagem, centrifugou-se a 11000xg durante 2 minutos e no fim rejeitou-se o filtrado. Por fim, adicionou-se 100 µL de solução CE a 70°C para uma recuperação mais eficaz do ADN absorvido na membrana, centrifugou-se a 11000xg durante 1 minuto e guardaram-se os microtubos com os extratos a 4°C para posterior análise.

NucleoSpin® Food	
1 Homogenize sample	 Homogenize 200 mg material
2 Lyse cells	 550 µL CF (65 °C)  10 µL Proteinase K 65 °C, 30 min  > 10,000 x g, 10 min Take clear supernatant (1 vol) and continue with step 3
3 Adjust DNA binding conditions	 1 vol C4 1 vol ethanol
4 Bind DNA	 Load sample stepwise (maximum loading capacity 750 µL)  11,000 x g, 1 min
5 Wash and dry silica membrane	 1 st wash 400 µL COW 11,000 x g, 1 min  2 nd wash 700 µL C5 11,000 x g, 1 min  3 rd wash 200 µL C5 11,000 x g, 2 min
6 Elute DNA	 100 µL CE (70 °C) RT, 5 min  11,000 x g, 1 min

Figura 14 – Protocolo de extração de ADN pelo Kit NucleoSpin® Food.

O protocolo de extração SDS/Ureia baseou-se na metodologia descrita por Aranishi (Aranish 2005) que utiliza para digestão das amostras uma solução tamponada constituída por 10 mM Tris-HCl pH=8.0, 20 mM EDTA pH=8.0, 2% SDS e 6 M ureia. Adicionou-se 600 µL de tampão de extração e 2,5 µL de proteinase K a 10 mg/ml a 200 mg de amostra homogeneizada e misturou-se bem em vortex. Seguidamente a mistura foi sujeita a uma digestão a 55 °C durante 60 minutos. No final da digestão os tubos foram arrefecidos e adicionou-se 600 µL de uma solução contendo clorofórmio e álcool isoamílico (24:1). A mistura foi agitada durante 5 minutos e centrifugada a 10000g durante 5 minutos. A fase superior resultante foi transferida para um novo tubo ao qual se adicionou novamente 600 µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Após centrifugação a 10000g durante 5 minutos transferiu-se cuidadosamente a fase superior para um novo tubo ao qual se adicionou 350 µL de isopropanol a – 20 °C. Após breve agitação as amostras foram guardadas a – 20 °C durante pelo menos 30 minutos para precipitação dos ácidos nucleicos. Seguidamente o ADN foi precipitado por centrifugação refrigerada a 18000g durante 15 minutos. O sobrenadante foi rejeitado por decantação e o precipitado redissolvido em 300 µL de tampão TE. Adicionou-se seguidamente 5 µL de RNase a 10 mg/ml e incubou-se a 37 °C durante 30 minutos. Após este período foram adicionados 150 µL de NaCl 5M e 900 µL de etanol a – 20 °C e incubou-se a mistura a – 20 °C durante pelo menos 30 minutos. Seguidamente o ADN foi precipitado por centrifugação refrigerada a 18000g durante 15 minutos e o sobrenadante rejeitado por decantação. O precipitado obtido foi lavado duas vezes com etanol a 76%, a 4 °C, seco em corrente de ar, redissolvido em 60 µL de água ultrapura e armazenado a 4 °C até ao momento da análise.

2.3. QUANTIFICAÇÃO DE ADN NOS EXTRATOS

Após a extração do ADN, procedeu-se à quantificação de ADN nas amostras por espectrofotometria UV, seguiu-se o seguinte protocolo: Colocou-se 3 μ L de água ultrapura em todos os poços e fez-se a leitura do branco; lavou-se a placa com etanol a 96% e colocou-se 3 μ L de cada amostra, em duplicado em cada uma das 8 posições do adaptador para leitura de pequenos volumes (figura 15); fez-se a leitura da absorvência a 260, 280 e 230 nm.



Figura 15 – Adaptador para leitura de absorvência em pequenos volumes (min. 4 microlitros) num leitor de placas.

O estado de fragmentação dos ácidos nucleicos extraídos foi verificado através de separação em gel de agarose a 0,8% em tampão SGTB.

2.4. AMPLIFICAÇÃO POR PCR E ELETROFORESE DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS

A amplificação dos fragmentos para sequenciação e a otimização dos *primers* desenhados de novo foram efetuadas num termociclador Bio-Rad MJ-mini. Toda a preparação das reações de PCR foi efetuada numa estação para preparação de PCR equipada com luz UV.

A amplificação do gene *barcode* COI foi efetuado utilizando os *primers* universais Fish F2 – 5'TGTAAAACGACGGCCAGTCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC3' e Fish R2 – 5'CAGGAAACAGCTATGACACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA3' (Ivanova et al. 2007), de acordo com as seguintes condições.

As condições de PCR foram as seguintes: 95°C durante 15 minutos, 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 54°C e 1 minuto a 72°C, e, finalmente, 7 minutos a 72°C. A reação de PCR foi realizada num termociclador (MJ Mini, Bio-Rad Laboratories) e foi preparada com a seguinte composição final, em 20 µL de reação: 10 ng de tampão de PCR, 1 U de Taq polimerase (FIREPol® DNA polymerase, Solis BioDyne), 2 mM de MgCl₂, 0,5 mM de cada *primer* e 2,5 mM ddNTP mix.

Para verificação da eficiência de amplificação separaram-se os produtos amplificados em gel de agarose a 1,5% em tampão SGTB e adicionado de 3 µL do fluoróforo GelRed 10000X. A separação foi efetuada em tina de gel submerso em tampão SGTB. Foram carregados em cada poço uma mistura de 3-5 microlitros de produto amplificado e 3 microlitros de corante de carregamento (40 % sucrose, 0,25% azul bromofenol). A separação efetuou-se a 120 volt durante cerca de 30 minutos.

2.5. PROTOCOLO PARA PURIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS PARA SEQUENCIAÇÃO

Após amplificação e verificação da sua efetividade procedeu-se à purificação das amostras para sequenciação utilizando um o Kit JETQUICK (Genomed, Alemanha). O protocolo seguido foi o seguinte: a cada tubo de PCR contendo os produtos amplificados adicionou-se 200 µL de solução de H1 (contém cloridrato de guanidina e isopropanol) e homogeneizou-se bem em vortex.

De seguida, colocou-se a coluna spin JETQUICK num microtubo de 2mL e carregou-se com a mistura do passo anterior. Centrifugou-se a 12000 x g durante 1 minuto e no fim rejeitou-se o filtrado. Lavou-se a coluna com 500 µL de solução H2 (contém etanol, NaCl, EDTA e Tris-HCl) e centrifugou-se a 12000 x g durante 1 minuto e no fim rejeitou-se o filtrado. Centrifugou-se novamente a velocidade máxima durante 1 minuto e rejeitou-se o filtrado com o microtubos de 2mL.

Para a eluição do ADN, colocou-se a coluna de spin num novo microtubo de 1,5 mL e adicionou-se 50 µL de água estéril diretamente para o centro da matriz de sílica da coluna spin JETQUICK e centrifugou-se a 12000 x g durante 2 minutos. Retirou-se a coluna e guardou-se os microtubos com o ADN purificado e enviou-se para sequenciação juntamente com os respetivos *primers forward* ou *reverse*.

2.6. ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS E FILOGENIA

Os fragmentos amplificados, após purificação, foram enviados para sequenciação numa empresa especializada. As sequências foram recebidas no formato ab1, verificadas quanto à sua qualidade (apenas leituras de bases com índice de qualidade PHRED scores > 20 foram consideradas). As zonas iniciais e finais da sequência foram também eliminadas recorrendo ao mesmo critério do índice de qualidade (cerca de 50 bps no início e final da sequência).

Todas as sequências foram analisadas com o auxílio do software MEGA6 (Tamura et al. 2013). Este é uma ferramenta integrada para a leitura de ficheiros ab1, realização do alinhamento das sequências, deduzir árvores filogenéticas, etc.

Após o tratamento referido as sequências foram alinhadas recorrendo ao algoritmo CLUSTALL que integra o software MEGA. Feito o alinhamento das sequências, procedeu-se então à identificação das espécies através da pesquisa em bases de dados de sequências gerais (GenBank) ou específicas para animais (Barcode of life Data System (BOLD)) (<http://www.boldsystems.org>), recorrendo ao algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool. Através destas ferramentas encontram-se regiões de semelhança entre as sequências obtidas e as mais similares encontradas nas bases de dados, permitindo a identificação da espécie, podendo assim ser feita a comparação com a espécie indicada no rótulo.

A reconstrução filogenética foi realizada utilizando o software MEGA 6.0. Os dendrogramas foram obtidos pela análise das sequências através do algoritmo Neighbor-Joining com os parâmetros pré-formatados no software.

2.7. DESENHO DE NOVOS *PRIMERS*

As reações de amplificação do gene da subunidade 1 do gene citocromo-oxidase foram realizadas utilizando os *primers* universais para peixes FishF2/FishR2, conforme referido. Todavia o tamanho de fragmento gerado não é adequado para reações de análise de fusão (HRMA) conforme os objetivos do trabalho, pelo que novos *primers*, focando regiões polimórficas, foram desenhados. Estes *primers* foram desenhados da seguinte forma: em primeiro lugar recolheram-se da base de dados BOLDSYSTEMS (constituída apenas por sequências com atributos suficientes para *barcoding*) sequências representativas das três espécies em estudo (*Gadus morhua*, *Gadus macrocephalus* e *Gadus chalcogrammus*) referidas na tabela 7.

Tabela 7 – Sequências utilizadas para o desenho de novos *primers*.

<i>Gadus morhua</i>	<i>Gadus macrocephalus</i>	<i>Gadus chalcogrammus</i>
DSFIB456-13	GBGC1354-06	RFE243-05
GBGC1822-06	RFE234-05	TZFPB500-0638
GBGCA542-10	RFE360-05	TZFPB502-06
GLF052-14	DSFIB165-12	TZFPB781-06
GTENK033-11	DSFIB166-12	ABFJ129-06
SCAFB104-07	DSFIB173-12P	DSFAL631-09
SCAFB113-07	SCAFB565-07	FMV536-11
SCAFB214-07	TZFP161-04	DSFAL647-09
SCAFB378-07	UCFMS018-14	RFE239-05
SCAFB549-07		SDP113001-13
SCAFB734-07		TZFP074-04
SCFAC259-06		TZFPB171-05

Às sequências referidas juntaram-se as já obtidas correspondentes às amostras em estudo para comparação e controlo. Procedeu-se ao alinhamento, seguido da identificação das regiões polimórficas capazes de distinguir as três espécies em estudo. Novos *primers* foram então desenhados, recorrendo à ferramenta Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) disponível online. Tendo em conta que os *primers* seriam posteriormente utilizados em análise HRMA o tamanho dos fragmentos amplificados foi mantido abaixo dos 100 pb sempre que possível. As características dos *primers* foram verificadas com o auxílio da ferramenta online gratuita OligoCalc, ou seja, a temperatura de *melting* (T_m) de cada *primer*, possível auto compatibilidade e possibilidade de formação de *primers-dimers*.

A especificidade dos *primers* foi verificada utilizando a ferramenta PrimerBlast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>).

2.8. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO DOS NOVOS PRIMERS

A otimização das condições de amplificação dos *primers* de novo desenhados para a obtenção de pequenos fragmentos em regiões polimórficas foi realizada utilizando PCR convencional, em reações de 20 µL com a seguinte composição: Solução tampão, MgCl₂, ddNTP mix, Primers *Foward* e *Reverse* e taq polimerase (FIREPol® DNA polymerase, Solis BioDyne). Após amplificação esta foi verificada em gel de agarose a 1,5% quanto ao tamanho dos fragmentos esperado, especificidade e intensidade das bandas amplificadas.

2.9. PROTOCOLO DA AMPLIFICAÇÃO E ANÁLISE DE FUSÃO EM PCR EM TEMPO REAL

As reações de PCR em tempo real foram igualmente preparadas numa estação para preparação de PCR equipada com luz UV, em tiras de microtubos brancos com tampas adequadas à leitura de fluorescência (Optical Flat 8-Cap Strips, Bio-Rad, EUA). O volume de reação foi de 10 µL, contendo os seguintes componentes: 8 µL de Supermix SsoFast EvaGreen (Bio-Rad, EUA) e 2 µL de amostra. As condições de amplificação e análise de fusão de alta resolução (HRMA), otimizadas para uma reação o mais rápida e eficiente possível, foram as indicadas na tabela 8. As reações foram realizadas no equipamento BioRad C1000 com módulo ótico CFX96 (Bio-Rad, EUA), figura 16. Foi utilizado o programa Precision Melt Analysis (Bio-Rad, USA) para o processamento dos dados de curvas de fusão.

Tabela 8 – Condições de tempos e temperaturas de amplificação em PCR em tempo real e em análise HRM.

Primer	Amplificação				Análise HRM		
	Desnaturação inicial	Desnaturação	Hibridação	Nº ciclos	Desnaturação	Renaturação	Curva de melting
Gadus_1	98°C/2 minutos	98°C/5 segundos	56°C	35	98°C/1 minutos	60°C/1 minuto	65°C a 95°C incremento de 0,5°C estabilização de 5 segundos
Gadus_2			54°C				
Gadus_3			55°C				
Gadus_4			55°C				
Gadus_5			54°C				
Gadus_6			54°C				
Gadus_7			58°C				

A temperatura de hibridação dos *primers* utilizada resultou do processo de otimização das condições de amplificação dos mesmos



Figura 16 – Termociclador (C1000) e módulo ótico de PCR em Tempo Real (CFX96).

3. Resultados e Discussão

3.1. QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS, AVALIAÇÃO DA PUREZA E ESTADO DE DEGRADAÇÃO DE ADN NOS EXTRATOS

A quantificação das amostras foi, como referido, executada num leitor de placas por espectrofotometria. O ADN e ARN absorvem radiação no comprimento de onda de 260 nm e as proteínas a 280 nm. A razão 260/280 é utilizada assim para avaliar a pureza do ADN ou ARN da amostra, ou seja a totalidade dos ácidos nucleicos presentes num extrato. Considera-se que os extratos contendo ADN são puros quando a razão das absorvências 260/280 é superior a aproximadamente 1,8. As amostras cujos valores da relação entre os comprimentos de onda são inferiores a 1,8 muito provavelmente apresentam elevados níveis de proteínas co extraídas com o ADN, compostos fenólicos ou outros contaminantes.

A razão 260/280 das diferentes amostras de bacalhau extraídas pelo KIT Nucleospin Food e pelo método SDS/Ureia, assim como as respetivas concentrações de ácidos nucleicos são apresentadas na tabela 9. Para este trabalho preliminar de seleção do método de extração mais adequado optou-se por utilizar apenas as amostras de 1-16, representativas da totalidade de amostragem.

Tabela 9 – Razão de absorvência a 260/280 e quantificação de ácidos nucleicos das amostras extraídas pelo kit Nucleospin Food e método SDS/Ureia.

Amostra	Tipo de Amostra	Nucleospin Food		SDS/Ureia	
		260/280	Conc. (ng/μL)	260/280	Conc. (ng/μL)
1	Inteiro Graúdo	1,209	3,691	2,000	852,4
2	Bacalhau Desfiado Salgado Seco	2,03	61,34	1,978	282,6
3	Bacalhau Desfiado Salgado Seco	2,039	110,1	2,008	1207
4	Bacalhau Desfiado Salgado Seco	1,848	40,36	2,027	1179
5	Migas de Paloco Salgado Seco	1,898	45,18	2,016	629,3
6	Paloco Desfiado Salgado Seco	1,752	42,36	2,000	445,3
7	Migas de Paloco Salgado Seco	1,935	88,23	2,028	1046
8	Bacalhau Desfiado Salgado Seco	1,392	8,943	2,028	839,5
9	Paloco Desfiado Salgado Seco	1,903	27,82	2,019	1199
10	Inteiro Graúdo	1,950	77,23	2,011	1157
11	Bacalhau Desfiado Salgado Seco	1,959	95,31	1,977	1093
12	Paloco Desfiado Demolhado Ultracongelado	1,219	1,628	1,561	219,6
13	Bacalhau Demolhado Ultracongelado	1,718	8,563	1,289	110,7
14	Bacalhau Desfiado Ultracongelado	1,679	6,941	1,361	84,51
15	Migas de Bacalhau Salgado Seco	1,936	105,0	1,975	475,7
16	Bacalhau Desfiado Salgado Seco	1,934	56,74	2,006	134,9
Média		1,775	48,71	1,893	685

Como podemos verificar, tendo em conta apenas estes resultados o método SDS/Ureia apresenta-se como o mais eficiente, tanto a nível de quantidade de ácidos nucleicos extraídos (média de 685 ng/μL versus 48,71 ng/μL para o kit) como a nível da sua pureza 260/280 (média de 1,893 versus 1,775 obtida com o kit de extração). A diferença mais significativa foi assim ao nível da quantidade extraída pois em termos de qualidade o ratio obtido com o kit de extração pode considerar-se aceitável, uma vez que se encontra perto do valor de referência de 1,8.

Uma outra forma de avaliar a qualidade de um extrato de ADN é através da sua separação em gel de agarose, neste caso a 0,8%. Por comparação com um marcador de peso molecular (*ladder*) pode estimar-se o tamanho médio do ADN extraído e também verificar a presença de ARN (de muito menor peso molecular que geralmente se apresenta com a forma esférica no final do gel).

Apresentam-se assim, nas figuras 17 e 18, os géis de agarose obtidos pela análise de algumas das amostras representativas em estudo.

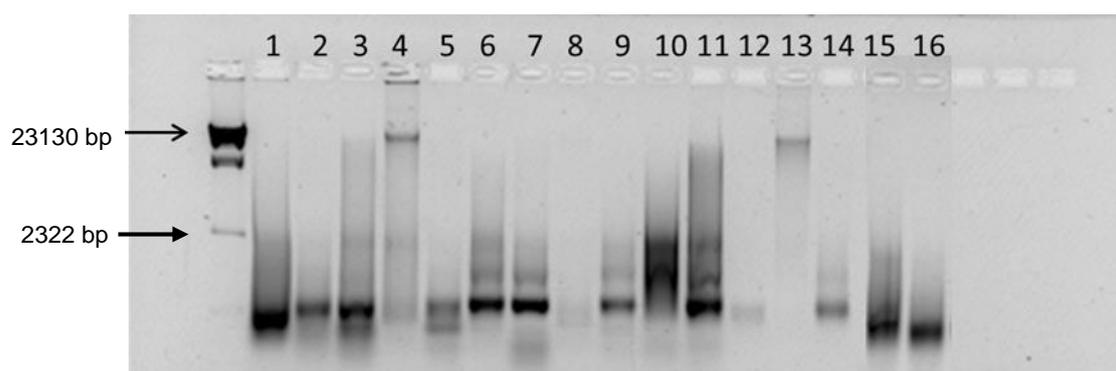


Figura 17 – Gel de agarose das amostras de bacalhau extraídas pelo KIT Nucleospin Food utilizando gel genómico. L: Ladder (Lambda DNA/HindIII Marker,2).

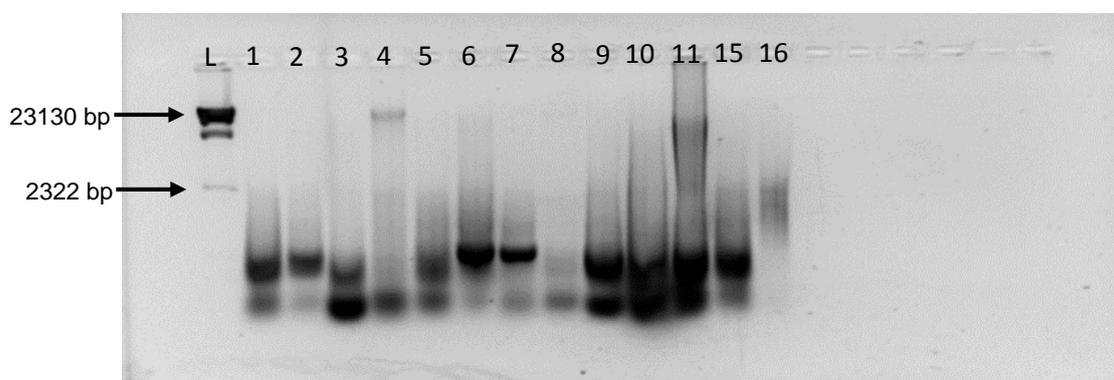


Figura 18 – Gel de agarose das amostras de bacalhau extraídas pelo método SDS/Ureia utilizando gel genómico. L: Ladder (Lambda DNA/HindIII Marker,2).

Como se verifica pela visualização das figuras 17 e 18 a quantidade e estado de degradação do ADN nos extratos é bastante variável. Relativamente à qualidade do extrato apenas as amostras 4 e 13 apresentaram ADN de elevado peso molecular numa banda bem definida. Todas as outras amostras em questão apresentaram uma elevada degradação do ADN o que é justificável pois as amostras foram sujeitas a um processo de secagem e salga que provoca uma diminuição do tamanho médio dos fragmentos de ADN extraído, já referido por outros autores (Xiao et al. 2015).

O perfil de ADN extraído foi assim idêntico para os dois processos de extração em estudo. Uma diferença substancial foi notada ao nível da quantidade de ARN extraído que se apresenta muito superior para o método SDS/Ureia. Este facto pode justificar a maior quantidade de ácidos nucleicos extraídos por este método, obtida pela análise a 260 nm, anteriormente referida.

Desta forma, considerando que a elevada quantidade de ARN presente nos extratos obtidos pelo método SDS pode limitar a eficiência da amplificação conforme referido por Wilson (Wilson 1997), uma vez que ARN em excesso pode inibir a reação de PCR, o método selecionado para a extração da totalidade das amostras foi o kit Nucleospin Food. Após esta análise e conclusões, e também por uma questão de tempo despendido na extração (muito mais reduzido no caso da utilização do kit) utilizaram-se as amostras extraídas pelo Kit Nucleospin Food para a realização do trabalho subsequente. Na tabela 10 apresentam-se os resultados de quantificação de ácidos nucleicos e ratio de absorvência 260/280 para a totalidade das amostras extraídas com o kit Nucleospin Food.

Tabela 10 – Razão de absorvência a 260/280 e quantificação de ácidos nucleicos da totalidade das amostras extraídas pelo kit Nucleospin Food.

Amostra	Tipo de Amostra	260/280	Conc. (ng/ μ L)
1	Inteiro Graúdo	1,209	3,691
2	Bacalhau Desfiado Salgado Seco	2,030	61,34
3	Bacalhau Desfiado Salgado Seco	2,039	110,1
4	Bacalhau Desfiado Salgado Seco	1,848	40,36
5	Migas de Paloco Salgado Seco	1,898	45,18
6	Paloco Desfiado Salgado Seco	1,752	42,36
7	Migas de Paloco Salgado Seco	1,935	88,23
8	Bacalhau Desfiado Salgado Seco	1,392	8,943
9	Paloco Desfiado Salgado Seco	1,903	27,82
10	Inteiro Graúdo	1,950	77,23
11	Bacalhau Desfiado Salgado Seco	1,959	95,31
12	Paloco Desfiado Demolhado Ultracongelado	1,219	1,628
13	Bacalhau Demolhado Ultracongelado	1,718	8,563
14	Bacalhau Desfiado Ultracongelado	1,679	6,941
15	Migas de Bacalhau Salgado Seco	1,936	105,0
16	Bacalhau Desfiado Salgado Seco	1,934	56,74
17	Paloco do Pacífico Salgado Seco Desfiado	1,929	94,80
18	Bacalhau do Pacífico Desfiado Salgado Seco	1,833	37,97
19	Filetes Paloco sem pele, 99% sem espinhas	1,936	122,2
20	Desfiado Paloco do Pacífico Salgado Seco	1,932	70,61
21	Bacalhau desfiado salgado seco	1,928	23,17
22	Migas Paloco sem pele, 99% sem espinhas	1,964	77,54
23	Migas de Paloco do Pacífico Salgado Seco	1,882	86,14
24	Posta fina de Bacalhau do Alasca em vácuo	1,889	7,543
25	Bacalhau do Pacífico Desfiado	1,250	2,157
26	Paloco do Pacífico Desfiado	1,812	3,722
27	Bacalhau Desfiado	1,042	3,189
28	Migas de Paloco do Pacífico	1,469	2,162
29	Bacalhau Salgado Seco Desfiado	1,991	14,08
30	Bacalhau do Pacífico Desfiado Salgado Seco	1,994	20,16
31	Bacalhau do Pacífico Desfiado Salgado Seco	1,468	4,360
32	Bacalhau Desfiado Demolhado Ultracongelado	1,625	1,658
33	Bacalhau Pacífico Desfiado Demolhado Ultracongelado	1,452	2,855

3.2. ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS E FILOGENIA

A totalidade das amostras foi enviada para sequenciação após purificação conforme descrito em Materiais e Métodos. Foram enviados cerca de 50 µL de cada amostra e respectivos *primers forward* e *reverse* a 10 ng/µl de acordo com o protocolo da empresa prestadora dos serviços de sequenciação. Pretendeu-se verificar a autenticidade das amostras pelo método padrão de identificação de espécies, a sequenciação de uma região *barcode*. Desta forma as amostras comerciais podem ser utilizadas como padrões no desenvolvimento da metodologia HRMA.

As reações de amplificação foram realizadas tendo como alvo a subunidade I do gene citocromo-oxidase (COI), utilizando o par de *primers* FishF2 / FishR2. Os produtos de amplificação das amostras foram sequenciados e as sequencias, após verificação, foram comparadas com as bases de dados GenBank (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome) e BOLD - Barcode of Life Data System (<http://www.boldsystems.org/>). Foi possível obter um alinhamento de 593 nucleotídeos para todas as amostras após verificação dos electroferogramas e eliminação de zonas terminais de má qualidade de leitura, assim como as sequências dos *primers*. Na tabela 11 estão representados os resultados para todas as amostras. São apresentados os nomes das espécies das entradas nas bases de dados com maior similaridade com a respetiva amostra. A similaridade, em percentagem, é indicada entre parêntesis a seguir a cada identificação e corresponde à percentagem de nucleótidos coincidentes.

Tabela 11 – Resultados da base de dados GenBank e BOLD de todas as amostras de bacalhau salgado inteiro, desfiado e demolido/ultracongelado.

#	Espécie descrita no rótulo	ID GenBank (% ident)	ID BOLD (% ident)
1	<i>Gadus morhua</i>	<i>Gadus morhua</i> (99%)	<i>Gadus morhua</i> (100%)
2	<i>Gadus macrocephalus</i>	<i>Gadus macrocephalus</i> (99%)	<i>Gadus macrocephalus</i> (99.83%)
3	<i>Gadus macrocephalus</i>	<i>Gadus macrocephalus</i> (99%)	<i>Gadus macrocephalus</i> (100%)
4	<i>Gadus morhua</i>	<i>Gadus morhua</i> (99%)	<i>Gadus morhua</i> (99,84%)
5	<i>Theragra chalcogramma</i>	<i>Gadus chalcogrammus</i> (100%)	<i>Gadus chalcogrammus</i> (100%)
6	<i>Theragra chalcogramma</i>	<i>Gadus chalcogrammus</i> (99%)	<i>Gadus chalcogrammus</i> (100%)
7	<i>Theragra chalcogramma</i>	<i>Gadus chalcogrammus</i> (100%)	<i>Gadus chalcogrammus</i> (100%)
8	<i>Gadus morhua</i>	*	*
9	<i>Theragra chalcogramma</i>	<i>Gadus chalcogrammus</i> (100%)	<i>Gadus chalcogrammus</i> (100%)
10	<i>Gadus morhua</i>	<i>Gadus morhua</i> (100%)	<i>Gadus morhua</i> (100%)
11	<i>Gadus morhua</i>	<i>Gadus macrocephalus</i> (99%)	<i>Gadus macrocephalus</i> (100%)
12	<i>Theragra chalcogramma</i>	<i>Gadus chalcogrammus</i> (100%)	<i>Gadus chalcogrammus</i> (100%)
13	<i>Gadus morhua</i>	*	*
14	<i>Gadus macrocephalus</i>	*	*
15	<i>Gadus morhua</i>	<i>Gadus morhua</i> (100%)	<i>Gadus morhua</i> (100%)
16	<i>Gadus macrocephalus</i>	<i>Gadus macrocephalus</i> (99%)	<i>Gadus macrocephalus</i> (100%)
17	<i>Theragra chalcogramma</i>	<i>Gadus chalcogrammus</i> (99%)	<i>Gadus chalcogrammus</i> (99.83%)
18	<i>Gadus macrocephalus</i>	<i>Gadus macrocephalus</i> (99%)	<i>Gadus macrocephalus</i> (100%)
19	<i>Theragra chalcogramma</i>	<i>Gadus chalcogrammus</i> (99%)	<i>Gadus chalcogrammus</i> (100%)
20	<i>Theragra chalcogramma</i>	<i>Gadus chalcogrammus</i> (100%)	<i>Gadus chalcogrammus</i> (100%)
21	<i>Gadus morhua</i>	<i>Gadus morhua</i> (99%)	<i>Gadus morhua</i> (99,84%)
22	<i>Theragra chalcogramma</i>	<i>Gadus chalcogrammus</i> (99%)	<i>Gadus chalcogrammus</i> (99.83%)
23	<i>Theragra chalcogramma</i>	<i>Gadus chalcogrammus</i> (100%)	<i>Gadus chalcogrammus</i> (100%)
24	<i>Gadus macrocephalus</i>	<i>Gadus macrocephalus</i> (100%)	<i>Gadus macrocephalus</i> (100%)
25	<i>Gadus macrocephalus</i>	<i>Gadus macrocephalus</i> (100%)	<i>Gadus macrocephalus</i> (100%)
26	<i>Theragra chalcogramma</i>	<i>Gadus chalcogrammus</i> (100%)	<i>Gadus chalcogrammus</i> (100%)
27	<i>Gadus macrocephalus</i>	<i>Gadus macrocephalus</i> (100%)	<i>Gadus macrocephalus</i> (100%)
28	<i>Theragra chalcogramma</i>	<i>Gadus chalcogrammus</i> (99%)	<i>Gadus chalcogrammus</i> (100%)
29	<i>Gadus morhua</i>	<i>Gadus macrocephalus</i> (99%)	<i>Gadus macrocephalus</i> (100%)
30	<i>Gadus macrocephalus</i>	<i>Gadus macrocephalus</i> (99%)	<i>Gadus macrocephalus</i> (100%)
31	<i>Gadus macrocephalus</i>	<i>Gadus macrocephalus</i> (99%)	<i>Gadus macrocephalus</i> (100%)
32	<i>Gadus macrocephalus</i>	<i>Gadus macrocephalus</i> (99%)	<i>Gadus macrocephalus</i> (99,84%)
33	<i>Gadus macrocephalus</i>	<i>Gadus macrocephalus</i> (99%)	<i>Gadus macrocephalus</i> (100%)

Verificou-se que foi possível a identificação inequívoca ao nível da espécie para a grande maioria das amostras (91%) utilizando o processo de sequenciação de região *barcode*. Todavia para três amostras, 8, 13 e 14 não foi possível obter uma sequência com suficiente qualidade para resultar numa identificação credível apesar de terem sido realizadas pelo menos três tentativas de sequenciação em diferentes extratos. Duas destas três amostras não sequenciadas são do tipo demolido e ultracongelado, mais processadas, o que poderá ter contribuído para a degradação do ADN. O estado de degradação do ADN assume importância uma vez que o fragmento do gene COI amplificado tem um tamanho significativo, ca. 600 pbs. Vários autores referem que o tamanho médio de ADN nos alimentos muito processados ronda os 200 pbs (Veneza et al. 2014).

Relativamente à concordância dos resultados de identificação de espécies com a espécie indicada no rótulo verificou-se que 93 % das amostras sequenciadas estavam corretamente rotuladas. Contudo, as amostras 11 e 29, rotuladas como *G. morhua* (a espécie de maior valor comercial) foram identificadas como *G. macrocephalus* (a espécie mais abundante neste tipo de produtos no mercado).

Com as sequências obtidas construiu-se um dendrograma, ou árvore filogenética, usando o algoritmo Neighbor-Joining (Figura 19).

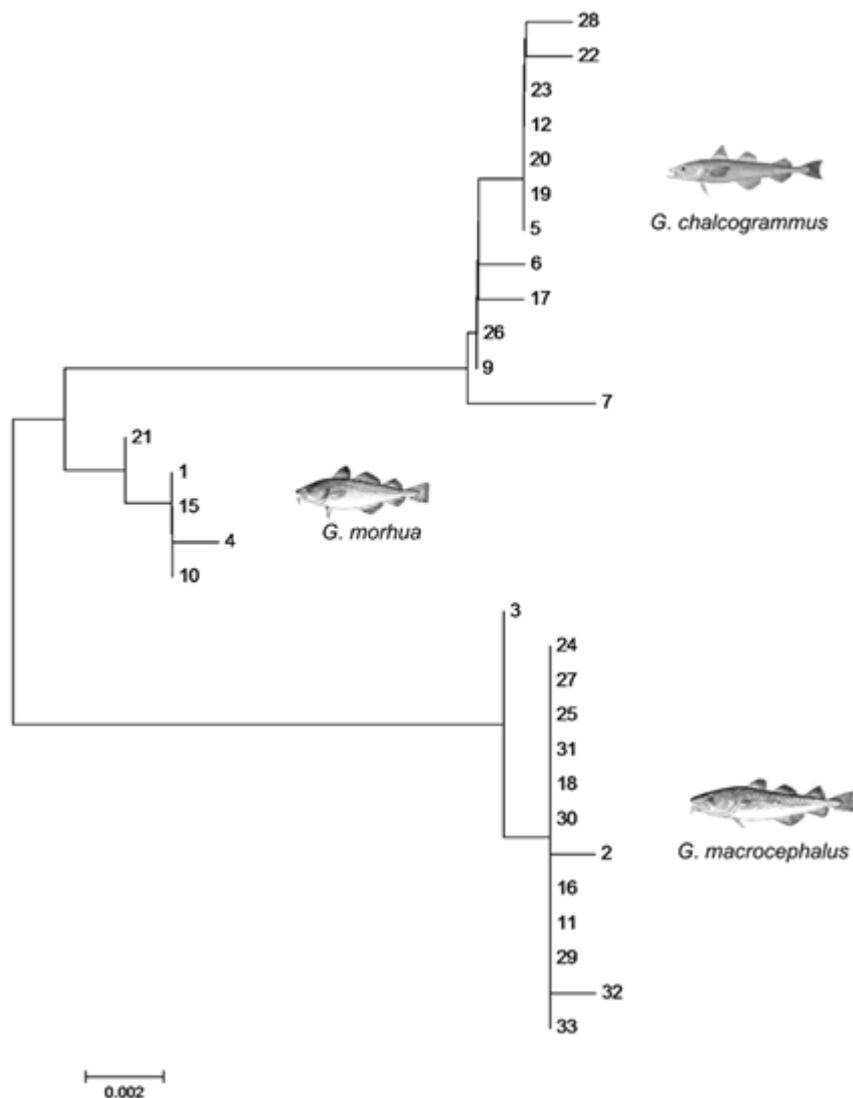


Figura 19 – Árvore filogenética Neighbor-Joining das 30 amostras sequenciadas para o gene COI.

A identificação de espécies recorrendo à construção de árvores filogenéticas permite, para além da identificação pela posição relativa no dendrograma, verificar de uma forma gráfica o nível de variação genética intraespecífica. Verificou-se assim que a diversidade intraespecífica ocorre para todas as espécies todavia a um nível bastante inferior à diversidade interespecífica, como é conveniente para um correto agrupamento e separação das espécies por *barcoding*. Pode ainda verificar-se que a espécie que apresenta maior diversidade é o *G. morhua* apesar do menor número de amostras analisados (Pinto et al. 2013).

O gene COI afigura-se assim apropriado para a discriminação destas três espécies. Todavia a metodologia de sequenciação não se mostrou efetiva para a totalidade das amostras, provavelmente devido a uma degradação excessiva de ADN nas amostras em questão. A metodologia de sequenciação é, adicionalmente, bastante morosa (cerca de 72 horas quando a sequenciação é requisitada externamente como acontece na maioria dos laboratórios), pelo que o desenvolvimento de uma metodologia mais rápida, focando zonas genómicas de menor tamanho, é de grande importância na autenticação deste tipo de produtos. A metodologia HRMA permite ultrapassar as limitações referidas pelo que foi a escolhida para o desenvolvimento do trabalho subsequente tendo por base a diversidade genética do gene COI entretanto bem caracterizada.

3.3. DESENHO DE NOVOS *PRIMERS* PARA PEQUENOS FRAGMENTOS POLIMÓRFICOS

Por forma a implementar uma metodologia de HRMA foram reunidas cerca de 33 (12 *G. morhua*, 9 *G. macrocephalus* e 12 *G. chalcogrammus*) sequências do gene COI, correspondentes às três espécies em questão, validadas pela base de dados BOLD systems. Após inserção das amostras em estudo sequenciadas alinharam-se as sequências e identificaram-se as regiões onde existiam polimorfismos entre as espécies. Foram identificadas 7 regiões contendo o necessário polimorfismo e simultaneamente flanqueadas por zonas conservadas e com o tamanho suficiente para o desenho de *primers* de amplificação.

A tabela 12 sumariza as regiões polimórficas identificadas e respetivas mutações encontradas para cada espécie.

Tabela 12 – Regiões polimórficas dos sete *primers* desenhados.

	Gadus F1/R1	Gadus F2/R2				Gadus F3/R3				Gadus F4/R4				Gadus F5/R5				Gadus F6/R6				Gadus F7/R7																
<i>Gadus macrocephalus</i>	G	C	A	G	A/G	C	T/C	C	C	C	A	C	T/C	A/C	G	C	A/G	T/C	G	C	C	A	C	T	T	C	G	T/C	A	C	C	C	C	G	T	A	T	
<i>Gadus morhua</i>	G/A	T	T	G	A	C/T	T	C/T	A	A	A	T	T	A	G	C	G	T	G/C	C	T/C	A	C	T/C	T	T	G	T	G	C/T	A	C/T	A	C/T	G/C	T	A	T
<i>Gadus chalcogrammus</i>	G	T	T	A	A	C	T	C	C	A	A/G	T	C	A/C	G/A	C/T	G	T	G	C/T	T	A/G	C/T	C	T/C	T	G/A	T	A	C	A	C	A	C	G	C	T	C

Na tabela 13 apresentam-se os *primers* selecionados, o seu tamanho, T_m (determinado com a ferramenta online OligoCalc (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligo.html>), e tamanho do fragmento amplificado. Aos *primers* foi atribuída a designação *Gadus*, seguida da indicação F (*forward*) ou R (*reverse*) e ao número do local amplificado.

Tabela 13 – Primers selecionados, respetiva sequência, tamanho, temperatura de fusão e tamanho do fragmento amplificado.

Nome do primer	Sequência (5' - 3')	Tamanho (pb)	Tm oligo calc (50 mM salt)	Tamanho do Fragmento
Gadus_F1	TCGAGCAGAGCTAAGTCAACC	21	61	73
Gadus_R1	GTGCGCTGTAACGATCACAT	20	58	
Gadus_F2	GCGCAGGCTTTTCGTAATAAT	20	56	121
Gadus_R2	TGTTATTTATTTCGAGGAAAGC	22	56	
Gadus_F3	GCTTCCCTCGAATAAATAACA	22	56	84
Gadus_R3	AGCTTCTACACCAGAGGATGC	21	61	
Gadus_F4	AGCATCCTCTGGTGTAGAAGC	21	61	81
Gadus_R4	CCAGCATGAGCGAGGTTT	18	56	
Gadus_F5	GCTGGGGCATCTGTTGAT	18	56	71
Gadus_R5	ATTGCCCAAGAATTGATGA	20	54	
Gadus_F6	TCATCAATTCTTGGGGCAAT	20	54	110
Gadus_R6	GCTGTAATTAGTACTGCTCAAACAAA	26	62	
Gadus_F7	GCAATTTACAGTACCAAACACC	23	61	90
Gadus_R7	AGCTGCTAAGACGGGGAGAG	20	63	

Todos os *primers* foram sujeitos ao teste de especificidade recorrendo a uma simulação informática de amplificação usando a ferramenta PrimerBlast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>). Todos os pares de *primers* resultaram altamente específicos para o género *Gadus* incidindo nas espécies em questão devido à abundância de sequências no GenBank relativas a estas.

Pela análise da tabela verifica-se que foi possível a obtenção de *primers* para as 7 regiões identificadas. Estes *primers* permitem a amplificação de fragmentos com de 71 a 121 pares de bases, com um tamanho médio de 90 pb, o que obedece aos critérios de tamanho de fragmento apropriado para análise de fusão de alta resolução.

3.4. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO DOS NOVOS *PRIMERS*

Os novos *primers* foram testados em PCR convencional previamente à sua utilização em HRMA. Para tal realizou-se a amplificação usando as condições normais no que diz respeito ao perfil de temperaturas e concentração de reagentes e observou-se o comportamento de amplificação de cada par de *primers* em extratos de 12 amostras (4 de cada espécie) representativas do tipo de amostras existentes. As temperaturas de hibridação (Th) testadas foram baseadas nas Tm obtidas através do software OligoCal subtraindo a estas últimas cerca de 5 °C. Sempre que possível, quando existia apenas uma pequena variação na Th determinada, foram constituídos grupos de pares de *primers* que poderiam ser usados em amplificações simultâneas à mesma temperatura, por uma questão de otimização de tempo.

Relativamente à quantidade de ADN a utilizar em cada amplificação, tendo em consideração os resultados de quantificação de ácidos nucleicos nas amostras e o seu perfil em gel de agarose, não nos foi possível controlar a quantidade de ADN utilizada em cada amplificação. Pelo perfil dos extratos em gel de agarose verificou-se que em grande parte das amostras o ARN está presente em maior quantidade que o ADN pelo que o resultado de quantificação por UV não reflete a quantidade real de ADN mas sim a soma da quantidade de ADN mais ARN. Optou-se, assim, por introduzir nas amostras uma diluição significativa para minorar os efeitos da matriz (essencialmente devidos a inibidores de amplificação) que foi otimizada em 1:20 em água ultrapura para PCR.

Na tabela 14 mostra-se a temperatura de hibridação otimizada para cada par de *primers* desenvolvido e perfil de amplificação.

Tabela 14 – Temperatura de hibridação otimizada para cada par de *primers* desenvolvido e perfil de amplificação

Nome do primer	Sequência (5' - 3')	Th otimizada
Gadus_F1	TCGAGCAGAGCTAAGTCAACC	56
Gadus_R1	GTGCGCTGTAACGATCACAT	
Gadus_F2	GCGCACGCTTTCGTAATAAT	54
Gadus_R2	TGTTATTTATTCGAGGGAAAGC	
Gadus_F3	GCTTTCCTCGAATAAATAACA	55
Gadus_R3	AGCTTCTACACCAGAGGATGC	
Gadus_F4	AGCATCCTCTGGTGTAGAAGC	55
Gadus_R4	CCAGCATGAGCGAGGTTT	
Gadus_F5	GCTGGGGCATCTGTTGAT	54
Gadus_R5	ATTGCCCAAGAATTGATGA	
Gadus_F6	TCATCAATTCTTGGGGCAAT	54
Gadus_R6	GCTGTAATTAGTACTGCTCAAACAAA	
Gadus_F7	GCAATTCACAGTACCAAACACC	58
Gadus_R7	AGCTGCTAAGACGGGGAGAG	

Na figura 20 apresenta-se, a título de exemplo, o gel de agarose dos produtos de amplificação dos pares de *primers* Gadus_3, Gadus_4 e Gadus_6. Verifica-se que todas as amostras, das três espécies, foram amplificadas com um sinal de intenso e relativamente uniforme. O tamanho de amplificação observado, recorrendo ao padrão de pesos moleculares e à comparação entre os diferentes *primers* corresponde ao esperado conforme indicado na tabela 13.

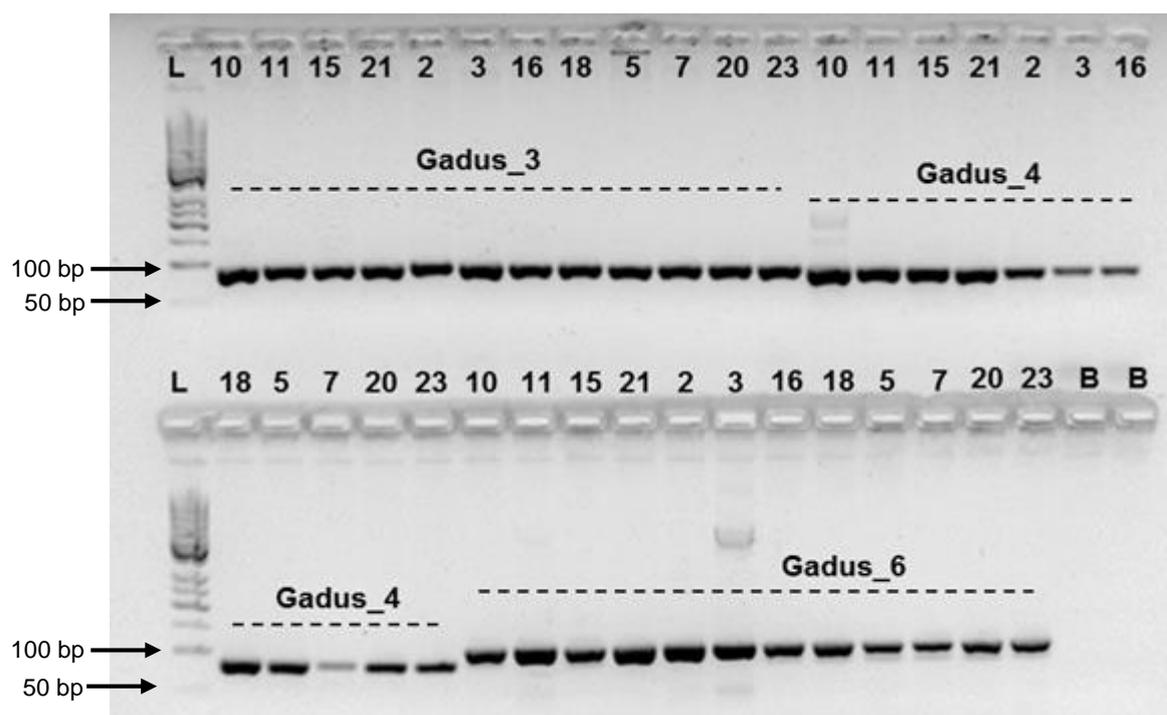


Figura 20 – Gel de agarose dos produtos de amplificação em PCR convencional dos *primers* Gadus_3, Gadus_4 e Gadus_6.

O produto amplificado resultou também muito específico para a maioria dos pares de *primers* verificando-se a presença de uma banda única.

Todavia, durante o processo de otimização, e após várias tentativas por alteração da temperatura de hibridação, os pares de *primers* dos quais resultaram bandas mais intensas, específicas e com um sinal de amplificação uniforme foram o Gadus_1, Gadus_2, Gadus_5, Gadus_5 e Gadus_7. Para os restantes o sinal de amplificação não foi uniforme para todas as Th testadas ocorrendo simultaneamente, embora a um nível bastante baixo, a amplificação de fragmentos inespecíficos (Figura 23, Gadus_4 amostra 10 e Gadus_6 amostra 3), situação que pode influenciar negativamente a performance do método de HRMA.

Verificada a especificidade e otimizadas as condições de amplificação, sendo a mais relevante a temperatura de hibridação, procedeu-se à verificação dos *primers* na distinção das espécies em modo HRMA.

3.5. HRMA DO GENE COI

A metodologia HRMA, conforme referido, pressupõe a amplificação de pequenos fragmentos (ca. 100 pb) para que as diferenças existentes nas sequências amplificadas sejam evidentes no perfil das curvas de fusão. Todavia alguns autores referem a eficiência da utilização de fragmentos de maior tamanho (ca. 200-600 pb) na distinção de variedades e espécies de plantas (Faria et al. 2013; Ganopoulos et al. 2012). Tendo em conta este último facto realizou-se uma amplificação e respetiva análise de *melting* utilizando os *primers* FishF2 e FishR2 nas condições já referidas para avaliar a possibilidade de utilização deste fragmento e comparação da sua eficiência com os *primers de novo* desenvolvidos. Neste ensaio foram utilizadas as amostras 10,15 e 21 da espécie *G.morhua*, 2, 3 e 16 da *G.macrocephalus* e por fim, 6,20 e 23 da *G.chalcogrammus*. Na figura 21 mostra-se o resultado da análise de fusão executada.

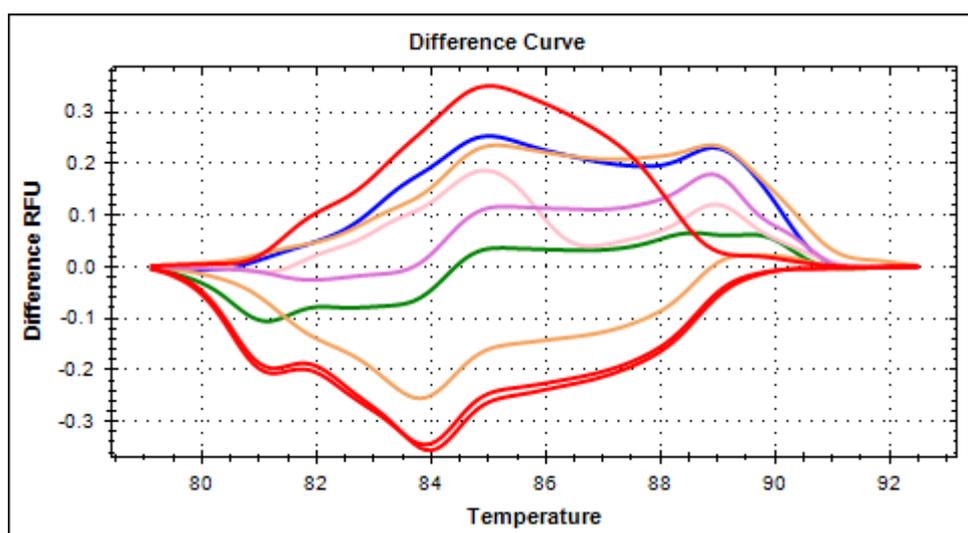


Figura 21 – Curvas diferenciais resultantes de HRMA de 600 pb do gene COI as amostras 10,15,21 da espécie *G.morhua*, 2,3,16 da espécie *G.macrocephalus* e 6,20,23 da espécie *G.chalcogrammus*.

Tal como se pode verificar na figura anterior a utilização de um fragmento de cerca de 600 pb, em modo HRMA, na distinção das três espécies em estudo mostrou-se bastante ineficiente reiterando assim a necessidade do desenvolvimento de *primers* que permitam a amplificação de pequenas regiões polimórficas.

3.6. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES ANALÍTICAS EM HRMA

Após otimização das T_h dos *primers* para amplificação de pequenos fragmentos em PCR convencional procedeu-se à otimização das condições em modo HRMA no que respeita às diluições a utilizar e perfil de temperaturas de amplificação. Relativamente aos tempos e temperaturas utilizadas durante a análise de fusão foram utilizadas condições padrão para a obtenção do máximo de resolução possível (análise de fusão de 65 a 95 °C com captação de fluorescência a cada 0,5 °C).

No que respeita ao perfil de temperaturas usado, este foi otimizado para uma maior rapidez na amplificação tendo, para tal, sido eliminado o passo de extensão a 72 °C e diminuídos os tempo de desnaturação e hibridação conforma recomendações bibliográficas para PCR rápido de pequenos fragmentos.

Após várias experiências chegou-se à conclusão que o perfil otimizado seria o seguinte: 98 °C durante 2 minutos + 35 ciclos de 98 °C durante 5 segundos e T_a durante 5 segundos, seguido por análise de fusão 60-95 °C em 0,5 °C incremento). Este perfil de temperaturas permite a conclusão de uma amplificação e análise de fusão em menos de 1 hora.

Por forma a determinar a influência da diluição na resolução HRMA, para além da diluição já estabelecida de 1:20 foi também testada uma diluição a 1:50 utilizando três amostras de cada espécie e o *primer* *Gadus_7*, que apresentava uma boa resolução específica. Na figura 22 pode verificar-se que a diluição 1:20 mostrou-se ser a mais eficiente na distinção das espécies provavelmente devido à grande diminuição da quantidade de ADN na diluição 1:50 o que afeta a qualidade da amplificação e introduz um fator de variação na análise. Por uma questão de harmonização na apresentação dos resultados em todas as curvas de fusão será utilizada a seguinte correspondência cor-espécie: azul referente ao *Gadus chalcogrammus* (CH), a cor vermelha corresponde ao *Gadus macrocephalus* (MC) e por fim a cor verde ao *Gadus morhua* (MO).

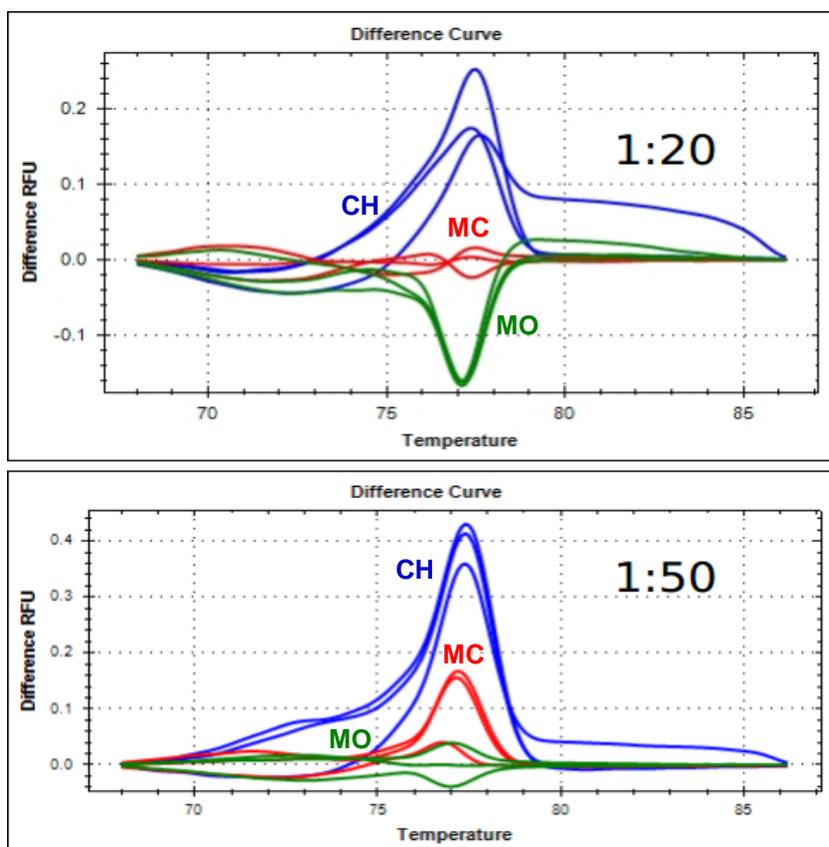


Figura 22 - Curvas diferenciais de fusão para três amostras de cada espécie amplificadas nas diluições 1:20 e 1:50 para o per de *primers Gadus_7*.

Através da análise dos gráficos das diferentes diluições da figura 22 observou-se que os melhores resultados foram os da diluição 1:20, pois há uma diferença significativa na separação das 3 espécies (*Gadus morhua*, *Gadus macrocephalus* e *Gadus chalcogrammus*). No restante trabalho optou-se por fazer diluições de 1:20 de todas as amostras.

3.7. DESEMPENHO DOS NOVOS *PRIMERS* EM HRMA

Após otimização e uniformização das condições analíticas em modo HRMA os 7 pares de *primers* desenvolvidos (Gadus_1 a Gadus_7) foram testados em 9 amostras (10,15,21 da espécie *G. morhua*, 2,3,16 da espécie *G. macrocephalus* e 6, 20,23 da espécie *G. chalcogrammus*), três representantes de cada uma das três espécies estudadas, anteriormente sequenciadas, cuja identidade foi verificada. Para uma melhor visualização gráfica as curvas de fusão das amostras pertencentes a uma mesma espécie são apresentadas da mesma cor, conforme referido anteriormente.

Na figura 23 são apresentadas as curvas diferenciais de fusão obtidas pela amplificação das amostras com os pares de *primers* Gadus_1 e Gadus_6.

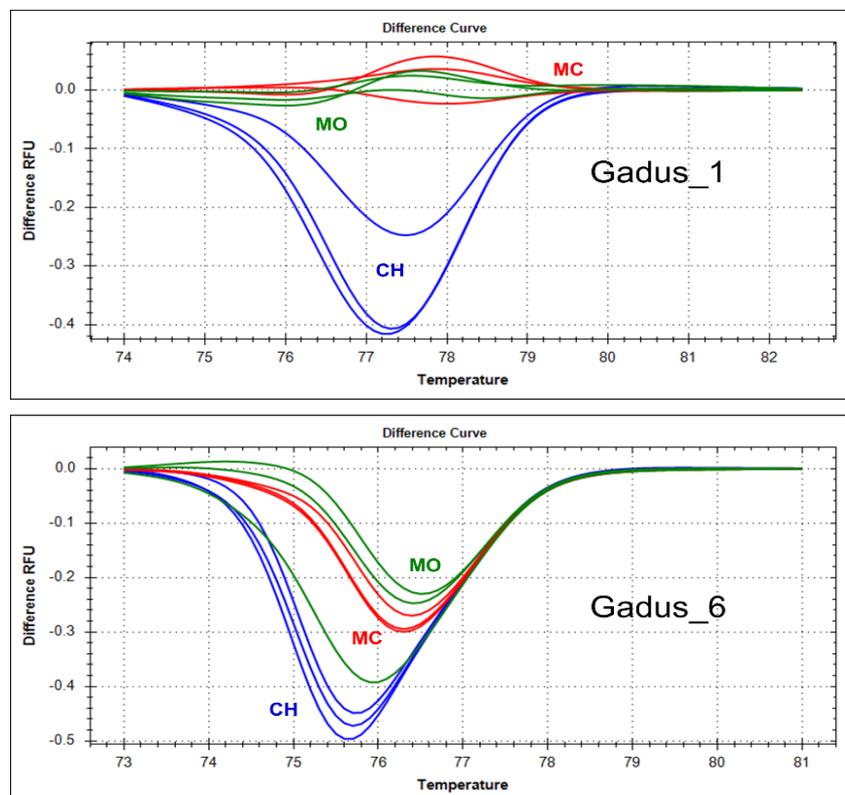


Figura 23 – Curvas diferenciais de fusão usando o par de *primers* Gadus_1 e Gadus_6 para 3 amostras de cada espécie.

O desempenho dos dois pares de *primers* apresentados não foi, como é visível nas curvas de fusão, suficiente para a distinção das três espécies. Em ambos os casos a espécie *G. macrocephalus* aparenta ter uma maior proximidade à espécie *G. morhua* o que não se verifica em termos filogenéticos. Apesar de se pretender quase exclusivamente a obtenção de perfis de fusão diferentes, que levem a uma clara discriminação das amostras por espécie, a relação entre as curvas deve também refletir aquela verificada nos dendrogramas pela análise filogenética. Esta correspondência é um bom indicador da possibilidade de utilizar a região polimórfica em questão como marcador em HRMA. Tal não é o que se verifica para os *primers* Gadus_1 e Gadus_6 pelo que não se consideraram bons marcadores HRMA. Apresentam-se seguidamente, na figura 24, os perfis de fusão obtidos no produto amplificado com os pares de *primers* Gadus_3, Gadus_4 e Gadus_5.

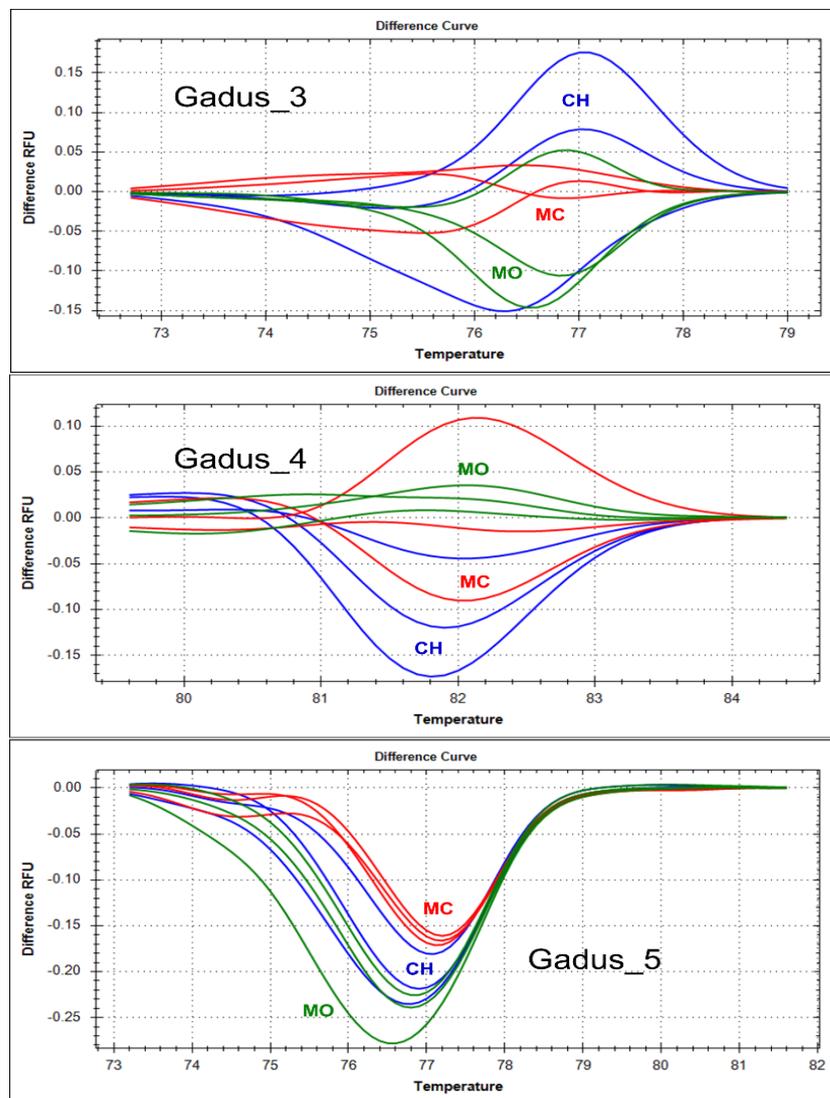


Figura 24 – Curvas diferenciais de fusão usando os pares de *primers* Gadus_3, Gadus_4 e Gadus_5 para 3 amostras de cada espécie.

Para estes pares de *primers* verificou-se que a sua capacidade de discriminação de espécies era quase inexistente. As curvas apresentam-se quase aleatoriamente dispostas não sendo possível o seu agrupamento em grupos distintos pelo que estes foram também rejeitados como marcadores na identificação das espécies, em análise HRM.

Na figura 25 apresentam-se as curvas diferenciais de fusão dos produtos amplificados em três espécies diferentes usando o par de *primers* *Gadus_7*.

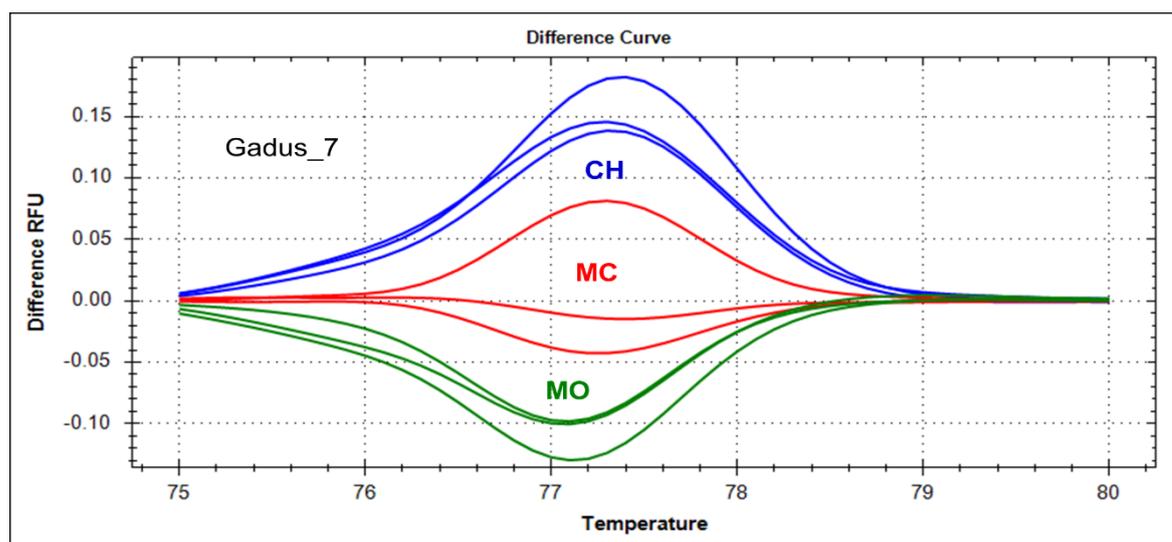


Figura 25 – Curvas diferenciais de fusão usando o par de *primers* *Gadus_7* em três amostras de cada espécie.

Para a região amplificada pelo *primer* *Gadus_7* verificou-se uma boa discriminação das espécies *G. chalcogrammus* e *G. morhua* em grupos perfeitamente definidos. Relativamente à espécie *G. macrocephalus* esta encontra-se também discriminada mas apresentando uma certa dispersão com diferentes sentidos de inflexão das curvas para amostras diferentes. As espécies *G. morhua* e *G. macrocephalus* encontram-se mais próximas em termos de perfil de fusão mas tal não corresponde à relação filogenética entre as três espécies uma vez que as mais próximas são *G. morhua* e *G. chalcogrammus*. Tendo em conta a referida dispersão na espécie *G. macrocephalus* e a não correspondência entre o perfil de fusão e a Filogenia este marcador, apesar das boas características apresentadas, não pode considerar-se marcador de primeira escolha para o trabalho em questão.

Por fim, na figura 26, apresenta-se a representação gráfica das curvas diferenciais de fusão para o par de *primers* Gadus_2. Como pode verificar-se foi conseguida a completa discriminação das espécies utilizando este marcador. Verifica-se aqui, também, uma melhor correspondência com a filogenia das espécies pela maior proximidade de *G. chalcogrammus* e *G. morhua*, como se pode visualizar na figura 19.

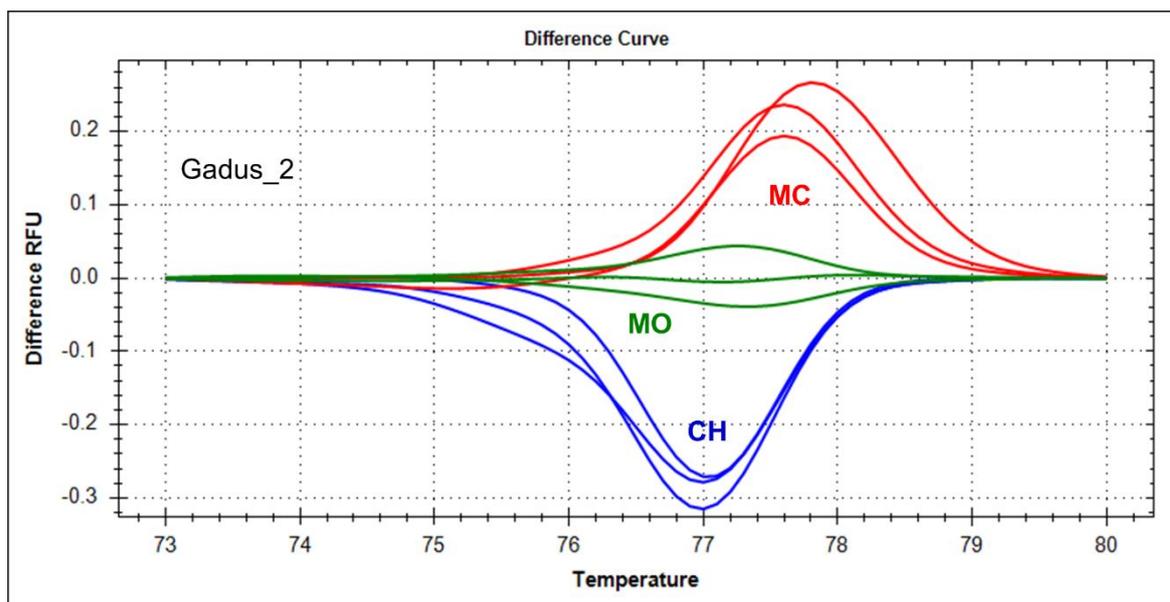


Figura 26 – Curvas diferenciais de fusão usando o par de *primers* Gadus_2 em três amostras de cada espécie.

Verificou-se adicionalmente que o desempenho de cada grupo de marcadores apresentados se relaciona (*Gadus_1/6* – *Gadus_3/4/5* – *Gadus_2/7*) com o número de posições polimórficas (mutações) nas regiões amplificadas. Assim, e como pode verificar-se na tabela 12 (Regiões polimórficas amplificadas pelos sete pares de *primers* desenvolvidos), as regiões *Gadus_1/6*, com pouca capacidade discriminatória, apresentam 3 mutações; as regiões *Gadus_3/4/5*, com capacidade discriminatória quase nula, apresentam 6 mutações e as regiões *Gadus_2/7*, que permitiram uma melhor discriminação, apresentam 7 mutações. Parece, desta forma, que o número de mutações no local amplificado tem uma forte influência na capacidade discriminatória apesar de a maioria dos trabalhos publicados em HRM focarem regiões com um pequeno número de mutações como os SNPs (Martino et al. 2010; Temesvári et al. 2011).

Desta forma, a região amplificada pelo par de *primers* *Gadus_F2* pode considerar-se um bom marcador para a discriminação das três espécies em estudo tendo sido o selecionado para a discriminação da totalidade das amostras seguidamente apresentada.

3.8. APLICAÇÃO DOS MARCADORES DESENVOLVIDOS PARA A DISTINÇÃO HRMA DA TOTALIDADE DAS AMOSTRAS

O marcador selecionado foi seguidamente aplicado na discriminação simultânea da totalidade das 33 amostras por forma a verificar a sua aplicabilidade em trabalhos com um grande número de amostras como acontece num trabalho de rotina.

Os extratos de 33 amostras foram então diluídos a 1:20 e amplificados, em duplicado, com o par de *primers* selecionado *Gadus_2*. O equipamento utilizado permite a amplificação simultânea de até 96 amostras. Na figura 27 apresenta-se o perfil de fusão das 33 amostras, entre 65 e 95 °C, sem qualquer processamento de dados. Pode verificar-se que a intensidade de amplificação final (eixo das ordenadas) se situa para a larga maioria das amostras entre as 10000 e as 12000 unidades relativas de fluorescência o que indica um boa uniformidade do sinal amplificado.

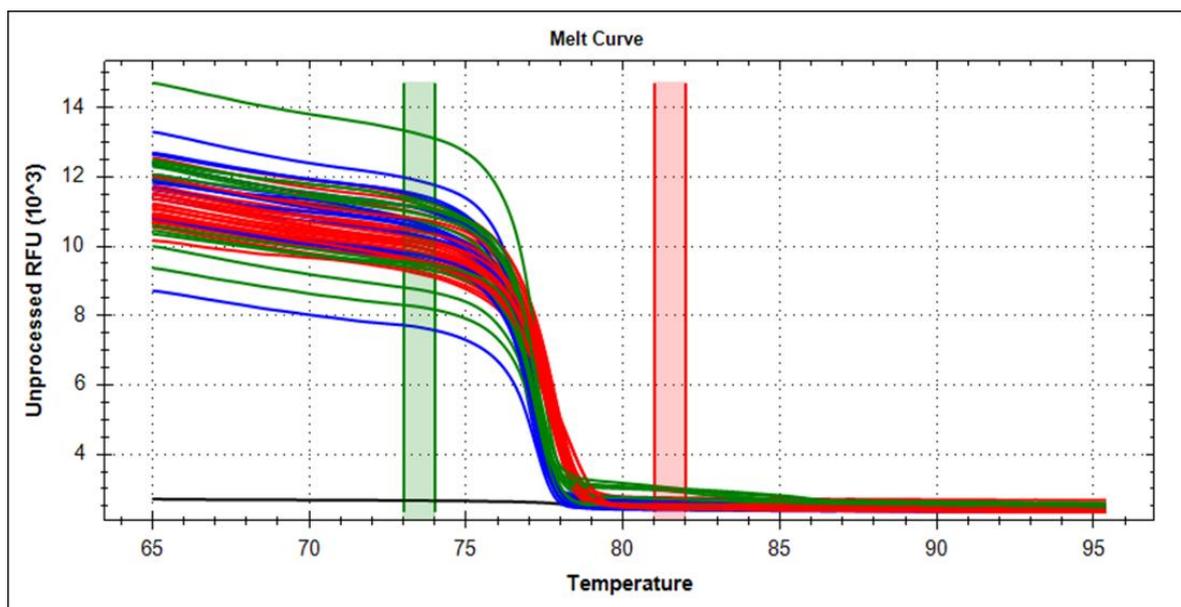


Figura 27 – Curva de fusão não processada dos sinais de amplificação de todas as amostras (*Primers Gadus_2*). A linha a preto representa um branco de amplificação.

Após o processamento de normalização do sinal de amplificação inicial para o mesmo valor de intensidade de fluorescência, verifica-se que as diferenças nos perfis de fusão são já notórias todavia ainda sem resolução suficiente para discriminação de grupos. O programa informático (elimina as regiões de temperatura onde as diferenças não são significativas focando desta forma zonas de fusão mais diferenciadoras como representado na seguinte figura 28.

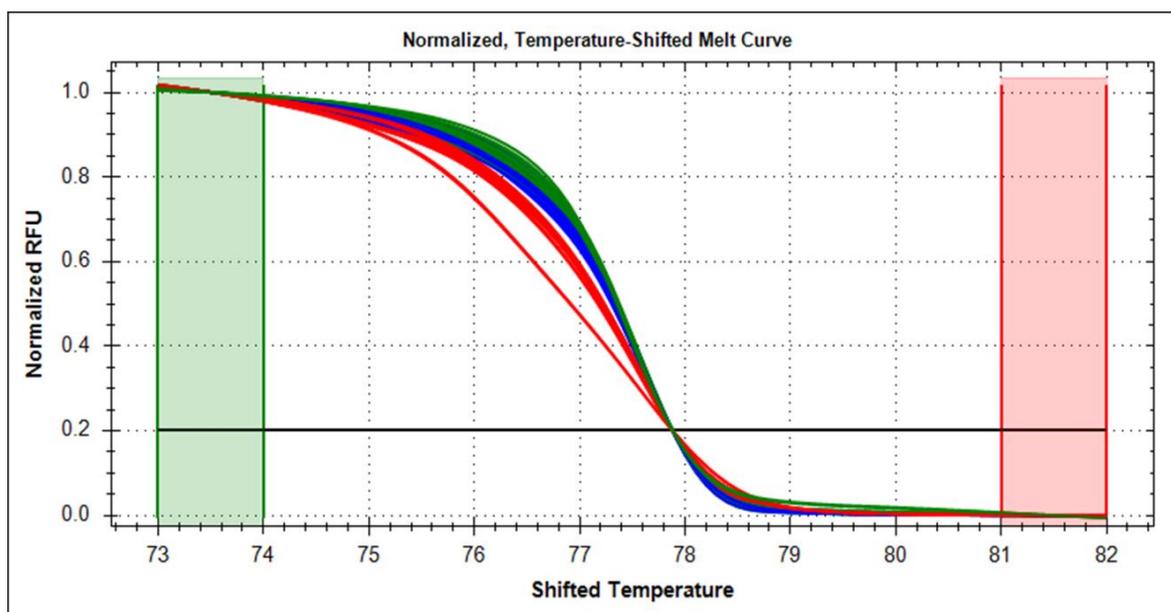


Figura 28 – Curvas de fusão normalizadas ao longo do eixo de temperatura.

O programa de análise de HRM prossegue a análise até à obtenção de uma curva diferencial, primeira derivada da curva de fusão anterior, onde são refletidas as diferenças entre as curvas de fusão normalizadas para uma melhor discriminação e visualização de dados. Obteve-se assim a figura 29 onde se pode observar as curvas de diferenças de fusão para as 33 amostras em estudo e respetivos replicados.

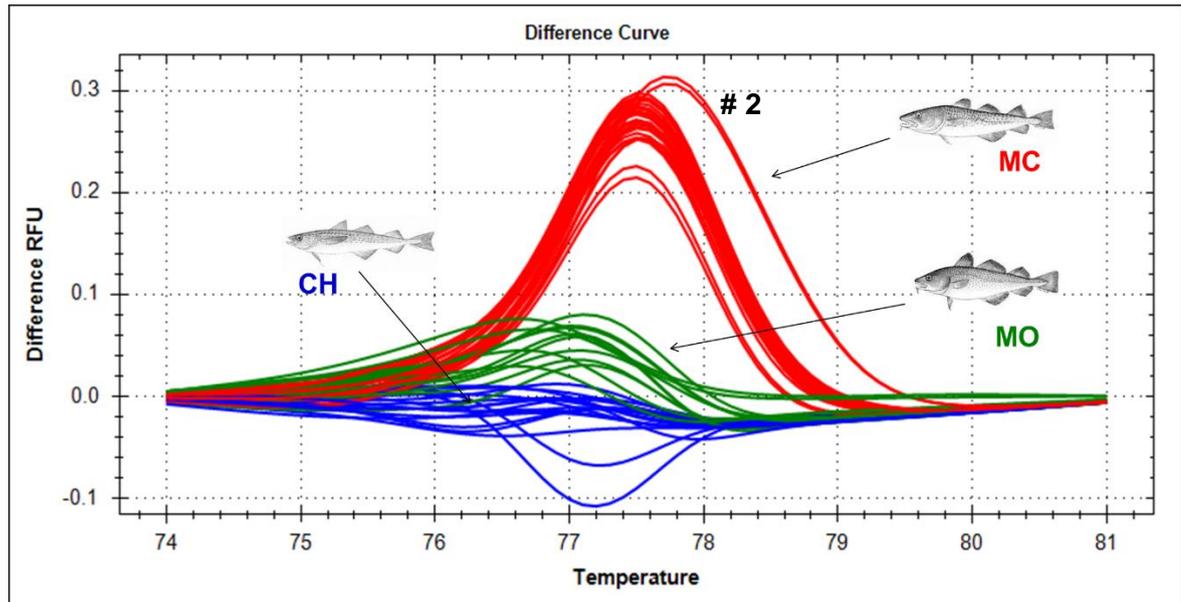


Figura 29 – Curvas diferenciais de fusão dos fragmentos amplificados pelo *primer* Gadus_2 para as 33 amostras, em duplicado.

Analisando as curvas de fusão das 33 amostras de bacalhau, observa-se e primeiro lugar que foi possível a separação das 3 espécies diferentes de bacalhau estudadas. A espécie *Gadus macrocephalus*, indicada a vermelho, encontra-se perfeitamente diferenciada das outras duas espécies. Uma das amostras de *Gadus macrocephalus* (#2) apresenta alguma diferenciação em relação às outras suas congéneres. Este desvio pode ser devido ao facto de esta amostra apresentar algum grau de divergência das restantes de *G. macrocephalus* sendo essa divergência genética no local em análise amplificado pelos primers Gadus_2. Existem mais duas amostras filogeneticamente divergentes, a 32 e a 3, mas que não apresentam diferenciação de curva de fusão provavelmente justificado pelo facto de a zona onde se encontram os polimorfismos intraespecíficos se encontrar fora da região amplificada pelo *primer* utilizado.

Relativamente às outras duas espécies, *G. morhua* e *G. chalcogrammus*, verifica-se que o programa foi capaz da sua discriminação, evidenciada pela diferença de cores, apesar de algumas curvas de aproximarem ao nível da inflexão. São todavia distinguíveis pois o ponto de inflexão da curva, que corresponde ao Tm do fragmento, se encontra aproximadamente aos 72 °C para *G. chalcogrammus* e 73 °C para *G. morhua*. Esta proximidade é perfeitamente justificável pois corresponde à maior proximidade em termos filogenéticos verificada no dendrograma da figura 19 onde o grupo das espécies de *G. morhua* apresenta uma raiz comum com o grupo das espécies de *G. chalcogrammus*.

O marcador selecionado amplificado pelos *primers* Gadus_2 mostrou-se assim eficiente na separação das amostras nas três espécies correspondentes e demonstrou ser um bom marcador para a autenticação de amostras de bacalhau processado.

A metodologia em estudo mostrou-se assim eficiente para a discriminação de amostras de bacalhau nas três espécies mais comercializadas. A técnica pode ser executada em menos de 1 hora, após processo extrativo, e para um número de amostras considerável. O custo de execução é também bastante reduzido quando comparado com o processo de sequenciação do gene COI.

Após esta análise comparou-se os resultados obtidos com as informações descritas nos rótulos. Essa comparação encontra-se esquematicamente na tabela 15.

Tabela 15 – Resultados obtidos das curvas de fusão de todas as amostras de bacalhau salgado inteiro, desfiado e demolido/ultracongelado.

#	Tipo de Processamento	Espécie descrita no rótulo	Cluster
1	Inteiro	<i>Gadus morhua</i>	<i>Gadus morhua</i>
2	Desfiado	<i>Gadus macrocephalus</i>	<i>Gadus macrocephalus</i>
3	Desfiado	<i>Gadus macrocephalus</i>	<i>Gadus macrocephalus</i>
4	Desfiado	<i>Gadus morhua</i>	*
5	Desfiado	<i>Theragra chalcogramma</i>	<i>Gadus chalcogrammus</i>
6	Desfiado	<i>Theragra chalcogramma</i>	<i>Gadus chalcogrammus</i>
7	Desfiado	<i>Theragra chalcogramma</i>	<i>Gadus chalcogrammus</i>
8	Desfiado	<i>Gadus morhua</i>	<i>Gadus morhua</i>
9	Desfiado	<i>Theragra chalcogramma</i>	<i>Gadus chalcogrammus</i>
10	Inteiro	<i>Gadus morhua</i>	<i>Gadus morhua</i>
11	Desfiado	<i>Gadus morhua</i>	<i>Gadus macrocephalus</i>
12	Demolido e Ultracongelado	<i>Theragra chalcogramma</i>	<i>Gadus chalcogrammus</i>
13	Demolido e Ultracongelado	<i>Gadus morhua</i>	<i>Gadus morhua</i>
14	Demolido e Ultracongelado	<i>Gadus macrocephalus</i>	<i>Gadus macrocephalus</i>
15	Desfiado	<i>Gadus morhua</i>	<i>Gadus morhua</i>
16	Desfiado	<i>Gadus macrocephalus</i>	<i>Gadus macrocephalus</i>
17	Desfiado	<i>Theragra chalcogramma</i>	<i>Gadus chalcogrammus</i>
18	Desfiado	<i>Gadus macrocephalus</i>	<i>Gadus macrocephalus</i>
19	Desfiado	<i>Theragra chalcogramma</i>	<i>Gadus chalcogrammus</i>
20	Desfiado	<i>Theragra chalcogramma</i>	<i>Gadus chalcogrammus</i>
21	Desfiado	<i>Gadus morhua</i>	<i>Gadus morhua</i>
22	Desfiado	<i>Theragra chalcogramma</i>	<i>Gadus chalcogrammus</i>
23	Desfiado	<i>Theragra chalcogramma</i>	<i>Gadus chalcogrammus</i>
24	Demolido e Ultracongelado	<i>Gadus macrocephalus</i>	<i>Gadus macrocephalus</i>
25	Demolido e Ultracongelado	<i>Gadus macrocephalus</i>	<i>Gadus macrocephalus</i>
26	Demolido e Ultracongelado	<i>Theragra chalcogramma</i>	<i>Gadus chalcogrammus</i>
27	Demolido e Ultracongelado	<i>Gadus macrocephalus</i>	<i>Gadus macrocephalus</i>
28	Desfiado	<i>Theragra chalcogramma</i>	<i>Gadus chalcogrammus</i>
29	Desfiado	<i>Gadus morhua</i>	<i>Gadus macrocephalus</i>
30	Desfiado	<i>Gadus macrocephalus</i>	<i>Gadus macrocephalus</i>
31	Desfiado	<i>Gadus macrocephalus</i>	<i>Gadus macrocephalus</i>
32	Demolido e Ultracongelado	<i>Gadus macrocephalus</i>	<i>Gadus macrocephalus</i>
33	Demolido e Ultracongelado	<i>Gadus macrocephalus</i>	<i>Gadus macrocephalus</i>

*Não integrada nos clusters devido a apresentar um perfil de fusão diferente de todas as outras amostras.

Avaliando os resultados das 33 amostras, é possível observar que duas amostras (#11 e #29) estavam adulteradas. Pois, estas amostras tinham descrito no rótulo, serem da espécie *Gadus morhua*, mas na verdade pertencem à espécie *Gadus macrocephalus*. Em relação à amostra #4, esta foi eliminada da análise, pois apresentava um perfil com características diferentes de todas as outras amostras, não permitindo a identificação da espécie a partir deste método.

As duas amostras identificadas como mal rotuladas por HRMA, 11 e 29, foram igualmente classificadas como *G. macrocephalus* pela sequenciação do gene COI, previamente realizada, o que atesta a eficiência do método HRMA.

A análise de fusão de fragmentos amplificados pelos *primers* Gadus_2 mostrou-se assim bastante eficiente tendo permitido classificação correta de 97% das amostras.

4. Conclusões

O Bacalhau, *Gadus morhua*, consumido maioritariamente na Europa e assumindo uma especial importância em Portugal, é considerado o mais valioso peixe do género *Gadus* pela sua importância gastronómica e mesmo cultural. O aumento do consumo desta espécie em todo o mundo, levou a uma diminuição nas capturas, e como consequência, provocou uma escassez da mesma.

Assim, a prática de adulterações nesta espécie, através da comercialização de diferentes espécies de peixes, apresentando características organoléticas e morfológicas semelhantes, como se fossem *Gadus morhua*, é uma prática comum, o que permite um maior ganho económico para os comerciantes. Além disso, o aumento dos produtos transformados e a existência de um mercado global, pode levar a substituições de espécies liberalmente ou acidentalmente. Daí a importância do controlo de espécies e alimentar, por forma a garantir que os consumidores não sejam defraudados nas suas escolhas alimentares.

Nos últimos anos, foram desenvolvidos vários métodos analíticos para a identificação de espécies e controlo da autenticidade de alimentos. Os métodos analíticos desempenham, um papel importante, indo desde os métodos físicos, alicerçados na microscopia, aos métodos baseados no ADN. Estes últimos têm revelado uma alternativa promissora aos métodos convencionais.

Sendo assim, este trabalho levou ao desenvolvimento de marcadores moleculares para a avaliação da autenticidade em amostras de bacalhau, através da utilização da técnica de PCR em tempo real. Foram utilizadas diferentes amostras de bacalhau inteiro, desfiado e demolido ultracongelado de três espécies distintas do género *Gadus*.

Inicialmente na realização deste trabalho em análise por PCR convencional e sequenciação dos fragmentos amplificados utilizaram-se os *primers* FishF2 / FishR2, que mostraram ser eficazes na identificação e discriminação das espécies *Gadus morhua*, *Gadus macrocephalus* e *Gadus chalcogrammus*. Verificou-se que 93 % das amostras sequenciadas estavam corretamente rotuladas, contudo detetaram-se duas adulterações rotuladas como *G. morhua* mas identificadas como *G. macrocephalus*, de menor valor comercial.

Como o método de PCR convencional e subsequente sequenciação é demorado e dispendioso, houve a necessidade de desenvolver um método mais robusto, nomeadamente através da redução do tempo de análise.

Foram assim desenvolvidos 7 novos marcadores no gene COI pelo desenho de *primers* para amplificação de fragmentos com um tamanho aproximado de 100 pb, em zonas onde foram detetados polimorfismos adequados à análise HRMA.

Os marcadores foram testados em amostras reais tendo um deles revelado alta eficiência na discriminação das três espécies em questão.

A metodologia HRMA, utilizada com os marcadores desenvolvidos e selecionados, mostrou-se eficiente na discriminação de *Gadus morhua* das outras espécies, tendo permitido a identificação correta em 97 % das amostras. Este estudo demonstrou que a substituição de espécies pode ser avaliada por HRMA, de uma forma rápida e específica, contribuindo assim para a definição da técnica de HRMA com uma robusta ferramenta de autenticação de alimentos.

5. Bibliografia

- Alves da Silva S, Frenher K, Pazza R. Use of mitochondrial gene sequencing for species identification in salmon filets. *Evolução e Conserv. da Biodiversidade*. 2012;3:64–7.
- Aranish F. PCR-RFLP analysis of nuclear nontranscribed spacer for mackerel species identification. *J. Agric. Food Chem*. 2005;53(3):508–11.
- Arvanitoyannis IS, Tsitsika E V., Panagiotaki P. Implementation of quality control methods (physico-chemical, microbiological and sensory) in conjunction with multivariate analysis towards fish authenticity. *Int. J. Food Sci. Technol*. 2005 Mar [cited 2014 Aug 4];40(3):237–63.
- Ashurst PR, Dennis MJ. *Food Authentication*. First Edit. 1996.
- Bank W. FISH TO 2030 Prospects for Fisheries and Aquaculture. 2013;(83177).
- Bréchon AL, Coombs SH, Sims DW, Griffiths AM. Development of rapid genetic technique for the identification of clupeid larvae in the Western English Channel and investigation of mislabelling in processed fish products. *ICES J. Mar. Sci*. 2013;70:399–407.
- Lo Brutto S, Arculeo M, Mauro A, Scalisi M, Cammarata M, Parrinello N. (Gadidae). *Ital. J. Zool*. 1998;65(sup1):49–52.
- Calo-Mata P, Sotelo CG, Pérez-Martín RI, Rehbein H, Hold GL, Russell VJ, et al. Identification of gadoid fish species using DNA-based techniques. *Eur. Food Res. Technol*. 2003;217(3):259–64.
- Carvalho DC De, Seerig A, Melo DC De, Sousa AB De. Identificação molecular de peixes : o caso do Surubim (*Pseudoplatystoma* spp .). 2009;215–9.
- Cawthorn D-M, Steinman HA, Witthuhn RC. Establishment of a mitochondrial DNA sequence database for the identification of fish species commercially available in South Africa. *Mol. Ecol. Resour*. 2011 Nov [cited 2014 Aug 4];11(6):979–91.
- Dantas A, Nodari R. Marcadores Genéticos.
- Druml B, Cichna-Markl M. High resolution melting (HRM) analysis of DNA--its role and potential in food analysis. *Food Chem. Elsevier Ltd*; 2014 Sep 1 [cited 2014 Aug 28];158:245–54.
- Dudu A, Georgescu S, Costache M. PCR-RFLP Method to Identify Salmonid Species of Economic Importance. *Sci. Pap. Anim. Sci. Biotechnologies*. 2011.
- Ederal U, Gerais DEM, Alves D, Neto P. Detecção de adulteração de espécies em pescado e derivados por meio da técnica de DNA Barcoding Detecção de adulteração de espécies em pescado e derivados por meio da técnica de DNA Barcoding. 2013.
- Erali M, Voelkerding K V, Wittwer CT. High Resolution Melting Applications for Clinical Laboratory Medicine. *Exp Mol Pathol*. 2008 August. 2009;85(1):50–8.
- Erali M, Wittwer CT. High resolution melting analysis for gene scanning. *J. homepage www.elsevier.com*. Elsevier Inc.; 2010;50(4):250–61. Faleiro F. MARCADORES GENÉTICO-MOLECULARES. 2007.
- FAO. *The State of World Fisheries and Aquaculture*. FAO, editor. 2014.

- Faria M a., Magalhães a., Nunes ME, Oliveira MBPP. High resolution melting of trnL amplicons in fruit juices authentication. *Food Control*. Elsevier Ltd; 2013;33(1):136–41.
- Fitzcharles EM. Rapid discrimination between four Antarctic fish species, genus *Macrourus*, using HRM analysis. *Fish. Res.* Elsevier B.V.; 2012 Sep [cited 2014 Aug 4];127-128:166–70.
- Fu JJ, Khan M a., Mei ZQ, Tania M, Yang LQ, Cheng JL. Development of RAPD-SCAR markers for different *Ganoderma* species authentication by improved RAPD amplification and molecular cloning. *Genet. Mol. Res.* 2015;14(2):5667–76.
- Galal-Khallaf A, Ardura A, Mohammed-Geba K, Borrell YJ, Garcia-Vazquez E. DNA barcoding reveals a high level of mislabeling in Egyptian fish fillets. *Food Control*. Elsevier Ltd; 2014 Dec [cited 2014 Aug 27];46:441–5.
- Galimberti A, De Mattia F, Losa A, Bruni I, Federici S, Casiraghi M, et al. DNA barcoding as a new tool for food traceability. *Food Res. Int.* Elsevier Ltd; 2013 Jan [cited 2014 Jul 10];50(1):55–63.
- Ganopoulos I, Bosmali I, Madesis P, Tsaftaris A. Microsatellite genotyping with HRM (High Resolution Melting) analysis for identification of the PGI common bean variety Plake *Megalosperma Prespon*. *Eur. Food Res. Technol.* 2012;234(3):501–8.
- Geiger MF, Herder F, Monaghan MT, Almada V, Barbieri R, Bariche M, et al. Spatial heterogeneity in the Mediterranean Biodiversity Hotspot affects barcoding accuracy of its freshwater fishes. *Mol. Ecol. Resour.* 2014 Apr 1 [cited 2014 Aug 17].
- Hall SJ, Hilborn R, Andrew NL, Allison EH. Innovations in capture fisheries are an imperative for nutrition security in the developing world. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2013 May 21 [cited 2014 Jul 21];110(21):8393–8.
- Hanner R, Becker S, Ivanova N V, Steinke D. FISH-BOL and seafood identification: geographically dispersed case studies reveal systemic market substitution across Canada. *Mitochondrial DNA*. 2011 Oct [cited 2014 Aug 4];22 Suppl 1(October):106–22.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. Biol. Sci.* 2003 Feb 7 [cited 2014 Jul 9];270(1512):313–21.
- Hebert PDN, Gregory TR. The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Syst. Biol.* 2005;54(5):852–9.
- Herrero B, Madriñán M, Vieites JM, Espiñeira M. Authentication of atlantic cod (*Gadus morhua*) Using real time PCR. *J. Agric. Food Chem.* 2010;58(8):4794–9.
- Hilsdorf A. Ferramentas Moleculares Aplicadas à pesca e aquicultura. X Reun. Científica do Inst. Pesca X Reun. Científica do Inst. Pesca. 2010;14–7.
- Hilsdorf A, Krieger JE. BIOLOGIA MOLECULAR NA. *Mol. Ferram. Genética, E Conserv.*
- Holmes BH, Steinke D, Ward RD. Identification of shark and ray fins using DNA barcoding. *Fish. Res.* 2009 Jan [cited 2014 Jul 11];95(2-3):280–8. Hubalkova Z, Kralik P, Kasalova J, Rencova E. Identification of gadoid species in fish meat by polymerase chain reaction (PCR) on genomic DNA. *J. Agric. Food Chem.* 2008 May 28;56(10):3454–9.

Ivanova N V., Zemlak TS, Hanner RH, Hebert PDN. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Mol. Ecol. Notes*. 2007;7(4):544–8.

Kalivas A, Ganopoulos I, Xanthopoulou A, Chatzopoulou P, Tsaftaris A, Madesis P. DNA barcode ITS2 coupled with high resolution melting (HRM) analysis for taxonomic identification of *Sideritis* species growing in Greece. *Mol. Biol. Rep.* 2014 Aug [cited 2014 Jul 29];41(8):5147–55.

Keskin E, Atar HH. DNA barcoding commercially important fish species of Turkey. *Mol. Ecol. Resour.* 2013 Sep [cited 2014 Jul 28];13(5):788–97.

Kim S, Eo H-S, Koo H, Choi J-K, Kim W. DNA barcode-based molecular identification system for fish species. *Mol. Cells*. 2010 Dec [cited 2014 Aug 4];30(6):507–12.

Lago C, Vieites JM. Authentication of gadoids from highly processed products susceptible to include species mixtures by means of DNA sequencing methods. *Eur Food Res Technol.* 2012;171–80.

Lakra WS, Verma MS, Goswami M, Lal KK, Mohindra V, Punia P, et al. DNA barcoding Indian marine fishes. *Mol. Ecol. Resour.* 2011 Jan [cited 2014 Aug 4];11(1):60–71.

Lamendin R, Miller K, Ward RD. Labelling accuracy in Tasmanian seafood : An investigation using DNA barcoding. *Food Control. Elsevier Ltd*; 2015;47:436–43.

Liu X, Luo W, Zeng C, Wang W, Gao Z. Isolation of new 40 microsatellite markers in mandarin fish (*Siniperca chuatsi*). *Int. J. Mol. Sci.* 2011;12(7):4180–9.

Mafra I, Ferreira IMPLVO, Oliveira MBPP. Food authentication by PCR-based methods. *Eur. Food Res. Technol.* 2007 Oct 30 [cited 2014 Aug 4];227(3):649–65.

Maralit B a., Aguila RD, Ventolero MFH, Perez SKL, Willette D a., Santos MD. Detection of mislabeled commercial fishery by-products in the Philippines using DNA barcodes and its implications to food traceability and safety. *Food Control. Elsevier Ltd*; 2013 Sep [cited 2014 Aug 9];33(1):119–25.

Martino A, Mancuso T, Rossi AM. Application of high-resolution melting to large-scale, high-throughput SNP genotyping: a comparison with the TaqMan method. *J. Biomol. Screen. Off. J. Soc. Biomol. Screen.* 2010;15(6):623–9.

Mohanty BP, Barik S, Mahanty A, Mohanty S. Food safety, labeling regulations and fish food authentication. *Natl. Acad. Sci. Lett.* 2013;36(3):253–8.

Piñeiro C, Barros-Velázquez JB, Pérez-Martín RI, Gallardo JM. Specific enzyme detection following isoelectric focusing as a complimentary tool for the differentiation of related Gadoid fish species. *Food Chem.* 2000;70(2):241–5.

Pinto A Di, Pinto P Di, Terio V, Bozzo G, Bonerba E, Ceci E, et al. DNA barcoding for detecting market substitution in salted cod fillets and battered cod chunks. *Food Chem. Elsevier Ltd*; 2013;141(3):1757–62.

Rasmussen Hellberg RS, Morrissey MT, Hanner RH. A multiplex PCR method for the identification of commercially important salmon and trout species (*Oncorhynchus* and *Salmo*) in North America. *J. Food Sci.* 2010 Sep [cited 2014 Aug 4];75(7):C595–606.

- Rasmussen RS, Morrissey MT. Methods for the Commercial Fish and Seafood Species. *Compr. Rev. food Sci. food Saf.* 2008;7(3):280–95.
- Rehbein H. Differentiation of hake species by RFLP-and SSCP-analysis of PCR amplified cytochrome b and parvalbumin sequences. *Dtsch. Leb. Behr's Verlag*; 2007 [cited 2015 Jul 16];103(11):511–7.
- Ribeiro ADO, Caires RA, Mariguela TC, Pereira LHG, Hanner R, Oliveira C. DNA barcodes identify marine fishes of São Paulo State, Brazil. *Mol. Ecol. Resour.* 2012 Nov [cited 2014 Aug 4];12(6):1012–20.
- Sarri C, Stamatis C, Sarafidou T, Galara I, Godosopoulos V, Kolovos M, et al. A new set of 16S rRNA universal primers for identification of animal species. *Food Control.* 2014 Sep [cited 2014 Aug 9];43:35–41.
- Scarano D, Rao R. DNA Markers for Food Products Authentication. *Diversity.* 2014;6(3):579–96.
- Semagn K, Bjørnstad Å, Ndjiondjop MN. An overview of molecular marker methods for plants. 2006;5(25):2540–68.
- Sussi C, NONNIS MARZANO F, MARTUZZI F, SUMMER A, GANDOLFI G, BRACCHI PG. Biochemical genetic assessment of unclassified meat of cod-like fish. *Ital. J. food Sci. Chiriotti*; 2002 [cited 2015 Jul 21];14(1):65–70.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 2013;30(12):2725–9.
- Tavares RA., Piedras SRN., Nunes MD., Almeida DB., Moreira CGA., Fernandes JM., et al. Identificação de Loci microssatélites com potencial de amplificação na espécie de Peixe-Rei. 2014;1941–5.
- Temesvári M, Paulik J, Kóbori L, Monostory K. High-resolution melting curve analysis to establish CYP2C19*2 single nucleotide polymorphism: Comparison with hydrolysis SNP analysis. *Mol. Cell. Probes.* 2011 Jan [cited 2015 Jul 30];25(2-3):130–3.
- Thilsted SH, James D, Toppe J, Subasinghe R, Karunasagar I. Maximizing the contribution of fish to human nutrition. *Second Int. Conf. Nutr. Rome*; 2014.
- Veneza I, Felipe B, Oliveira J, Silva R, Sampaio I, Schneider H, et al. A barcode for the authentication of the snappers (Lutjanidae) of the western Atlantic : rDNA 5S or mitochondrial COI. *Food Control. Elsevier Ltd*; 2014;38:116–23.
- Wilson IG. Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification. 1997;63(10):3741–51.
- Wong EH-K, Hanner RH. DNA barcoding detects market substitution in North American seafood. *Food Res. Int.* 2008 Oct [cited 2014 Jul 16];41(8):828–37.
- Xiao Y, Xuejiao Z, Zichu X, Wenhui W. The Influence of Processing on the DNA Integrity in Several Raw Materials of Marine Foods. *J. Food Sci. Technol.* 2015;7(7):534–9.