



**Desenvolvimento de marcadores moleculares para a avaliação
da autenticidade do Açafrão (*Crocus sativus* L.)**

Caterina Machado Villa

**Dissertação do 2º Ciclo de Estudos conducente ao Grau de
Mestre em Controlo de Qualidade, Especialidade Água e Alimentos**

Trabalho realizado sob a orientação de:

Doutora Isabel Maria Sousa Gomes Mafra

Professora Doutora Maria Beatriz Prior Pinto Oliveira

Porto

2014

É autorizada a reprodução integral desta dissertação apenas para efeitos de investigação, mediante declaração escrita do interessado que a tal se compromete.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, à Doutora Isabel Mafra pela grande oportunidade que me ofereceu com este trabalho, pelos novos conhecimentos adquiridos, por toda a ajuda fornecida, pela disponibilidade constante e por ter enriquecido o meu percurso académico.

Agradeço à Professora Doutora Beatriz Oliveira por ter disponibilizado todos os recursos necessários para o decorrer do meu trabalho.

À Joana Costa, sem a qual este trabalho teria sido praticamente impossível. Obrigada por estares sempre disponível para ajudar e por nunca me ter sido negada qualquer ajuda.

À Liliana Meira, a minha fiel companheira nesta viagem. Um obrigada simplesmente, por TUDO: pela companhia, pelas conversas, conselhos, desabafos, almoços, lanches, passeios, pela ajuda quer no trabalho prático, quer na escrita da tese...e muito mais. Mas principalmente, obrigada pela tua amizade e que possas continuar a ser a minha companheira na próxima longa viagem que nos espera.

À Begoña Fernandez, Francisca Rodrigues e Sónia Soares principalmente pela ajuda essencial fornecida ao longo deste ano de trabalho, pelo esclarecimento das muitas dúvidas que foram surgindo, mas também pelos momentos de descontração, pelos desabafos, pelas piadas e brincadeiras que fizeram este ano terminar demasiado rápido.

Aos meus pais e avós, sem os quais todo o meu percurso de formação não teria sido possível. À minha tia, que apesar de já não estar entre nós, continua a ajudar-me pela pessoa que foi e pela pessoa que continua a ser no meu coração.

E finalmente, ao Hélder Barbosa, por estar presente em todas as etapas da minha vida, pela paciência, pelos conselhos, pelos sermões e, principalmente, por me ter guiado na escolha deste Mestrado e deste tema, porque qualquer outra escolha teria sido errada, obrigada por me teres mostrado o caminho certo.

A todos os que me acompanharam neste percurso, a todos os que apoiaram as minhas escolhas, a todos os que ajudaram a cumprir os meus objetivos...

OBRIGADA!

Resumo

O Açafrão, *Crocus sativus* L., é considerado a especiaria mais cara do mundo, a qual é obtida a partir dos estigmas secos da sua flor. É utilizado como aromatizante e corante na preparação de alimentos, mas também na medicina tradicional e moderna. Como consequência do seu elevado valor comercial, o Açafrão tem sido frequentemente associado a um incomparável grau de adulteração com os mais diversos materiais e estratégias. A detecção de adulterantes torna-se assim uma questão de elevada importância na avaliação do valor do produto, para verificar a concorrência desleal e para garantir a proteção do consumidor contra práticas fraudulentas. Diferentes métodos têm sido desenvolvidos para avaliar a qualidade e autenticidade do Açafrão, baseados em métodos normalizados com medição de parâmetros químicos e sensoriais. No entanto, a autenticação do Açafrão baseia-se maioritariamente na observação microscópica de características morfológicas, que é um método moroso que necessita de pessoal com experiência e que é suscetível de interpretação subjetiva. Hoje-em-dia, os métodos baseados na análise de ADN têm provado ser adequados para a avaliação da autenticidade de alimentos, especiarias e plantas medicinais, mesmo sujeitos a elevado grau de processamento.

O objetivo deste trabalho consistiu no desenvolvimento de marcadores moleculares para avaliação da autenticidade do Açafrão. Foram utilizadas amostras de bolbos, folhas e estigmas de *Crocus sativus* L. e outras espécies do mesmo género para além do potencial adulterante *Carthamus tinctorius*. Os extratos de ADN de todas as amostras foram amplificados por PCR qualitativa tendo como alvo as regiões designadas como *DNA barcode* – ITS1, ITS2 e *matK* – e um marcador SCAR. A técnica de PCR em tempo real usando o corante EvaGreen com análise por HRM (*High Resolution Melting*) foi também explorada para discriminar diferentes espécies do género *Crocus*.

Os *primers* para as regiões ITS1 e *matK* revelaram ser específicos para o género *Crocus*, enquanto os *primers* para o *locus* ITS2 e o marcador SCAR foram específicos para as espécies *Crocus sativus* L. e *Crocus cartwrightianus*. A análise por HRM foi capaz de discriminar *Crocus sativus* L. das outras espécies *Crocus*, cujos resultados foram confirmados pelos dados de sequenciação. Os *primers* para a região ITS1 específica de *Carthamus tinctorius* detetaram com sucesso o adulterante em amostras comerciais de Açafrão. Este estudo revelou que as ferramentas genéticas fornecem métodos fáceis, rápidos e eficazes para a autenticação do Açafrão.

Palavras-chave: açafrão, autenticidade, PCR, marcadores moleculares

Abstract

Saffron is the most expensive spice in the world, which is obtained from the red-dried stigmas of the flowered *Crocus sativus* L. It is used for flavoring and coloring in food preparation and also in traditional and modern medicine. As a consequence of its high market value, saffron has been frequently associated to an unrivaled degree of adulteration performed in both ground and whole stigma with the most diverse materials and strategies. Thus, the detection of adulterants becomes a very important issue for the evaluation of the product value, to ascertain the unfair competition and assure the consumer protection against fraudulent practices. Different methods have been developed to assess quality and authenticity of saffron based on standardized methods to assess chemical and sensorial parameters. However, saffron authentication relies mostly on microscopic observation of morphological traits, which is time-consuming, depends on experienced personal and is susceptible of subjective interpretation. Nowadays, DNA-based methods have proved to be suitable for the authenticity assessment of food, spices and medicinal plants, even highly processed.

The aim of this work was to develop molecular markers for further evaluation of the authenticity of saffron. Leave, bulbs and stigmas samples of *C. sativus* L. and other *Crocus* spp. and dried flowers of the potential adulterant *Carthamus tinctorius* were used. DNA extracts of all samples were amplified by polymerase chain reaction (PCR) targeting three different DNA barcode loci – ITS1, ITS2 and *matK* – and a SCAR marker. A real-time PCR assay using EvaGreen dye combined with High Resolution Melting analysis was carried out in order to discriminate different species of *Crocus* genus. Fragments obtained by the amplification of ITS1 were sequenced.

The *primers* targeting ITS1 and *matK* loci were specific for the genus *Crocus*, while the *primers* targeting ITS2 locus and the SCAR marker were specific for the species *C. sativus* L. and *Crocus cartwrightianus*. The HRM analysis was able to discriminate *Crocus sativus* L. from other *Crocus* spp., whose results were confirmed by sequencing data. *Primers* targeting locus ITS1 specific for *Carthamus tinctorius* successfully detected the adulterant in saffron commercial samples. This study revealed that genomic tools provide easy, fast and reliable methods for saffron authentication.

Keywords: saffron, authenticity, PCR, molecular markers

Índice

Agradecimentos	iii
Resumo	v
Abstract	vi
Índice	vii
Índice de Figuras	ix
Índice de Tabelas	xiv
Lista de Abreviaturas	xv
Componente Teórica	1
1 Introdução	3
1.1 Plantas Aromáticas e Especiarias	3
1.2 Adulteração de plantas aromáticas e especiarias.....	8
2 Metodologias utilizadas na avaliação da autenticidade de plantas aromáticas e especiarias	11
2.1 Métodos físicos e químicos	12
2.2 Métodos baseados na análise de ADN <i>fingerprinting</i>	13
2.2.1 Fundamentos da PCR.....	15
2.2.2 RAPD.....	16
2.2.3 SCAR.....	18
2.2.4 SSR	18
2.2.5 ISSR	19
2.2.6 AFLP	20
2.2.7 PCR em tempo real.....	21
2.2.8 PCR sequenciação	26
2.2.9 <i>Barcoding</i>	27
3 <i>Crocus sativus</i> L.	29
3.1 Descrição e propriedades	29
3.2 Aplicação das técnicas de biologia molecular na avaliação da autenticidade da espécie <i>Crocus sativus</i> L.....	31

4	Objetivos e âmbito do trabalho	36
	Componente experimental	37
5	Metodologia	39
5.1	Descrição e processamento das amostras	39
5.2	Reagentes e soluções	41
5.3	Extração de ADN	42
5.4	Avaliação ADN extraído	44
5.5	Amplificação por PCR	45
5.5.1	Oligonucleótidos	45
5.5.2	PCR qualitativa	45
5.5.3	PCR em tempo real e análise <i>High Resolution Melting</i> (HRM)	47
5.5.4	Sequenciação	49
6	Resultados e Discussão	51
6.1	Escolha do método de extração e avaliação da qualidade do ADN extraído	51
6.2	Amplificação por PCR qualitativa	55
6.2.1	Identificação de Açafraão (<i>Crocus sativus</i> L.)	55
6.2.1.1	<i>Locus</i> 18S rARN	55
6.2.1.2	<i>Loci</i> ITS1 e ITS2	58
6.2.1.3	<i>Locus matK</i>	64
6.2.1.4	SCAR <i>marker</i>	67
6.2.2	Identificação de Cártamo (<i>Carthamus tinctorius</i> L.)	70
6.2.2.1	Avaliação da especificidade – <i>Loci</i> ITS1 e ITS2	70
6.2.2.2	Deteção de Cártamo em amostras de Açafraão	71
6.3	Análise por PCR em tempo real	73
6.4	Sequenciação	78
7	Considerações finais	83
8	Referências Bibliográficas	85

Índice de Figuras

- Figura 1 - A:** Tendências de importação de especiarias, 2001-2011. **B:** Participação do mercado das principais regiões importadoras de especiarias em 2011 (% do valor de importação mundial correspondentes a 4.71 mil milhões de dólares) [2] 4
- Figura 2** – Representação esquemática da amplificação de um fragmento de ADN pela técnica de PCR. De um ponto de vista teórico, a quantidade de ADN alvo cresce exponencialmente ao longo dos ciclos, resultando em 34 bilhões de cópias idênticas ao fim de 35 ciclos. Adaptado de: [49]. ... 15
- Figura 3** – Representação esquemática das três etapas de amplificação por PCR (desnaturação, hibridação e extensão), que resulta na duplicação da quantidade de ADN alvo. Adaptado de [49]. 16
- Figura 4** - Representação esquemática da amplificação do ADN através de um único oligonucleótido de aproximadamente 10 bases (*primer*) pela técnica de RAPD e separação dos produtos por eletroforese em gel de agarose. Adaptado de:[44] 17
- Figura 5** - Representação esquemática das técnicas de SSR e ISSR. Em SSR são usados *primers* complementares a sequências que flanqueiam as regiões repetitivas a amplificar, enquanto em ISSR são utilizados *primers* nas regiões complementares às próprias regiões repetitivas a amplificar. Adaptado de: [51]. 19
- Figura 6** - Diagrama esquemático das etapas da técnica de AFLP. Adaptado de: [36]. 21
- Figura 7** - Esquema de PCR em tempo real realizado com sonda de hidrólise do tipo TaqMan. Adaptado de: [36]. 23
- Figura 8**- Curva de amplificação por real-time PCR. Adaptado de: [56]. 25
- Figura 9** - Representação esquemática da técnica de sequenciação. 26
- Figura 10** – Representação esquemática dos genes candidatos a *barcodes* pertencentes aos genomas nuclear, mitocondrial e ribossomal de plantas. Marcadores a vermelho não são utilizados como *barcodes* em plantas, marcadores a verde são potenciais *barcodes*, e marcadores a amarelo são *barcodes* atualmente em estudo. Figura extraída e referências citadas por Chen et al. [76]. . 29
- Figura 11** – *Crocus sativus* L.. Fonte: [83]. 29
- Figura 12** – Principais compostos biologicamente ativos do *Crocus sativus* L. Adaptado de: [82]. 30
- Figura 13** – Produtos de PCR a partir de marcadores SCAR. Em todos os géis: (-) controlo negativo; C.s., ADN de estigmas secos de *C. sativus*; **M** – marcador molecular. **A** – PCR realizada com o *primer* ScAm190 específico para *Arnica montana*: A.m., ADN a partir de pétalas secas de *A. montana*; 1%, 2%, 5%, ADN a partir de misturas de *C. sativus* e *A. montana*. **B** – PCR realizada com o *primer* ScBo267 específico para *Bixa orellana*: B.o., ADN a partir de sementes secas de *B. orellana*; 1%, 2%, 5%, ADN a partir de misturas de *C. sativus* e *B. orellana*. **C** – PCR realizada com o *primer* ScCo390 específico para *Calendula officinalis*: C.o., ADN a partir de pétalas secas de *C. officinalis*; 1%, 2%, 5%, ADN a partir de misturas de *C. sativus* e *C.officinalis*. **D** – PCR realizada com o *primer* ScCt131 específico para *Carthamus tinctorius*: C.t., ADN a partir de pétalas secas de *C. tinctorius*; 1%, 2%, 5%, ADN a partir de misturas de *C. sativus* e *C. tinctorius* **E** – PCR realizada com o *primer* ScCv304 específico para *Crocus vernus*: C.v., ADN a partir de estigmas secos de *C.vernus*; 1%, 2%, 5%, ADN a partir de misturas de *C. sativus* e *C. vernus* **F** – PCR realizada com o *primer* ScCl289 específico para *Curcuma longa*: C.l., ADN a partir de rizomas secos de *C. longa*; 1%, 2%, 5%, DNA a partir de misturas de *C. sativus* e *C.longa*. **G** – PCR realizada com o *primer* ScHsp354 específico para *Hemerocallis* sp.: H.sp., ADN a partir de pétalas secas de *Hemerocallis* sp.; 1%, 2%, 5%, ADN a partir de misturas de *C. sativus* e *Hemerocallis* sp. Fonte: [42]. 34
- Figura 14** – Produtos de PCR com marcadores SCAR de amostras comerciais de Açafrão (*C. sativus*) (linhas 1-17) e alimentos contendo Açafrão como ingrediente (linhas 18-24). **D** – PCR realizada com os *primers* ScCl289 específicos para *Curcuma longa*. **E** – PCR realizada com os *primers* ScHsp354 específicos para *Hemerocallis* sp. (-) Controlo negativo; C.l. - ADN de rizomas secos de *C. longa*; H.sp. – ADN de tépalas de *Hemerocallis* sp. Adaptado de: [107]. 34
- Figura 15** – Amplificação por PCR simples e multiplex com *primers* SC2 e ITS de amostras de

<i>Crocus sativus</i> e <i>Carthamus tinctorius</i> . M: marcador molecular; Linhas 1-3: Açafrão autêntico; 4-6: Cártamo; 7-9: Mistura de Açafrão e Cártamo. Adaptado de: [73].	35
Figura 16 – Amostras utilizadas na realização deste estudo.	39
Figura 17 - Eletroforese em gel de agarose de ADN genómico dos bolbos extraído a partir de três diferentes métodos. Linha 1 – <i>Crocus sativus</i> extraído pelo método DNeasy Plant; Linha 2 – <i>Crocus cartwrightianus</i> “Albus” extraído pelo método DNeasy Plant; Linha 3 – <i>C. sativus</i> . extraído pelo método CTAB; Linha 4 – <i>C. cartwrightianus</i> extraído pelo método CTAB; Linha 5 – <i>C. sativus</i> extraído pelo método NucleoSpin Food; Linha 6 – <i>C. cartwrightianus</i> extraído pelo método NucleoSpin. M – marcador molecular HyperLadder I (Bioline, Londres, Reino Unido). B – Branco de extração.	52
Figura 18 – Eletroforese em gel de agarose de ADN genómico extraído a partir das folhas. Linhas 1, 3, 5-8 – <i>Crocus sativus</i> ; Linha 2 – <i>Crocus olivieri balausae</i> ; Linha 4 – Açafrão selvagem; Linha 9 – <i>Crocus kosaninii</i> ; Linha 10 – <i>Crocus kotschyanus</i> ; Linha 11 – <i>Crocus speciosus</i> ; M – marcador molecular HyperLadder I (Bioline, Londres, Reino Unido); B – Branco de extração.	53
Figura 19 - Eletroforese em gel de agarose de ADN genómico extraído a partir dos estigmas e Açafrão em pó. Linha 1 a 10 – CR12 a CR21. Linha 11 – CR25. M – marcador molecular HyperLadder I (Bioline, Londres, Reino Unido). B – Branco de extração.	55
Figura 20 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos dos bolbos e dos estigmas com os <i>primers</i> 18SRG-F/18SRG-R. A) Linha 1 – <i>Crocus sativus</i> extraído pelo método DNeasy Plant; Linha 2 – <i>Crocus cartwrightianus</i> “Albus” extraído pelo método DNeasy Plant; Linha 3 – <i>C. sativus</i> extraído pelo método CTAB; Linha 4 – <i>C. cartwrightianus</i> extraído pelo método CTAB; Linha 5 – <i>C. sativus</i> extraído pelo método NucleoSpin; Linha 6 – <i>C. cartwrightianus</i> extraído pelo método NucleoSpin. B) Linha 1 – <i>C. tinctorius</i> extraído pelo método DNeasyPlant. Linha 2 – <i>C. tinctorius</i> extraído pelo método CTAB. Linha 3 – <i>C. tinctorius</i> extraído pelo método NucleoSpin. M – Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CN – Controlo negativo.	56
Figura 21 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos das folhas com os <i>primers</i> 18SRG-F/18SRG-R. Linhas 1 a 11 – CR01 a CR11; Linhas 12 a 14 – CR22 a CR24. M – Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CN – Controlo negativo.	56
Figura 22 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos dos estigmas e do Açafrão em pó com os <i>primers</i> 18SRG-F/18SRG-R. Linhas 1 a 10 – CR12 a CR21. Linha 11 – CR25. M – Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CN – Controlo negativo.	57
Figura 23 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação das amostras para estudo da reatividade cruzada com os <i>primers</i> 18SRG-F/18SRG-R. Linha 1 – CR01; Linha 2 – CT; Linha 3 a 6 – CR08 a CR11; Linha 7 – Cebola; Linha 8 – Alho; Linha 9 – Salsa; Linha 10 – Pimenta branca; Linha 11 – Louro; Linha 12 – Pimentão doce; Linha 13 – Piri-piri; Linha 14 – Erva príncipe; Linha 15 – Funcho; Linha 16 – Dente-de-leão; Linha 17 – Cavalinha; Linha 18 – Cidreira; Linha 19 – Camomila; Linha 20 – Chá verde; Linha 21 – Salvia; Linha 22 – Hortelã-pimenta; Linha 23 – <i>Hipericum androsaeum</i> ; Linha 24 – <i>Hipericum perforatum</i> . M – Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CN – Controlo negativo.	57
Figura 24 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação das amostras para estudo da reatividade cruzada com os <i>primers</i> ITS-CS-F/ITS-CS-R1. Linha 1 – CR01; Linha 2 – CR08; Linha 3 – CR09; Linha 4 – CR10; 5 – CR11; Linha 6 – CT; Linha 7 – Cebola; Linha 8 – Alho; Linha 9 – Salsa; Linha 10 – Pimenta branca; Linha 11 – Louro; Linha 12 – Pimentão-doce; Linha 13 – Piri-piri; Linha 14 – Erva príncipe; Linha 15 – Funcho; Linha 16 – Dente-de-leão; Linha 17 – Cavalinha; Linha 18 – Cidreira; Linha 19 – Camomila; Linha 20 – Chá verde; Linha 21 – Salvia; Linha 22 – Hortelã-pimenta; Linha 23 – <i>Hipericum androsaeum</i> ; Linha 24 – <i>Hipericum perforatum</i> . M – Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CN – Controlo negativo.	58
Figura 25 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos dos bolbos com os <i>primers</i> ITS-CS-F/ITS-CS-R1. Linha 1 – <i>Crocus sativus</i> extraído pelo método DNeasy Plant; Linha 2 – <i>Crocus cartwrightianus</i> “Albus” extraído pelo método	

DNeasy Plant; Linha 3 – *C. sativus* extraído pelo método CTAB; Linha 4 – *C. cartwrightianus* extraído pelo método CTAB; Linha 5 – *C. sativus* extraído pelo método NucleoSpin; Linha 6 – *C. cartwrightianus* extraído pelo método NucleoSpin. M – marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CN – Controlo negativo..... 59

Figura 26 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos das folhas de *Crocus* com os *primers* ITS-CS-F/ITS-CS-R1. **A)** Linhas 1 a 11: CR01 a CR11. **B)** Linhas 1 a 3: CR22 a CR24. M – Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CN – Controlo negativo. 60

Figura 27 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos dos estigmas e do Açafraão em pó com os *primers* ITS-CS-F/ITS-CS-R1. Linhas 1 a 10: CR12 a CR21; Linha 11: CR25; Linha 12: CT. M – Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CN – Controlo negativo..... 60

Figura 28 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos dos bolbos com os *primers* ITS-CS-F/ITS-CS-R1. Linhas 1 a 5 - 50 ng/μL; 5 ng/μL; 0,5 ng/μL; 0,05 ng/μL; 0,005 ng/μL de *Crocus sativus*. Linhas 6 a 10 - 50 ng/μL; 5 ng/μL; 0,5 ng/μL; 0,05 ng/μL; 0,005 ng/μL de *Crocus cartwrightianus* “Albus”. M – Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CN – Controlo negativo. 61

Figura 29 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação das amostras para estudo da reatividade cruzada com os *primers* ITS-CS-F/ITS-CS-R2. Linha 1 – CR01; Linha 2 – CT; Linha 3 – CR08; Linha 4 – CR09; Linha 5 – CR10; 6 – CR11; Linha 7 – Cebola; Linha 8 – Alho; Linha 9 – Salsa; Linha 10 – Pimenta branca; Linha 11 – Louro; Linha 12 – Pimentão-doce; Linha 13 – Piri-piri; Linha 14 – Erva príncipe; Linha 15 – Funcho; Linha 16 – Dente-de-leão; Linha 17 – Cavalinha; Linha 18 – Cidreira; Linha 19 – Camomila; Linha 20 – Chá verde; Linha 21 – Salvia; Linha 22 – Hortelã-pimenta; Linha 23 – *Hipericum androsaemum*; Linha 24 – *Hipericum perforatum*. M – Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CN – Controlo negativo. 62

Figura 30 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos dos bolbos com os *primers* ITS-CS-F/ITS-CS-R2. Linha 1 – *Crocus sativus* extraído pelo método DNeasy Plant; Linha 2 – *Crocus cartwrightianus* “Albus” extraído pelo método DNeasy Plant; Linha 3 – *C. sativus* extraído pelo método CTAB; Linha 4 – *C. cartwrightianus* extraído pelo método CTAB; Linha 5 – *C. sativus* extraído pelo método NucleoSpin; Linha 6 – *C. cartwrightianus* extraído pelo método NucleoSpin. M – marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CN – Controlo negativo..... 63

Figura 31 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos das folhas com os *primers* ITS-CS-F/ITS-CS-R2. Linhas 1 a 11: CR01 a CR11; Linhas 12 a 14: CR22 a CR24. M – marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CN – Controlo negativo. 63

Figura 32 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos dos estigmas e do Açafraão em pó com os *primers* ITS-CS-F/ITS-CS-R2. Linhas 1: CT; Linhas 2 a 11: CR12 a CR21; Linha 12: CR25. M – Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CN – Controlo negativo..... 64

Figura 33 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação das amostras para estudo da reatividade cruzada com os *primers* MKCS-F/MKCS-R. Linha 1 – CR01; Linha 2 – CT; Linha 3 – CR08; Linha 4 – CR09; Linha 5 – CR10; 6 – CR11; Linha 7 – Cebola; Linha 8 – Alho; Linha 9 – Salsa; Linha 10 – Pimenta branca; Linha 11 – Louro; Linha 12 – Pimentão-doce; Linha 13 – Piri-piri; Linha 14 – Erva príncipe; Linha 15 – Funcho; Linha 16 – Dente-de-leão; Linha 17 – Cavalinha; Linha 18 – Cidreira; Linha 19 – Camomila; Linha 20 – Chá verde; Linha 21 – Salvia; Linha 22 – Hortelã-pimenta; Linha 23 – *Hipericum androsaemum*; Linha 24 – *Hipericum perforatum*. M – Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CN – Controlo negativo. 65

Figura 34 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos das folhas e bolbos com os *primers* MKCS-F/MKCS-R. **A)** Linhas 1 a 11: CR01 a CR11; Linha 12 – *Crocus sativus* extraído pelo método NucleoSpin; Linha 13 – *Crocus cartwrightianus* “Albus” extraído pelo método NucleoSpin. M – marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CN – Controlo negativo. **B)** Linhas 1 a 3: CR22 a CR24. M – marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CN –

Controlo negativo	66
Figura 35 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos dos estigmas e Açafrão em pó com os <i>primers</i> MKCS-F/MKCS-R. Linhas 1 a 10: CR12 a CR21; Linha 11: CR25; Linha 12: CT. M – Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CN – Controlo negativo.....	66
Figura 36 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação das amostras para estudo da reatividade cruzada com os <i>primers</i> CS-F/CS-R. Linha 1 – CR01; Linha 2 – CT; Linha 3 – CR08; Linha 4 – CR09; Linha 5 – CR10; 6 – CR11; Linha 7 – Cebola; Linha 8 – Alho; Linha 9 – Salsa; Linha 10 – Pimenta branca; Linha 11 – Louro; Linha 12 – Pimentão-doce; Linha 13 – Piri-piri; Linha 14 – Erva príncipe; Linha 15 – Funcho; Linha 16 – Dente-de-leão; Linha 17 – Cavalinha; Linha 18 – Cidreira; Linha 19 – Camomila; Linha 20 – Chá verde; Linha 21 – Salvia; Linha 22 – Hortelã-pimenta; Linha 23 – <i>Hipericum androsaeum</i> ; Linha 24 – <i>Hipericum perforatum</i> . M – Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CN – Controlo negativo.	67
Figura 37 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos dos bolbos com os <i>primers</i> CS-F/CS-R. Linha 1 – <i>Crocus sativus</i> extraído pelo método DNeasy Plant; Linha 2 – <i>Crocus cartwrightianus</i> “Albus” extraído pelo método DNeasy Plant; Linha 3 – <i>C. sativus</i> extraído pelo método CTAB; Linha 4 – <i>C. cartwrightianus</i> extraído pelo método CTAB; Linha 5 – <i>C. sativus</i> extraído pelo método NucleoSpin; Linha 6 – <i>C. cartwrightianus</i> extraído pelo método NucleoSpin. M – marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CN – Controlo negativo.	68
Figura 38 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos das folhas com os <i>primers</i> CS-F/CS-R. A) Linhas 1 a 11: CR01 a CR11. B) Linhas 1 a 3: CR22 a CR24. M – marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CN – Controlo negativo.....	68
Figura 39 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos dos estigmas e Açafrão em pó com os <i>primers</i> CS-F/CS-R. Linha 1: CT; Linhas 2 a 11: CR12 a CR21; Linha 12: CR25. M – Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CN – Controlo negativo.	69
Figura 40 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação das amostras para estudo da reatividade cruzada com os <i>primers</i> ITS-CT-F/ITS-CT-R1. Linha 1 – CT; Linha 2 – CR01; Linha 3 – CR08; Linha 4 – CR09; Linha 5 – CR10; 6 – CR11; Linha 7 – Cebola; Linha 8 – Alho; Linha 9 – Salsa; Linha 10 – Pimenta branca; Linha 11 – Louro; Linha 12 – Pimentão-doce; Linha 13 – Piri-piri; Linha 14 – Erva príncipe; Linha 15 – Funcho; Linha 16 – Dente-de-leão; Linha 17 – Cavalinha; Linha 18 – Cidreira; Linha 19 – Camomila; Linha 20 – Chá verde; Linha 21 – Salvia; Linha 22 – Hortelã-pimenta; Linha 23 – <i>Hipericum androsaeum</i> ; Linha 24 – <i>Hipericum perforatum</i> . M – Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CN – Controlo negativo.	70
Figura 41 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação das amostras para estudo da reatividade cruzada com os <i>primers</i> ITS-CT-F/ITS-CT-R2. Linha 1 – CR01; Linha 2 – CT; Linha 3 – CR08; Linha 4 – CR09; Linha 5 – CR10; 6 – CR11; Linha 7 – Cebola; Linha 8 – Alho; Linha 9 – Salsa; Linha 10 – Pimenta branca; Linha 11 – Louro; Linha 12 – Pimentão-doce; Linha 13 – Piri-piri; Linha 14 – Erva príncipe; Linha 15 – Funcho; Linha 16 – Dente-de-leão; Linha 17 – Cavalinha; Linha 18 – Cidreira; Linha 19 – Camomila; Linha 20 – Chá verde; Linha 21 – Salvia; Linha 22 – Hortelã-pimenta; Linha 23 – <i>Hipericum androsaeum</i> ; Linha 24 – <i>Hipericum perforatum</i> . M – Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CN – Controlo negativo.	71
Figura 42 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos dos estigmas, do Açafrão em pó e das misturas de Açafrão com 10% de Cártamo usando os <i>primers</i> ITS-CT-F/ITS-CT-R1. Linha 1: CT (Controlo positivo); Linhas 2 a 11: CR12 a CR21; Linha 12: CR25. M – Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CN – Controlo negativo.	72
Figura 43 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos dos estigmas, do Açafrão em pó e das misturas de Açafrão com 10% de Cártamo usando os <i>primers</i> ITS-CT-F/ITS-CT-R2. Linha 1: CT (Controlo positivo); Linhas 2 a 11: CR12 a CR21; Linha 12: CR25. M – Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen,	67

Alemanha). CN – Controlo negativo.	72
Figura 44 – Amplificação das amostras das folhas de <i>Crocus sativus</i> por PCR em tempo real com o corante EvaGreen e com os <i>primers</i> ITS-CS-F/ITS-CS-R1, e respetiva análise por HRM. A – Curvas de amplificação; B – Curvas de desnaturação; C – Curvas de desnaturação normalizadas; D – Curvas de diferença por análise HRM. (Cor vermelha – Amostras CR01, CR03, CR04, CR05, CR06, CR07, CR08; Cor verde – Amostras CR08, CR09, CR10, CR11).....	75
Figura 45 – Amplificação das amostras dos bolbos por PCR em tempo real com corante EvaGreen e com os <i>primers</i> ITS-CS-F/ITS-CS-R1, e respetiva análise por HRM. A – Curvas de amplificação; B – Curvas de desnaturação; C – Curvas de desnaturação normalizada; D – Curvas de diferença por análise HRM. (Cor vermelha – Amostra CS; Cor amarela – Amostra CA).....	76
Figura 46 – Amplificação das amostras de Açafrão em estigmas e em pó por PCR em tempo real com corante EvaGreen e com os <i>primers</i> ITS-CS-F/ITS-CS-R1 e ITS-CT-F/ITS-CT-R1, e respetiva análise por HRM. A – Curvas de amplificação; B – Curvas de desnaturação; C – Curvas de desnaturação normalizada; D – Curvas de diferença por análise HRM. (Cor vermelha – Amostras CR12, CR13, CR14, CR15, CR16, CR17, CR18, CR19, CR20, CR21, CR25 amplificadas com os <i>primers</i> ITS-CS-F/ITS-CS-R1; Cor azul – Amostras CT, CR19, CR20 amplificadas com os <i>primers</i> ITS-CT-F/ITS-CT-R1).....	77

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Parâmetros de qualidade previstos por algumas organizações para plantas aromáticas e especiarias. Adaptado de:[37].	9
Tabela 2 – Comparação do nível de competência técnica e custos necessários para vários métodos de autenticação. Adaptado de: [43].	14
Tabela 3 – Farmacologia e aplicações medicinais de <i>Crocus sativus</i> L.	31
Tabela 4 – Adulterações mais comuns em <i>Crocus sativus</i> L. Adaptado de: [108].	33
Tabela 5 – Descrição das amostras utilizadas com as respectivas origens.	40
Tabela 6 – Oligonucleótidos utilizados para a PCR qualitativa.	46
Tabela 7 – Componentes e respectivas quantidades utilizados nas ampliações por PCR qualitativa com diferentes <i>primers</i> .	46
Tabela 8 – Condições utilizadas nas ampliações por PCR qualitativa com diferentes <i>primers</i> .	47
Tabela 9 – Componentes e respectivas quantidades utilizados nas ampliações por PCR em tempo real com diferentes <i>primers</i> .	48
Tabela 10 – Condições utilizadas nas ampliações por PCR em tempo real e na análise por HRM com diferentes <i>primers</i> .	48
Tabela 11 - Valores das concentrações e purezas do ADN extraído dos bolbos para cada tipo de extração.	51
Tabela 12 – Valores das concentrações e purezas do ADN extraído das folhas de <i>Crocus</i> spp. a partir do método CTAB.	52
Tabela 13 – Valores das concentrações e purezas do ADN extraído das flores de <i>Carthamus tinctorius</i> para cada tipo de extração.	53
Tabela 14 – Valores das concentrações e purezas do ADN extraído dos estigmas e do Açafrão em pó pelo método DNeasy Plant.	54
Tabela 15 – Alinhamento das sequências obtidas após sequenciação com os <i>primers</i> ITS-CT-F/ITS-CT-R1 para a amostra CT (<i>Carthamus tinctorius</i>).	79
Tabela 16 – Alinhamento das sequências obtidas após sequenciação com os <i>primers</i> ITS-CS-F/ITS-CS-R1 para as amostras CR14, CR15 (estigmas de <i>Crocus sativus</i> L.) e CR25 (Açafrão em pó).	79
Tabela 17 – Alinhamento das sequências obtidas após sequenciação com os <i>primers</i> ITS-CS-F/ITS-CS-R1 para as amostras CR01, CR03 a CR07, CR22 a CR24 (folhas de <i>Crocus sativus</i> L.), CS (bolbos de <i>Crocus sativus</i> L.), CR02 (<i>Crocus olivieri balausae</i>), CR08 (<i>Crocus kosaninii</i>), CR09 (<i>Crocus kotschyanus</i>), CR10 (<i>Crocus speciosus</i>) e CA (bolbos de <i>Crocus cartwrightianus</i> “Albus”).	81
Tabela 18 - Legenda da informação de sequenciação.	82

Lista de Abreviaturas

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphisms</i>
AFNOR	<i>Association Française de Normalisation</i>
ARN	Ácido Ribonucleico
ASTA	<i>American Spice Trade Association</i>
BOLD	<i>Barcode of life database</i>
BSI	<i>British Standard Institution</i>
CBoL	<i>Consortium for the Barcode of Life</i>
CoxI	Citocromo c oxidase Subunidade I
Ct	<i>Cycle Threshold</i>
dNTP	Desoxirribonucleótido trifosfato
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
ESA	<i>European Spice Association</i>
ESI-MS	<i>Electrospray Ionisation Mass Spectrometry</i> (Ionização por Eletrospray com Espetrometria de massa)
FRET	<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>
GC	<i>Gas Chromatography</i> (Cromatografia Gasosa)
GC-MS	<i>Gas Chromatography Mass Spectroscopy</i> (Cromatografia Gasosa em Espetrometria de massa)
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
HRM	<i>High Resolution Melting analysis</i> (Análise de desnaturação de elevada resolução)
IBOL	<i>International Barcode of Life Project</i>
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
ISSR	<i>Inter Simple Sequence Repeats</i>
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
LC-MS	<i>Liquid Chromatography Mass Spectroscopy</i> (Cromatografia Líquida com Espetrometria de massa)
LC-NMR	<i>Liquid Chromatography Nuclear Magnetic Resonance</i> (Cromatografia Líquida com Ressonância Magnética Nuclear)
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> (Ressonância Magnética Nuclear)
ORF	<i>Open-reading Frames</i>
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
PDA	<i>Pulse Height Distribution Analysis</i> (Analisador de Altura de Pulso)
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
SCAR	<i>Sequence Characterized Amplified Regions</i>

SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SSR	<i>Simple Sequence Repeat</i>
TLC	<i>Thin Layer Chromatography</i> (Cromatografia em Camada Fina)
T_m	Temperatura de desnaturação
UV	Ultra-violeta

Componente Teórica

1 Introdução

1.1 Plantas Aromáticas e Especiarias

Atualmente, são usados variadíssimos tipos de ervas em todo o mundo. A palavra “erva” provém do Latim “*herba*”, que significa planta medicinal. No sentido estrito, a palavra herbácea refere-se a uma planta que murcha após florescer, sem as hastes se tornarem lenhosas. As herbáceas são largamente usadas como corantes, para jardinagem, medicina e alimentos. Na Europa, por exemplo, são desde há muito tempo utilizadas para fins medicinais. Algumas herbáceas comestíveis pertencem à categoria de especiarias e, mesmo algumas contendo componentes tóxicos podem ser classificadas como especiarias se o elemento venenoso puder, de alguma forma, ser neutralizado com aquecimento ou outro tipo de processamento [1]. Outra categoria pertencente às herbáceas comestíveis é o grupo das plantas aromáticas.

Uma herbácea é botanicamente classificada como planta perene, mas o significado de especiaria ou de erva aromática vem do seu uso na culinária e de características aromáticas, respetivamente e não de uma classificação botânica. Uma especiaria deve por conseguinte ser comestível. O termo especiaria pode ser definido como um composto com um sabor acre ou atividade de coloração, que aumenta o apetite ou intensifica a digestão. Uma especiaria pode ser obtida a partir de sementes, frutos, folhas, cascas, raízes de plantas que crescem principalmente em zonas tropicais, subtropicais e temperadas [1]. Uma planta aromática tem a capacidade de produzir substâncias aromáticas, atribuídas à presença de compostos voláteis conhecidos como óleos essenciais, por exemplo compostos orgânicos, podendo ser utilizada na culinária, perfumaria, medicamentos, na indústria farmacêutica e cosmética.

Atualmente, o mercado de especiarias e plantas aromáticas está em crescente aumento. Em 2012, a produção mundial de especiarias ascendeu aos 6,75 milhões de toneladas, sendo este número estimado com base nos dados da FAOSTAT correspondentes a pimenta, malagueta, cártamo e outras especiarias [2]. Em termos económicos, estimou-se que em 2011 o comércio de especiarias rondou os 4,71 mil milhões de dólares (3,46 mil milhões de euros), com uma respetiva exportação global de 1,29 milhões de toneladas, o que mostra uma tendência ascendente constante [3]. Os principais mercados importadores de especiarias são os Estados Unidos da América, a União Europeia, o Japão, a Arábia Saudita, Singapura e a Malásia (Figura 1). Enquanto os principais países fornecedores são a China, Índia, Madagáscar, Indonésia, Vietnam, Brasil, Espanha, Guatemala e Sri Lanka. Além da competição no mercado internacional, os produtores e exportadores têm de enfrentar inúmeros desafios, incluindo as

pertinentes questões de qualidade. As exportações de especiarias estão sujeitas ao cumprimento de padrões rigorosos de qualidade para a segurança alimentar, estabelecidos pela ASTA (*American Spice Trade Association*) e pela ESA (*European Spice Association*). A demanda por produtos processados, de elevada qualidade, que proporcionem benefícios principalmente na saúde, e ao mesmo tempo que sejam saborosos e agradáveis ao paladar está a crescer, oferecendo assim novas oportunidades de negócios no comércio de especiarias [4].

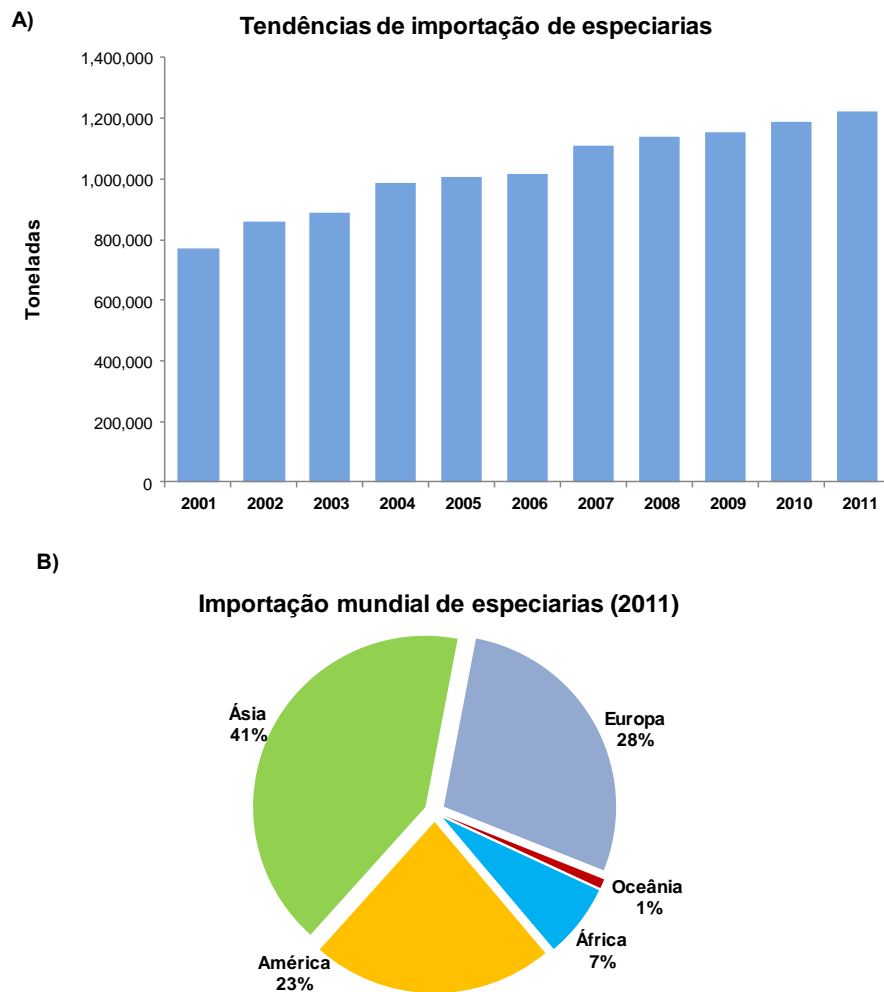


Figura 1 - A: Tendências de importação de especiarias, 2001-2011. **B:** Participação do mercado das principais regiões importadoras de especiarias em 2011 (% do valor de importação mundial correspondentes a 4.71 mil milhões de dólares) [2] .

De entre as espécies mais consumidas destacam-se as da família Lamiaceae, como *Origanum vulgare* e *Ocimum basilicum*, ou ainda as diferentes plantas designadas erradamente por “Açafrão” como *Curcuma longa* e *Carthamus tinctorius* e o próprio Açafrão autêntico, *Crocus sativus*. As especiarias *Piper nigrum* e *Capsicum annuum* também são largamente comercializadas e são parte integrante da cozinha

mediterrânica, tal como as espécies acima mencionadas.

O género *Origanum*, pertencente à família Lamiaceae, inclui mais de 40 espécies largamente distribuídas pela região Mediterrânica e Ásia central [5, 6]. A espécie comercialmente conhecida como orégão mediterrânico e frequentemente usada para fins culinários é *Origanum vulgare hirtum* [7]. Esta planta aromática é comercializada mundialmente, tendo uma grande importância económica devido ao seu uso como acompanhamento de variados tipos de cozinhados, mas também como óleo essencial [8]. É normalmente considerada a “erva da pizza”, no entanto, há que destacar também as suas propriedades medicinais, razão pela qual o orégão tem sido tão usado na medicina tradicional há vários séculos [5, 9]. Por exemplo, os seus óleos essenciais apresentam propriedades antimicrobianas, antifúngicas, antioxidantes e inseticidas [5, 8]. Pode também ser usado para tratar exaustão, distúrbios nervosos, infeções do trato respiratório e tensão, problemas de estômago, pressão arterial baixa, irritações da pele, asma, dores de dentes e de cabeça. Tem ainda efeitos benéficos nos sistemas cardiovascular e nervoso, na indução de apoptose, na modulação de açúcares e de lípidos no sangue e possui atividade antimalárica [5, 9-12].

Devido às suas propriedades benéficas quer para a saúde, quer para a qualidade dos alimentos, o orégão é largamente comercializado em todo o mundo, tendo o seu consumo vindo a crescer a uma taxa de 8,5% e sendo considerada das plantas aromáticas mais vendidas. Só nos Estados Unidos da América em 2002 representou aproximadamente 7,5 mil toneladas e 15 milhões de dólares em importações, enquanto a sua produção mundial excedeu as 10 mil toneladas [13].

Ocimum basilicum L., conhecido como basilíco ou manjeriço, é uma planta anual aromática pertencente à família Lamiaceae [14]. As espécies pertencentes a este género têm sido usadas desde há pelo menos 3000 anos na culinária e como plantas medicinais. Atualmente, o manjeriço é utilizado como tempero para produtos à base de tomate e salsa, na preparação do molho pesto, sendo também usado como planta medicinal e na produção de óleos essenciais [12, 15, 16]. Possui propriedades antioxidantes e atividade biológica contra insetos, fungos, nemátodes e microrganismos, tendo efeitos de anestésico local e antissético [14, 16, 17]. É usado para tratar dores de cabeça, tosse, diarreia, constipações, verrugas, mau funcionamento dos rins e pode ser aplicado na pele para tratamento de acne [18, 19]. Os extratos de óleos essenciais são também usados para fragrâncias, produtos de cosmética, higiene oral e dentária [18]. De acordo com estudos recentes, o óleo essencial de basilíco apresenta um grande potencial para ser usado como repressor do stress e como componente de fármacos destinados ao tratamento da leucemia [17]. Pode também ter efeitos benéficos na diabetes através da inibição da atividade das enzimas α -glucosidase e α -amilase [20].

Capsicum annum L., pertencente à família Solanaceae, é a planta usada para a produção do chili, que é um tempero culinário extensivamente utilizado devido à sua cor e pungência e que é proveniente de frutos maduros/secos desta planta [21]. Para além do seu uso típico como especiaria é também muito apreciado pelas suas propriedades medicinais [22]. No ano de 2012, a produção mundial de chili ascendeu às 3,35 milhões de toneladas, sendo a Índia o maior produtor desta especiaria, seguido pela China e pelo Peru. Estes três países asseguraram cerca de 53% da produção mundial de chili no mesmo ano. As importações totais mundiais atingiram as 546 mil toneladas correspondendo a 1,3 mil milhões de dólares, das quais 260 mil toneladas foram exportadas pela Índia e 98 mil toneladas pela China [2]. O chili é exportado em frutos inteiros secos, picado, em pó e outros produtos de valor acrescentado como chili fermentado, pasta de chili ou oleorresina, tendo a sua procura aumentado nos últimos anos. O chili em pó é a especiaria mais importante exportada a partir da Índia, sendo cerca de 20-30% utilizado para preparações em pó com uma exportação de 22 mil toneladas por ano [21, 22].

A capsaicina, um dos principais componentes do chili, está a tornar-se a nível mundial no principal fármaco baseado em plantas devido aos seus benefícios como analgésico e nutracêutico e pelas suas propriedades antioxidantes. É sabido que esta planta possui inúmeras propriedades benéficas, sendo vastamente utilizada no tratamento de dores de garganta, tosse, asma, artrite, indigestão ácida e dores de ouvido. Além destas propriedades, a capsaicina promove uma melhor visão, acelera o parto, reduz coágulos sanguíneos, trata graves dores de cabeça, feridas infetadas e derrames, aumenta a circulação sanguínea e alivia dores reumáticas. A ingestão de capsaicina estimula a produção de endorfinas, que dão uma sensação de prazer [12, 22].

Piper nigrum L., ou pimenta preta, pertencente à família Piperaceae, tem uma posição importante entre as especiarias e é muitas vezes referida como “The King of Spices” ou “Ouro Preto”. De um modo geral, a pimenta é o tempero mais utilizado na culinária, mas também é muito conhecido pela sua grande variedade de propriedades medicinais [23]. O maior produtor mundial é a China, mais especificamente as ilhas Hainan, responsáveis por mais de 80% da produção anual de pimenta preta, sendo que o comércio anual desta especiaria ronda os 494 milhões de dólares [22, 24]. A pimenta preta é comercializada em frutos secos inteiros ou produtos de valor acrescentado como a pimenta branca, pimenta preta em pó, pimenta verde desidratada, óleo de pimenta ou oleorresina. A pimenta em pó é a forma mais comum à disposição do consumidor e o facto do seu processo produtivo ser amigo do ambiente, aumenta a sua demanda no mercado mundial. A exportação média anual é de aproximadamente 32,4 mil toneladas

no valor de 99,5 milhões de dólares, ou seja, cerca de 12% do total das exportações globais totais de pimenta [22].

Estudos farmacológicos e clínicos revelaram que a piperina, um composto da pimenta preta, tem atividade antipirética, analgésica, anti-inflamatória, antioxidante e hepatoprotetora. As alcanidas, por outro lado, são particularmente relevantes devido às suas diferentes propriedades biológicas, tais como inseticidas, antibacterianas, anti-inflamatórias e antioxidantes [25, 26]. Os frutos de *Piper nigrum* são anti-helmínticos, antiasmáticos e são utilizados para tratar a dor, insónias e epilepsia [25]. Para além disso, a pimenta preta favorece a digestão, melhora o apetite, trata a tosse, dispneia, dores de garganta, febre, cólicas, disenteria e infeções por larvas. Tem um efeito protetor nas principais enzimas do fígado e não tem efeitos mutagénicos nem carcinogénicos [26].

Em termos botânicos, *Curcuma longa* L. (sin. *Curcuma domestica*), conhecida por Açafrão da Índia ou curcuma, está classificada como pertencente à família das Zingiberaceae, sendo nativa da Índia e Ásia Meridional [27]. Os seus rizomas são comercializados mundialmente para produzir o conhecido açafrão em pó, bastante utilizado na culinária [22]. A Índia destaca-se como o principal produtor e exportador de curcuma com uma produção anual que ronda 716,84 mil toneladas, exportando aproximadamente 46,5 mil toneladas avaliadas em 383 milhões de dólares. Cerca 61% da curcuma indiana exportada é comercializada como açafrão em pó [22].

Os óleos de curcuma possuem propriedades biológicas antifúngicas, antioxidantes, anti-inflamatórias, antiespasmódicas, antiplaquetárias, anticoagulantes, antifibróticas, antivirais e anticancerígenas. Na medicina tradicional, esta especiaria é usada para tratar variadas doenças, incluindo distúrbios biliares, flatulência, anorexia, tosse, disfunções hepáticas, reumatismo, sinusite, diabetes, dores de estômago, disenteria, úlceras, icterícias, artrite, entorses, feridas, acne e infeções oculares. Funciona como antídoto para certos venenos e como repelente de insetos [22, 28-31]. A curcuma pode também ser usada como fluidificante do sangue, na redução dos níveis de colesterol e o seu principal componente, a curcumina, revelou ter efeitos benéficos na doença de Alzheimer [27, 32].

Botanicamente classificado como *Carthamus tinctorius* L., o cártamo ou açafrão-bastardo como é vulgarmente conhecido, é por vezes confundido com o Açafrão autêntico. Esta planta pertence à família das Asteraceae e é originária do Irão, Noroeste da Índia e África [27]. As flores de cártamo e o óleo das suas sementes são largamente utilizados para os mais diversos fins. As flores, em particular, são usadas para a extração de corantes importantes na culinária mas também na tinturaria, pintura e cosmética. Por outro lado, as suas sementes, muito apreciadas pelos pássaros, originam um óleo alimentar de elevado valor dietético. São também usadas como exsiccantes em tintas e

vernizes para pintura e cosmética, devido às suas propriedades emolientes e regeneradoras do tecido cutâneo. Tanto as flores, como os óleos e sementes têm importantes propriedades medicinais [27, 33]. Como exemplo destas propriedades salientam-se: a prevenção de abortos e infertilidade; ação anti-inflamatória; tratamento de problemas menstruais, doenças cardiovasculares, vasculares cerebrais e coronárias, ferimentos, pressão sanguínea elevada, diabetes, etc. Os chás de cártamo têm sido muito utilizados, principalmente, pelos seus efeitos conhecidos no fortalecimento do corpo e efeitos terapêuticos, nomeadamente melhorias na hipertensão, anginas, artrite, problemas de articulações, constipações e na redução dos níveis de colesterol [33-35]. O óleo de cártamo, rico em ácido linoléico conjugado, tem ação reconhecida na redução da gordura corporal e aumento da tonicidade muscular, pelo que tem particular interesse comercial a nível alimentar também como suplemento [27].

1.2 Adulteração de plantas aromáticas e especiarias

A adulteração em especiarias e plantas aromáticas é, infelizmente, uma prática comum que tem vindo a aumentar a par do aumento do comércio, afetando diretamente o consumidor e indiretamente o próprio desenvolvimento económico. Como tal, esta tendência não pode ser negligenciada no âmbito das correntes de abastecimento global que enfatizam constantemente a diferença entre produtores, fornecedores e consumidores [1]. A deteção de adulterantes torna-se assim importante para avaliar a qualidade do produto, verificar a concorrência desleal e garantir a proteção do consumidor contra práticas fraudulentas. Os consumidores exigem informações claras e precisas para tomar decisões sobre a própria dieta, sendo essenciais para escolher um produto em detrimento de outro. A escolha do consumidor pode também refletir estilos de vida, preocupações religiosas (por exemplo, o vegetarianismo, a preferência por produtos orgânicos, a ausência de carne de porco para Judeus ou Muçulmanos e carne de vaca para Hindus) ou de saúde, uma vez que o consumo de produtos que contenham constituintes/ingredientes não declarados pode causar intoxicação ou reações alérgicas em indivíduos sensibilizados. No caso em que o produto sofreu processamento removendo a capacidade de distinguir os ingredientes, uma informação correta e fiável torna-se essencial [22, 36].

As especiarias são geralmente compostos de material vegetal seco ou processado e, tal como as plantas aromáticas, são dotadas de um sabor ou aroma específico, devido à presença de óleos essenciais, cuja abundância e perfil químico são reputados como principal marcador de qualidade (Tabela 1). No entanto, a adição de

plantas não-aromáticas ou drogas vegetais com um aroma muito semelhante pode ser difícil de detetar se cuidadosa e devidamente executada. A adição de matéria estranha que não é reconhecida à primeira vista ou de diferentes plantas de menor valor comercial, mas com perfil aromático semelhante e pertencente à mesma família botânica, são formas muito comuns de adulteração.

Tabela 1 - Parâmetros de qualidade previstos por algumas organizações para plantas aromáticas e especiarias. Adaptado de: [37].

Produto	Umidade	Cinzas	Cinzas de ácidos insolúveis	Óleos voláteis
Anis	12 (ISO)	9 (ISO)	2,5 (AFNOR)	1 (ISO)
Basilico (BSI)	12	16	3,5	0,5
Louro (ISO)	8	7	2	1
Cardamomo (ESA)	12	9	2,5	4
Cássia (ESA)	14	7	2	1
Sementes de aipo (ISO)	11	12	3	1,5
Chili (ISO)	11	10	1,6	-
Canela (ESA)	14	7	2	0,4
Cravo-da-Índia	12 (ISO)	7 (ISO)	0,5 (ISO)	14 (AFNOR)
Coentros	12 (ISO)	7 (ISO)	1,5 (ISO)	0,3 (ESA)
Cominhos (ESA)	13	14	3	0,5
Sementes de endro (ESA)	12	10	2,5	1
Alcaravia (ISO)	13	8	1,5	2,5
Sementes de funcho (ISO)	12	9	2	1,5
Fenacho (ISO)	12	7	2	-
Pó de alho	7 (ESA)	6 (ESA)	0,5 (ISO)	-
Gengibre	12 (ISO)	8 (ISO)	2 (ESA)	1,5 (ISO)
Clava	10	4	0,5	5
Majorana (ISO)	12	10	2	1
Menta (ISO)	13	12	2,5	0,5
Mostarda (BSI)	10	6,5	1	-
Noz-moscada	12 (ESA)	3 (ISO)	0,5 (ISO)	6,5 (ESA)
Orégãos (BSI)	12	10	2,5	1,5 (ESA)
Pimenta preta	12 (ESA)	7 (ISO)	1,5 (ESA)	2 (ISO)
Rosemarinho	10 (ISO)	8 (ESA)	1 (ESA)	1 (ISO)
Açafrão (ISO)	12	8	1	-
Sálvia (ISO)	12	12	2	1,5
Estragão (ESA)	8	12	1,5	0,5
Tomilho	12	14 (ISO)	12 (ISO)	1 (ISO)
Curcuma (BSI)	12	8	2	2,5

Assim, as plantas aromáticas e as especiarias mais adulteradas são as que possuem elevado valor comercial e baixa disponibilidade, como é o caso do Açafrão (*Crocus sativus* L.), ou aquelas que são comercializadas em grande volume, em que pequenas percentagens de adulterantes podem levar a grandes ganhos fraudulentos, como nos casos de pimenta preta, chili ou orégãos [7]. Por exemplo, no caso do orégão, apesar da sua grande disponibilidade a baixo custo nos supermercados e mercearias de todo o mundo ser sem dúvida uma circunstância favorável para os consumidores, a concorrência comercial e o fraco controlo de toda a cadeia de fornecimento pode levar a um aumento de riscos em termos de fraudes comerciais e económicas [13]. Um estudo recente do mercado europeu entre 2000 e 2007 revelou que, na maior parte das vezes, produtos rotulados e vendidos como orégão mediterrânico autêntico não correspondem ao declarado, sendo evidência de uma prática que consiste na adição de:

- I. plantas que carecem de um perfil de óleo essencial claramente detetável (*Rubus* sp., *Cistus incanus* L., *Rhus coriaria* L.) [7],
- II. óleos essenciais de plantas com sabor a orégão, maioritariamente pertencentes à família Lamiaceae (*Satureja montana* L., *O. majorana* L.) [7], e
- III. espécies da família Oleaceae e Eleagnaceae, em particular *Olea europaea* L. [13].

Relativamente ao chili, as preparações em pó são as mais vulneráveis à adulteração com substâncias estranhas que não são detetadas visualmente [22]. Está reportado que o chili em pó é adulterado através da adição de quantidades extra de pericarpo branqueado, sementes, cálices e pedúnculos para aumentar o volume, mas sem afetar a aparência visual. Pode também ser adulterado com corantes artificiais (alcatrão de carvão vermelho e vermelho de Sudão), amêndoa em pó, polpa de beterraba vermelha e frutos secos ou em pó de *Zizipus nummularia* [38, 39].

No caso da pimenta preta, o elevado valor comercial e o facto de ser comercializada em grandes volumes são as principais razões responsáveis pela sua adulteração. As sementes de papaia (*Carica papaya* L.) são um dos adulterantes mais comuns da pimenta preta devido à sua semelhança estrutural, ao seu baixo custo e à fácil disponibilidade. Assim, uma adulteração não detetada das bagas de pimenta preta com sementes de papaia pode levar à adulteração dos produtos de valor acrescentado que são obtidos a partir das bagas, como a pimenta em pó ou oleorresinas, podendo até ter efeitos deletérios nas pessoas que os consomem, pois foi relatado que estas sementes podem causar alguma toxicidade e afetar a fertilidade [22, 23]. A pimenta preta pode também ser substituída por bagas de espécies selvagens de *Piper*, como *P. attenuatum* e *P. galeatum* que são mais baratas. Frutos secos de *Lantana camara*, *Embelia ribes*, sementes de *Mirabilis jalapa* e frutos de *Schinus molle* são outros

adulterantes menores. O amido proveniente de fontes económicas ou diferentes partes da planta com menor qualidade podem também funcionar como adulterantes [22].

A curcuma é provavelmente a especiaria mais sujeita a adulteração devido ao facto de ser frequentemente vendida na sua forma moída [22, 31]. As adulterações podem ser efetuadas com outras plantas ou compostos químicos sintéticos, por exemplo cores artificiais como Amarelo de Metanilo, Orange II e cromato de chumbo ou pó de giz e pedra sabão amarela. No entanto, as adulterações mais frequentes são realizadas com plantas, normalmente com rizomas de espécies relacionadas mais económicas e especialmente com as que contêm o pigmento corante curcumina, como *Curcuma zedoaria* (*Curcuma xanthorrhiza*), *Curcuma malabarica* e *Curcuma aromatica* [22, 40]. Estas últimas são relatadas como sendo tóxicas, por isso a sua adição à curcuma pode levar a riscos para a saúde pública [31, 41].

Quanto ao Açafrão, devido ao seu elevado valor comercial e à grande demanda de produção, este é regularmente adulterado com os mais diversos materiais e estratégias mais baratas. Corantes artificiais e naturais, compostos minerais, outras especiarias e partes de outras plantas com cor e morfologia semelhantes têm sido deliberadamente adicionados como adulterantes em estigmas secos de Açafrão a fim de aumentar o volume e o peso de lotes comerciais. Os materiais mais frequentemente encontrados são flores de *Carthamus tinctorius*, *Calendula officinalis* e *Arnica montana*, sementes de *Bixa orellana*, pétalas de *Hemerocallis* sp., rizomas em pó de *Curcuma longa* e estigmas de *Crocus vernus* [42].

Matérias-primas de elevada qualidade são fundamentais para a produção de alimentos com valor nutricional adequado e sabor desejável. Os controlos de qualidade são feitos por vários testes laboratoriais, os quais representam o ponto de partida obrigatório para um bom sistema de rastreabilidade de alimentos. Os governos têm diferentes orientações nacionais para a produção e preservação de alimentos, enquanto a definição de que testes deverão ser utilizados para avaliar a qualidade e a segurança dos alimentos é da responsabilidade de várias agências independentes, como a American Food and Drug Administration e a Autoridade Europeia de Segurança Alimentar.

2 Metodologias utilizadas na avaliação da autenticidade de plantas aromáticas e especiarias

A crescente procura por sistemas confiáveis de rastreabilidade de alimentos tem encaminhado a investigação científica para o desenvolvimento de diferentes abordagens

analíticas para a deteção de fraudes. Atualmente existem numerosos métodos, muitos baseados na caracterização morfológica/anatómica, em marcadores organoléticos (odor, cor, textura) ou testes químicos para a avaliação da autenticidade de alimentos e a deteção da presença de adulterantes [43, 44]. De uma forma geral, as três estratégias básicas usadas para identificar adulterações em alimentos e produtos agrícolas incluem:

- demonstração da presença de uma substância estranha ou de um marcador;
- demonstração de que um componente está desviado do seu nível normal e
- demonstração da improbabilidade desse perfil ocorrer.

Entre estas, a primeira estratégia é considerada a melhor e a mais simples [22]. As técnicas analíticas utilizadas para deteção de adulterantes ou para autenticação de determinado produto incluem métodos físicos, métodos químicos/bioquímicos, imunoenaios e, mais recentemente, ferramentas moleculares baseadas na análise de ADN [22].

2.1 Métodos físicos e químicos

Os métodos físicos usados na deteção de adulterações incluem a avaliação estrutural por visualização macroscópica e microscópica, bem como a análise de outros parâmetros físicos como a textura, a solubilidade, a densidade e as propriedades organoléticas [22].

A análise macroscópica avalia características como a forma, a cor e o odor, enquanto a análise microscópica revela as características dos componentes celulares ou tecidos da especiaria ou planta aromática, ou ainda dos seus derivados que podem ou não ser processados. Estas análises, apesar de bastante úteis em certos casos para a autenticação e deteção de adulterantes, exigem experiência na avaliação de características macroscópicas e microscópicas do produto, especialmente quando os produtos estão processados na forma de pó, misturados com outro tipo de produtos ou degradados devido a um mau armazenamento/processamento. Estas análises não fornecem meios inequívocos de autenticação, principalmente para espécies relacionadas pois muitas vezes possuem características estruturais semelhantes. A precisão e fiabilidade dos resultados irá depender muito dos examinadores, tornando esta análise maioritariamente subjetiva. Para além disso, outros fatores tais como a origem geográfica, o período de crescimento e as condições de armazenamento podem afetar a estrutura do material [22, 43, 45].

Os métodos químicos podem incluir técnicas cromatográficas e espectroscópicas, tais como HPLC, TLC, GC, GC-MS, NMR, LC-MS e LC-NMR, e métodos imunológicos

como ELISA [22]. Destaca-se ainda a utilização de isozimas, as quais podem ser definidas como múltiplas formas moleculares de uma única enzima, tendo normalmente propriedades enzimáticas semelhantes e pequenas diferenças na composição aminoacídica [46]. Sendo constituídas por aminoácidos, as isozimas têm uma carga elétrica que deles depende, podendo por isso serem separadas por eletroforese e permitir detetar variações alélicas [46, 47].

A caracterização química é muito útil na deteção de adulterantes como drogas sintéticas ou fitoquímicos. Os perfis fitoquímicos podem variar bastante consoante a forma como a planta foi processada ou de acordo com as condições ambientais em que as plantas foram cultivadas. No entanto, para muitos produtos, os compostos marcadores podem-se sobrepor com os de espécies relacionadas, mas não desejadas, em alguns casos os padrões químicos podem ser demasiado raros ou caros, ou ainda, podem não ter sido identificados marcadores para um determinado tipo botânico [22]. No caso dos imunoenaios, a sua aplicabilidade poderá ser limitada quando utilizados em alimentos processados uma vez que as proteínas poderão estar degradadas, dificultando a sua deteção. O nível de expressão de proteínas está dependente do tecido e portanto, fornece resultados somente do tecido escolhido para identificação [36].

2.2 Métodos baseados na análise de ADN

Os métodos baseados na análise de ADN surgiram como alternativas eficazes na avaliação da autenticidade, permitindo ultrapassar algumas das dificuldades apresentadas pelas técnicas existentes (Tabela 2). O facto das moléculas de ADN existirem em número ilimitado em diferentes tecidos biológicos, sendo independentes da idade e condições ambientais, são vantagens a realçar. Os marcadores de ADN estão livres de efeitos pleiotrópicos (quando um único gene controla diversas características do fenótipo que muitas vezes não estão relacionadas), permitindo a monitorização de qualquer número de marcadores numa única população. A análise de ADN pode ser realizada em qualquer fase do ciclo de vida de um organismo e a partir de quase todos os seus tecidos, incluindo os mumificados. Um aspeto muito importante relaciona-se com o facto de as moléculas de ADN manterem integridade suficiente para poderem ser analisadas, mesmo no caso de alimentos que sofreram processamento, como são os casos das especiarias e algumas plantas aromáticas [46]. Nestes casos, os métodos baseados no ADN são mais eficazes, sendo também passíveis de serem aplicados a diferentes matrizes alimentares. Além disso, as moléculas de ADN fornecem mais informações sobre um determinado organismo do que as proteínas, podendo ser

facilmente extraídas mesmo quando presentes em pequenas quantidades no material orgânico [44]. No entanto, um marcador molecular deve estar facilmente disponível, ser altamente polimórfico e reprodutível, seletivamente neutro para diferentes condições ambientais e práticas de manuseamento, o que são condições muitas das vezes difíceis de se obter. Por isso, dependendo do estudo a realizar, um marcador molecular deverá ser selecionado tendo em conta o cumprimento de todos os requisitos acima mencionados [36].

Tabela 2 – Comparação do nível de competência técnica e custos necessários para vários métodos de autenticação. Adaptado de: [43]

Métodos Autenticação	Competência técnica	Custo
Análise morfológica	+++	+
Análise Proteínas	+++	+++
TLC	++	++
LC-MS	+++++	++++
Análise ADN	+++	+++

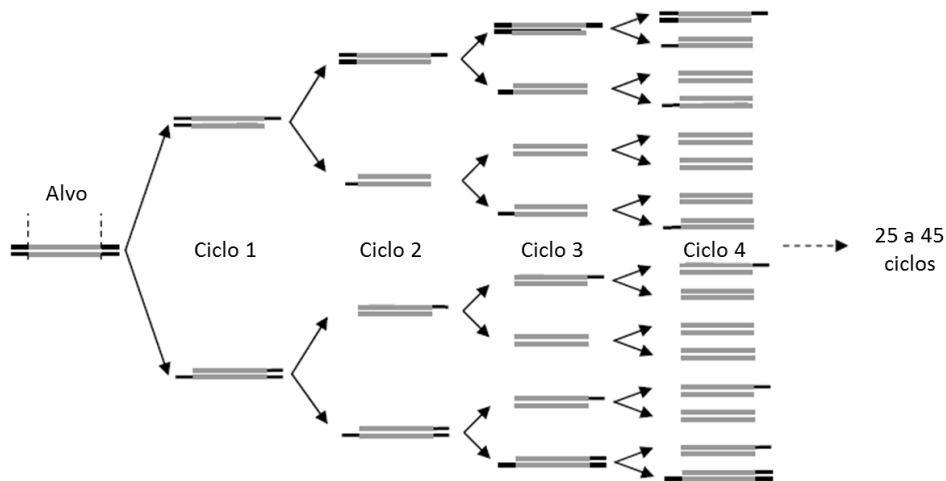
A análise de ADN torna-se assim uma ferramenta fundamental na deteção inequívoca de qualquer adulterante biológico e na identificação de espécies geneticamente relacionadas. Permite autenticar alimentos processados ao identificar a(s) espécie(s) de origem com base na informação genética. Torna fácil a identificação de alimentos geneticamente modificados e atesta a segurança dos alimentos, pois deteta facilmente patogénios e alergénios em alimentos [36].

A maioria dos métodos com alvo em marcadores de ADN baseia-se na reação em cadeia da polimerase (PCR) e requerem apenas algumas cópias de ADN para análise. A sequenciação de ADN e, mais recentemente, *DNA barcoding* são outras abordagens também utilizadas na análise de ADN com aplicação na identificação de plantas em alimentos. Os métodos baseados na amplificação de ADN para a deteção de adulterantes e avaliação da autenticidade incluem técnicas que não necessitam do conhecimento prévio da sequência a analisar, tais como: RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*). Das técnicas que se baseiam no uso de *primers* específicos, destacam-se: SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*), SSR (*Simple Sequence Repeats*) ou microssatélites, PCR em tempo real e PCR-sequenciação. A abordagem recente designada por *DNA barcoding* será também referida por permitir a análise da variabilidade de pequenas regiões específicas do genoma pelo uso de *primers*

específicos.

2.2.1 Fundamentos da PCR

A técnica de PCR baseia-se no mecanismo de replicação do ADN *in vivo* de forma a amplificar segmentos específicos de ADN proveniente de qualquer porção de material genético que possa ser considerada alvo e de ser replicado numerosas vezes. Uma amplificação típica inclui: o ADN alvo, uma polimerase de ADN termoestável, dois oligonucleótidos utilizados como *primers*, desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP), tampão e magnésio. Após mistura dos reagentes, a reação irá decorrer em três etapas distintas que correspondem a temperaturas diferentes. Cada série de temperaturas é definida como “ciclo de amplificação”. Estes ciclos são repetidos de 25 a 45 vezes, dependendo da quantidade de ADN medido no início da reação [48]. Assim, o número de sequências-alvo irá crescer exponencialmente a par do aumento do número de ciclos ao longo da reação (Figura 2) [49, 50].



Amplificação exponencial:

$$2^1 = 2 \text{ cópias} \quad 2^2 = 4 \text{ cópias} \quad 2^3 = 8 \text{ cópias} \quad 2^4 = 16 \text{ cópias} \quad 2^{35} = 34 \text{ bilhões de cópias}$$

Figura 2 – Representação esquemática da amplificação de um fragmento de ADN pela técnica de PCR. De um ponto de vista teórico, a quantidade de ADN alvo cresce exponencialmente ao longo dos ciclos, resultando em 34 bilhões de cópias idênticas ao fim de 35 ciclos. Adaptado de: [49].

As três etapas de temperatura de cada ciclo de amplificação designam-se por:

1. Desnaturação: na primeira etapa de temperaturas, que ronda os 94-95°C durante 15 a 45 segundos, irá favorecer a separação do ADN alvo de cadeia dupla em cadeias simples;
2. Hibridação: a temperatura da reação baixa para 48-65°C durante 15 a 45 segundos, levando à ligação dos *primers* (específicos para o fragmento de

ADN alvo) às moléculas de ADN de cadeia simples. A temperatura ótima para este passo depende da composição dos *primers* utilizados;

3. Extensão: a temperatura sobe para os 72°C, favorecendo a ligação da *Taq* polimerase, que irá sintetizar as cadeias complementares a partir dos *primers*. Esta etapa dura entre 30 segundos a alguns minutos dependendo do comprimento dos fragmentos a amplificar (Figura 3).

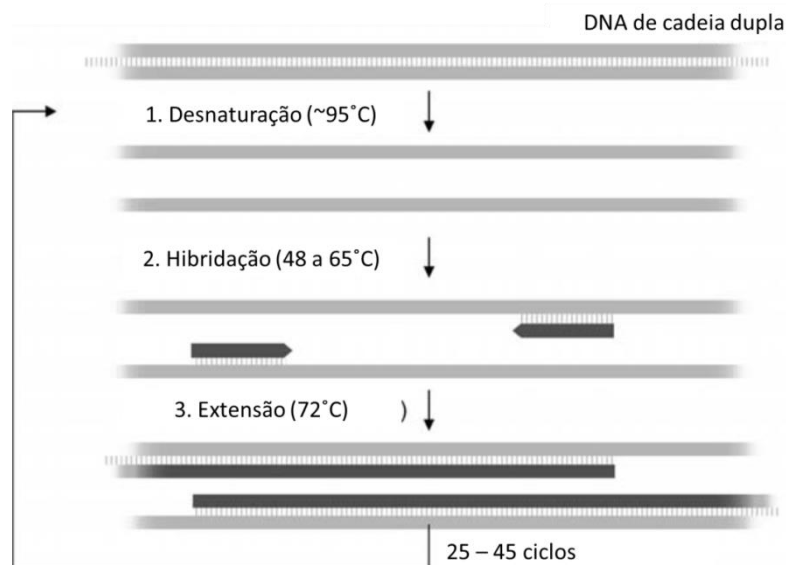


Figura 3 – Representação esquemática das três etapas de amplificação por PCR (desnaturação, hibridação e extensão), que resulta na duplicação da quantidade de ADN alvo. Adaptado de: [49].

Os produtos amplificados podem ser analisados por tamanho, quantidade, sequência e serem utilizados em inúmeros procedimentos experimentais. Uma das análises mais frequentes consiste na separação dos fragmentos por eletroforese, sendo as bandas detetadas por diferentes métodos como coloração ou autoradiografia [47].

2.2.2 RAPD

RAPD é um método que envolve a amplificação de fragmentos de ADN genómico, usando pequenos *primers* (normalmente de 10 nucleótidos) e de sequência arbitrária para desta forma detetar polimorfismos de ADN de forma aleatória [46]. Os polimorfismos a detetar são o resultado de uma substituição de pares de bases por inserções ou deleções que modificam o local de ligação dos *primers*, ou inserções na sequência genómica que separam o local de ligação do *primer* gerando uma sequência de amplificação de tamanho diferente ou até não permitindo que a amplificação ocorra. Em média, cada *primer* dirige a amplificação de vários *loci* discretos no genoma, tornando o

ensaio útil para o rastreio eficiente de polimorfismos entre indivíduos. No entanto, devido à natureza conjectural da amplificação do ADN com *primers* aleatórios, é importante otimizar e manter as condições de reação de forma consistente para que a amplificação do ADN seja reprodutível. O perfil de fragmentos amplificados é depois analisado por eletroforese em gel de agarose (Figura 4) [47, 51].

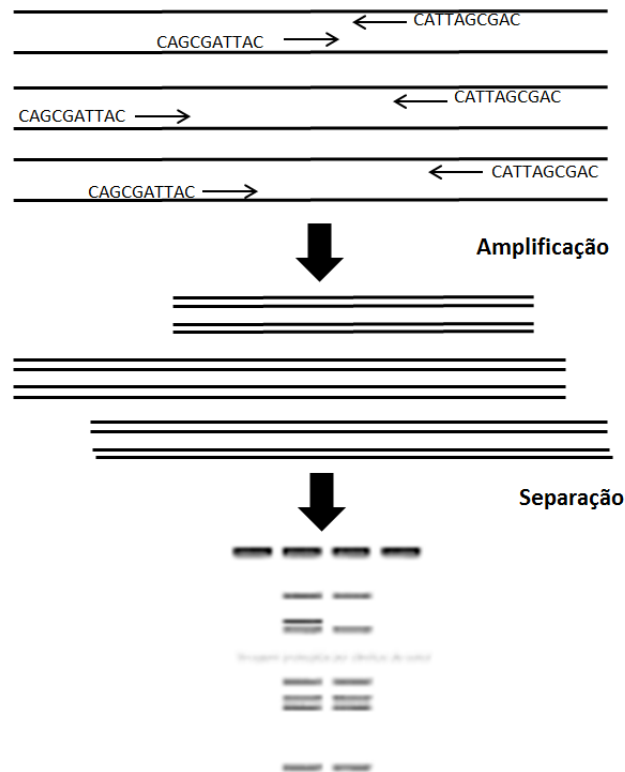


Figura 4 - Representação esquemática da amplificação do ADN através de um único oligonucleótido de aproximadamente 10 bases (*primer*) pela técnica de RAPD e separação dos produtos por eletroforese em gel de agarose. Adaptado de: [44] .

As principais vantagens deste método estão associadas à rapidez e facilidade de execução, não requerendo elevadas quantidades de ADN a analisar nem conhecimento prévio do genoma ou das sequências. Para além disso, fornece um número ilimitado de marcadores por todo o genoma e revela um elevado nível de polimorfismo intra- e inter-espécies que mostram um baixo polimorfismo usando outros marcadores [46, 47, 52]. No entanto, esta técnica apresenta uma baixa reprodutibilidade, requerendo grandes cuidados com as condições de reação e contaminações e o uso de extratos de ADN de elevado nível de purificação e peso molecular [47].

Esta técnica tem sido bastante utilizada na deteção de adulterantes de plantas devido ao seu baixo custo de operação e à capacidade para discriminar diferentes espécies botânicas [44].

2.2.3 SCAR

Os marcadores SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*) são fragmentos de ADN amplificados por PCR usando *primers* especificamente desenhados a partir das sequências nucleotídicas selecionadas e sequenciadas de um dado perfil de RAPD [47, 53]. Após a amplificação os fragmentos são analisados por eletroforese em gel de agarose [47].

Este método tem como principais vantagens a rapidez e facilidade de execução, para além de uma maior reprodutibilidade do que a técnica RAPD para cada *locus* específico. Por se basear numa amplificação específica por PCR, necessita apenas de pequenas quantidades do ADN alvo (10-100 ng por reação). A principal desvantagem reside na necessidade de ter informação prévia da sequência a amplificar [47].

A conversão de marcadores RAPD em marcadores específicos SCAR torna o processo de deteção de potenciais adulterantes de amostras comerciais num método mais fácil, sensível e específico [44].

2.2.4 SSR

Os microssatélites ou marcadores SSR (*Simple Sequence Repeat*) são repetições em *tandem* de sequências simples que consistem frequentemente em dois, três ou quatro nucleótidos que se podem repetir 10 a 100 vezes e que estão espalhados pelo genoma da maior parte das espécies eucarióticas. O número de cópias destas repetições, que pode ser altamente variável devido a um *crossing-over* desigual, está na base dos polimorfismos, os quais podem ser detetados por amplificação por PCR com um conjunto de *primers* específicos [46, 47].

Se as sequências nucleotídicas das regiões que flanqueiam os microssatélites forem conhecidas, podem ser desenhados *primers* específicos (geralmente 20-25 pb) para amplificar os microssatélites por PCR [54] (Figura 5). O procedimento para o desenvolvimento de marcadores SSR, na ausência de dados suficientes da sequência, inclui a construção de uma biblioteca de ADN e pesquisa da biblioteca com sondas correspondentes às sequências repetitivas desejadas. De modo a desenhar *primers* únicos que flanqueiam regiões SSR, é necessária a sequenciação dos clones selecionados. Por estes motivos, o desenvolvimento destes *primers* é muitas vezes um processo laborioso e dispendioso [46].

As vantagens desta técnica relacionam-se com a elevada abundância de microssatélites em eucariotas e a sua distribuição aleatória por todo o genoma. A elevada reprodutibilidade das análises dos microssatélites e o facto de não requerem ADN de

qualidade e quantidade elevadas são vantagens a referir [54]. No entanto, a necessidade do conhecimento prévio da sequência a analisar e os elevados custos de desenvolvimento quando as sequências dos *primers* para o alvo em estudo não estão disponíveis dificultam a aplicação da técnica. Para além disso, mutações nos locais de ligação dos *primers* podem resultar na ocorrência de alelos nulos (ausência de amplificação por PCR do produto em questão), o que pode levar a erros na avaliação genotípica [47, 54].

As sequências de microssatélites são especialmente adequadas na distinção de génotipos relacionados. Devido à sua grande variabilidade, são também usados em estudos de populações e na identificação de cultivares estritamente relacionadas [47]. Nas plantas, foi demonstrado que os microssatélites podem ser altamente informativos, permitindo até a distinção entre indivíduos [46].

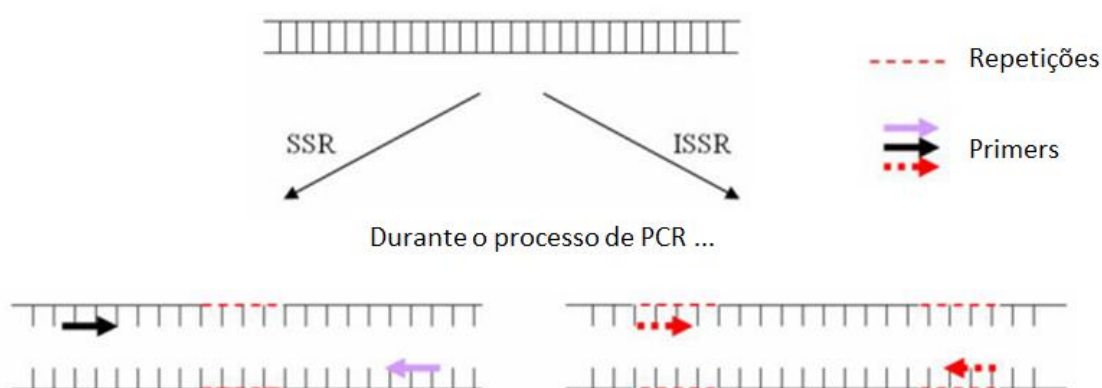


Figura 5 - Representação esquemática das técnicas de SSR e ISSR. Em SSR são usados *primers* complementares a sequências que flanqueiam as regiões repetitivas a amplificar, enquanto em ISSR são utilizados *primers* nas regiões complementares às próprias regiões repetitivas a amplificar. Adaptado de: [51].

2.2.5 ISSR

A técnica de ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) consiste na amplificação de fragmentos de ADN de aproximadamente 100-3000 pb localizados entre regiões adjacentes de microssatélites. Esta técnica usa *primers* em regiões complementares aos próprios microssatélites para amplificar regiões ISSR de diferentes tamanhos através da PCR [46, 47] (Figura 5). São gerados simultaneamente cerca de 10-60 fragmentos a partir de múltiplos *loci*, separados por eletroforese em gel e avaliados segundo a presença ou ausência de fragmentos de um determinado tamanho [54].

É um método simples e rápido que combina a maior parte das vantagens dos microssatélites (SSR) e AFLP e a universalidade da RAPD [46]. Possui também

vantagens em termos de reprodutibilidade, com valores relatados de 99%, o facto de não serem necessários dados de sequência para construção dos *primers*, não exigir elevadas quantidades de ADN por reacção (5-50 ng) e pelos ISSR estarem distribuídos por todo o genoma [46, 54].

Esta técnica tem sido rapidamente adotada pela comunidade científica em várias áreas do melhoramento de espécies de plantas. Tem sido bastante útil em estudos de diversidade genética, estudos filogenéticos, marcação genética, mapeamento de genomas, em biologia evolutiva, e numa vasta gama de espécies cultivadas [55].

2.2.6 AFLP

AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) é uma técnica de sequência arbitrária e de ADN *fingerprint* que deteta fragmentos de restrição amplificados por PCR depois da digestão do ADN genómico por endonucleases de restrição. Os polimorfismos são detetados através das diferenças no comprimento dos fragmentos amplificados por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), por eletroforese capilar ou por metodologias autoradiográficas ou de fluorescência. Assim, os AFLP são fragmentos de ADN (80-500 pb) obtidos da digestão com enzimas de restrição, seguida pela ligação a adaptadores de cadeia dupla, complementares aos locais de restrição dos produtos de digestão, e uma amplificação seletiva por PCR com *primers* específicos da sequência do adaptador/local de restrição (Figura 6) [47].

Em organismos complexos, como as plantas, são efetuadas duas amplificações: a primeira consiste numa pré-amplificação que pode ou não conter *primers* específicos; a segunda utiliza os produtos diluídos da pré-amplificação como *template* recorrendo a *primers* específicos [44].

Os perfis das bandas correspondem às variações nos locais de restrição na região do ADN em questão, sendo que estes fragmentos são gerados simultaneamente a partir de diferentes locais genómicos (50-100 fragmentos por reacção) [47].

Possui como vantagens o facto de possuir uma reprodutibilidade e sensibilidade considerável, permitir a distinção entre organismos homocigóticos e heterocigóticos pela intensidade das bandas, distinguir organismos estritamente relacionados e ter uma larga aplicabilidade. Adicionalmente, não necessita da informação da sequência para o desenho de *primers*, e fornece um grande número de marcadores polimórficos numa única reacção [46, 47]. No entanto, apresenta como principais desvantagens o facto de necessitar de ADN de elevada pureza e peso molecular para evitar gerar falsos polimorfismos, que levam a erros de identificação [54].

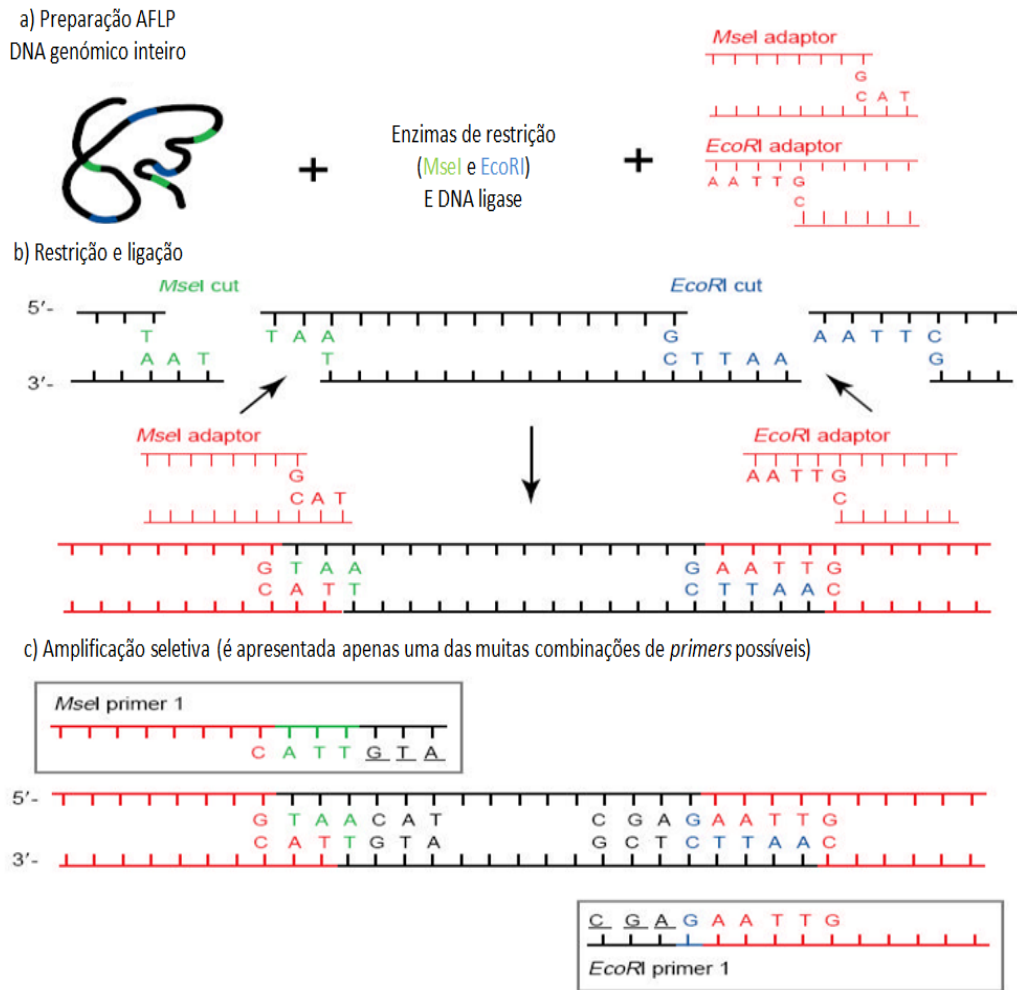


Figura 6 - Diagrama esquemático das etapas da técnica de AFLP. Adaptado de: [36].

2.2.7 PCR em tempo real

A técnica de PCR em tempo real é utilizada para detetar e quantificar simultaneamente uma ou mais sequências específicas de uma amostra de ADN. O procedimento segue o princípio geral da PCR, mas a sua principal característica consiste na capacidade de monitorizar o progresso de amplificação à medida que este decorre. Ao contrário da PCR convencional, os dados são recolhidos ao longo dos ciclos e não somente no final da reação. Nesta última, o alvo amplificado é identificado somente depois do último ciclo de amplificação ter acabado, sendo posteriormente efetuada uma análise por eletroforese em gel de agarose para separação e visualização dos produtos amplificados. A PCR em tempo real é um processo quantitativo, pois permite obter dados no início da fase exponencial de amplificação, que são, nesta fase, diretamente proporcionais à quantidade de ADN inicial na reação [56]. O mesmo não ocorre na PCR convencional, na qual os dados são obtidos no final da fase exponencial ou, mais

frequentemente, fase plateau, em que o produto final amplificado não é diretamente proporcional à quantidade de ADN inicial.

A deteção dos produtos da PCR é efetuada através da medição da acumulação de um sinal de fluorescência que está correlacionado diretamente com a quantidade de produtos amplificados à medida que a reação ocorre. Este sinal é obtido por um de dois métodos: corantes fluorescentes não específicos que se intercalam em qualquer cadeia dupla de ADN ou sondas de ADN de sequência específica constituídas por oligonucleótidos marcados com um elemento fluorescente – o fluoróforo – que permite a deteção somente após a hibridação da sonda com a cadeia de ADN complementar [57].

A seleção do melhor método passa pela experiência individual, pelo nível de sensibilidade e precisão necessárias para a análise dos dados, para além do orçamento disponível. Além disso, a escolha do método deve ter em conta a capacidade e a experiência do investigador na conceção e otimização da PCR em tempo real [56].

Na PCR em tempo real que utiliza corantes não específicos, o corante é adicionado à reação, emitindo fluorescência aquando da sua ligação com o ADN de cadeia dupla, devido a uma mudança na conformação do ADN. À medida que os produtos da PCR aumentam, a fluorescência também irá aumentar de intensidade, que é medida em cada ciclo, permitindo assim quantificar a concentração de ADN. Devido ao facto do corante se ligar a qualquer parte da cadeia dupla, a escolha de *primers* é crítica para não levar à formação de produtos não específicos, como dímeros de *primers*, que irão alterar o resultado da quantificação. Uma das abordagens mais simples e comuns de PCR em tempo real consiste na utilização do corante universal SYBR[®] Green I que se intercala em todo o tipo de ADN de cadeia dupla. Como forma de verificar a especificidade da reação, o programa de temperaturas da PCR em tempo real envolve uma etapa designada por curva de desnaturação (*melting*). O incremento crescente de temperatura (0,2-0,5°C/10s) favorece a desnaturação das cadeias duplas de ADN, o que provoca uma diminuição da intensidade de fluorescência, permitindo desta forma calcular a temperatura de desnaturação (T_m) dos produtos de PCR obtidos através do traçado da curva de desnaturação. Este traçado permite a diferenciação do fragmento alvo de outros fragmentos de cadeia dupla, como dímeros de *primers* que terão uma T_m bastante inferior, assim como perfis de picos de desnaturação bem distintos dos produtos esperados. Mais recentemente, como alternativa ao clássico corante SYBR[®] Green I que pode interferir com a reação de amplificação, surgiram os corantes de nova geração, tais como o novo corante designado por EvaGreen. Este corante apresenta uma fluorescência melhorada, bem como uma melhor resolução, podendo ser utilizado em maior quantidade na reação sem provocar a sua inibição [58].

Tirando partido do aparecimento destes corantes de elevada especificidade e

resolução, bem como do desenvolvimento de novos equipamentos (termocicladores) de PCR em tempo real, surgiu nos últimos anos um novo *software* de análise designado por *High Resolution Melting* (HRM). Depois do último ciclo de amplificação dos produtos de PCR, a curva de desnaturação dos fragmentos inicia-se com pequenos incrementos de temperatura por unidade de tempo ($\sim 0,05^\circ\text{C/s}$), o que possibilita registar todas as pequenas alterações na fluorescência emitida. No final, o *software* HRM vai avaliar todas as variações durante a curva de desnaturação, permitindo distinguir diferentes alterações na composição e no tamanho dos fragmentos esperados. Deste modo, a simples alteração de um nucleótido por outro (por exemplo a troca de uma adenina por uma timina) pode ser suficiente para distinguir duas sequências nucleotídicas aparentemente iguais. Esta nova ferramenta tem sido amplamente utilizada nas mais variadas áreas como genotipagem, edição de ARN ou avaliação de mutações genéticas (doenças genéticas) [59-61]. Mais recentemente, tem sido aplicada com muito sucesso na identificação e quantificação de adulterantes nos alimentos processados, na diferenciação de espécies/cultivares e na deteção de alergénios [61].

Os métodos de PCR em tempo real com a utilização de sondas específicas para o fragmento alvo aumentam significativamente a especificidade da reação, uma vez que a sonda funciona como um “terceiro *primer*” que deve estar corretamente alinhado com os primers *forward* e *reverse*. A sonda consiste num oligonucleótido complementar à sequência alvo que possui um fluoróforo na extremidade 5' (responsável pela fluorescência) e um *quencher* (anulador de fluorescência) na extremidade 3' (Figura 7).

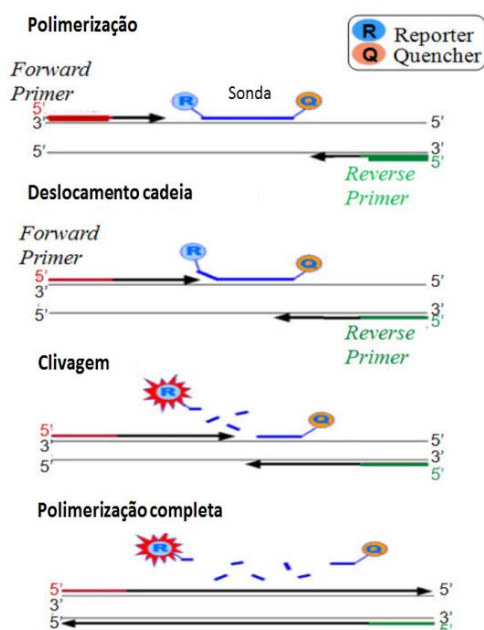


Figura 7 - Esquema de PCR em tempo real realizado com sonda de hidrólise do tipo TaqMan. Adaptado de: [36].

A proximidade do fluoróforo ao *quencher* anula a emissão de fluorescência. O sistema de sondas de hidrólise do tipo TaqMan™ explora o uso da atividade exonucleásica 5'→3' da *Taq* polimerase para produzir o sinal de fluorescência, enquanto as sondas *Molecular Beacons* ou *primers SCORPION* exploram interações específicas entre o amplicão e a sonda [62]. Quando ocorre a separação entre o fluoróforo e o *quencher*, sucede a emissão de um sinal de fluorescência e a sua deteção. Um aumento de produtos amplificados ao longo de cada ciclo leva, assim, a um aumento proporcional da fluorescência [36].

Outra alternativa consiste no uso de duas sondas que possuem fluoróforos cujos comprimentos de onda de excitação e emissão estão em ressonância (FRET - *Fluorescence Resonance Energy Transfer*), havendo por isso emissão de fluorescência quando os dois estão fisicamente próximos [62].

A medição do sinal de fluorescência permite efetuar a representação gráfica semi-logaritmica que se traduz no aumento do sinal em função do número de ciclos (Figura 8) e onde se conseguem identificar quatro fases. O número de ciclos necessários para a produção de sinal de fluorescência estatisticamente acima do nível de ruído do aparelho é designado por Ct (*Cycle threshold*). Este valor está inversamente relacionado com a concentração inicial de ADN alvo, no início da reação. Na primeira fase, denominada de fase *lag*, as pequenas variações de fluorescência que se possam observar encontram-se sempre abaixo da linha *threshold* e correspondem ao ruído do aparelho. Na fase exponencial ocorre um aumento acentuado de fluorescência, proporcional à quantidade de ADN que está a ser amplificado. À medida que os produtos de PCR se acumulam, a atividade da *Taq* polimerase diminui, o que resulta num aumento não exponencial. É neste ponto que a reação entra na fase linear. Uma vez que a acumulação dos produtos da PCR acaba, devido ao esgotamento de reagentes e perda de atividade da *Taq* polimerase, essenciais para a amplificação, a reação entra na fase *plateau* [56, 63, 64].

Pode ser então efetuada uma quantificação absoluta ou relativa do ADN de uma amostra de concentração desconhecida. A quantificação absoluta pode ser realizada por interpolação dos valores de Ct numa curva de calibração de uma série de diluições de uma concentração conhecida de ADN. Após a amplificação dessas diluições, a curva de calibração é gerada traçando um gráfico dos valores Ct obtidos para cada diluição em função do logaritmo da quantidade de ADN.

Por outro lado, existem dois métodos para quantificação relativa de ADN, o método da dupla curva de calibração e o método comparativo do ΔCt . O primeiro utiliza duas curvas de calibração, uma para a sequência de interesse e outra para um gene de referência. As quantidades absolutas de ADN alvo e ADN de referência são determinadas por interpolação dos valores de Ct nas respetivas curvas, sendo a percentagem desse

alvo na amostra desconhecida calculada através do quociente entre esses valores, multiplicado por 100. No método comparativo do ΔCt usam-se padrões com concentrações conhecidas e compara-se a amplificação relativa da sequência alvo com a amplificação da sequência do gene de referência. O resultado traduz-se numa curva de valores de ΔCt ($\Delta Ct = Ct \text{ gene de referência} - Ct \text{ gene alvo}$) em função do logaritmo da quantidade ou concentração do alvo a analisar. A quantidade do alvo presente na amostra é obtida por interpolação valor de ΔCt da amostra com a curva padrão [36, 56, 65].

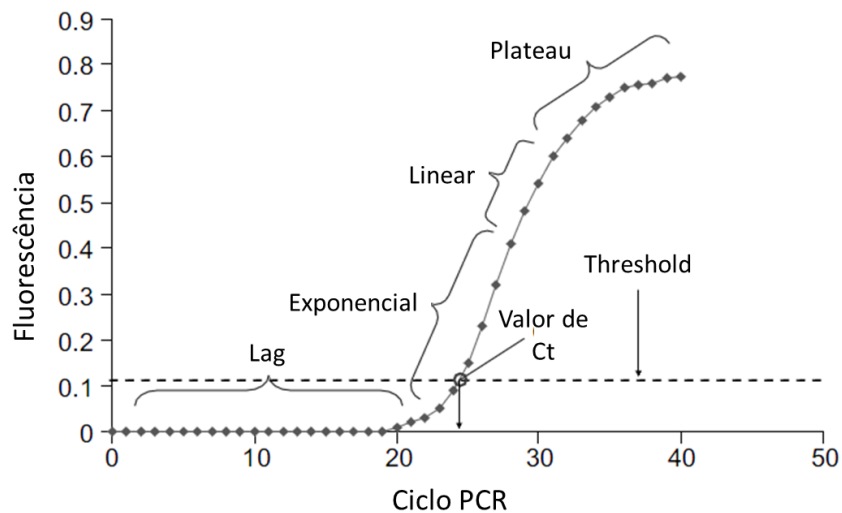


Figura 8- Curva de amplificação por real-time PCR. Adaptado de: [56].

Existem diversos mecanismos que podem interferir com a eficiência da amplificação por PCR, sendo um deles a inibição da actividade da *Taq* polimerase. Apesar destes mecanismos poderem variar, em geral o resultado será uma redução na eficiência da amplificação. Este parâmetro também pode ser calculado a partir da curva de amplificação. Para isso, é realizada uma representação gráfica dos valores de Ct em função do logaritmo da quantidade de ADN. O valor da eficiência (E) será calculado a partir da seguinte expressão:

$$E (\%) = 10^{\left(-\frac{1}{\text{declive}}\right)} - 1$$

sendo um declive de 3,32 correspondente uma eficiência de 100% [56].

A principal vantagem da PCR quantitativa reside no fato de possuir um dinâmico e largo alcance, de ser um processo potencialmente automatizado e de poder ser utilizada em aplicações de alto rendimento e em larga escala. Fornece resultados quantitativos diretamente sem recorrer a passos adicionais (ex: eletroforese), ao contrário da PCR

convencional, e com elevada sensibilidade, parâmetro essencial para a deteção de quantidades vestigiais de adulterantes. É capaz de detetar quantidades de ADN iguais ou inferiores a 10 pg, dependendo da sequência alvo e/ou da matriz testada, de processar mais de 350 amostras individuais em apenas 2 horas (dependendo do número de poços do termociclador) e com um risco mínimo de ocorrerem contaminações cruzadas. Para além disso permite analisar fragmentos de pequenas dimensões, característica útil no estudo de amostras que tenham sofrido elevado grau de processamento [56, 58, 62].

2.2.8 PCR sequenciação

A sequenciação é uma técnica que consiste na determinação da ordem das bases nucleotídicas ao longo de uma cadeia de ADN. Esta técnica permite-nos efetuar uma análise completa da molécula ao fornecer a sequência exata de bases num segmento de ADN.

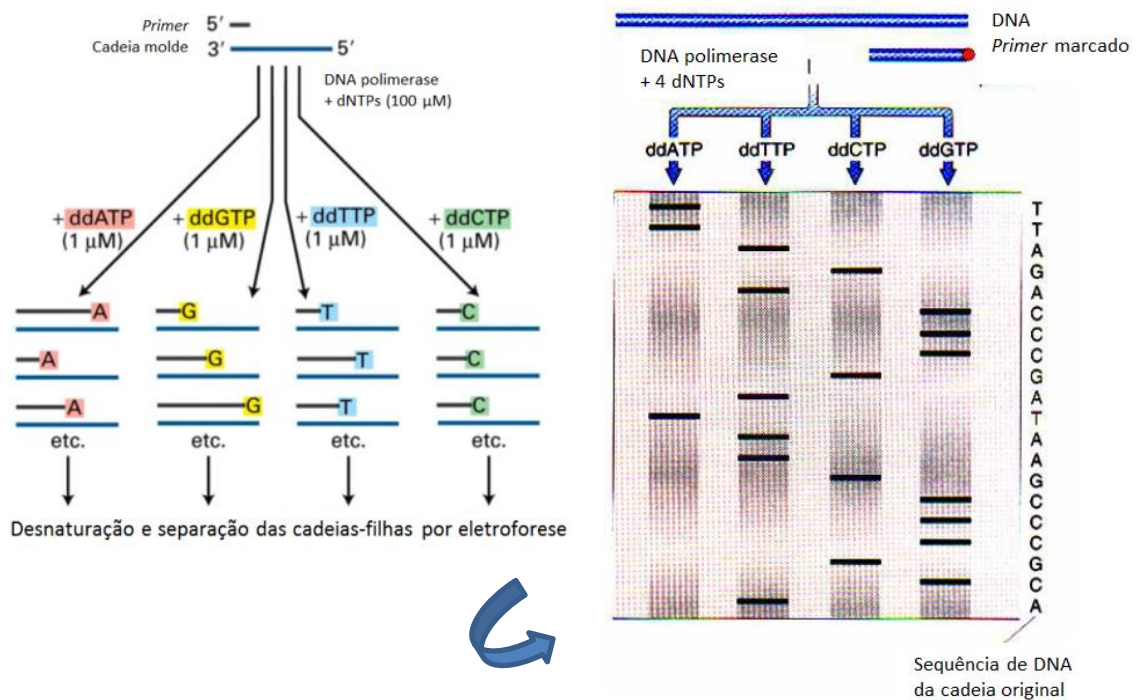


Figura 9 - Representação esquemática da técnica de sequenciação.

A técnica de PCR sequenciação envolve a determinação da sequência nucleotídica dentro de um fragmento de ADN amplificado por PCR, usando *primers* específicos para um determinado local genómico. Após a amplificação, o ADN é dividido em quatro amostras onde são adicionados os quatro desoxiribonucleotídeos, um

didesoxiribonucleótido diferente para cada reação e ADN polimerase. A extensão da sequência concorre com a adição dos desoxiribonucleótidos à nova cadeia de ADN e termina com a adição de um didesoxiribonucleótido. Assim, cada reação irá ter fragmentos de tamanhos diferentes que terminam com a adição do didesoxiribonucleótido em questão. A sequência completa é então lida em gel de eletroforese (Figura 9) [47].

Esta técnica proporciona a análise da variação genética entre indivíduos, para além de possibilitar a sequenciação de genoma cloroplastidial, mitocondrial e ribossomal. Adicionalmente possui uma elevada reprodutibilidade, necessita de pouca quantidade de ADN por reação quando este é amplificado por PCR e a maior parte do processo é passível de automatização [54]. No entanto, tem como desvantagem a cobertura de um baixo nível do genoma e o custo elevado quando os *primers* da região de interesse não estão disponíveis. Se as sequências forem visualizadas por eletroforese em gel de poliacrilamida ou por autoradiografia os procedimentos analíticos são trabalhosos e tecnicamente exigentes. Por estes motivos, a maioria dos estudos tem-se focado somente em um ou alguns *loci* [47].

2.2.9 *Barcoding*

Em 2003 foi desenvolvido por investigadores da Universidade de Guelph, Canadá, um novo sistema de identificação, o *DNA barcoding*. Esta abordagem é baseada na análise da variabilidade de pequenas regiões específicas denominadas de *DNA barcode*, permitindo assim, através destas sequências no genoma de um organismo, identificá-lo e distingui-lo de outros organismos geneticamente relacionados. Em suma, é uma combinação de tecnologias de sequenciação para facilitar a caracterização da biodiversidade. Este método provou ser útil na resolução de problemas taxonómicos em várias aplicações teóricas e práticas [66]. O *DNA barcoding* tem a vantagem de combinar três importantes aspetos: molecularização dos processos de identificação (ou seja, a investigação da variabilidade do ADN para discriminar entre taxa), a padronização do procedimento e a informatização [67].

Hebert et al. [66, 68] propôs o sistema de identificação para o reino animal baseado na porção da extremidade 5' do gene mitocondrial da citocromo c oxidase subunidade I (*cox1*, também conhecido por COI) como a região padrão de *DNA barcode*. No entanto, em plantas terrestres o ADN mitocondrial tem taxas de substituição mais lentas do que em animais e apresenta uma recombinação intra-molecular, limitando assim a resolução na identificação de plantas [69]. A pesquisa para um análogo do gene *cox1* em plantas terrestres centrou-se no genoma cloroplastidial e nuclear. A região ITS (*Internal Transcribed Spacers*) do ADN ribossomal nuclear (18S-5.8S-26S) tem sido a

mais utilizada como *DNA barcode* em trabalhos de autenticação e sistemática molecular de plantas [70, 71]. Apesar de existirem algumas limitações ao seu uso, como o facto de estar sujeita a uma evolução concertada incompleta que pode levar à existência de cópias parálogas divergentes entre indivíduos e apresentar uma baixa qualidade dos dados de sequenciação e por vezes, de amplificação, continua a ser o *locus* mais utilizado [71]. Existem diferentes razões para o seu uso alargado, por exemplo a disponibilidade de vários conjuntos de *primers* universais para uma grande diversidade de grupos taxonómicos. Adicionalmente, o facto do comprimento e sequências desta região evoluírem rapidamente e, portanto, terem uma elevada variabilidade, fornecendo frequentemente marcadores moleculares bastante adequados para estudos evolutivos a nível das espécies, e o facto de existirem mais de 100 cópias de genes rARN numa célula que permitem uma fácil amplificação desta região [72, 73]. Outra vantagem da região ITS está associada ao facto de ser facilmente amplificável mesmo a partir de pequenas quantidades de ADN (elevado número de cópias de rARN) e do elevado grau de variabilidade mesmo em espécies geneticamente relacionadas [74]. Mais recentemente, alguns estudos focaram-se maioritariamente na região ITS2 como possível candidato a *DNA barcode* por ser uma região mais curta relativamente à região ITS. Consequentemente a região ITS2 é mais fácil de amplificar usando um único par de *primers*, o que não acontece com a sequência ITS inteira por possuir uma eficiência de amplificação mais baixa. Para além disso, o facto de ter um comprimento menor torna a sequenciação mais simples. A região ITS2 é, por isso, um potencial marcador filogenético universal, e poderá ser amplamente usada em reconstruções filogenéticas quer ao nível do género quer ao nível da espécie, com potencial aplicação como marcador de autenticidade de plantas medicinais e aromáticas [75, 76].

Vários genes cloroplastidiais, tais como os mais conservados *rpoB*, *rpoC1* e *rbcL*, ou genes com taxas rápidas de evolução, como as sequências intergénicas *trnH-psbA*, *atpF-atpH* e *psbK-psbI* e uma seção do gene *matK*, têm sido propostos como regiões de *DNA barcode* para plantas [77, 78]. No entanto, a combinação de dois ou mais *barcodes*, em plantas, revelou uma melhor resolução, como demonstrado por um grupo de trabalho em plantas do CBoL (*Consortium for the Barcode of Life*), que sugeriu o uso da combinação dos genes *rbcL* e *matK* como regiões de *DNA barcode*, devido à simples taxa de recuperação do gene *rbcL* e à elevada resolução do gene *matK* [70, 79] (Figura 10). Embora ainda existam divergências de opinião sobre a eficácia destes marcadores, especialmente quando se estudam espécies estritamente relacionadas, o *DNA barcoding* apresenta resultados consistentes quando é usado na identificação de amostras desconhecidas com base na comparação com sequências de referência [80, 81].

Apesar da abordagem molecular com base no *DNA barcode* não ser uma

inovação recente para a ciência, a força deste método baseia-se na disponibilidade de uma plataforma internacional. A base de dados BOLD (*Barcode of Life Database*), coordenada pelo *International Barcode of Life Project* (IBOL), é um repositório que suporta toda a coleção de *DNA barcode*, com o objetivo de criar uma biblioteca de referência para todas as espécies vivas [67].

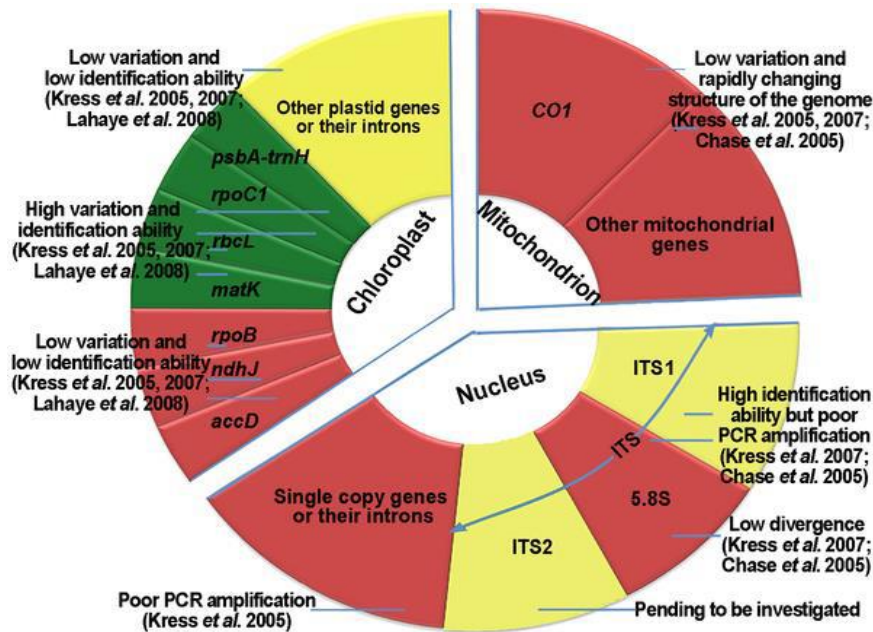


Figura 10 – Representação esquemática dos genes candidatos a *barcodes* pertencentes aos genomas nuclear, mitocondrial e ribossomal de plantas. Marcadores a vermelho não são utilizados como *barcodes* em plantas, marcadores a verde são potenciais *barcodes*, e marcadores a amarelo são *barcodes* atualmente em estudo. Figura extraída e referências citadas por Chen et al. [76].

3 *Crocus sativus* L.

3.1 Descrição e propriedades

Vulgarmente conhecido como Açafrão, *Crocus sativus* L. (Figura 11) pertence à família das Iridaceae e é largamente cultivado na Índia, Balcãs e Mediterrâneo Oriental [27, 82, 83]. Espanha e Irão são os principais produtores, representando em conjunto mais de 80% da produção mundial desta especiaria, que é aproximadamente 205 toneladas por ano [84]. Hoje-em-dia atingiu um



Figura 11 – *Crocus sativus* L.. Fonte: [83]

elevado valor comercial devido ao condimento a que dá origem. O preço do Açafrão da melhor qualidade no mercado internacional ronda os 700-1500 euros por kg. Esta especiaria é normalmente comercializada em embalagens com 2 g ou até somente 0,25 g, as quais rondam 7-15 euros por grama [85].

O seu pigmento é muito valorizado na culinária e na indústria alimentar, pelo que atinge preços bastante elevados no mercado. O rendimento do pigmento do Açafrão é muito baixo por ser extraído dos três finos estigmas e estiletos da flor desta planta. Por isso, a verdadeira especiaria é constituída apenas pelos estigmas desidratados ou pelo seu pó [27].

O Açafrão é também utilizado para outros fins, como corante, conservante, antioxidante, é utilizado na cosmética e apresenta inúmeras propriedades farmacológicas [86, 87]. Devido aos seus diversos usos como planta medicinal, inúmeros estudos fitoquímicos e bioquímicos têm vindo a ser realizados, tendo-se isolado vários compostos biologicamente ativos do Açafrão. Os principais compostos são a crocina, responsável pela cor, a picrocrocina, responsável pelo gosto amargo, e o safranal, responsável pelo odor e aroma (Figura 12). Contém mais de 150 compostos voláteis, mas também possui muitos componentes ativos não-voláteis, sendo muitos deles carotenoides, incluindo zeaxantina, licopeno e α - e β -caroteno [82, 87].

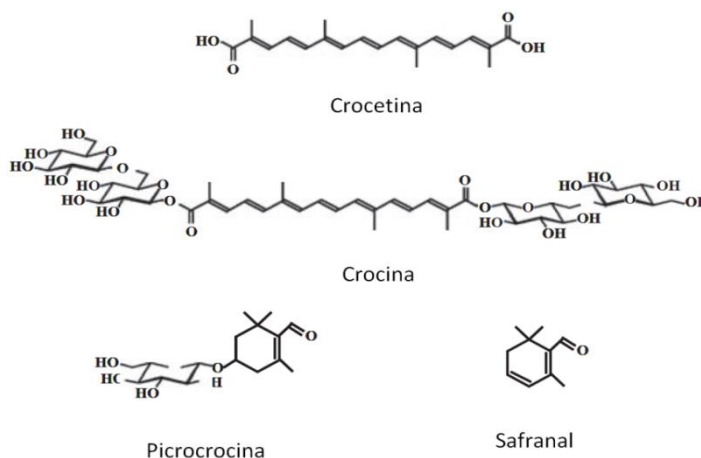


Figura 12 – Principais compostos biologicamente ativos do *Crocus sativus* L. Adaptado de: [82].

Na Tabela 3 apresentam-se diversas propriedades medicinais atribuídas ao Açafrão. O conteúdo em carotenoides é responsável por muitas das suas propriedades, tais como a inibição de cancro da pele, melhoramento da artrite e da visão [88]. Pensa-se que a crocina e o safranal são responsáveis pela inibição da dor e pelas suas propriedades anti-inflamatórias [89]. A sua composição em compostos fenólicos e flavonoides está relacionada com o seu efeito antioxidante [90]. Segundo alguns estudos

a crocina é responsável por aumentar as capacidades de aprendizagem e de memória [88].

Tabela 3 – Farmacologia e aplicações medicinais de *Crocus sativus* L.

Produto derivado do Açafrão	Propriedades
Açafrão	Efeito na síntese proteica e na formação de ácidos nucleicos [91]
Extrato de Açafrão Crocina, safranal e picrocrocina	Inibição do crescimento de células tumorais [92-95]
Extrato de Açafrão	Proteção contra a toxicidade induzida por cisplatina [96]
Extrato de Açafrão Crocina e crocetina	Atividade antioxidante [97, 98]
Extrato de Açafrão Crocetina, crocina	Atividade quimioprotetora contra a genotoxicidade induzida por agentes antitumorais (aflatoxina B1, nitrosaminas e benzopireno) [95, 99]
Extrato de Açafrão	Redução níveis de colesterol [100]
Crocina e crocetina	Aumento da atividade cerebral, aprendizagem e memorização [99]
Safranal	Atividade neuroprotetora e efeito sobre o sistema nervoso central e periférico [101]

O Açafrão é também considerado anticancerígeno, antidepressivo e anticonvulsivo [86, 102]. Possui efeitos benéficos contra lesões neuronais, doenças hepáticas, doenças de Alzheimer e Parkinson, transtornos menstruais, resistência a insulina, doenças cardiovasculares e aterosclerose. Adicionalmente, intervém no melhoramento do perfil de lípidos no plasma, dos níveis de glucose no sangue, da pressão sanguínea e do sistema respiratório, aumentando a oxigenação pulmonar [84, 87, 88]. No entanto, em doses elevadas, o Açafrão é considerado abortivo, hemorrágico e pode provocar vertigens. A dose letal para um adulto está estimada entre os 12 a 20 g [27].

3.2 Aplicação das técnicas de biologia molecular na avaliação da autenticidade da espécie *Crocus sativus* L.

Várias estratégias têm sido aplicadas de forma a evitar práticas fraudulentas, sendo para tal utilizadas duas abordagens diferentes: a primeira relacionada com a pureza e autenticação de Açafrão; e a segunda associada à sua classificação. Relativamente à classificação, esta está certificada no mercado de comércio internacional por referência à norma ISO 3632-2:2010 [103]. Estes protocolos definem quatro tipos

diferentes de Açafração de acordo com a sua intensidade de coloração, calculada por meio de uma combinação de medições por espectrofotometria UV de picrocrocina, safranal e crocina. Segundo estes protocolos a quantidade máxima de matéria estranha permitida no Açafração é de 1% [42].

Os métodos mais usados na autenticação do Açafração, como os clássicos baseados na observação de características morfológicas em microscópio, os métodos baseados nas técnicas cromatográficas, eletroforéticas e espectroscópicas (HPLC/PDA/ESI-MS) e mesmo os métodos especificados nas normas referidas anteriormente, muitas das vezes não satisfazem os requisitos de deteção de substâncias estranhas definidos na ISO 3632-2:2010 [103]. Apesar destes métodos fornecerem uma avaliação satisfatória da qualidade do Açafração e da sua autenticação [104-106], hoje-em-dia a melhor abordagem passa pelas técnicas de biologia molecular que fornecem uma análise económica, rápida, eficaz e objetiva [42].

Para complementar as técnicas já existentes, têm sido realizados vários estudos com utilização de marcadores de ADN para deteção das variadas adulterações praticadas no Açafração (Tabela 4). Com o objetivo de avaliar a autenticidade do Açafração, Marieschi et al. [42] desenvolveram marcadores SCAR a partir de perfis de RAPD das espécies *A. montana*, *B. orellana*, *C. officinalis*, *C. tinctorius*, *C. vernus*, *C. longa* e *Hemerocallis* sp. para verificarem a sua presença como potenciais adulterantes em amostras de Açafração (*C. sativus*) comercial. O método foi otimizado no que diz respeito a uma aplicação específica e fiável em material vegetal de tipo comercial (isto é, seco ou armazenado), a fim de complementar os métodos farmacognósticos e químicos existentes. Este método permitiu a deteção inequívoca de baixas quantidades (até 1%) de espécies adulterantes em ambos os lotes, artificiais e comerciais (Figura 13), em conformidade com os requisitos da norma ISO 3632-2:2010 [103], e cujos protocolos oficiais não conseguem detetar sem recorrer a análises dispendiosas e complexas.

No seguimento do estudo anterior [41], o método SCAR foi aplicado a vários alimentos contendo ou compostos por Açafração (*C. sativus*) para a deteção de adulterações/contaminações com as sete espécies comuns acima referidas e utilizadas como agentes para aumento de volume. Os resultados mostraram que 21% das amostras analisadas tinham sido adulteradas e duas delas com mais do que um agente (Figura 14) [107]. O método atendeu assim às necessidades atuais do mercado e poderá ser usado para analisar grandes lotes de Açafração antes de prosseguir com a sua classificação, excluindo preventivamente aqueles falsificados com agentes, que de outra forma, passariam despercebidos [42]. Para além disso, poderá ser utilizado em alimentos processados contendo Açafração, em alguns casos como alternativa a abordagens que tenham sérias limitações em termos de fiabilidade, sensibilidade, tempo ou número de

amostras a analisar, como análises por microscopia ou por espectrofotometria UV [107].

Tabela 4 – Adulterações mais comuns em *Crocus sativus* L. Adaptado de: [108]

Formas de adulteração	Descrição
Sem adição de substâncias estranhas	Mistura com Açafrão condensado ou mais velho
Adição de diferentes partes da planta de Açafrão	-
Adição de substâncias que aumentem o peso	<ol style="list-style-type: none"> 1. Aumento da humidade 2. Imersão em xarope, mel, glicerina ou azeite 3. Adição de sulfato de bário, sódio, cálcio, carbonato de cálcio, hidróxido de potássio, nitrato de potássio, tartarato de monopotássio, borato de sódio, lactose, amido ou xaropes de glucose
Adição de partes de outras plantas	<ol style="list-style-type: none"> 1. Flores de <i>Carthamus tinctorius</i> 2. Flores de <i>Calendula officinalis</i> 3. Estigmas de outros tipos de Açafrão mais curtos e sem propriedades de corante (<i>Crocus vernus</i>, <i>Crocus speciosus</i>, etc.) 4. <i>Rhoeas</i> L., <i>Punica granatum</i>, <i>Arnica montana</i>, <i>Scolimus hispanicus</i>, flores cortadas em fatias. 5. Periantos de flores como cravos 6. Pimenta vermelha 7. Plantas herbáceas cortadas em porções e coradas em corantes azóicos 8. Pequenas raízes de <i>Allium porrum</i> 9. Madeira de sândalo e pó de madeira Campeche 10. Curcuma
Adição de substâncias de origem animal	Fibras de carne salgada e seca
Adição de substâncias artificiais	Fibras coloridas de gelatina
Adição de substâncias orgânicas corantes	Tropeolina, fucsina, ácido pícrico, tartarazina, eritrocina, azorrubina, amarelo alaranjado, amarelo naftanol, rocelina, etc.

Javanmardi et al. [109] desenvolveram marcadores SCAR específicos para *Carthamus tinctorius* a partir de duas bandas obtidas por RAPD. A aplicação do método a misturas com proporções conhecidas de pétalas de cártamo em Açafrão (*C. sativus*) permitiu a deteção de 1% de cártamo, considerando o método apropriado para a identificação de fraudes com pétalas de cártamo.

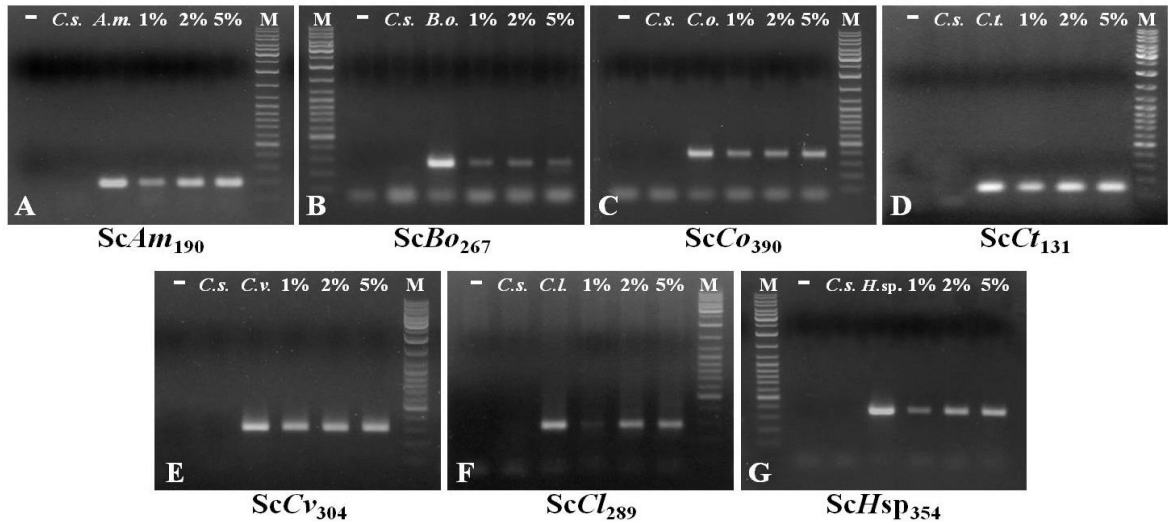


Figura 13 – Produtos de PCR a partir de marcadores SCAR. Em todos os géis: (-) controlo negativo; C.s., ADN de estigmas secos de *C. sativus*; **M** – marcador molecular. **A** – PCR realizada com o *primer* ScAm190 específico para *Arnica montana*: A.m., ADN a partir de pétalas secas de *A. montana*; 1%, 2%, 5%, ADN a partir de misturas de *C. sativus* e *A. montana*. **B** – PCR realizada com o *primer* ScBo267 específico para *Bixa orellana*: B.o., ADN a partir de sementes secas de *B. orellana*; 1%, 2%, 5%, ADN a partir de misturas de *C. sativus* e *B. orellana*. **C** – PCR realizada com o *primer* ScCo390 específico para *Calendula officinalis*: C.o., ADN a partir de pétalas secas de *C. officinalis*; 1%, 2%, 5%, ADN a partir de misturas de *C. sativus* e *C. officinalis*. **D** – PCR realizada com o *primer* ScCt131 específico para *Carthamus tinctorius*: C.t., ADN a partir de pétalas secas de *C. tinctorius*; 1%, 2%, 5%, ADN a partir de misturas de *C. sativus* e *C. tinctorius*. **E** – PCR realizada com o *primer* ScCv304 específico para *Crocus vernus*: C.v., ADN a partir de estigmas secos de *C. vernus*; 1%, 2%, 5%, ADN a partir de misturas de *C. sativus* e *C. vernus*. **F** – PCR realizada com o *primer* ScCl289 específico para *Curcuma longa*: C.l., ADN a partir de rizomas secos de *C. longa*; 1%, 2%, 5%, DNA a partir de misturas de *C. sativus* e *C. longa*. **G** – PCR realizada com o *primer* ScHsp354 específico para *Hemerocallis* sp.: H.sp., ADN a partir de pétalas secas de *Hemerocallis* sp.; 1%, 2%, 5%, ADN a partir de misturas de *C. sativus* e *Hemerocallis* sp. Fonte: [42].

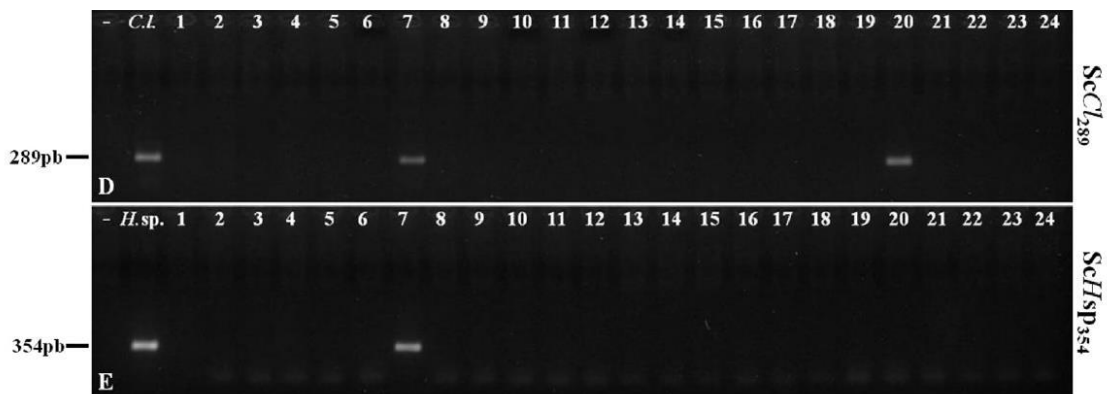


Figura 14 – Produtos de PCR com marcadores SCAR de amostras comerciais de Açafão (*C. sativus*) (linhas 1-17) e alimentos contendo Açafão como ingrediente (linhas 18-24). **D** – PCR realizada com os *primers* ScCl289 específicos para *Curcuma longa*. **E** – PCR realizada com os *primers* ScHsp354 específicos para *Hemerocallis* sp. (-) Controlo negativo; C.l. - ADN de rizomas secos de *C. longa*; H.sp. – ADN de tépalas de *Hemerocallis* sp. Adaptado de: [107].

Babaei et al. [73] desenvolveram marcadores SCAR específicos para *C. sativus* e *primers* baseados em sequências ITS específicos para *Carthamus tinctorius*. Para além disso, realizaram uma PCR multiplex de modo a utilizar simultaneamente os marcadores SCAR e ITS. A combinação dos dois tipos de marcadores levou ao aparecimento de dois produtos de PCR distintos, um para o Açafrão e outro para o cártamo (Figura 15). Desta forma, desenvolveram um método específico e reproduzível para a deteção de adulterantes, como *C. tinctorius*, em amostras comerciais de *C. sativus*, com a vantagem de poder analisar as duas espécies numa única amplificação por PCR em multiplex.

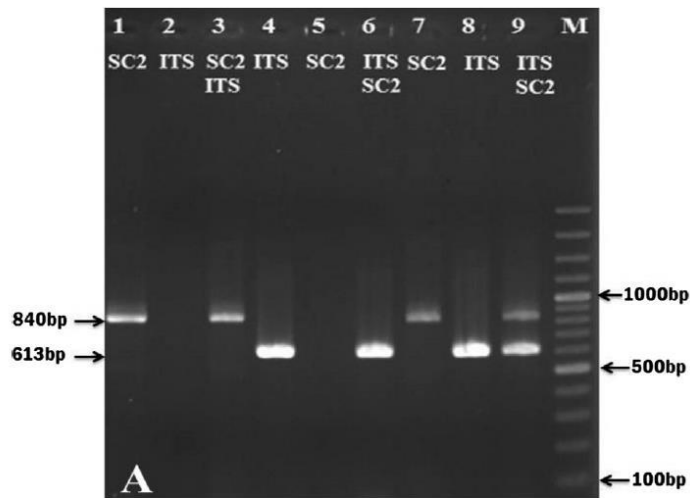


Figura 15 – Amplificação por PCR simples e multiplex com *primers* SC2 e ITS de amostras de *Crocus sativus* e *Carthamus tinctorius*. M: marcador molecular; Linhas 1-3: Açafrão autêntico; 4-6: Cártamo; 7-9: Mistura de Açafrão e Cártamo. Adaptado de: [73].

4 Objetivos e âmbito do trabalho

Devido ao elevado valor comercial e baixa disponibilidade do Açafrão, *Crocus sativus* L., esta especiaria tem sofrido constantemente adulterações intencionais, principalmente para baixar o custo de produção, mas sem qualquer alteração no custo de venda ao consumidor. De modo a proteger os direitos do consumidor e evitar fraudes alimentares, torna-se essencial o desenvolvimento de métodos para deteção destas adulterações de forma a garantir a autenticidade dos produtos.

Assim, o objetivo deste trabalho centrou-se no desenvolvimento de marcadores moleculares para avaliação da autenticidade do Açafrão, utilizando as técnicas PCR qualitativa e PCR em tempo real acoplada a uma análise por HRM. Em primeiro lugar teve que se proceder ao estudo de um método de extração de ADN que fornecesse extratos de quantidade e pureza adequadas para amplificação por métodos de PCR. O desenvolvimento de técnicas de análise de ADN foi então o principal objetivo que passou pela utilização das regiões de *DNA barcode* – ITS e *matK* – para além de marcadores SCAR em diferentes amostras de *Crocus sativus* L. e outras espécies do mesmo género. A deteção de *Carthamus tinctorius*, como espécie potencialmente adulterante, foi também objeto de estudo neste trabalho.

Pretendeu-se ainda validar a aplicação dos métodos desenvolvidos na autenticação de amostras reais de estigmas de Açafrão, como ferramentas rápidas, sensíveis e eficazes na distinção e identificação de diferentes espécies *Crocus*, mas também na deteção de possíveis adulterantes.

Componente experimental

5 Metodologia

5.1 Descrição e preparação das amostras

Para a realização deste estudo foram adquiridas 26 amostras de *Crocus sativus*, *Carthamus tinctorius* e diferentes espécies do género *Crocus* provenientes de vários locais (Figura 16, Tabela 5). Foram utilizadas folhas liofilizadas fornecidas pelo Banco de Germoplasma Vegetal de Cuenca, folhas frescas provenientes da Arabia Saudita e colhidas em Cinfães, Portugal. Utilizaram-se bolbos de *Crocus sativus* e *Crocus cartwrightianus* “Albus”. Foram também usadas amostras comerciais de estigmas secos de Açafrão e de *Carthamus tinctorius*, bem como estigmas frescos de Açafrão selvagem, para além de uma amostra de Açafrão em pó proveniente da Grécia. Adicionalmente, foram realizadas misturas de estigmas do adulterante *Carthamus tinctorius* em duas amostras de Açafrão autêntico.

Os bolbos foram triturados com recurso a um moinho de lâmina dupla (Grindomix GM200, Retsch, Alemanha), as folhas liofilizadas, secas e os estigmas foram triturados num almofariz com a ajuda de azoto líquido, no caso das folhas. Para evitar a ocorrência de contaminações todo o material foi lavado e esterilizado antes e após a sua utilização para preparação das amostras. Todas as amostras foram armazenadas em recipientes esterilizados e armazenadas a uma temperatura de -20°C.



Figura 16 – Amostras utilizadas na realização deste estudo.

Tabela 5 – Descrição das amostras utilizadas com as respetivas origens.

Código	Tipo de amostra	Informações gerais
CS	Bolbos	<i>Crocus sativus</i> – Safran du Gâtinais. Origem: França
CA	Bolbos	<i>Crocus cartwrightianus</i> "Albus"– Safran du Gâtinais. Origem: França
CT	Flores secas	<i>Carthamus tinctorius</i> – mercado Istambul. Origem: Turquia
CR01	Folhas liofilizadas	<i>Crocus sativus</i> – Banco de Germoplasma Vegetal de Cuenca. Origem: Itália
CR02	Folhas liofilizadas	<i>Crocus olivieri balausae</i> – Banco de Germoplasma Vegetal de Cuenca. Origem: Desconhecida
CR03	Folhas liofilizadas	<i>Crocus sativus</i> – Banco de Germoplasma Vegetal de Cuenca. Origem: Grécia
CR04	Folhas liofilizadas	<i>Crocus sativus</i> – Banco de Germoplasma Vegetal de Cuenca. Origem: Espanha
CR05	Folhas liofilizadas	<i>Crocus sativus</i> – Banco de Germoplasma Vegetal de Cuenca. Origem: Azerbaijão
CR06	Folhas liofilizadas	<i>Crocus sativus</i> – Banco de Germoplasma Vegetal de Cuenca. Origem: Irão
CR07	Folhas liofilizadas	<i>Crocus sativus</i> – Banco de Germoplasma Vegetal de Cuenca. Origem: França
CR08	Folhas liofilizadas	<i>Crocus kosaninii</i> – Banco de Germoplasma Vegetal de Cuenca. Origem: Desconhecida
CR09	Folhas liofilizadas	<i>Crocus kotschyanus</i> – Banco de Germoplasma Vegetal de Cuenca. Origem: Desconhecida
CR10	Folhas liofilizadas	<i>Crocus speciosus</i> – Banco de Germoplasma Vegetal de Cuenca. Origem: Desconhecida
CR11	Folhas frescas	<i>Crocus</i> sp. selvagem. Origem: Cinfães
CR12	Estigmas frescos	<i>Crocus</i> sp. selvagem. Origem: Cinfães
CR13	Estigmas secos	<i>Crocus sativus</i> . Origem: Desconhecida
CR14	Estigmas secos	<i>Crocus sativus</i> – Aba-Sheba Saffron. Origem: Arabia Saudita
CR15	Estigmas secos	<i>Crocus sativus</i> – Bahraman Saffron. Origem: Irão
CR16	Estigmas secos	<i>Crocus sativus</i> – Azafran de La Mancha, Cefran. Origem: Espanha
CR17	Estigmas secos	<i>Crocus sativus</i> - Azafran de La Mancha. Origem: Espanha
CR18	Estigmas secos	<i>Crocus sativus</i> . Azafrán en Hebras, Ducros. Origem: Espanha
CR19	Mistura	10% de <i>Carthamus tinctorius</i> em <i>Crocus sativus</i> (CR15)
CR20	Mistura	10% de <i>Carthamus tinctorius</i> em <i>Crocus sativus</i> (CR16)
CR21	Estigmas secos	<i>Crocus sativus</i> – Zafferano di Sardegna DOP, Itria. Origem: Itália
CR22	Folhas secas	<i>Crocus sativus</i> - Two year old farm. Origem: Arabia Saudita
CR23	Folhas secas	<i>Crocus sativus</i> - One year old farm. Origem: Arabia Saudita
CR24	Folhas secas	<i>Crocus sativus</i> Cashmerianus Hort. Origem: Arabia Saudita
CR25	Açafrão em pó	<i>Crocus sativus</i> – Krokos Kozanis. Origem: Grécia

5.2 Reagentes e soluções

Solução de Proteinase K (20 mg/mL)

Pesaram-se 20 mg de Proteinase K, adicionou-se 1 mL de água ultra-pura e armazenou-se a uma temperatura de -20°C.

CTAB1-PVP

Pesaram-se 2 g do reagente CTAB e 1 g de PVP-40 e juntaram-se 10 mL de Tris HCl (1M), 4 mL de EDTA (500 mM) e 28 mL de NaCl (5 M). Após dissolver a mistura em água desionizada, corrigiu-se o pH para 7,5 com HCl e completou-se o volume até 100 mL. A solução foi autoclavada e armazenada à temperatura ambiente.

CTAB2

Pesaram-se 0,5 g do reagente CTAB e juntaram-se 800 µL de NaCl (5 M). Completou-se o volume com água desionizada até 100 mL, sendo que a solução foi autoclavada e armazenada à temperatura ambiente.

Tampão TE 0,1x

Para obter a solução TE 1x juntaram-se 0,5 mL de solução Tris (1 M) e 0,1 mL de EDTA (0,5 M), completando-se o volume até 50 mL com água desionizada. A solução TE 0,1x obteve-se por diluição da solução TE 1x em água desionizada. Posteriormente, a solução foi autoclavada a 121°C durante 15 minutos.

Tampão SGTB 1x

Adicionaram-se 100 mL de SGTB 20x (GRiSP Research Solutions, Porto, Portugal) até perfazer 2 L com água desionizada.

Solução de dNTP

Adicionaram-se 50 µL de cada dNTP a 1800 µL de água ultra-pura e armazenou-se a -20°C.

Tampão de carregamento 6x

Pesaram-se 4 g de sacarose e 5 mg de azul de bromofenol e dissolveu-se em 5 mL de água desionizada. Adicionaram-se 2,4 mL de EDTA (0,5 M) e completou-se o volume até 10 mL com água desionizada. Após autoclavagem a solução foi armazenada a -20°C.

5.3 Extração de ADN

Testaram-se diferentes métodos de extração de ADN de modo a identificar o mais adequado para cada tipo de amostra, em termos de rendimento e pureza dos extratos. Assim, testaram-se os métodos: DNeasy Plant baseado no kit comercial DNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN, GmbH, Hilden, Alemanha); CTAB baseado no protocolo descrito por Mafra et al. [110], ao qual foram efetuadas algumas alterações; e Nucleospin baseado no kit comercial NucleoSpin® Food kit (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha), também com algumas modificações.

5.3.1 Método DNeasy Plant

Pesaram-se 50 a 100 mg de cada amostra para tubos estéreis de 2 mL. Para promover a lise das células adicionaram-se 400 µL do reagente AP1 pré-aquecido a 65°C e 4 µL de RNase A a cada tubo, agitou-se vigorosamente no vórtex e incubou-se durante 10 min a 65°C num termobloco (Eppendorf Thermomixer Comfort, Hamburg, Alemanha) com uma agitação de 900 rpm. Durante a incubação inverteram-se os tubos 2 vezes. De seguida, adicionaram-se 130 µL de P3, agitou-se e incubou-se 5 min em gelo. Posteriormente, realizou-se uma centrifugação a 17000xg durante 5 min. Montou-se a coluna QIAshredder fornecida pelo kit com os tubos contendo as amostras e centrifugou-se novamente a 17000xg durante 2 min, de modo a filtrar o lisado. Após rejeitar as colunas, transferiu-se o sobrenadante para tubos estéreis de 2 mL e adicionou-se AW1 na proporção de 1,5x o volume da amostra para ajustar as condições de ligação do ADN à coluna. Montou-se então a coluna DNeasy fornecida pelo mesmo kit e, para promover esta ligação, transferiu-se até cerca de 650 µL de cada amostra para as colunas e centrifugou-se 1 min a 10000xg. Rejeitou-se o sobrenadante, carregou-se a coluna com o restante volume da amostra, voltando-se a centrifugar. Seguidamente adicionaram-se 500 µL de AW2 às colunas, centrifugou-se 1 min a 10000xg e rejeitou-se o sobrenadante. Adicionaram-se novamente 500 µL de AW2 às colunas (no caso das amostras de estigmas repetiu-se este passo até desaparecer a cor), centrifugou-se 2 min a 17000xg e rejeitou-se o líquido. Logo após, as colunas foram colocadas em tubos estéreis de 1,5 mL e adicionaram-se 25 ou 50 µL (respetivamente para estigmas ou folhas) de AE pré-aquecido a 65°C, incubou-se durante 5 min à temperatura ambiente (20-25°C), centrifugou-se 1 min a 10000xg, de modo a eluir o ADN, e repetiu-se o último passo, obtendo-se assim um extrato final com 50 ou 100 µL, respetivamente no caso dos estigmas ou folhas.

5.3.2 Método CTAB

Pesaram-se 100 mg de cada amostra para tubos estéreis de 2 mL e adicionaram-se 1000 µL de CTAB1-PVP (2% CTAB (m/v); 0,1 mol/L Tris; 1,4 mol/L NaCl; 1% PVP-40 (polivilpirroliona (m/v); 0,02 mol/L EDTA; pH 8,0) pré-aquecido a 65°C e 20 µL de β-mercaptoetanol. Todos os tubos foram sujeitos a uma agitação vigorosa (vórtex) e incubados durante 1 hora a 65°C num termobloco, a uma agitação de 900 rpm. A cada 15 minutos os tubos foram sujeitos a nova agitação em vórtex. No final da incubação realizou-se uma centrifugação durante 15 min a 17000xg e a uma temperatura de 4°C. De seguida, extraíram-se aproximadamente 650 µL do sobrenadante para um tubo estéril de 1,5 mL, centrifugou-se novamente a 17000xg durante 5 min à mesma temperatura e extraíram-se 600 µL de sobrenadante para um tubo estéril de 1,5 mL juntamente com 500 µL de clorofórmio. Agitou-se vigorosamente durante 20 s e centrifugou-se durante 10 min a 12000xg e a uma temperatura de 4°C. Posteriormente, separou-se a fase superior para um tubo estéril de 2 mL e adicionaram-se duas partes em volume da solução CTAB2 (0,5% CTAB (m/v); 0,04 mol/L NaCl) para favorecer a precipitação. Incubou-se tudo à temperatura ambiente durante 60 min, ao fim dos quais se efetuou uma centrifugação a 12000xg durante 10 min e a uma temperatura de 4°C. Após descartar o sobrenadante, dissolveu-se o precipitado em 350 µL de NaCl (1,2 M) e em 350 µL de clorofórmio, agitou-se vigorosamente durante 30 s em vórtex e centrifugou-se a 12000xg durante 10 min a uma temperatura de 4°C. Separou-se a fase superior para tubos estéreis de 1,5 mL, adicionaram-se 0,6 partes em volume de isopropanol (-20°C) e agitou-se por inversão. Centrifugou-se novamente a 12000xg durante 10 min e a 4°C, rejeitou-se o sobrenadante e adicionaram-se 500 µL de etanol (70 % (v/v) a -20 °C) para precipitar o ADN. Após misturar cuidadosamente por inversão centrifugou-se mais uma vez a 12000xg durante 10 min e retirou-se o solvente com a ajuda de uma micropipeta, secando os tubos em estufa durante 30 min a 50°C. Por último, adicionaram-se 100 µL de TE (10 mmol/L Tris e 1 mmol/L EDTA) ao precipitado e deixou-se dissolver durante a noite com agitação suave (300 rpm) a 10°C, de modo a promover uma melhor hidratação dos extratos.

5.3.3 Método NucleoSpin

Pesaram-se 100 mg de cada amostra para tubos estéreis de 2 mL, aos quais se adicionaram 550 µL do tampão de lise CF pré-aquecido a 65°C e 10 µL de proteinase K para promover a lise das células. Todos os tubos foram incubados a 65°C durante 60 min num termobloco a 900 rpm, com agitação vigorosa de 20 em 20 min. Posteriormente, efetuou-se uma centrifugação a 17000xg durante 15 min (4°C), ao fim da qual se

recolheu o sobrenadante para tubos estéreis de 1,5 mL, seguida de nova centrifugação durante 5 min nas condições anteriores. Ao sobrenadante recolhido adicionou-se um volume idêntico do tampão C4 e de etanol, para ajustar as condições de ligação do ADN à coluna, e misturou-se por inversão cuidadosa durante 30 s. Montou-se assim a coluna no tubo de recolha, pipetaram-se no máximo 700 μ L de cada amostra e centrifugou-se 1 min a 11000xg. Rejeitou-se o líquido eluído e repetiu-se este procedimento com a restante amostra. Para lavagem, adicionaram-se 400 μ L do tampão CQW na coluna, centrifugou-se durante 1 min a 11000xg e rejeitou-se o líquido eluído, adicionaram-se 700 μ L do tampão C5 à coluna, realizou-se outra centrifugação durante 1 min a 11000xg e rejeitou-se o líquido eluído, adicionaram-se 200 μ L do tampão C5 e centrifugou-se mais uma vez a 11000xg durante 2 min de modo a remover completamente o tampão. Colocou-se a coluna num novo tubo estéril de 1,5 mL e adicionaram-se 100 μ L do tampão de eluição CE, pré-aquecido a 70°C. Incubou-se 5 min à temperatura ambiente (20-25°C) e centrifugou-se 1 min a 11000xg para eluir o ADN, obtendo-se assim os extratos finais.

Como controlo dos reagentes de extração, foram realizados brancos em todas as extrações. Os extratos obtidos foram então armazenados a -20°C até amplificação por PCR.

5.4 Avaliação ADN extraído

A avaliação da concentração e pureza do ADN extraído foi efetuada por espectrofotometria UV com Leitor de Microplacas Multidetecção Synergy™ HT e o dispositivo Take3 (Biotek Instruments, Winooski, Estados Unidos da América), que é específico para leitura UV de extratos de ácidos nucleicos. A determinação da concentração e pureza dos extratos foi efetuada usando o *software* de análise de dados Gen5 v2.01 por medição das absorvências (A) a 260 nm e 280 nm. Estes comprimentos de onda correspondem às absorvências máximas de ácidos nucleicos e proteínas, respetivamente. Devido ao facto destas moléculas absorverem parcialmente nestes comprimentos de onda, a razão entre estes dois valores (A₂₆₀/A₂₈₀) fornece a pureza dos extratos de ADN, ou seja, indica o nível de contaminação dos extratos com proteínas, sendo que valores de aproximadamente 1,8 representam extratos com elevada pureza [111]. A determinação dos valores da concentração de ADN dos extratos (em ng/ μ L) foi obtida pelo *software*, procedendo-se seguidamente à sua diluição para uma concentração de 25 ng/ μ L para posterior amplificação por PCR.

A integridade dos extratos de ADN de todas as amostras foi avaliada através de

uma eletroforese de ADN genómico em gel de agarose a 1% em tampão SGTB 1x (GRiSP Research Solutions, Porto, Portugal) e corado com Gel Red 1x (Biotium, Hayward, CA, Estados Unidos da América). A eletroforese decorreu durante 25 min a uma tensão elétrica de 200 V. Em cada poço colocaram-se 2 μ L de tampão de carregamento 6x previamente misturados com 5 μ L de cada amostra. Como marcador de massa molecular utilizou-se o marcador HiperLadder I (Bioline, Londres, Reino Unido), adicionando-se 5 μ L do marcador diretamente no gel de agarose. O gel foi então visualizado com recurso a um transiluminador de luz UV e a imagem digital foi adquirida utilizando um sistema fotográfico Kodak Digital Science™ DC120 (Rochester, NY, Estados Unidos da América) e analisada pelo *software* Kodak Digital Science™ 1D.

5.5 Amplificação por PCR

5.5.1 Oligonucleótidos

Os *primers* utilizados neste trabalho estão descritos na Tabela 6. Todos os *primers* específicos para o género *Crocus* e para a espécie *Carthamus tinctorius* foram desenhados propositadamente para este estudo através do programa *Primer3 Output designing tool* (<http://frodo.wi.mit.edu/>) e ajustados manualmente quando necessário. O *software* Oligo Calc (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>) foi também utilizado para confirmar as propriedades dos *primers* e verificar a ausência de formação de *hairspins* ou auto-hibridação. A especificidade dos *primers* foi estudada através da ferramenta *Primer-Blast* que permite revelar as homologias de um par de *primers* relativamente a todas as sequências presentes na base de dados do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). A síntese dos novos *primers* foi efetuada pela empresa Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Alemanha).

5.5.2 PCR qualitativa

Para a amplificação por PCR qualitativa utilizou-se água ultrapura (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), tampão (670 mM Tris-HCl, pH 8.8, 160 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1% Tween 20), MgCl_2 , dNTP (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha), enzima SuperHot Taq Polymerase™ (Genaxxon Bioscience GmbH, Alemanha), *primers* (Tabela 6) e extrato de ADN para um volume final de 25 μ L, consoante as quantidades apresentadas na tabela 7. As reações de amplificação foram efetuadas num termociclador MJ Mini™ Gradient Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Estados Unidos da América) com condições de tempo e temperatura diferentes para cada *primer* e indicadas na Tabela 8. Para cada

reação foi sempre incluído um controlo negativo (CN) para os reagentes da amplificação em que se substituiu o extrato de ADN por água ultra-pura.

Tabela 6 – Oligonucleótidos utilizados para a PCR qualitativa.

Espécie	Primers	Sequência (5' → 3')	Alvo	Amplicação (pb)	Referência
<i>Crocus</i> sp.	ITS-CS-F ITS-CS-R1	GATCGCGAACGTGTTACACCAT TATATCCACGCCTGCGTCCCT	ITS1	226	DQ094185.2*
	MKCS-F MKCS-R	TCGATTCGTGCGTTACCATCACAC TCTTTGAAGGACCATAGGGTTCCA	<i>matK</i>	606	AB017325.1*
	ITS-CS-F ITS-CS-R2	GATCGCGAACGTGTTACACCAT TCTGATTCCGAGGACGGTTC	ITS2	641	DQ094185.2*
	CS-F CS-R	CTACGTTCCAGTTCGCTGTTTG GTGGTGTGCTGGTAGACTGAAA	SCAR marker	274	KC353365.1*
<i>C. tinctorius</i>	ITS-CT-F ITS-CT-R1	GGATTGGGTGTGAGCCTTAGC ATGGTCTGGGGCGACGCGAT	ITS1	382	FJ539127.1*
	ITS-CT-F ITS-CT-R2	GGATTGGGTGTGAGCCTTAGC GCTTAAACTCAGCGGGTAGTCC	ITS2	620	FJ539127.1*
Eucariotas (18S rRNA)	18SRG-F 18SRG-R	CTGCCCTATCAACTTTCGATGGTA TTGGATGTGGTAGCCGTTTCTCA	18S rARN	113	HQ873432.1

* Número de acesso do GenBank utilizado no desenho de *primers* este trabalho.

Tabela 7 – Componentes e respetivas quantidades utilizados nas amplificações por PCR qualitativa com diferentes *primers*.

Componente (µL)		Água ultrapura	Tampão (10x)	MgCl ₂ (25 mM)	dNTP (2,5 mM cada)	Primer Forward (10 µM)	Primer Reverse (10 µM)	Taq Polimerase (5 U/µL)	Extrato de ADN (25 ng/µL)	Volume Total
<i>Crocus</i> sp.	ITS-CS-F/ ITS-CS-R1	15,8	2,5	2,0	2,0	0,25	0,25	0,2	2,0	25,0
	MKCS-F/ MKCS-R	14,8	2,5	3,0	2,0	0,25	0,25	0,2	2,0	25,0
	ITS-CS-F/ ITS-CS-R2	16,3	2,5	1,5	2,0	0,25	0,25	0,2	2,0	25,0
	CS-F/ CS-R	14,8	2,5	3,0	2,0	0,25	0,25	0,2	2,0	25,0
<i>C. tinctorius</i>	ITS-CT-F/ ITS-CT-R1	15,8	2,5	2,0	2,0	0,25	0,25	0,2	2,0	25,0
	ITS-CT-F/ ITS-CT-R2	16,3	2,5	1,5	2,0	0,25	0,25	0,2	2,0	25,0
Eucariotas	18SRG-F/ 18SRG-R	15,5	2,5	1,5	2,0	0,6	0,6	0,2	2,0	25,0

A fim de visualizar os produtos obtidos nas amplificações, todos os fragmentos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão SGTB 1x e corado com Gel Red 1x durante 25 min a 200 V. Em cada poço, adicionaram-se 4 µL de tampão de carregamento 6x com 20 µL de produto PCR ou com 2 µL de marcador molecular 100 bp (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). Ao fim da eletroforese, as bandas obtidas foram visualizadas num transiluminador de luz UV, sendo a imagem digital captada por um sistema fotográfico Kodak Digital Science™ DC120 e analisada a partir do *software* Kodak Digital Science™ 1D.

Tabela 8 – Condições utilizadas nas amplificações por PCR qualitativa com diferentes *primers*.

<i>Primers</i>	<i>Crocus sp.</i>				<i>C. tinctorius</i>		Eucariotas							
	ITS-CS-F/ ITS-CS-R1		MKCS-F/ MKCS-R		ITS-CS-F/ ITS-CS-R2		CS-F/ CS-R		ITS-CT-F/ ITS-CT-R1		ITS-CT-F/ ITS-CT-R2		18SRG-F/ 18SRG-R	
<i>Etapas</i>	Temperatura	Temperatura	Temperatura	Duração	Temperatura	Duração	Temperatura	Duração	Temperatura	Duração	Temperatura	Duração	Temperatura	Duração
Desnaturação	95°C	5 min	95°C	5 min	95°C	5 min	95°C	5 min	95°C	5 min	95°C	5 min	95°C	5 min
Amplificação	95°C	30 s	95°C	45 s	95°C	45 s	95°C	30 s	95°C	30 s	95°C	45s	95°C	30 s
	64°C	30 s	58°C	45 s	64°C	45 s	60°C	30 s	60°C	30 s	60°C	45s	65°C	30 s
	72°C	45 s	72°C	60 s	72°C	60 s	72°C	45 s	72°C	45 s	72°C	60s	72°C	30 s
Nº Ciclos	40		40		40		40		40		40		40	
Extensão	72°C	5 min	72°C	5 min	72°C	5 min	72°C	5 min	72°C	5 min	72°C	5min	72°C	5 min

5.5.3 PCR em tempo real e análise *High Resolution Melting* (HRM)

De modo a obter uma técnica que fosse capaz de distinguir as diferentes espécies do género *Crocus* numa única reação, procedeu-se à realização de uma PCR em tempo real acoplada a uma análise por HRM. Assim, a escolha dos *primers* baseou-se na sua capacidade de amplificar ADN de todas as amostras testadas do género *Crocus*. Por estes motivos, neste tipo de análise foi utilizado o par de *primers* codificante para a região ITS1 que em PCR convencional revelaram ter especificidade para o género *Crocus*. Utilizaram-se também os *primers* específicos para a espécie *Carthamus tinctorius* para analisar as amostras de Cártamo e as misturas realizadas com este adulterante.

As amplificações por PCR em tempo real foram realizadas num volume total de 20

μL contendo água ultrapura, 1x SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad Laboratories, Estados Unidos da América), *primers* e extrato de ADN de acordo com as quantidades apresentadas na tabela 9. Cada amostra foi amplificada em triplicado e em cada amplificação foi incluído um controlo negativo, em que se substituiu o extrato de ADN por água ultrapura.

Após as amplificações seguiu-se para a análise HRM, na qual se favoreceu a hibridação da cadeia dupla de ADN seguida da criação de uma curva de desnaturação através da aplicação de condições específicas, que consistiram num aumento de 0,2 °C a cada 10 segundos até se atingirem os 95 °C. As condições de tempo e temperatura utilizadas na PCR em tempo real e na análise por HRM, para cada par de *primers*, estão descritas na tabela 10.

Tabela 9 – Componentes e respetivas quantidades utilizados nas amplificações por PCR em tempo real com diferentes *primers*.

<i>Primers</i>	Componentes (μL)			
	Água ultrapura	SsoFast™ Evagreen® Supermix	<i>Primers</i> (10 μM)	Extrato de ADN (25 ng/ μL)
ITS-CS-F/ ITS-CS-R1	7,4	10	0,3 cada	2
ITS-CT-F/ ITS-CT-R1	6,8	10	0,6 cada	2

Tabela 10 – Condições utilizadas nas amplificações por PCR em tempo real e na análise por HRM com diferentes *primers*.

<i>Primers</i>	PCR em tempo real			Análise HRM	
	Temperatura	Duração	Nº de ciclos	Temperatura	Duração
ITS-CS-F/ ITS-CS-R1	95°C	5 min	1	95°C	3 min
e ITS-CT-F/ ITS-CT-R1	95°C	30 s	45	65°C	5 min
	65°C	60 s		65°C a 95°C	0,2°C /10 min

As reações foram efetuadas num termociclador CFX96 Real-Time System (Bio-Rad Laboratories, Estados Unidos da América), sendo os dados adquiridos e processados pelo *software* Bio-Rad CFX Manager 3.1 (Bio-Rad, Laboratories, Estados Unidos da América). A análise por HRM foi efetuada com recurso ao *software* Precision Melt Analysis 1.2 (Bio-Rad Laboratories, CA, Estados Unidos da América).

5.5.4 Sequenciação

Para complementar os resultados da PCR em tempo real e da análise HRM procedeu-se à sequenciação de todas as amostras analisadas. Para cada amostra efetuou-se a sequenciação da região ITS1, sendo que foram realizadas duas réplicas e nos sentidos *forward* e *reverse* de modo a ter no total quatro réplicas dos mesmos resultados e garantindo assim uma maior fiabilidade, principalmente nas regiões iniciais e finais da sequência que são mais suscetíveis de erro.

Os produtos de PCR a sequenciar foram amplificados segundo as condições nas Tabelas 7 e 8, duplicando os reagentes para um volume total de 50 µL, com os *primers* ITS-CS-F/ITS-CS-R1 para o género *Crocus* e ITS-CT-F/ITS-CT-R1 para a espécie *Carthamus tinctorius*. A purificação foi realizada através do kit JETquick, PCR Product Purification Spin Kit (Genomed, Löhne, Alemanha), segundo as instruções do fornecedor e a sequenciação foi efetuada pela empresa StabVida (Caparica, Portugal). Os dados obtidos da sequenciação foram analisados e editados manualmente com recurso aos *softwares* BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) e FinchTV (<http://www.geospiza.com/Products/finchtv.shtml>) disponíveis *online*.

6 Resultados e Discussão

6.1 Escolha do método de extração e avaliação da qualidade do ADN extraído

Para cada tipo de amostra realizaram-se diferentes métodos de extração para averiguar qual o mais adequado, fornecendo concentrações e purezas do ADN elevadas. Extratos com níveis de pureza entre 1,7 e 2,1 podem-se considerar de boa qualidade, sendo que o valor óptimo dever-se-á centrar à volta de 1,8. Assim, para os bolbos de *Crocus sativus* L. e *Crocus cartwrightianus* “Albus” testaram-se os três métodos descritos na seção 5.3, ou seja, DNeasy Plant, CTAB e NucleoSpin, para os quais os valores de concentração e pureza se apresentam na Tabela 11. No caso do DNeasy Plant, verifica-se que as concentrações e purezas obtidas foram bastante baixas. Apesar de no CTAB se terem registado purezas elevadas, as concentrações obtidas foram ainda demasiado baixas, por estes motivos considerou-se o método NucleoSpin como o mais adequado para este tipo de amostra, uma vez que forneceu concentrações relativamente elevadas e purezas aceitáveis.

Tabela 11 - Valores das concentrações e purezas do ADN extraído dos bolbos para cada tipo de extração.

Método de Extração	Amostra	Concentração (ng/μL)	Pureza (A260/A280)
DNeasy Plant	CS	3,0	2,18
	CA	5,2	2,29
CTAB	CS	4,9	1,73
	CA	20,7	1,97
NucleoSpin	CS	96,7	2,19
	CA	110,0	2,19

A avaliação da integridade do ADN genómico dos extratos obtidos dos bolbos foi efetuada por eletroforese em gel de agarose e pode ser visualizada na Figura 17, onde se podem observar bandas/arrastamentos de baixo peso molecular. Os poços em que não aparecem bandas ou onde estas têm uma fraca intensidade correspondem aos extratos com uma baixa concentração. Por outro lado, os extratos com maior concentração revelam algum arrastamento que pode ser explicado pela presença de ADN degradado e contaminação com algum ARN.

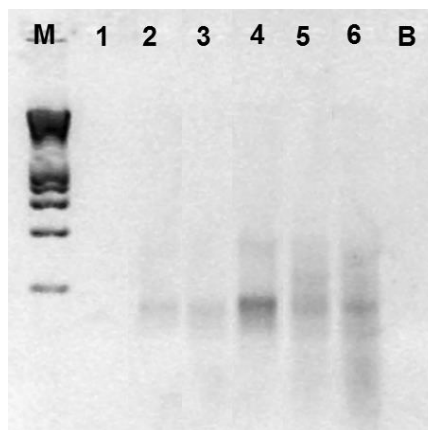


Figura 17 – Eletroforese em gel de agarose de ADN genómico dos bolbos extraído a partir de três diferentes métodos. Linha 1 – *Crocus sativus* extraído pelo método DNeasy Plant; Linha 2 – *Crocus cartwrightianus* “Albus” extraído pelo método DNeasy Plant; Linha 3 – *C. sativus*. extraído pelo método CTAB; Linha 4 – *C. cartwrightianus* extraído pelo método CTAB; Linha 5 – *C. sativus* extraído pelo método NucleoSpin Food; Linha 6 – *C. cartwrightianus* extraído pelo método NucleoSpin. M – marcador molecular HyperLadder I (Bioline, Londres, Reino Unido). B – Branco de extração.

Relativamente à extração de ADN das folhas frescas e liofilizadas procedeu-se à utilização do protocolo CTAB pois em trabalhos anteriores [112] revelou ser o mais adequado para este tipo de matriz. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 12, onde se pode observar um intervalo bastante alargado de concentrações, desde os 69,4 ng/ μ L até os 510 ng/ μ L. Quanto às purezas pode-se verificar que estão todas dentro dos parâmetros aceitáveis para se considerar ADN de boa qualidade.

Tabela 12 – Valores das concentrações e purezas do ADN extraído das folhas de *Crocus* spp. a partir do método CTAB.

Amostra	Concentração (ng/ μ L)	Pureza (A260/A280)
CR01	220,3	2,17
CR02	510,0	1,99
CR03	210,3	2,06
CR04	90,2	2,05
CR05	70,6	2,17
CR06	87,4	2,12
CR07	179,9	1,98
CR08	72,1	1,89
CR09	69,4	1,88
CR10	299,6	2,00
CR11	457,1	1,94
CR22	78,4	1,84
CR23	111,0	2,00
CR24	71,5	1,98

Na Figura 18 está representada a eletroforese em gel de agarose para avaliação da integridade do ADN genómico das amostras de folhas de *Crocus* CR01 a CR11. As bandas obtidas são de elevada massa molecular, com um tamanho superior a 10.000 pb. Todos os extratos apresentam uma elevada integridade, com a exceção da amostra CR11 (Linha 4) que se encontra bastante degradada, o que pode ser explicado pelo facto de esta não ter sido liofilizada antes do seu armazenamento, ao contrário de todas as outras.

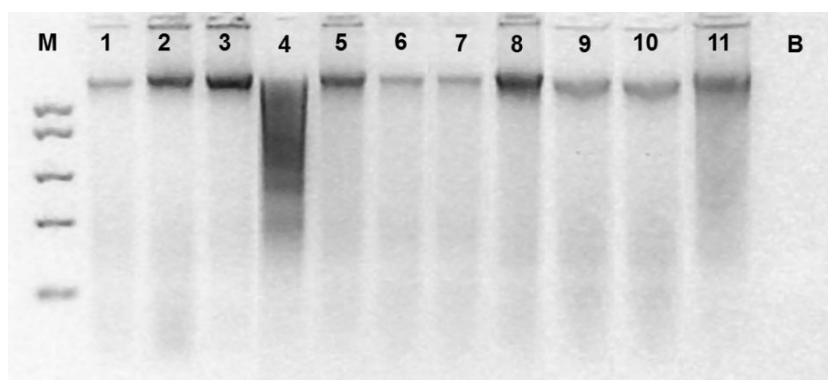


Figura 18 – Eletroforese em gel de agarose de ADN genómico extraído a partir das folhas. Linhas 1, 3, 5-8 – *Crocus sativus*; Linha 2 – *Crocus olivieri balausae*; Linha 4 – Açafrão selvagem; Linha 9 – *Crocus kosaninii*; Linha 10 – *Crocus kotschyanus*; Linha 11 – *Crocus speciosus*; M – marcador molecular HyperLadder I (Bioline, Londres, Reino Unido); B – Branco de extração.

Para escolher qual o método mais adequado para amostras de estigmas de Açafrão ou flores de Cártamo, testaram-se novamente os três métodos CTAB, NucleoSpin e DNeasy Plant. Na Tabela 13 encontram-se os valores das concentrações e purezas obtidas para cada método no caso da amostra de Cártamo (*Carthamus tinctorius* – CT). A maior concentração e pureza do ADN foram fornecidas pelo DNeasy Plant, tendo por isso sido escolhido para extrair as restantes amostras de estigmas e Açafrão em pó.

Tabela 13 – Valores das concentrações e purezas do ADN extraído das flores de *Carthamus tinctorius* para cada tipo de extração.

Tipo de extração	Concentração (ng/μL)	Pureza (A260/A280)
CTAB	20,5	1,58
NucleoSpin	23,6	1,57
DNeasy Plant	48,8	1,80

Os resultados obtidos para a extração do ADN das amostras de estigmas e Açafrão em pó pelo método Dneasy Plant estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 – Valores das concentrações e purezas do ADN extraído dos estigmas e do Açafrão em pó pelo método DNeasy Plant.

Amostra	Concentração (ng/μL)	Pureza (A260/A280)
CR12	4,6	1,49
CR13	83,2	1,82
CR14	43,2	1,85
CR15	36,5	1,94
CR16	12,8	2,07
CR17	26,9	5,34
CR18	38,5	2,10
CR19	32,2	1,93
CR20	26,4	2,70
CR21	30,3	1,97
CR25	25,5	1,48

Os resultados obtidos foram muito variáveis, desde uma concentração de 4,6 ng/μL da amostra CR12, a uma concentração de 83,2 da amostra CR13. O primeiro valor é bastante baixo possivelmente devido ao facto de esta amostra ter sido utilizada fresca e não ter sofrido qualquer tipo de secagem ou liofilização e por isso a presença de humidade talvez não tenha favorecido a extração adequada de ADN. Por outro lado, algumas das purezas também não estão dentro do intervalo de valores mais adequado. As amostras CR12 e CR25 apresentam uma pureza demasiado baixa rondando os 1,5 o que sugere alguma contaminação por proteínas. As amostras CR17 e CR20 apresentam uma pureza muito acima dos níveis normais, indicando a presença de interferentes tais como polifenóis. As restantes amostras apresentam valores dentro dos níveis requeridos.

Na Figura 19 está representada a eletroforese em gel de agarose para avaliação do ADN genómico das amostras de estigmas e Açafrão em pó. Pela observação do gel pode-se verificar que há presença de ADN em todas as amostras, no entanto existe algum arrastamento que não permite tirar nenhuma conclusão acerca da massa molecular dos extratos.

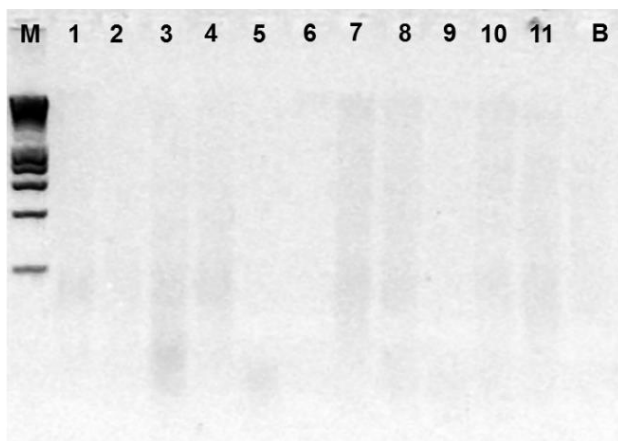


Figura 19 - Eletroforese em gel de agarose de ADN genómico extraído a partir dos estigmas e Açafrão em pó. Linha 1 a 10 – CR12 a CR21. Linha 11 – CR25. M – marcador molecular HyperLadder I (Bioline, Londres, Reino Unido). B – Branco de extração.

6.2 Amplificação por PCR qualitativa

6.2.1 Identificação de Açafrão (*Crocus sativus* L.)

6.2.1.1 *Locus* 18S rARN

Em primeiro lugar, todas as amostras extraídas foram submetidas a uma PCR qualitativa com oligonucleótidos específicos para um gene universal a todas as espécies eucariotas (18SRG-F/18SRG-R) de modo a confirmar a sua capacidade de amplificação. Para além disso, utilizaram-se mais 18 amostras previamente extraídas no laboratório para verificar a reatividade dos *primers* em estudo com outras espécies, nomeadamente diversos condimentos, especiarias e plantas aromáticas.

No caso das amostras em que se testaram diferentes métodos de extração verifica-se, pela observação do aparecimento de bandas do tamanho esperado (113 pb), que mesmo os métodos que apresentaram resultados de baixa qualidade em termos de rendimento e pureza forneceram extratos amplificáveis por PCR qualitativa (Figura 20). Do mesmo modo, como se pode verificar nas Figuras 21 e 22, os restantes extratos das folhas e estigmas apresentaram uma boa capacidade de amplificação.

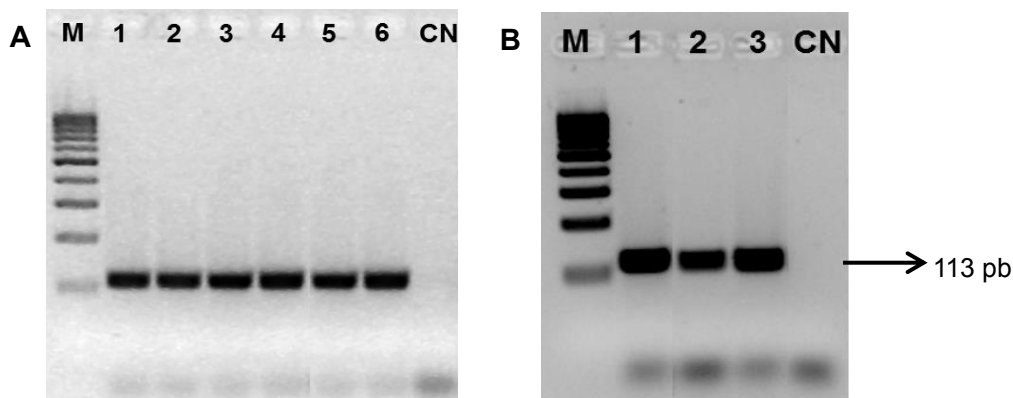


Figura 20 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos dos bolbos e dos estigmas com os *primers* 18SRG-F/18SRG-R. **A)** Linha 1 – *Crocus sativus* extraído pelo método DNeasy Plant; Linha 2 – *Crocus cartwrightianus* “Albus” extraído pelo método DNeasy Plant; Linha 3 – *C. sativus* extraído pelo método CTAB; Linha 4 – *C. cartwrightianus* extraído pelo método CTAB; Linha 5 – *C. sativus* extraído pelo método NucleoSpin; Linha 6 – *C. cartwrightianus* extraído pelo método NucleoSpin. **B)** Linha 1 – *C. tinctorius* extraído pelo método DNeasyPlant. Linha 2 – *C. tinctorius* extraído pelo método CTAB. Linha 3 – *C. tinctorius* extraído pelo método NucleoSpin. M – Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CN – Controlo negativo.

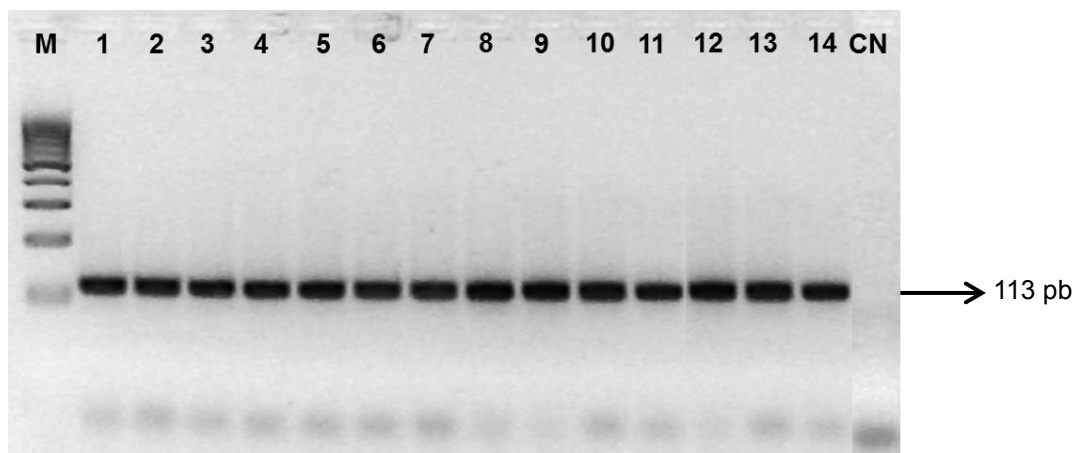


Figura 21 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos das folhas com os *primers* 18SRG-F/18SRG-R. Linhas 1 a 11 – CR01 a CR11; Linhas 12 a 14 – CR22 a CR24. M – Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CN – Controlo negativo.

Na Figura 23 apresentam-se os resultados da amplificação relativamente à avaliação da reatividade cruzada com outros condimentos, especiarias e plantas aromáticas. Na reação também foram incluídas algumas das amostras extraídas para este estudo, nomeadamente uma amostra de *Crocus sativus* (CR01), uma de *C. kosaninii* (CR08), *C. kotschyanus* (CR09), *C. speciosus* (CR10), Açafão selvagem (CR11) e *Carthamus tinctorius* (CT). Como se pode verificar todas as amostras apresentam boa capacidade de amplificação, podendo deste modo ser utilizadas nas análises posteriores.

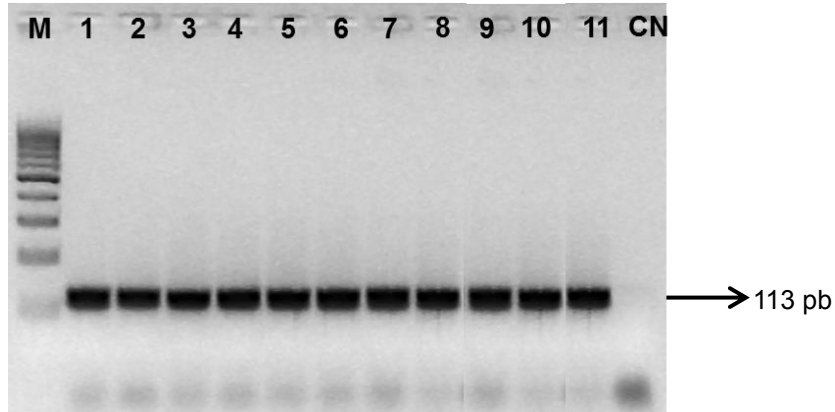


Figura 22 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos dos estigmas e do Açafrão em pó com os *primers* 18SRG-F/18SRG-R. Linhas 1 a 10 – CR12 a CR21. Linha 11 – CR25. M – Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CN – Controlo negativo.

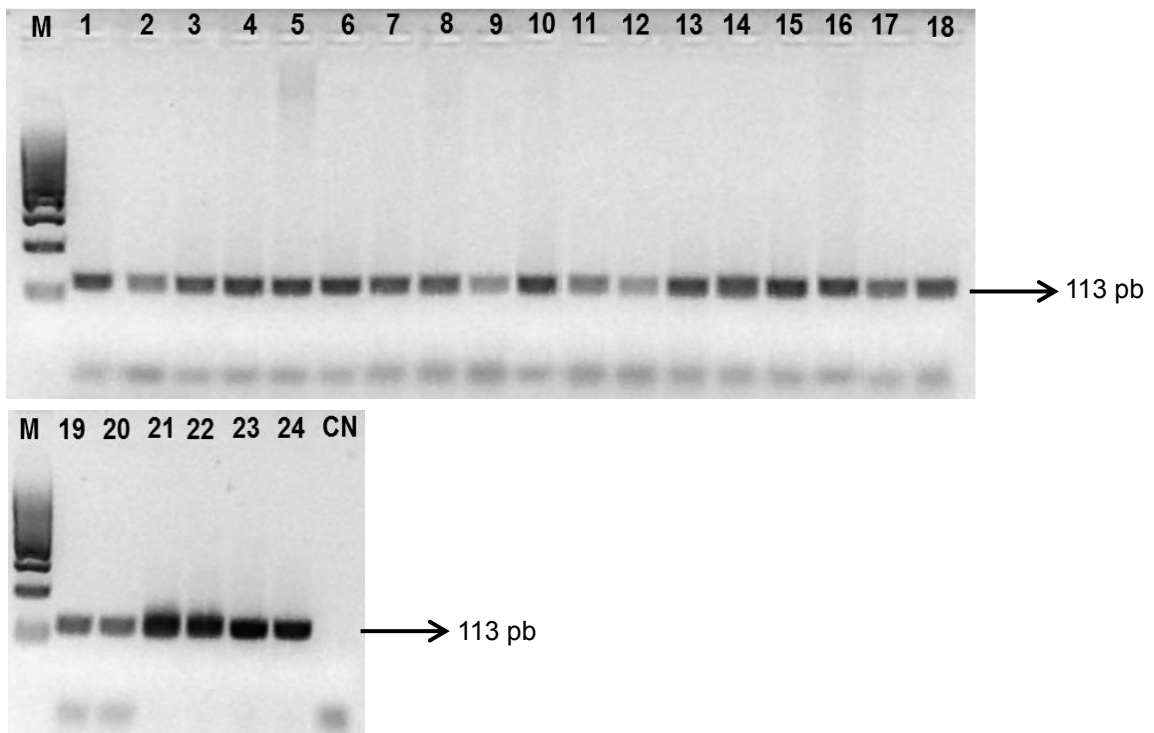


Figura 23 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação das amostras para estudo da reatividade cruzada com os *primers* 18SRG-F/18SRG-R. Linha 1 – CR01; Linha 2 – CT; Linha 3 a 6 – CR08 a CR11; Linha 7 – Cebola; Linha 8 – Alho; Linha 9 – Salsa; Linha 10 – Pimenta branca; Linha 11 – Louro; Linha 12 – Pimentão doce; Linha 13 – Piri-piri; Linha 14 – Erva príncipe; Linha 15 – Funcho; Linha 16 – Dente-de-leão; Linha 17 – Cavalinha; Linha 18 – Cidreira; Linha 19 – Camomila; Linha 20 – Chá verde; Linha 21 – Salvia; Linha 22 – Hortelã-pimenta; Linha 23 – *Hipericum androsaemum*; Linha 24 – *Hipericum perforatum*. M – Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CN – Controlo negativo.

6.2.1.2 *Loci ITS1 e ITS2*

Como já referido, a região ITS é largamente utilizada desde há décadas em estudos filogenéticos de diversos grupos de plantas. O elevado poder de discriminação desta região em baixos níveis taxonómicos é bem conhecido na sistemática molecular de plantas e como consequente, é frequentemente usada como *DNA barcode*. Alguns estudos recentes revelaram algumas preocupações relativamente a este *locus*, e por estes motivos surgiu a possibilidade de utilizar uma das duas regiões em que se divide, ITS1 e ITS2, adjacentes ao *locus* 5.8S [72, 75]. Assim, desenharam-se *primers* que incluíssem cada uma destas regiões, verificando-se a sua especificidade nas amostras analisadas.

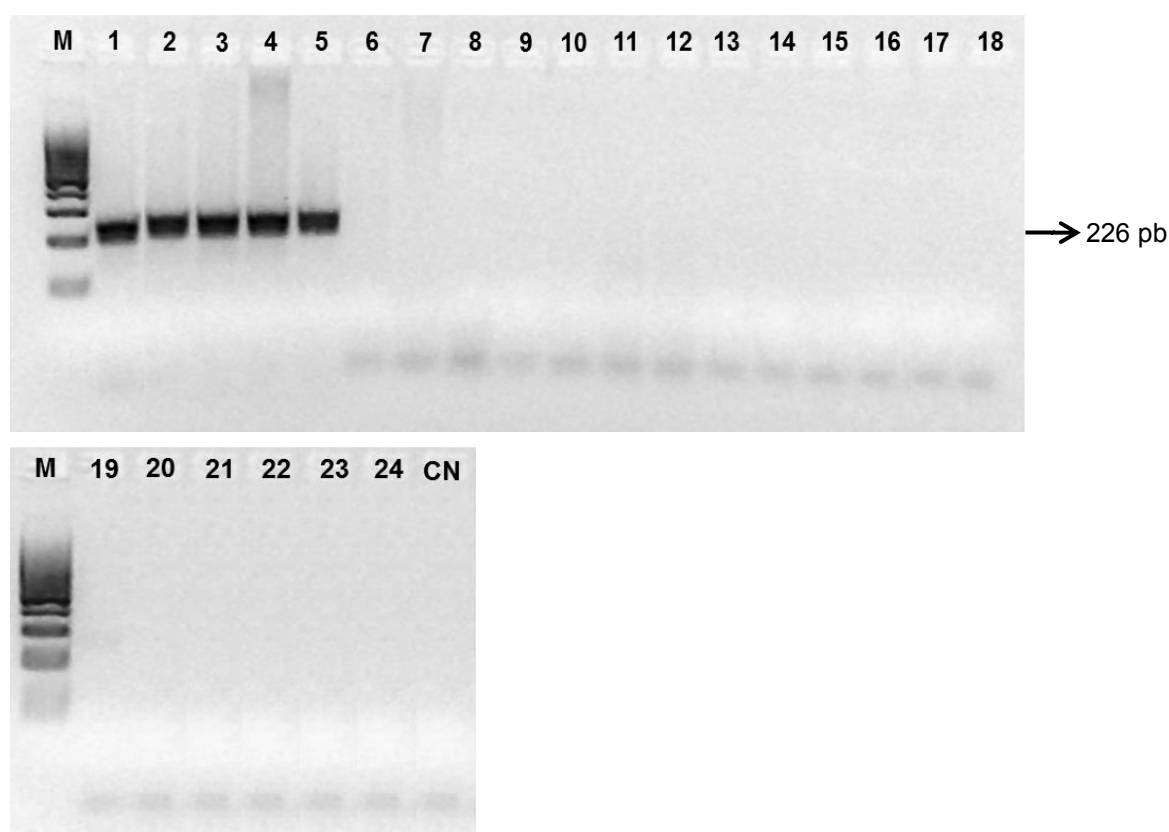


Figura 24 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação das amostras para estudo da reatividade cruzada com os *primers* ITS-CS-F/ITS-CS-R1. Linha 1 – CR01; Linha 2 – CR08; Linha 3 – CR09; Linha 4 – CR10; 5 – CR11; Linha 6 – CT; Linha 7 – Cebola; Linha 8 – Alho; Linha 9 – Salsa; Linha 10 – Pimenta branca; Linha 11 – Louro; Linha 12 – Pimentão-doce; Linha 13 – Piri-piri; Linha 14 – Erva príncipe; Linha 15 – Funcho; Linha 16 – Dente-de-leão; Linha 17 – Cavalinha; Linha 18 – Cidreira; Linha 19 – Camomila; Linha 20 – Chá verde; Linha 21 – Salvia; Linha 22 – Hortelã-pimenta; Linha 23 – *Hipericum androsaeum*; Linha 24 – *Hipericum perforatum*. M – Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CN – Controlo negativo.

Primeiramente otimizou-se a reação com os *primers* ITS-CS-F/ITS-CS-R1 para as condições de temperatura, quantidade de magnésio, número de ciclos e duração de cada etapa de amplificação e, finalmente, testou-se a reatividade cruzada com espécies de plantas usadas como condimentos, especiarias, ou ervas aromáticas. Os resultados obtidos estão representados na Figura 24, onde se pode verificar que estes *primers* amplificaram somente as amostras do género *Crocus*, como comprovado pelo aparecimento de bandas no tamanho esperado, 226 pb, não tendo qualquer reatividade com as outras amostras testadas.

Assim, pôde-se prosseguir para a amplificação da região ITS1 através da realização de uma PCR qualitativa com os primers ITS-CS-F/ITS-CS-R1 para todas as amostras de *Crocus* em estudo. Nas Figuras 25, 26 e 27 podem-se observar os produtos obtidos após separação por eletroforese em gel de agarose. Pode-se verificar que houve amplificação de todas as amostras pelo aparecimento de bandas no tamanho esperado de 226 pb, com exceção da amostra CT, correspondente à amostra de *Carthamus tinctorius* (Figura 27).

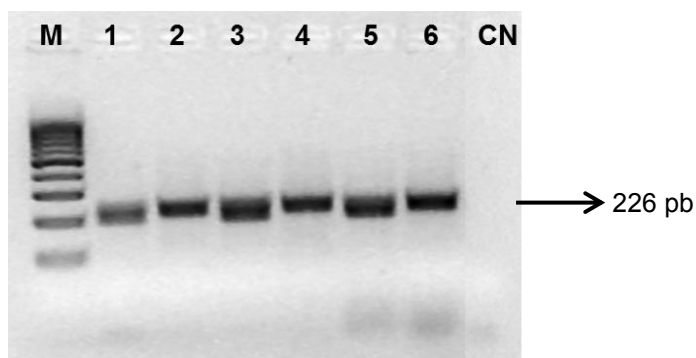


Figura 25 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos dos bolbos com os *primers* ITS-CS-F/ITS-CS-R1. Linha 1 – *Crocus sativus* extraído pelo método DNeasy Plant; Linha 2 – *Crocus cartwrightianus* “Albus” extraído pelo método DNeasy Plant; Linha 3 – *C. sativus* extraído pelo método CTAB; Linha 4 – *C. cartwrightianus* extraído pelo método CTAB; Linha 5 – *C. sativus* extraído pelo método NucleoSpin; Linha 6 – *C. cartwrightianus* extraído pelo método NucleoSpin. M – marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CN – Controlo negativo.

No entanto, os produtos obtidos exibem mais do que uma banda muito próximas, especialmente visíveis nas Figuras 26, 27 e 28. É sabido que *Crocus sativus* é uma planta triploide [113]. Em plantas triploides existem três cópias de cada gene (neste caso em particular o *locus* ITS1). Pode acontecer que haja alguma alteração nas sequências desses genes mesmo sem modificar a sua função, principalmente devido a mutações pontuais, deleções ou inserções. Este facto pode levar ao aparecimento de bandas

adicionais no caso de espécies triplóides se existirem diferenças em alguma das cópias das sequências, fazendo com que apareçam bandas de massa molecular diferente, mas com intensidade menor [114-116]. Para obter uma melhor separação das bandas, poder-se-ia realizar uma eletroforese em gel de poliacrilamida de forma a permitir uma melhor resolução.

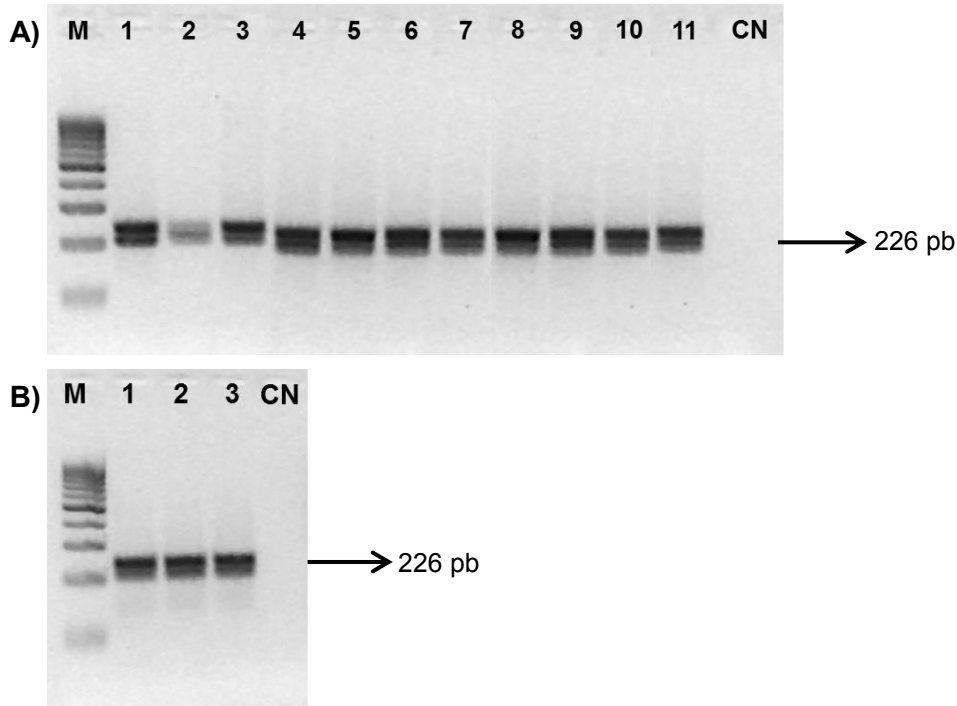


Figura 26 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos das folhas de *Crocus* com os *primers* ITS-CS-F/ITS-CS-R1. **A)** Linhas 1 a 11: CR01 a CR11. **B)** Linhas 1 a 3: CR22 a CR24. M – Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CN – Controlo negativo.

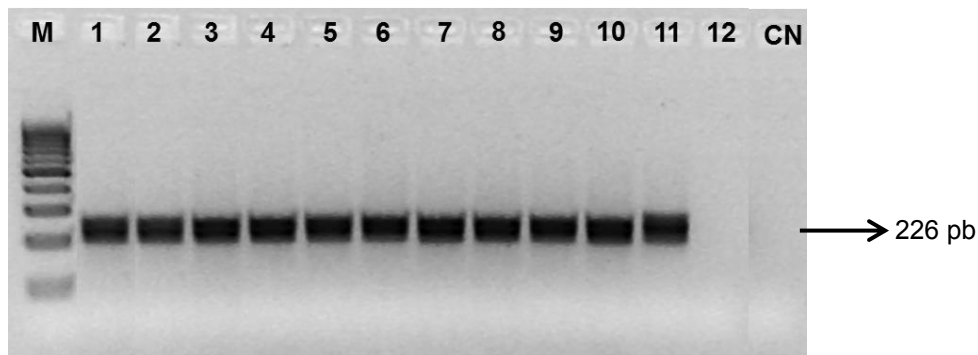


Figura 27 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos dos estigmas e do Açafão em pó com os *primers* ITS-CS-F/ITS-CS-R1. Linhas 1 a 10: CR12 a CR21; Linha 11: CR25; Linha 12: CT. M – Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CN – Controlo negativo.

Com base nestes dados pode-se afirmar que os *primers* propostos para o *locus* ITS1 são específicos para o género *Crocus*, pois amplificam apenas as amostras pertencentes a este género. Como se pode verificar pela Figura 27, a única amostra não amplificada pertence a um género diferente (*Carthamus tinctorius*).

A partir dos extratos dos bolbos de *Crocus sativus* e *Crocus cartwrightianus* obtidos através do método NucleoSpin e diluídos para 50 ng/μL, realizaram-se também diluições seriadas até 0,005 ng/μL para avaliar a sensibilidade da técnica de PCR proposta para o *locus* ITS1. Este facto foi comprovado como se pode verificar pela presença de bandas até à última diluição (Figura 28).

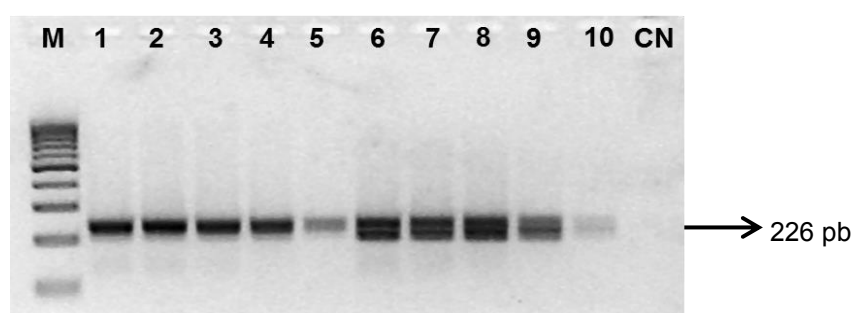


Figura 28 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos dos bolbos com os *primers* ITS-CS-F/ITS-CS-R1. Linhas 1 a 5 - 50 ng/μL; 5 ng/μL; 0,5 ng/μL; 0,05 ng/μL; 0,005 ng/μL de *Crocus sativus*. Linhas 6 a 10 - 50 ng/μL; 5 ng/μL; 0,5 ng/μL; 0,05 ng/μL; 0,005 ng/μL de *Crocus cartwrightianus* “Albus”. M – Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CN – Controlo negativo.

Relativamente ao *locus* ITS2, após otimização das condições da amplificação por PCR com os *primers* ITS-CS-F/ITS-CS-R2, prosseguiu-se com a avaliação da reatividade cruzada como anteriormente efetuado com os *primers* para o *locus* ITS1. Na Figura 29 apresentam-se os resultados obtidos, os quais confirmam a especificidade da reação para *Crocus sativus*. Deste modo, prosseguiu-se para a avaliação da amplificação das restantes espécies de *Crocus* em estudo com os referidos *primers* do *locus* ITS2. Os resultados obtidos estão apresentados nas Figuras 30, 31 e 32.

Quanto às amostras dos bolbos (Figura 30) verifica-se que ocorreu amplificação somente nas amostras cujo ADN foi extraído pelo método NucleoSpin, o que comprova a melhor qualidade do extrato, como já referido na seção 6.1. Verifica-se também que houve amplificação bem sucedida de das duas espécies de bolbos, *Crocus sativus* L. e *Crocus cartwrightianus*, pelo aparecimento de bandas no tamanho esperado de 641 pb. No entanto, há também a presença de bandas com pesos moleculares diferentes, o qual poderá ter sido devido a várias razões. Uma das quais consiste no facto de a região ITS ser uma zona que pode estar sujeita a uma evolução concertada incompleta e que pode levar à existência de cópias parálogas divergentes entre indivíduos, ou seja, cópias que

têm a capacidade de acumular mutações de forma mais ou menos independente, resultando assim numa variabilidade intraindividual [71, 112, 117]. Assim, devido à elevada variabilidade desta região, frequentemente sujeita a mutações pontuais, inserções ou deleções [117], pode acontecer que dentro do genoma de um mesmo indivíduo existam cópias da região que estejam mutadas, não permitindo a ligação completa dos *primers* à sequência ou levando a amplificação de uma sequência que não corresponde exatamente ao alvo pretendido, originando assim produtos de PCR de tamanhos diferentes, mas com uma intensidade menor.

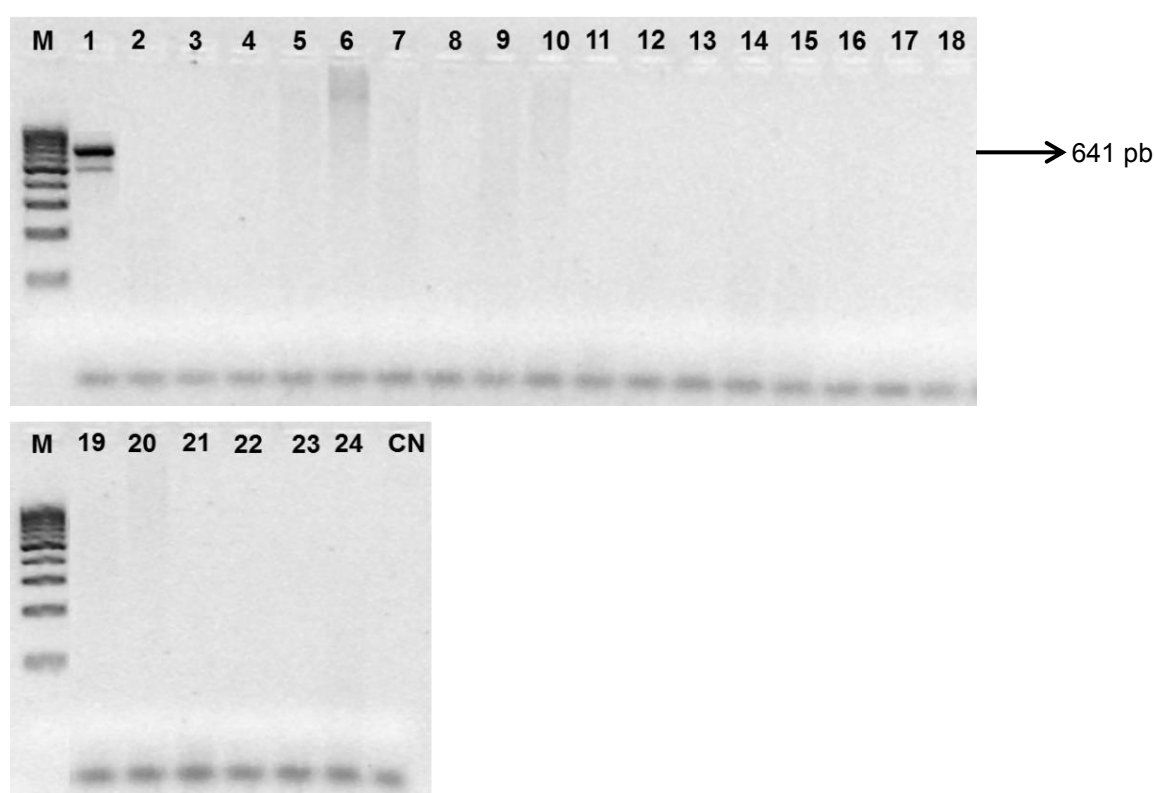


Figura 29 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação das amostras para estudo da reatividade cruzada com os *primers* ITS-CS-F/ITS-CS-R2. Linha 1 – CR01; Linha 2 – CT; Linha 3 – CR08; Linha 4 – CR09; Linha 5 – CR10; 6 – CR11; Linha 7 – Cebola; Linha 8 – Alho; Linha 9 – Salsa; Linha 10 – Pimenta branca; Linha 11 – Louro; Linha 12 – Pimentão-doce; Linha 13 – Piri-piri; Linha 14 – Erva príncipe; Linha 15 – Funcho; Linha 16 – Dente-de-leão; Linha 17 – Cavalinha; Linha 18 – Cidreira; Linha 19 – Camomila; Linha 20 – Chá verde; Linha 21 – Salvia; Linha 22 – Hortelã-pimenta; Linha 23 – *Hipericum androsaeum*; Linha 24 – *Hipericum perforatum*. M – Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CN – Controlo negativo.

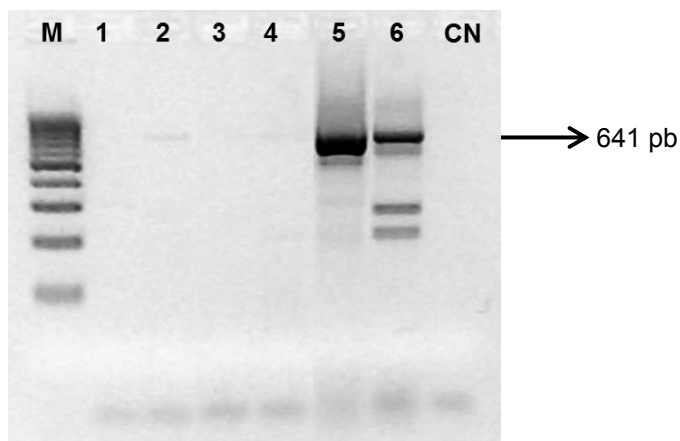


Figura 30 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos dos bulbos com os *primers* ITS-CS-F/ITS-CS-R2. Linha 1 – *Crocus sativus* extraído pelo método DNeasy Plant; Linha 2 – *Crocus cartwrightianus* “Albus” extraído pelo método DNeasy Plant; Linha 3 – *C. sativus* extraído pelo método CTAB; Linha 4 – *C. cartwrightianus* extraído pelo método CTAB; Linha 5 – *C. sativus* extraído pelo método NucleoSpin; Linha 6 – *C. cartwrightianus* extraído pelo método NucleoSpin. M – marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CN – Controlo negativo.

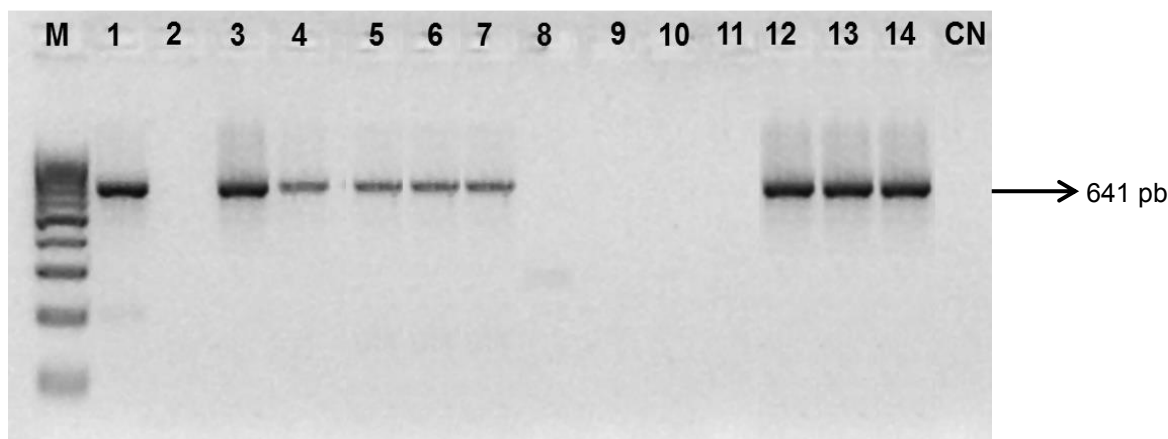


Figura 31 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos das folhas com os *primers* ITS-CS-F/ITS-CS-R2. Linhas 1 a 11: CR01 a CR11; Linhas 12 a 14: CR22 a CR24. M – marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CN – Controlo negativo.

Na Figura 31, pode-se verificar que ocorreu amplificação somente nas amostras CR01, CR03 a CR07 e CR22 a CR24, todas elas classificadas como *Crocus sativus* L., não se observando qualquer banda para as restantes espécies. No entanto, quando se aplicou a técnica aos extratos de estigmas e Açafrão em pó (Figura 32), obtêve-se amplificação apenas na amostra em pó (CR25).

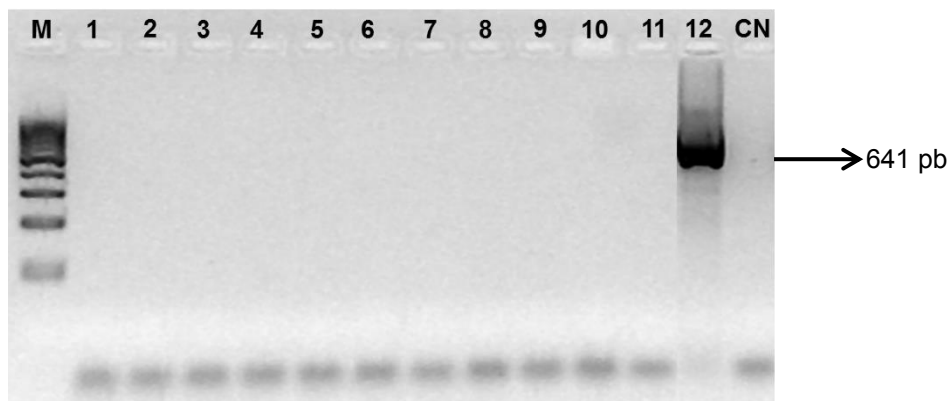


Figura 32 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos dos estigmas e do Açafrão em pó com os *primers* ITS-CS-F/ITS-CS-R2. Linhas 1: CT; Linhas 2 a 11: CR12 a CR21; Linha 12: CR25. M – Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CN – Controlo negativo.

Assim, pode-se afirmar que este *locus*, quando amplificado com os *primers* ITS-CS-F/ITS-CS-R2, é específico para as espécies *Crocus sativus* e *Crocus cartwrightianus* pois só amplificou as amostras pertencentes a estas espécies. No entanto, apesar dos referidos *primers* funcionarem em folhas e bolbos, não são eficazes para estudos de autenticidade uma vez que não permitiram a amplificação das amostras de estigmas de *Crocus sativus*.

O facto do *locus* ITS2 ser específico para as espécies *Crocus sativus* L. e *Crocus cartwrightianus* e não para as outras espécies pertencentes ao mesmo género pode ser devido às relações genéticas entre estas duas espécies. Está reportado que *Crocus sativus* L. teve origem a partir de um antepassado bastante semelhante com o atual *Crocus cartwrightianus*, tendo por isso uma proximidade genética elevada, com uma composição de ADN muito semelhante [113, 118-120]. Este facto pode significar que existe alguma semelhança no *locus* ITS2 destas duas espécies e portanto levar à amplificação das duas amostras com os oligonucleótidos específicos para essa região.

6.2.1.3 *Locus matK*

O gene cloroplastidial *matK* localiza-se no intrão *trnK* e codifica para a enzima maturase K, responsável pelo *splicing* de intrões do Grupo II. Este gene tem um tamanho ideal, uma elevada taxa de substituição dentro de espécies e uma larga proporção de variabilidade nucleotídica, para além de possuir regiões mutacionais altamente conservadas. Por estes motivos, é frequentemente utilizado em estudos genéticos de identificação de espécies e sistemática vegetal [121]. Assim, pretendeu-se neste trabalho avaliar esta região como potencial marcador de autenticidade de *Crocus sativus*. Para este efeito, desenharam-se *primers* para amplificação desta região.

Em primeiro lugar, otimizou-se a técnica de PCR qualitativa com os *primers* MKCS-F/MKCS-R e testou-se a potencial reatividade cruzada de forma idêntica ao efetuado na secção 6.2.1.2. A eletroforese em gel de agarose dos produtos obtidos permitiu verificar a amplificação do fragmento esperado de 606 pb em todas as amostras do género *Crocus*. Para além disso há também presença de uma banda de fraca intensidade que mostra que houve alguma amplificação da amostra Dente-de-leão (Figura 33). Foi realizada uma segunda PCR qualitativa para verificar se este facto se deveu a alguma contaminação ou se ocorreu efetivamente amplificação desta amostra, no entanto verificou-se a mesma situação. Como não está reportado que o Dente-de-leão seja um adulterante de Açafrão [42, 107, 108], concluiu-se que esta reatividade não é relevante e, portanto, os *primers* MKCS-F/MKCS-R poderão ser igualmente eficazes em estudos de autenticidade.

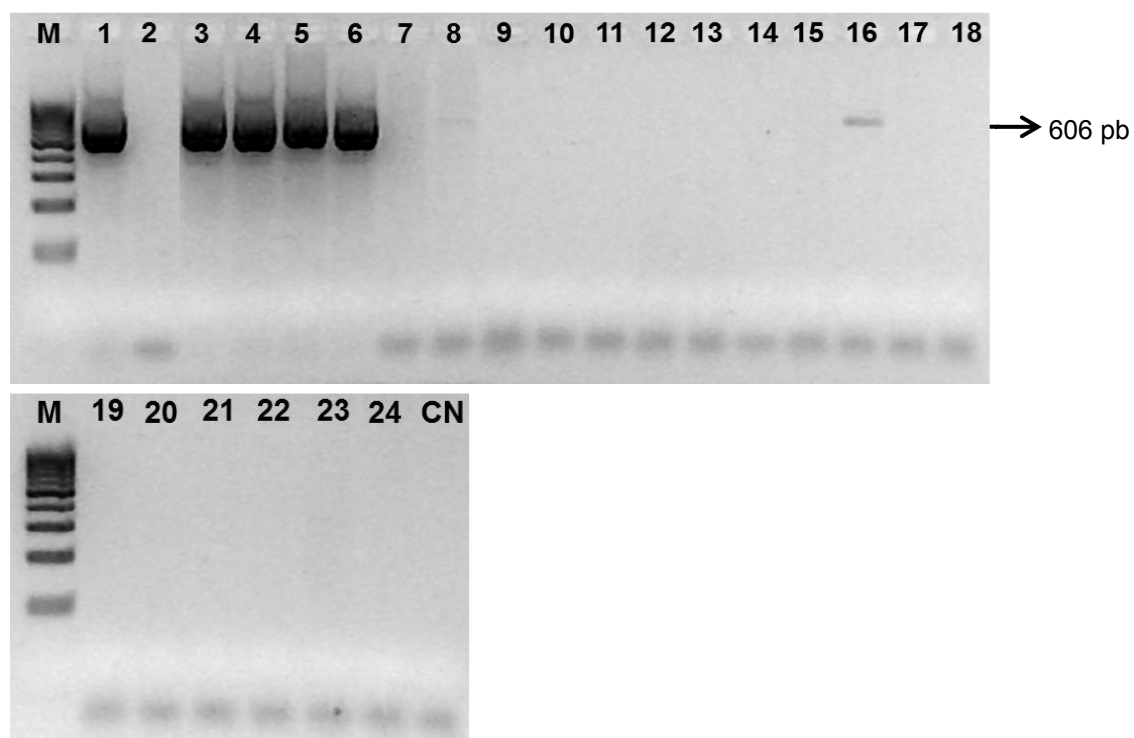


Figura 33 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação das amostras para estudo da reatividade cruzada com os *primers* MKCS-F/MKCS-R. Linha 1 – CR01; Linha 2 – CT; Linha 3 – CR08; Linha 4 – CR09; Linha 5 – CR10; 6 – CR11; Linha 7 – Cebola; Linha 8 – Alho; Linha 9 – Salsa; Linha 10 – Pimenta branca; Linha 11 – Louro; Linha 12 – Pimentão-doce; Linha 13 – Piri-piri; Linha 14 – Erva príncipe; Linha 15 – Funcho; Linha 16 – Dente-de-leão; Linha 17 – Cavalinha; Linha 18 – Cidreira; Linha 19 – Camomila; Linha 20 – Chá verde; Linha 21 – Salvia; Linha 22 – Hortelã-pimenta; Linha 23 – *Hipericum androsaeum*; Linha 24 – *Hipericum perforatum*. M – Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CN – Controlo negativo.

De seguida testou-se a aplicabilidade destes *primers* com as restantes amostras, cujos resultados estão apresentados nas Figuras 34 e 35. Verificou-se que houve

amplificação de todas as amostras, incluindo bolbos, folhas e estigmas, com exceção do *Carthamus tinctorius* (linha 12, Figura 35), o que indica que os *primers* propostos para o *locus matK* são específico do género *Crocus*.

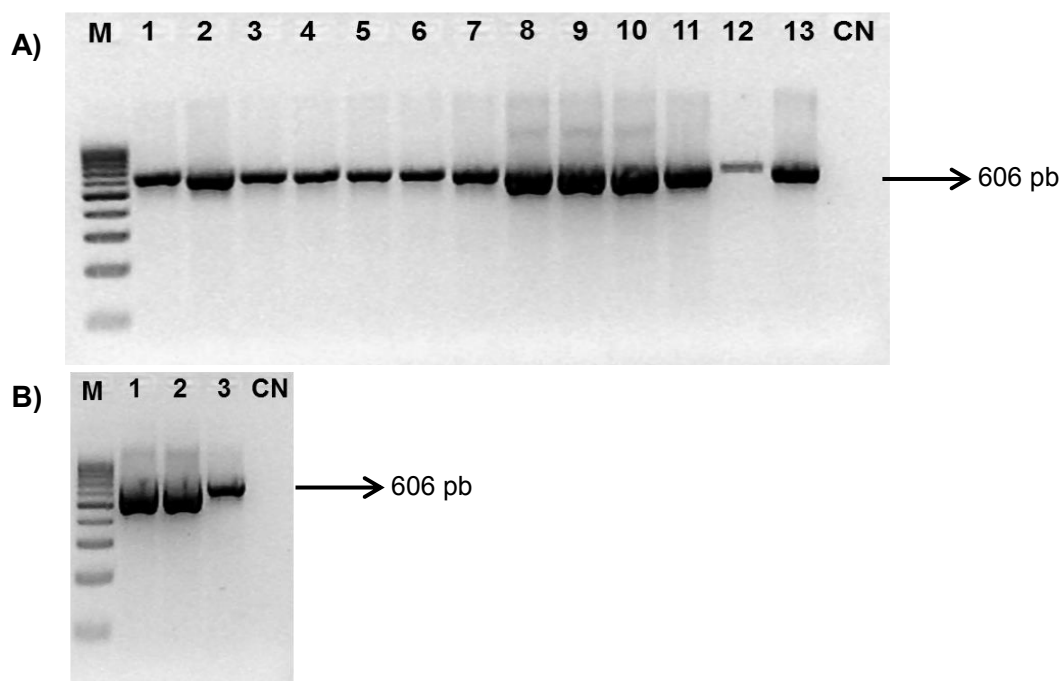


Figura 34 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos das folhas e bolbos com os *primers* MKCS-F/MKCS-R. **A)** Linhas 1 a 11: CR01 a CR11; Linha 12 – *Crocus sativus* extraído pelo método NucleoSpin; Linha 13 – *Crocus cartwrightianus* “Albus” extraído pelo método NucleoSpin. M – marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CN – Controlo negativo. **B)** Linhas 1 a 3: CR22 a CR24. M – marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CN – Controlo negativo.

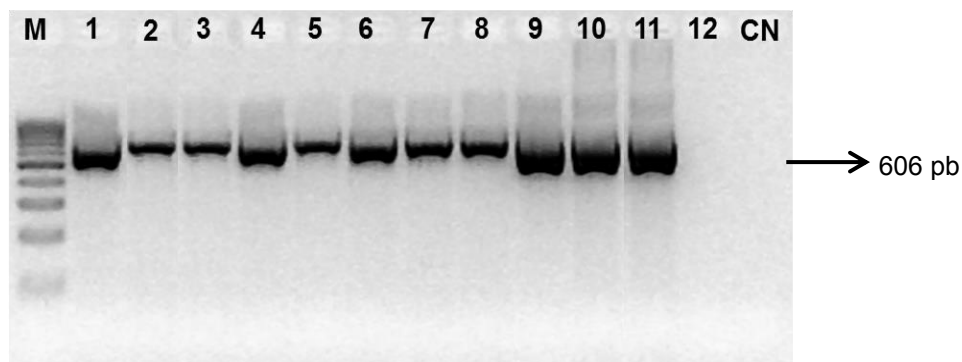


Figura 35 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos dos estigmas e Açafrão em pó com os *primers* MKCS-F/MKCS-R. Linhas 1 a 10: CR12 a CR21; Linha 11: CR25; Linha 12: CT. M – Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CN – Controlo negativo.

6.2.1.4 SCAR marker

Os marcadores SCAR, como já referido na seção 2.2.3, são fragmentos de ADN amplificados por PCR usando *primers* especificamente desenhados a partir das sequências nucleotídicas selecionadas e sequenciadas do perfil de RAPD. Muitos estudos têm demonstrado que marcadores SCAR provenientes de perfis RAPD têm sido usados com sucesso na identificação de espécies de plantas e cultivares e na deteção de adulterantes em amostras comerciais [42, 53, 73, 122, 123].

Desenvolveram-se assim *primers* CS-F/CS-R específicos para uma sequência obtida a partir de um perfil RAPD que foi depositada na base de dados do NCBI com o nome *Crocus sativus clone F6 RAPD marker AJ-05 genomic sequence*, e o código de acesso do Genbank de KC353365.1. Procedeu-se seguidamente à otimização da amplificação por PCR qualitativa e avaliou-se a potencial reatividade cruzada com outras espécies. Os resultados demonstraram que houve amplificação somente na amostra da

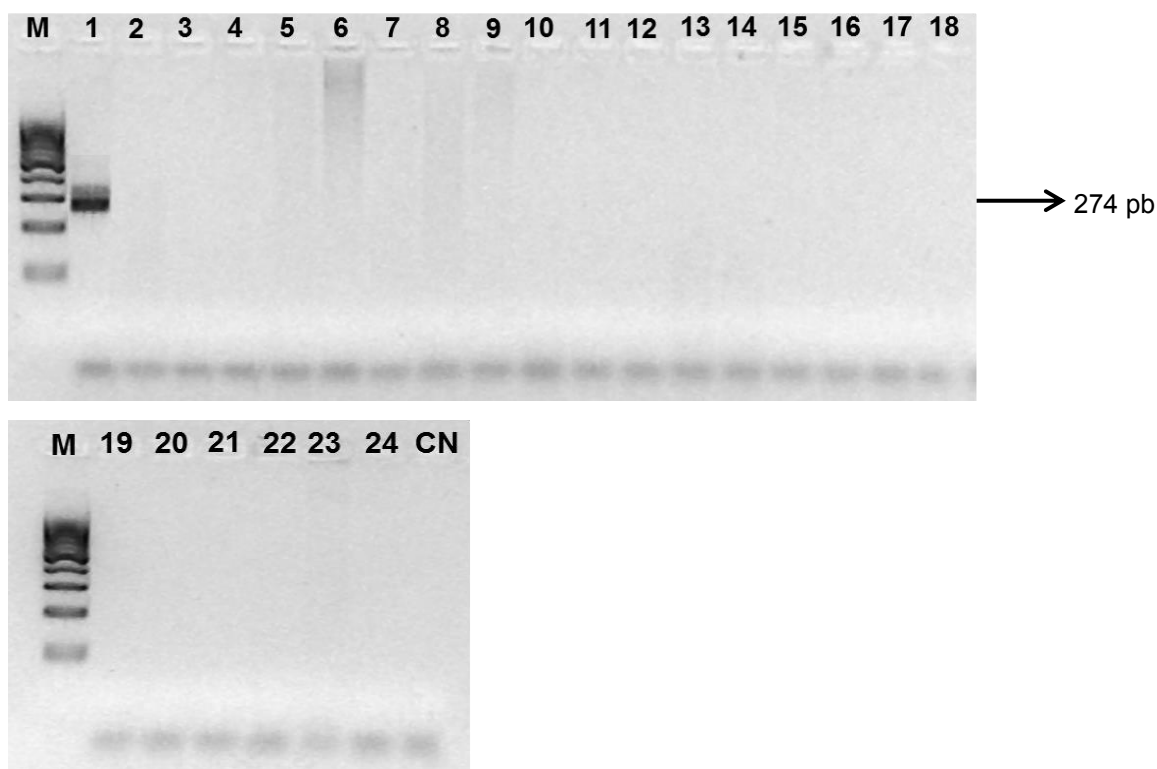


Figura 36 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação das amostras para estudo da reatividade cruzada com os *primers* CS-F/CS-R. Linha 1 – CR01; Linha 2 – CT; Linha 3 – CR08; Linha 4 – CR09; Linha 5 – CR10; 6 – CR11; Linha 7 – Cebola; Linha 8 – Alho; Linha 9 – Salsa; Linha 10 – Pimenta branca; Linha 11 – Louro; Linha 12 – Pimentão-doce; Linha 13 – Piri-piri; Linha 14 – Erva príncipe; Linha 15 – Funcho; Linha 16 – Dente-de-leão; Linha 17 – Cavalinha; Linha 18 – Cidreira; Linha 19 – Camomila; Linha 20 – Chá verde; Linha 21 – Salvia; Linha 22 – Hortelã-pimenta; Linha 23 – *Hipericum androsaemum*; Linha 24 – *Hipericum perforatum*. M – Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CN – Controlo negativo.

espécie *Crocus sativus* L. (Figura 36), com o fragmento esperado de 274 pb, confirmando a especificidade dos *primers*. Deste modo, passou-se para a amplificação das restantes amostras, cujos resultados estão apresentados nas Figuras 37, 38 e 39.

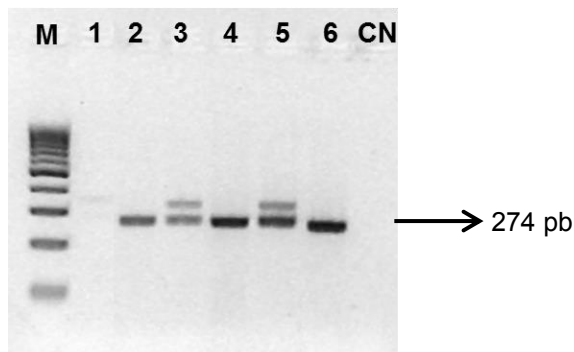


Figura 37 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos dos bulbos com os *primers* CS-F/CS-R. Linha 1 – *Crocus sativus* extraído pelo método DNeasy Plant; Linha 2 – *Crocus cartwrightianus* “Albus” extraído pelo método DNeasy Plant; Linha 3 – *C. sativus* extraído pelo método CTAB; Linha 4 – *C. cartwrightianus* extraído pelo método CTAB; Linha 5 – *C. sativus* extraído pelo método NucleoSpin; Linha 6 – *C. cartwrightianus* extraído pelo método NucleoSpin. M – marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CN – Controlo negativo.

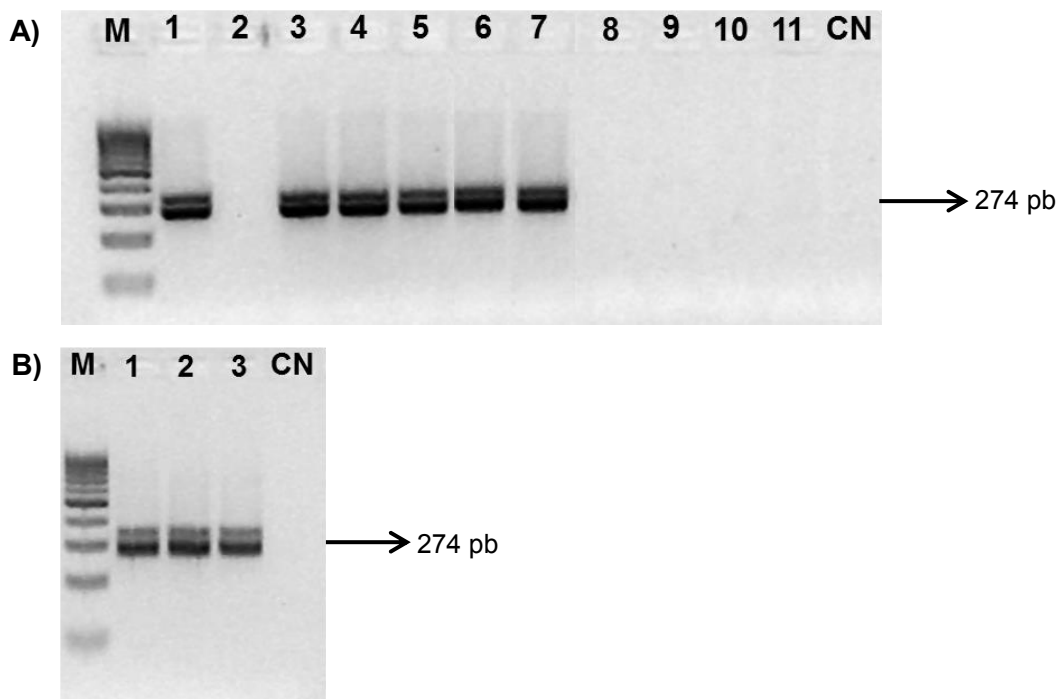


Figura 38 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos das folhas com os *primers* CS-F/CS-R. **A)** Linhas 1 a 11: CR01 a CR11. **B)** Linhas 1 a 3: CR22 a CR24. M – marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CN – Controlo negativo.

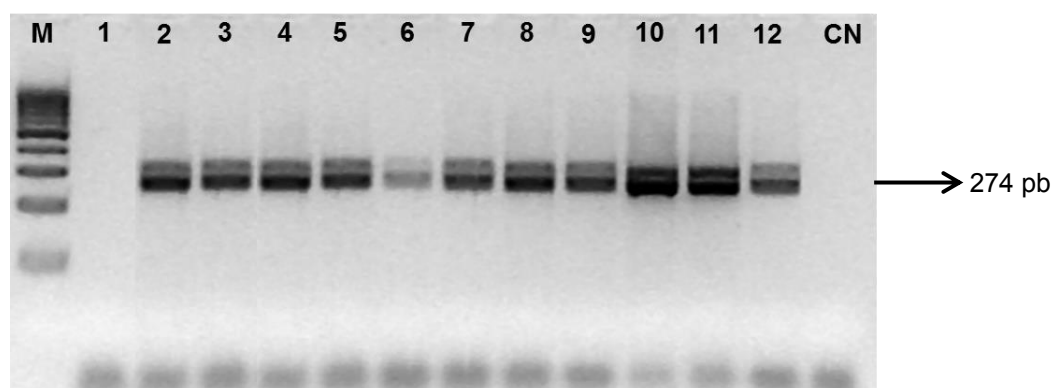


Figura 39 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos dos estigmas e Açafrão em pó com os *primers* CS-F/CS-R. Linha 1: CT; Linhas 2 a 11: CR12 a CR21; Linha 12: CR25. M – Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CN – Controlo negativo.

Relativamente às amostras dos bolbos, verifica-se que houve amplificação quer de *Crocus sativus* L. quer de *C. cartwrightianus*, com uma maior intensidade de bandas para as amostras cujo ADN foi extraído pelo método NucleoSpin, confirmando mais uma vez a melhor qualidade destes extratos (Figura 37). Verifica-se também o aparecimento de uma banda de fraca intensidade desviada do peso molecular pretendido das amostras de Açafrão, talvez devido ao baixo rendimento de extração. Para além disso, observa-se que no caso da amostra de *Crocus cartwrightianus* aparece apenas um único fragmento (Figura 37), que pode ser devido ao facto desta espécie ser diplóide [113] e portanto possuir as duas cópias das sequências com pesos moleculares iguais.

Nas Figuras 38 e 39 estão apresentados os resultados das amostras de folhas e estigmas, respetivamente, onde se verifica que houve amplificação apenas das correspondentes à espécie *Crocus sativus*. Nestes casos, para além da banda com o peso molecular pretendido, também há presença de uma segunda banda com um peso ligeiramente superior, tal como aconteceu com os bolbos.

Assim, pode-se concluir que os *primers* CS-F/CS-R são específicos para as espécies *Crocus sativus* L. e *C. cartwrightianus*, pois não amplificaram mais nenhuma espécie pertencente ao género *Crocus*. Por isso, tal como no *locus* ITS2, existe também uma elevada semelhança nesta região devido à proximidade genética das duas espécies [113, 118-120].

6.2.2 Identificação de Cártamo (*Carthamus tinctorius* L.)

6.2.2.1 Avaliação da especificidade – *Loc*i ITS1 e ITS2

Em estudos recentes, provou-se que o Cártamo é um adulterante muito comum do Açafraão [42, 107]. Por estes motivos desenharam-se *primers* para as sequências das regiões ITS1 e ITS2 desta espécie de modo a verificar a sua especificidade para posterior aplicação na deteção como adulterante.

Após otimização das condições da PCR qualitativa, testou-se a reatividade cruzada dos *primers* ITS-CT-F/ITS-CT-R1 e ITS-CT-F/ITS-CT-R2 específicos para os *loci* ITS1 e ITS2, respetivamente, com as amostras de outros condimentos, especiarias e ervas aromáticas já utilizadas anteriormente. Os resultados obtidos apresentam-se nas Figuras 40 e 41, os quais revelaram não ter qualquer reatividade com as outras espécies que não *C. tinctorius*.

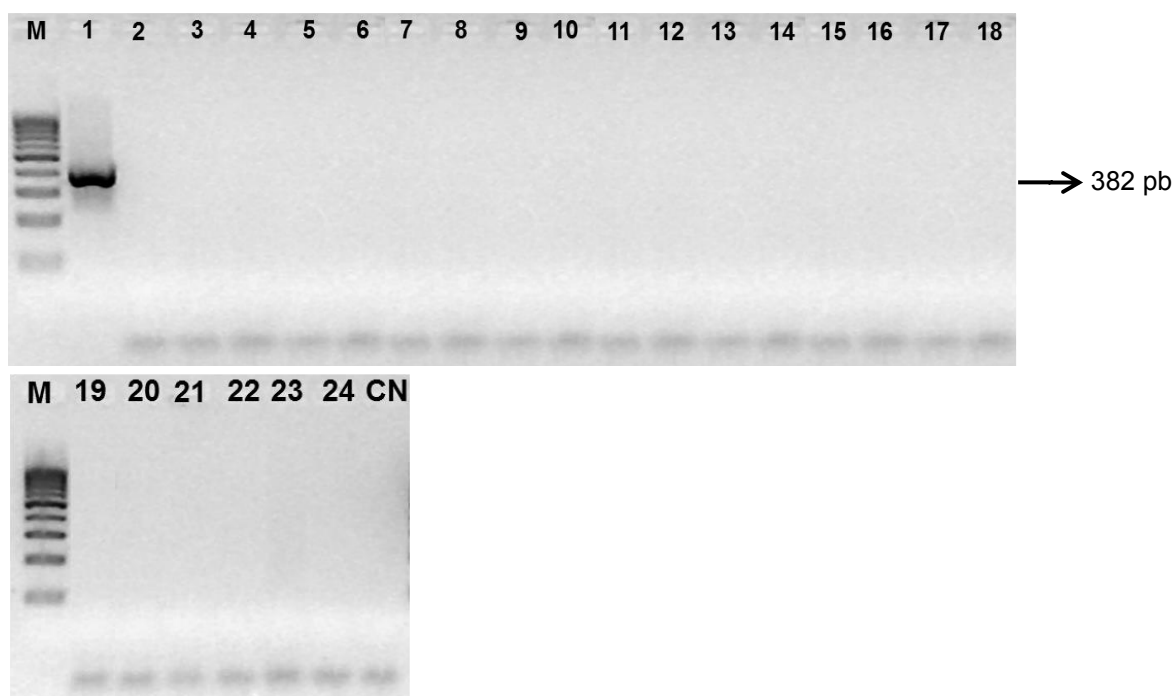


Figura 40 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação das amostras para estudo da reatividade cruzada com os *primers* ITS-CT-F/ITS-CT-R1. Linha 1 – CT; Linha 2 – CR01; Linha 3 – CR08; Linha 4 – CR09; Linha 5 – CR10; 6 – CR11; Linha 7 – Cebola; Linha 8 – Alho; Linha 9 – Salsa; Linha 10 – Pimenta branca; Linha 11 – Louro; Linha 12 – Pimentão-doce; Linha 13 – Piri-piri; Linha 14 – Erva príncipe; Linha 15 – Funcho; Linha 16 – Dente-de-leão; Linha 17 – Cavalinha; Linha 18 – Cidreira; Linha 19 – Camomila; Linha 20 – Chá verde; Linha 21 – Salvia; Linha 22 – Hortelã-pimenta; Linha 23 – *Hipericum androsaemum*; Linha 24 – *Hipericum perforatum*. M – Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CN – Controlo negativo.

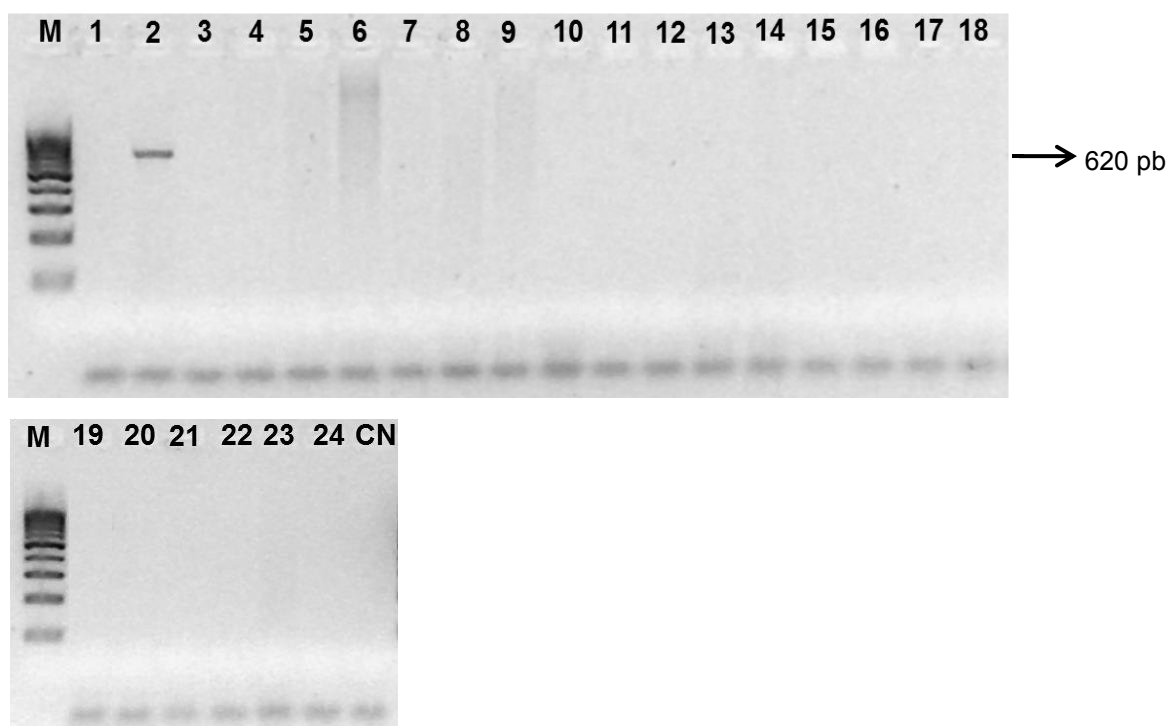


Figura 41 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação das amostras para estudo da reatividade cruzada com os *primers* ITS-CT-F/ITS-CT-R2. Linha 1 – CR01; Linha 2 – CT; Linha 3 – CR08; Linha 4 – CR09; Linha 5 – CR10; 6 – CR11; Linha 7 – Cebola; Linha 8 – Alho; Linha 9 – Salsa; Linha 10 – Pimenta branca; Linha 11 – Louro; Linha 12 – Pimentão-doce; Linha 13 – Piri-piri; Linha 14 – Erva príncipe; Linha 15 – Funcho; Linha 16 – Dente-de-leão; Linha 17 – Cavalinha; Linha 18 – Cidreira; Linha 19 – Camomila; Linha 20 – Chá verde; Linha 21 – Salvia; Linha 22 – Hortelã-pimenta; Linha 23 – *Hipericum androsaemum*; Linha 24 – *Hipericum perforatum*. M – Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CN – Controlo negativo.

6.2.2.2 Detecção de Cártamo em amostras de Açafrão

Após comprovar a especificidade dos *primers* ITS-CT-F/ITS-CT-R1 e ITS-CT-F/ITS-CT-R2 para o Cártamo, pôde-se então seguir para a análise da presença do adulterante em amostras de estigmas e Açafrão em pó.

Para além das amostras de estigmas em estudo, efetuaram-se misturas de 10% de Cártamo como adulterante (CR19 e CR20) em duas amostras de estigmas de Açafrão, comprovadas como sendo autênticas (CR15 e CR16). Assim, testou-se a presença do adulterante nas amostras de Açafrão e nas misturas realizadas através de amplificação por PCR com os dois referidos pares de *primers* para o *locus* ITS de Cártamo (Figuras 42 e 43).

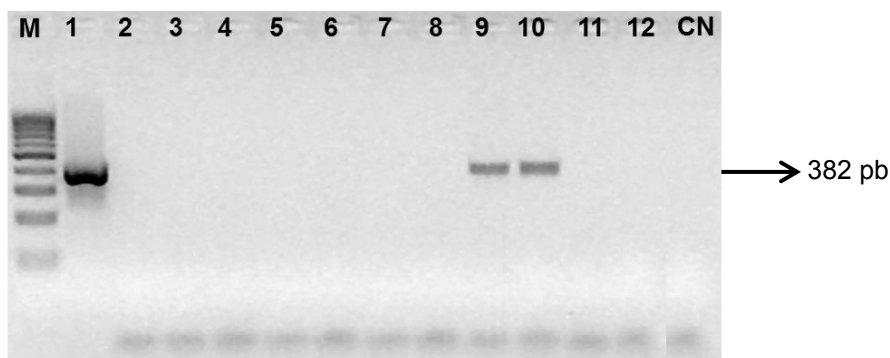


Figura 42 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos dos estigmas, do Açafirão em pó e das misturas de Açafirão com 10% de Cártamo usando os *primers* ITS-CT-F/ITS-CT-R1. Linha 1: CT (Controlo positivo); Linhas 2 a 11: CR12 a CR21; Linha 12: CR25. M – Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CN – Controlo negativo.

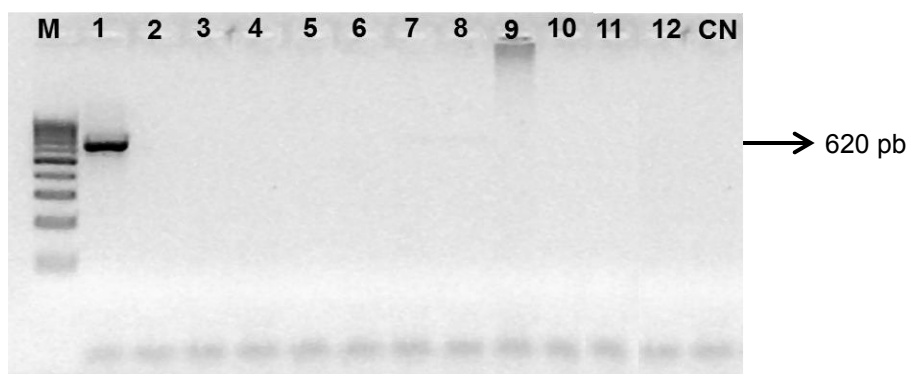


Figura 43 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos dos estigmas, do Açafirão em pó e das misturas de Açafirão com 10% de Cártamo usando os *primers* ITS-CT-F/ITS-CT-R2. Linha 1: CT (Controlo positivo); Linhas 2 a 11: CR12 a CR21; Linha 12: CR25. M – Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CN – Controlo negativo.

Relativamente aos *primers* ITS-CT-F/ITS-CT-R1, como mostra a Figura 42, estes revelaram que nenhuma das amostras de Açafirão estava adulterada com Cártamo. O aparecimento dos fragmentos esperados de 382 pb nas misturas com 10% de Cártamo (linhas 9 e 10 da Figura 42) provou a eficácia destes *primers* na deteção do adulterante em amostras comerciais. Por outro lado, os *primers* ITS-CT-F/ITS-CT-R2 não foram capazes de detetar o adulterante nas misturas realizadas, por isso não se podem considerar eficazes para este propósito.

Um aspeto interessante a estudar seria a combinação de mais misturas deste adulterante em Açafirão em diferentes percentagens de forma a determinar a sensibilidade relativa da técnica. Para além disso, poderia-se adquirir mais amostras comerciais de Açafirão em estigmas e em pó para verificar a eventual presença de Cártamo como adulterante.

6.3 Análise por PCR em tempo real

Após otimização da PCR qualitativa e do estudo da especificidade de cada par de *primers*, procedeu-se à avaliação da sua aplicabilidade na técnica de PCR em tempo real acoplada a uma análise por HRM. O propósito da combinação destas técnicas era conseguir diferenciar, numa mesma reação, amostras pertencentes a espécies distintas dentro do género *Crocus*. Como já referido, a análise por HRM permite distinguir pequenas diferenças em sequências muito semelhantes, tais como as obtidas por espécies geneticamente relacionadas [59-61, 124]. Para isso, recorreu-se à utilização de *primers* que amplificassem todas as amostras do género *Crocus*, tendo deste modo sido escolhidos os que tiveram como alvo o *locus* ITS1.

Uma vez que o método de extração de ADN é de elevada relevância na amplificação, este é ainda mais importante na análise por HRM, pois esta técnica permite identificar pequenas diferenças nas sequências que podem ser afetadas por diferenças entre a qualidade de extratos. Por estes motivos considerou-se apropriada a comparação de amostras cujo ADN tivesse sido extraído pelo mesmo método.

Em primeiro lugar, realizou-se uma PCR em tempo real e análise HRM para todas as amostras, em triplicado, de folhas extraídas pelo método CTAB (Figura 44). No gráfico em que estão apresentadas as curvas de amplificação (Figura 44A), verifica-se que existem dois grupos que se distinguem perfeitamente pelo número de ciclos em que a amplificação se inicia. Por outro lado, no gráfico da temperatura de desnaturação (Figura 44B), verifica-se que os dois grupos se centram numa única temperatura que ronda os 88°C. Os dados da análise por HRM revelam a existência de dois grupos bem distintos (Figura 44C e 44D). Esta distinção deve-se ao facto da técnica ter separado num grupo as amostras pertencentes à espécie *Crocus sativus* L. (a vermelho) e no outro as restantes amostras do mesmo género, mas de espécies diferentes (a verde), com base nas pequenas diferenças existentes nas sequências nucleotídicas. Ou seja, todas as amostras de *Crocus sativus* L. (CR01, CR03 a CR07) possuem a mesma sequência, enquanto as outras espécies do mesmo género (CR08 a CR11) possuem diferenças nas sequências, tendo por isso sido incluídas noutra grupo. A análise por HRM revelou também que a maioria das amostras e respetivas réplicas foi agrupada no respetivo *cluster* com uma percentagem de confiança superior a 95%. As curvas de amplificação mostram que as amostras de *Crocus sativus* começam a amplificar mais cedo o que pode ser devido também à existência de pequenas diferenças nas regiões de emparelhamento dos primers das restantes espécies, fazendo com que os *primers* demorem mais tempo a ligar-se e atrasando a amplificação. No entanto, a temperatura de desnaturação mantém-se igual, pois o fragmento alvo é o esperado, mas apenas com pequenas diferenças

nucleotídicas.

Na Figura 45 apresentam-se os resultados de um ensaio de PCR em tempo real e análise por HRM dos bolbos extraídos pelo método NucleoSpin. Relativamente às curvas de amplificação (Figura 45A), também se conseguem visualizar dois grupos distintos, que diferem no número de ciclos em que se dá início a amplificação do ADN. Por outro lado, a temperatura de desnaturação ronda para todas as amostras os 89°C (Figura 45B). A distinção das amostras em dois grupos é também apresentada pelos resultados obtidos da análise HRM (Figura 45C e 45D).

Da mesma forma que nas folhas, também nos bolbos a técnica conseguiu diferenciar *Crocus sativus* L. (a vermelho) de *Crocus cartwrightianus* (a amarelo) colocando-os em *clusters* diferentes com uma percentagem de confiança em torno dos 99% para todas as amostras e respetivas réplicas.

Por fim, a abordagem relativamente aos estigmas e ao Açafrão em pó foi ligeiramente diferente. Neste caso todas as amostras pertenciam à mesma espécie, com exceção da amostra de *Carthamus tinctorius* que não amplificava com os *primers* ITS-CS-F e ITS-CS-R1. Assim, decidiu-se utilizar na mesma reação quer os oligonucleótidos ITS-CS-F/ITS-CS-R1 quer os específicos para o Cártamo, ITS-CT-F/ITS-CT-R1. Deste modo iria-se ter uma diferenciação entre as amostras de Açafrão e aquelas que estavam adulteradas com Cártamo (CR19 e CR20).

Sendo assim, todas as amostras de Açafrão em estigmas e em pó (CR12 a CR21 e CR25) extraídas pelo método DNeasy Plant foram submetidas a uma PCR em tempo real e análise HRM com os *primers* ITS-CS-F/ITS-CS-R1 (em triplicado). Na mesma reação foram incluídas as amostras de *Carthamus tinctorius* e as misturas (CR19 e CR20), cujo ADN foi extraído pelo mesmo método, com os *primers* ITS-CT-F/ITS-CT-R1. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 46.

As curvas de amplificação mostram algumas diferenças a realçar (Figura 46A). A vermelho está representada a reação com os oligonucleótidos específicos do género *Crocus* e a azul com os específicos para *Carthamus tinctorius*. No caso do segundo grupo, verifica-se que a amostra de Cártamo amplifica ao mesmo tempo que as restantes amostras de Açafrão, entre os 14 e os 18 ciclos. No entanto, nas misturas de Açafrão com Cártamo a amplificação ocorreu um pouco mais tarde, à volta dos 19 ciclos, o que se justifica pelo facto da espécie alvo se encontrar numa baixa percentagem e portanto levar mais tempo a amplificar.

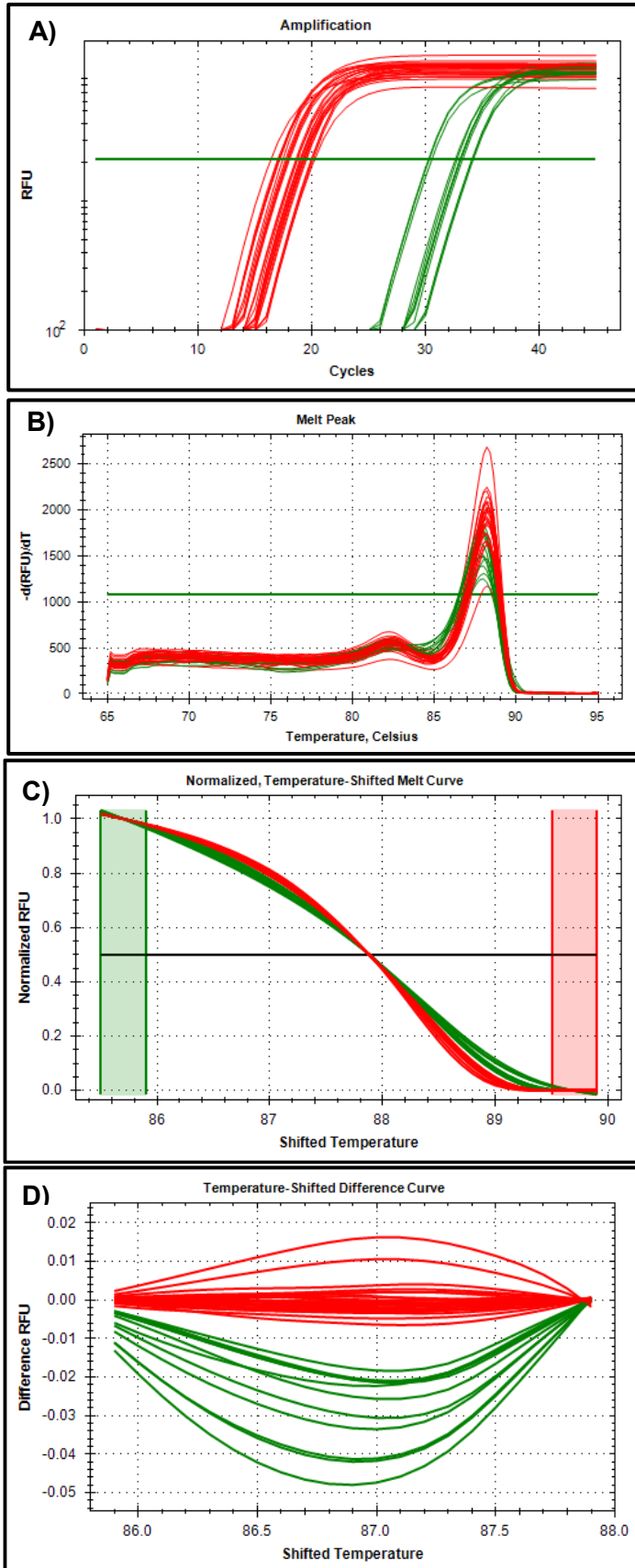


Figura 44 – Amplificação das amostras das folhas de *Crocus sativus* por PCR em tempo real com o corante EvaGreen e com os primers ITS-CS-F/ITS-CS-R1, e respetiva análise por HRM. **A** – Curvas de amplificação; **B** – Curvas de desnaturação; **C** – Curvas de desnaturação normalizadas; **D** – Curvas de diferença por análise HRM. (Cor vermelha – Amostras CR01, CR03, CR04, CR05, CR06, CR07, CR08; Cor verde – Amostras CR08, CR09, CR10, CR11).

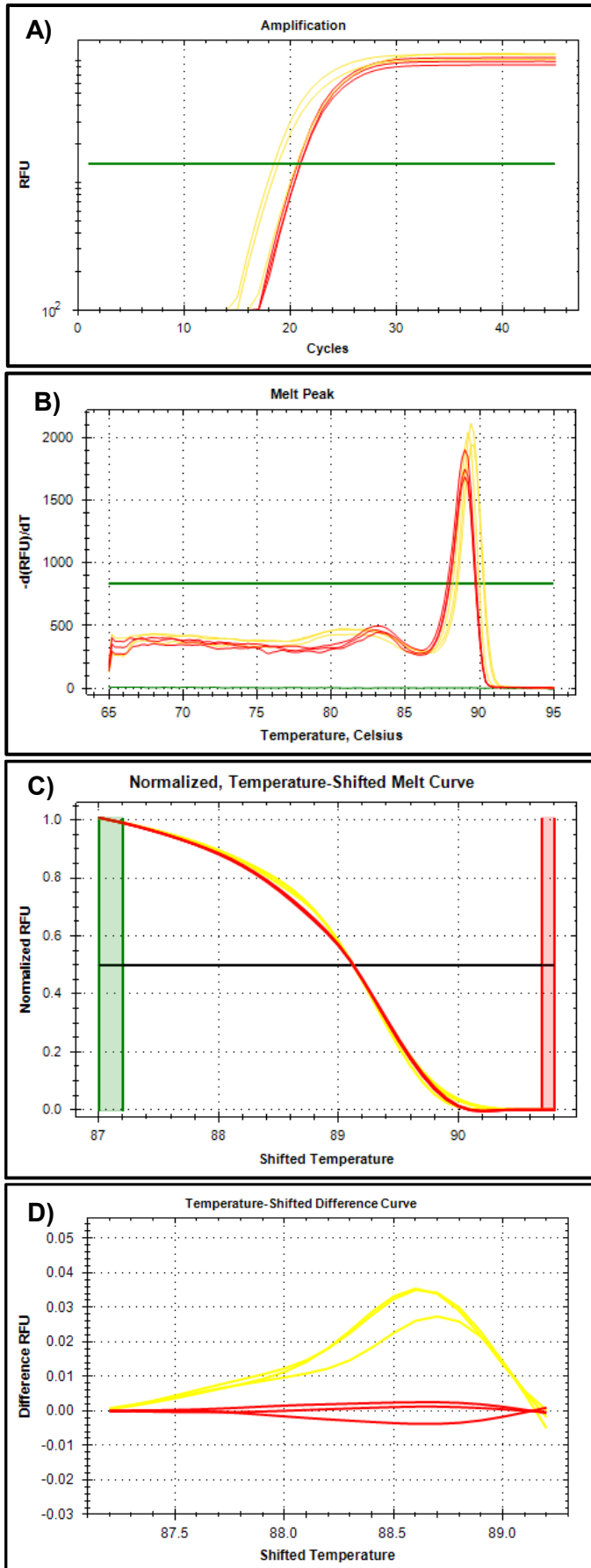


Figura 45 – Amplificação das amostras dos bolbos por PCR em tempo real com corante EvaGreen e com os *primers* ITS-CS-F/ITS-CS-R1, e respetiva análise por HRM. **A** – Curvas de amplificação; **B** – Curvas de desnaturação; **C** – Curvas de desnaturação normalizada; **D** – Curvas de diferença por análise HRM. (Cor vermelha – Amostra CS; Cor amarela – Amostra CA).

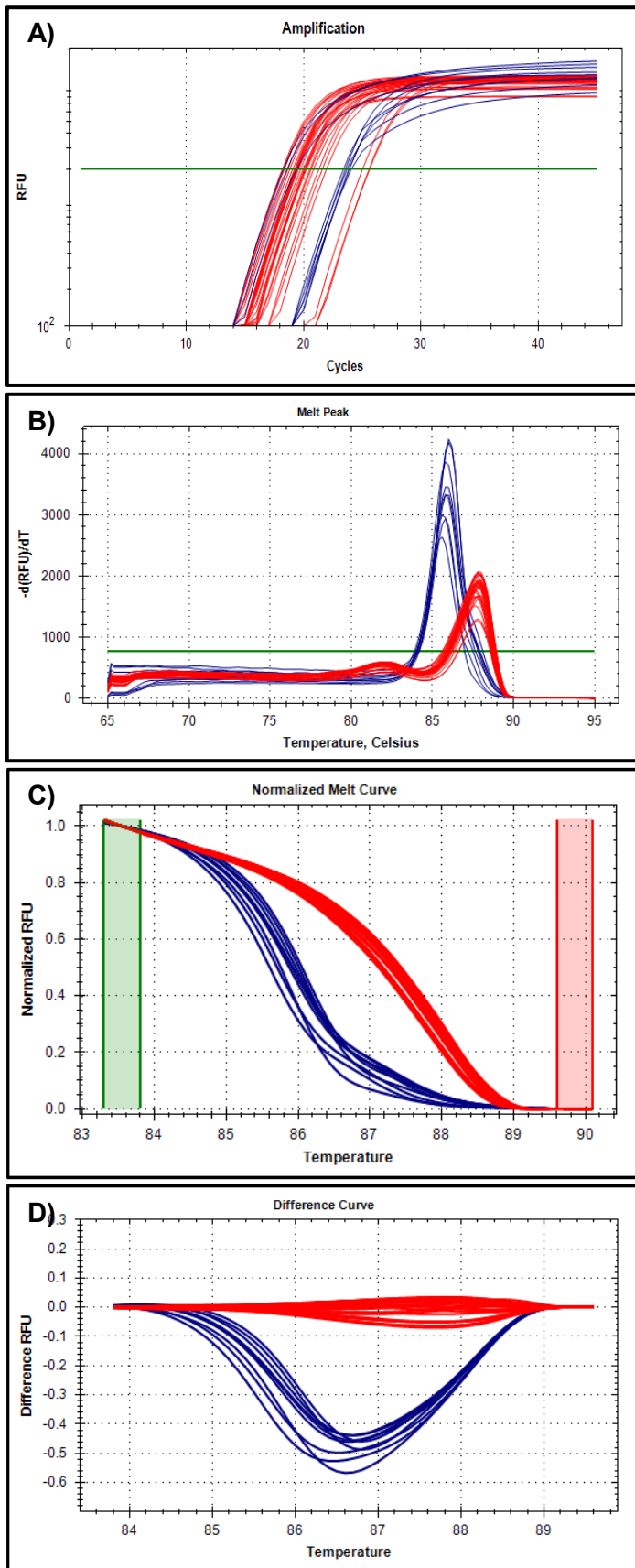


Figura 46 – Amplificação das amostras de Açafrao em estigmas e em pó por PCR em tempo real com corante EvaGreen e com os *primers* ITS-CS-F/ITS-CS-R1 e ITS-CT-F/ITS-CT-R1, e respetiva análise por HRM. **A** – Curvas de amplificação; **B** – Curvas de desnaturação; **C** – Curvas de desnaturação normalizada; **D** – Curvas de diferença por análise HRM. (Cor vermelha – Amostras CR12, CR13, CR14, CR15, CR16, CR17, CR18, CR19, CR20, CR21, CR25 amplificadas com os *primers* ITS-CS-F/ITS-CS-R1; Cor azul – Amostras CT, CR19, CR20 amplificadas com os *primers* ITS-CT-F/ITS-CT-R1).

Verifica-se que no gráfico da temperatura de desnaturação existem dois picos bem definidos, o que confirma a presença dos dois fragmentos alvo diferentes (Figura 46B). O grupo em que houve amplificação do *locus* ITS1 de Cártamo apresentou uma temperatura de desnaturação à volta dos 86°C, enquanto o outro grupo centrou-se à volta dos 88°C.

A análise por HRM permitiu distinguir perfeitamente as duas reações, sendo que no grupo a vermelho foram incluídas as amostras amplificadas com os *primers* ITS-CS-F/ITS-CS-R1 e no grupo a azul as amostras amplificadas com os *primers* ITS-CT-F/ITS-CT-R1 (Figura 46C e 46D). Isto demonstra também a capacidade desta técnica em diferenciar as amostras que estão adulteradas com *Carthamus tinctorius* (CR19 e CR20). A maioria das amostras e respetivas réplicas foram incluídas nos dois *clusters* com uma percentagem de confiança acima dos 98%.

Resumindo, em todas as amostras a técnica de PCR em tempo real acoplada a uma análise HRM foi capaz de diferenciar espécies diferentes dentro do género *Crocus*, provando ser uma abordagem eficaz na identificação de espécies e deteção de adulterantes.

6.4 Sequenciação

Para confirmar os resultados obtidos na PCR em tempo real e análise por HRM e demonstrar a existência de diferenças nas sequências de nucleótidos consoante a espécie, procedeu-se à sequenciação de algumas das amostras analisadas, nomeadamente todas as amostras das folhas e bolbos (CR01 a CR11, CR22 a CR24, CS e CA), alguns estigmas (CR14, CR15 e CT) e o Açafrão em pó (CR25).

Relativamente à amostra de *Carthamus tinctorius* (CT), a sequenciação foi realizada com os *primers* ITS-CT-F/ITS-CT-R1 específicos para o *locus* ITS1, de 382 pb. Os resultados apresentaram eletroferogramas com uma elevada resolução, permitindo a sequenciação de 317 pb da região alvo, em que se eliminaram as regiões iniciais e finais onde a resolução é normalmente muito baixa. Na Tabela 15 pode-se observar que não houve diferenças entre a amostra de Cártamo e a sequência da base de dados do NCBI (FJ539127.1).

Quanto aos estigmas e Açafrão em pó, a sequenciação foi realizada com os *primers* ITS-CS-F/ITS-CS-R1 específicos para o *locus* ITS1, de 226 pb. Os resultados apresentaram eletroferogramas com uma elevada resolução, permitindo a sequenciação de 195 pb, em que se eliminaram também neste caso as regiões iniciais e finais. Na Tabela 16 estão apresentados os resultados das amostras CR14, CR15 e CR25 em comparação com a sequência no NCBI (DQ094185.2).

Tabela 15 – Alinhamento das sequências obtidas após sequenciação com os *primers* ITS-CT-F/ ITS-CT-R1 para a amostra CT (*Carthamus tinctorius*).

FJ539127.1	128	GTGCTTATCTCTAGGCATCGTGGACGTCGTGTGCGGCACAAAAACAAACCCCGGCACGGCA	187
Cártamo	1	GTGCTTATCTCTAGGCATCGTGGACGTCGTGTGCGGCACAAAAACAAACCCCGGCACGGCA	60
FJ539127.1	188	TGTGCCAAGGAAAAACAAACTTAAGAAGGGTTCGTCTCGTGTGGCCCGTTTGC GG TGTG	247
Cártamo	61	TGTGCCAAGGAAAAACAAACTTAAGAAGGGTTCGTCTCGTGTGGCCCGTTTGC GG TGTG	120
FJ539127.1	248	CACACGGGTCGTGGCCTCTCATTAACCATAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTC	307
Cártamo	121	CACACGGGTCGTGGCCTCTCATTAACCATAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTC	180
FJ539127.1	308	ACGCATCGATGAAGAACGTAGCAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGA	367
Cártamo	181	ACGCATCGATGAAGAACGTAGCAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGA	240
FJ539127.1	368	ACCATCGAGTTTTTGAACGCAAGTTGCGCCGAAGCCATTTCGGCCGAGGGCAGTCTGCC	427
Cártamo	241	ACCATCGAGTTTTTGAACGCAAGTTGCGCCGAAGCCATTTCGGCCGAGGGCAGTCTGCC	300
FJ539127.1	428	TGGGCGTCACGCATCGC	444
Cártamo	301	TGGGCGTCACGCATCGC	317

Tabela 16 – Alinhamento das sequências obtidas após sequenciação com os *primers* ITS-CS-F/ ITS-CS-R1 para as amostras CR14, CR15 (estigmas de *Crocus sativus* L.) e CR25 (Açafrão em pó).

DQ094185.2	46	TCGCGAACGTGTTACACCATACTTACTTACTTACGACTCCGTTCCGTCCTCCGTCCTCCTC	105
CR14	1	TCGCGAACGTGTTACACCATACTTACTTACTTAGACTCCGTTCCGCCCCGTCCTCCTC	60
CR15	1	TCGCGAACGTGTTACACCATACTTACTTACTTAGACTCCGTTCCGCCCCGTCCTCCTC	60
CR25	1	TCGCGAACGTGTTACACCATACTTACTTACTTAGACTCCGTTCCGCCCCGTCCTCCTC	60
DQ094185.2	106	GCGGCGTGGCGAGATTTTGGAGGAAACGAAACCCCGGCGCAGTGGGCGCCAAGGAACACT	165
CR14	61	GCGGCGTGGCGAGATTCTGGAGGAAACGAAACCCCGGCGCAGTGGGCGCCAAGGAACACT	120
CR15	61	GCGGCGTGGCGAGATTCTGGAGGAAACGAAACCCCGGCGCAGTGGGCGCCAAGGAACACT	120
CR25	61	GCGGCGTGGCGAGATTCTGGAGGAAACGAAACCCCGGCGCAGTGGGCGCCAAGGAACACT	120
DQ094185.2	166	TCTTGAAACGCGCGTCGCGCCCTCTCCACCTCCCTTTCTGTCTGTCCCACGATAGGGAG	225
CR14	121	TCTTGAAACGCGCGTCGCGCCCTCTCCACCTCCCTTTCTGTCTGTCCCACGATAGGGAG	180
CR15	121	TCTTGAAACGCGCGTCGCGCCCTCTCCACCTCCCTTTCTGTCTGTCCCACGATAGGGAG	180
CR25	121	TCTTGAAACGCGCGTCGCGCCCTCTCCACCTCCCTTTCTGTCTGTCCCACGATAGGGAG	180
DQ094185.2	226	GGAGGGAGGG	235
CR14	181	GCAGGCATGG	190
CR15	181	GCAGGCATGG	190
CR25	181	GCAGGCATGG	190

Procedeu-se do mesmo modo para o ADN extraído das folhas de espécies de *Crocus* e amplificado com os *primers* ITS-CS-F/ ITS-CS-R1. Os resultados da sequenciação permitiram a análise de 190 pb da região amplificada com eletroferogramas de elevada resolução. Na Tabela 17 podem-se observar as diferenças nucleotídicas entre a sequência no NCBI e as sequências obtidas para espécies do género *Crocus* (CR02, CR08 a CR10 e CA) e *Crocus sativus* L. (CR01, CR03 a CR07, CR22 a CR24 e CS). Alguns nucleótidos não foram completamente identificados na

sequenciação, tendo-lhes sido atribuídas letras diferentes de acordo com a informação da Tabela 18.

Verifica-se que as folhas, os estigmas e o Açafraão em pó possuem um conjunto de diferenças em relação aos dados do NCBI (nucleótidos realçados a verde), sendo que essas diferenças são praticamente as mesmas com exceção de 4 nucleótidos (realçados a vermelho) (Tabela 16), que nas folhas não resultaram serem diferentes da base de dados. Sendo o *locus* ITS1 uma região de elevada variabilidade, a probabilidade de ocorrerem erros de sequenciação é muito maior [71, 117]. Por este motivo, foram realizadas várias réplicas para cada amostra e em todas elas as diferenças reproduziram-se o que reforçou os resultados obtidos neste trabalho. Deste modo, sugere-se a existência de erros de sequenciação na sequência depositada no NCBI.

Relativamente aos 4 nucleótidos que nas folhas não resultaram diferentes da base de dados, pode ser devido ao fato de se estar perante duas partes diferentes da planta. Segundo Li et al. [125] é possível existirem diferenças na região ITS dentro da mesma espécie até 1,9%, neste caso para a planta *Meconopsis*. Logo, o mesmo pode acontecer dentro da espécie *Crocus sativus* L., em que a percentagem de diferenças nucleotídicas intraespécie aqui apresentada é de 1,7%.

Na Tabela 17 observam-se diferenças nucleotídicas entre as espécies de *Crocus* (realçadas a cinzento). Salvo raras exceções que podem ser devidas a erros de sequenciação ou pela impossibilidade de identificação dos nucleótidos, todas as amostras da espécie *Crocus sativus* L. apresentaram a mesma sequência (CR01, CR03 a CR07, CR22 a CR24 e CS). Por outro lado, todas as outras amostras (CR02, CR08 a CR10 e CA) apresentaram pequenas diferenças nucleotídicas entre si e com *Crocus sativus* L. por serem espécies diferentes. Estes dados vêm apoiar os resultados da análise por HRM, a qual separou em dois grupos distintos as espécies: *Crocus sativus* L. e as restantes espécies de *Crocus*.

Os dados de sequenciação mostraram a potencialidade do *locus* ITS1 na distinção de espécies *Crocus*, podendo assim comprovar os resultados obtidos na análise por HRM.

A partir destes resultados poderia-se prosseguir com o desenho de novos *primers* de modo a amplificar uma região maior e portanto levar a que os dados de sequenciação incluíssem a região ITS1 completa. Com a informação completa da região ITS1 para cada espécie de *Crocus*, poder-se-ia prosseguir para o desenho de novos *primers* específicos de cada espécie, desenvolvendo assim análises mais específicas e permitindo uma identificação mais rápida e fiável das espécies.

Tabela 17 – Alinhamento das sequências obtidas após sequenciação com os *primers* ITS-CS-F/ITS-CS-R1 para as amostras CR01, CR03 a CR07, CR22 a CR24 (folhas de *Crocus sativus* L.), CS (bolbos de *Crocus sativus* L.), CR02 (*Crocus olivieri balausae*), CR08 (*Crocus kosaninii*), CR09 (*Crocus kotschyanus*), CR10 (*Crocus speciosus*) e CA (bolbos de *Crocus cartwrightianus* “Albus”).

DQ094185.2	46	TCGCGAACGTGTTACACCATACTTACTTACTTACGACTCCGTTCCGTCCTCCGTCACCTCCTC	105
CR01	1	TCGCGAACGTGTTACACCATACTTACTTACTTACGACTCCGTTCCGTCCTCCGTCACCTCCTC	60
CR03	1	TCGCGAACGTGTTACACCATACTTACTTACTTACGACTCCGTTCCGTCCTCCGTCACCTCCTC	60
CR04	1	TCGCGAACGTGTTACACCATACTTACTTACTTACGACTCCGTTCCGTCCTCCGTCACCTCCTC	60
CR05	1	TCGCGAACGTGTTACACCATACTTACTTACTTACGACTCCGTTCCGTCCTCCGTCACCTCCTC	60
CR06	1	TCGCGAACGTGTTACACCATACTTACTTACTTACGACTCCGTTCCGTCCTCCGTCACCTCCTC	60
CR07	1	TCGCGAACGTGTTACACCATACTTACTTACTTACGACTCCGTTCCGTCCTCCGTCACCTCCTC	60
CR22	1	TCGCGAACGTGTTACACCATACTTACTTACTTACGACTCCGTTCCGTCCTCCGTCACCTCCTC	60
CR23	1	TCGCGAACGTGTTACACCATACTTACTTACTTACGACTCCGTTCCGTCCTCCGTCACCTCCTC	60
CR24	1	TCGCGAACGTGTTACACCATACTTACTTACTTACGACTCCGTTCCGTCCTCCGTCACCTCCTC	60
CS	1	TCGCGAACGTGTTACACCATACTTACTTACTTACGACTCCGTTCCGTCCTCCGTCACCTCCTC	60
CR02	1	ATACGAACGTGTTACACCATACTTACTTACTTACGACTCCGTTCCGTCCTCCGTCACCTCCTC	60
CR08	1	ATACGAACGTGTTACACCATACTTACTTACTTACGACTCCGTTCCGTCCTCCGTCACCTCCTC	60
CR09	1	-CGCGAACGTGTTACACCATACTTACTTACTTACGACTCCGTTCCGTCCTCCGTCACCTCCTC	60
CR10	1	ATACGAACGTGTTACACCATACTTACTTACTTACGACTCCGTTCCGTCCTCCGTCACCTCCTC	60
CR11	1	ATACGAACGTGTTACACCATACTTACTTACTTACGACTCCGTTCCGTCCTCCGTCACCTCCTC	60
CA	1	-CGCGAACGTGTTACACCATACTTACTTACTTACGACTCCGTTCCGTCCTCCGTCACCTCCTC	60
DQ094185.2	106	GCGGCGTGCGGAGATTTTGGAGGAAACGAAACCCCGCGCAGTGGGCGCCAAAGGAACACT	165
CR01	61	GCGGCGTGCGGAGATTTTGGAGGAAACGAAACCCCGCGCAGTGGGCGCCAAAGGAACACT	120
CR03	61	GCGGCGTGCGGAGATTTTGGAGGAAACGAAACCCCGCGCAGTGGGCGCCAAAGGAACACT	120
CR04	61	GCGGCGTGCGGAGATTTTGGAGGAAACGAAACCCCGCGCAGTGGGCGCCAAAGGAACACT	120
CR05	61	GCGGCGTGCGGAGATTTTGGAGGAAACGAAACCCCGCGCAGTGGGCGCCAAAGGAACACT	120
CR06	61	GCGGCGTGCGGAGATTTTGGAGGAAACGAAACCCCGCGCAGTGGGCGCCAAAGGAACACT	120
CR07	61	GCGGCGTGCGGAGATTTTGGAGGAAACGAAACCCCGCGCAGTGGGCGCCAAAGGAACACT	120
CR22	61	GCGGCGTGCGGAGATTTTGGAGGAAACGAAACCCCGCGCAGTGGGCGCCAAAGGAACACT	120
CR23	61	GCGGCGTGCGGAGATTTTGGAGGAAACGAAACCCCGCGCAGTGGGCGCCAAAGGAACACT	120
CR24	61	GCGGCGTGCGGAGATTTTGGAGGAAACGAAACCCCGCGCAGTGGGCGCCAAAGGAACACT	120
CS	61	GCGGCGTGCGGAGATTTTGGAGGAAACGAAACCCCGCGCAGTGGGCGCCAAAGGAACACT	120
CR02	61	GCGGCGTGCGGAGATTTTGGAGGAAACGAAACCCCGCGCAGTGGGCGCCAAAGGAACACT	120
CR08	61	GCGGCGTGCGGAGATTTTGGAGGAAACGAAACCCCGCGCAGTGGGCGCCAAAGGAACACT	120
CR09	61	GCGGCGTGCGGAGATTTTGGAGGAAACGAAACCCCGCGCAGTGGGCGCCAAAGGAACACT	120
CR10	61	GCGGCGTGCGGAGATTTTGGAGGAAACGAAACCCCGCGCAGTGGGCGCCAAAGGAACACT	120
CR11	61	GCGGCGTGCGGAGATTTTGGAGGAAACGAAACCCCGCGCAGTGGGCGCCAAAGGAACACT	120
CA	61	GCGGCGTGCGGAGATTTTGGAGGAAACGAAACCCCGCGCAGTGGGCGCCAAAGGAACACT	120
DQ094185.2	166	TCTTGGAACCGCCGTCGCGAACCTCTCCACCTCCCTTCTGTCTGTCCCAGGATAGGGAG	225
CR01	121	TCTTGGAACCGCCGTCGCGAACCTCTCCACCTCCCTTCTGTCTGTCCCAGGATAGGGAG	180
CR03	121	TCTTGGAACCGCCGTCGCGAACCTCTCCACCTCCCTTCTGTCTGTCCCAGGATAGGGAG	180
CR04	121	TCTTGGAACCGCCGTCGCGAACCTCTCCACCTCCCTTCTGTCTGTCCCAGGATAGGGAG	180
CR05	121	TCTTGGAACCGCCGTCGCGAACCTCTCCACCTCCCTTCTGTCTGTCCCAGGATAGGGAG	180
CR06	121	TCTTGGAACCGCCGTCGCGAACCTCTCCACCTCCCTTCTGTCTGTCCCAGGATAGGGAG	180
CR07	121	TCTTGGAACCGCCGTCGCGAACCTCTCCACCTCCCTTCTGTCTGTCCCAGGATAGGGAG	180
CR22	121	TCTTGGAACCGCCGTCGCGAACCTCTCCACCTCCCTTCTGTCTGTCCCAGGATAGGGAG	180
CR23	121	TCTTGGAACCGCCGTCGCGAACCTCTCCACCTCCCTTCTGTCTGTCCCAGGATAGGGAG	180
CR24	121	TCTTGGAACCGCCGTCGCGAACCTCTCCACCTCCCTTCTGTCTGTCCCAGGATAGGGAG	180
CS	121	TCTTGGAACCGCCGTCGCGAACCTCTCCACCTCCCTTCTGTCTGTCCCAGGATAGGGAG	180
CR02	121	TCTTGGAACCGCCGTCGCGAACCTCTCCACCTCCCTTCTGTCTGTCCCAGGATAGGGAG	180
CR08	121	TCTTGGAACCGCCGTCGCGAACCTCTCCACCTCCCTTCTGTCTGTCCCAGGATAGGGAG	180
CR09	121	TCTTGGAACCGCCGTCGCGAACCTCTCCACCTCCCTTCTGTCTGTCCCAGGATAGGGAG	180
CR10	121	TCTTGGAACCGCCGTCGCGAACCTCTCCACCTCCCTTCTGTCTGTCCCAGGATAGGGAG	180
CR11	121	TCTTGGAACCGCCGTCGCGAACCTCTCCACCTCCCTTCTGTCTGTCCCAGGATAGGGAG	180
CA	121	TCTTGGAACCGCCGTCGCGAACCTCTCCACCTCCCTTCTGTCTGTCCCAGGATAGGGAG	180
DQ094185.2	226	GGAGGGATGG	235
CR01	181	GCAGGCATGG	190
CR03	181	GCAGGCATGG	190
CR04	181	GCAGGCATGG	190
CR05	181	GCAGGCATGG	190
CR06	181	GCAGGCATGG	190
CR07	181	GCAGGCATGG	190
CR22	181	GCAGGCATGG	190
CR23	181	GCAGGCATGG	190
CR24	181	GCAGGCATGG	190
CS	181	GCAGGCATGG	190
CR02	181	GGAGGGATGG	190
CR08	181	GGAGGGATGG	190
CR09	181	GGAGGGATGG	190
CR10	181	GGAGGGATGG	190
CR11	181	GGAGGGATGG	190
CA	181	GCAGGCATGG	190

Tabela 18 - Legenda da informação de sequenciação.

Symbol	Description	Bases represented			
A	adenine	A			
C	cytosine		C		
G	guanine			G	1
T	thymine			T	
U	uracil			U	
W	weak	A			T
S	strong		C	G	
M	amino	A	C		
K	keto			G	T
R	purine	A		G	
Y	pyrimidine		C		T
B	not A (B comes after A)		C	G	T
D	not C (D comes after C)	A		G	T
H	not G (H comes after G)	A	C		T
V	not T (V comes after T and U)	A	C	G	
N or -	any base (not a gap)	A	C	G	T

8 Considerações finais

O tão conhecido Açafrão, *Crocus sativus* L., mundialmente utilizado como condimento na preparação dos mais variados alimentos, é considerada a especiaria mais cara do planeta. O preço do Açafrão da melhor qualidade no mercado internacional ronda os 700-1500 euros por kg. Isto é devido ao facto do seu pigmento ser extraído apenas dos seus três finos estigmas. Assim, a prática de adulterações nesta espécie, através da adição de substâncias sintéticas ou naturais, é muito comum, o que permite um abaixamento do preço de produção e conseqüentemente um maior ganho económico para os produtores. O consumidor é desta forma enganado sobre a autenticidade do produto que está a adquirir.

A fraude alimentar efetuada por comerciantes sem escrúpulos é uma prática recorrente, pelo que numerosos métodos físicos e químicos/bioquímicos têm sido utilizados para verificar essas irregularidades. No entanto, o aparecimento de novas formas de adulteração está a dificultar a sua deteção por métodos tradicionais, o que tem sido um impulso para o desenvolvimento de novos métodos, mais fiáveis e robustos para combater estas práticas fraudulentas e para proteger os consumidores. Os métodos analíticos com base em marcadores de ADN têm-se revelado ferramentas e alternativas promissoras aos métodos convencionais.

Assim, este trabalho levou ao desenvolvimento de marcadores moleculares para avaliação da autenticidade do Açafrão, através da utilização das técnicas de PCR qualitativa e PCR em tempo real. As regiões genómicas estudadas foram as designadas como *DNA barcode* - ITS1, ITS2 e *matK* - e um marcador SCAR. Para isso, foram utilizadas diferentes amostras, entre as quais amostras de folhas e bolbos de diferentes espécies do género *Crocus*, estigmas de amostras comerciais de Açafrão, Cártamo (como exemplo de um adulterante comum) e Açafrão em pó, para além de terem sido realizadas misturas de estigmas de *Crocus sativus* com *Carthamus tinctorius*.

A análise por PCR qualitativa permitiu concluir que as regiões ITS1 e *matK* são específicas do género *Crocus*, pois houve amplificação de todas as amostras pertencentes a esse género com os *primers* desenhados especificamente para essas regiões. Por outro lado, a região ITS2 e o marcador SCAR foram específicos para a espécie *Crocus sativus* L. e *Crocus cartwrightianus*, pois está reportado que estas duas espécies são bastante próximas geneticamente. Todos estes marcadores foram considerados aptos para estudos de autenticidade e identificação de espécies em todas as matrizes testadas, com a exceção da região ITS2 cuja amplificação não resultou quando aplicada em estigmas.

A utilização de *primers* específicos para a região ITS1 de *Carthamus tinctorius* permitiu, através de uma PCR qualitativa, a deteção de Cártamo numa percentagem de 10% nas misturas realizadas, provando a eficácia desta região na deteção deste adulterante. Por outro lado, a região ITS2 específica para a mesma espécie revelou não ser útil para este propósito.

O desenho de *primers* específicos que detetassem outros adulterantes, como *Calendula officinalis* e *Arnica montana*, sementes de *Bixa orellana*, pétalas de *Hemerocallis* sp., rizomas em pó de *Curcuma longa* e estigmas de *Crocus vernus* [42] e a verificação da existência dessas adulterações em amostras comerciais, poderia ser uma abordagem interessante para o seguimento deste trabalho.

A técnica de PCR em tempo real acoplada a uma análise por HRM foi aplicada com sucesso à região ITS1, permitindo a diferenciação de espécies do mesmo género. Este propósito foi conseguido pois a análise por HRM permitiu separar amostras pertencentes a espécies diferentes em grupos distintos com uma elevada percentagem de confiança, baseando-se apenas nas pequenas diferenças nucleotídicas presentes na sequência. Para além disso foi capaz de diferenciar as amostras que estavam adulteradas com Cártamo. Assim, esta abordagem também revelou ser útil na identificação de espécies e na deteção de adulterantes.

Para comprovar os resultados da análise por HRM e verificar quais as diferenças nucleotídicas em que se baseou para a separação de espécies em grupos diferentes, procedeu-se à sequenciação de algumas amostras. Os resultados demonstraram que todas as amostras da espécie *Crocus sativus* L. possuíam a mesma sequência, no entanto apresentavam diferenças nucleotídicas em relação a todas as outras amostras, também diferentes entre si. Os resultados mostraram também com elevada fiabilidade a existência de alguns erros nas sequências do NCBI. O *locus* ITS1 revelou assim ser viável na distinção de espécies do género *Crocus*.

Com este estudo fica demonstrada a elevada fiabilidade e robustez das técnicas de biologia molecular no estudo da autenticidade, de forma a identificar fraudes, tão commumente praticadas nesta espécie e em muitas outras especiarias e plantas aromáticas.

9 Referências Bibliográficas

1. Hirasa K, Takemasa M. Spices and Herbs: Basic Concepts. In: Hirasa K, Takemasa M, editors. *Spice Science and Technology*. New York: CRC Press; 1998. p. 1-27.
2. FAOSTAT – Food and Agriculture Organization, Statistic Division. 2014; Consultado em: Julho 2014. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/T/TP/E>.
3. Marieschi M, Torelli A, Poli F, Sacchetti G, Bruni R. RAPD-based method for the quality control of mediterranean oregano and its contribution to pharmacognostic techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009; 57(5): 1835-40.
4. UNCTAD/WTO I. World markets in the spice trade - 2000-2004. Geneva: International trade centre UNCTAD/WTO, 2006.
5. El Babili F, Bouajila J, Souchard JP, Bertrand C, Bellvert F, Fouraste I, et al. Oregano: chemical analysis and evaluation of its antimalarial, antioxidant, and cytotoxic activities. *Journal of Food Science*. 2011; 76(3): C512-C8.
6. Venkateswara R, Mukhopadhyay T, Annamalai T, Radhakrishnan N, Sahoo MR. Chemical constituents and biological studies of *Origanum vulgare* Linn. *Pharmacognosy Research*. 2011; 3(2): 143-5.
7. Marieschi M, Torelli A, Bianchi A, Bruni R. Detecting *Satureja montana* L. and *Origanum majorana* L. by means of SCAR-PCR in commercial samples of Mediterranean oregano. *Food Control*. 2011; 22(3-4): 542-8.
8. Bolechowski A, Moral R, Bustamante MA, Paredes C, Agulló E, Bartual J, et al. Composition of oregano essential oil (*Origanum vulgare*) as affected by the use of winery-distillery composts. *Journal of Essential Oil Research*. 2011; 23(3): 32-8.
9. Chandler-Ezell K. Folklore of oregano. *The Herbarist*. 2004; 70: 16-24.
10. Singletary K. Oregano: overview of the literature on health benefits. *Nutrition Today*. 2010; 45(3): 129-38.
11. Savini I, Arnone R, Catani MV, Avigliano L. *Origanum vulgare* induces apoptosis in human colon cancer CaCo2 cells. *Nutrition and Cancer*. 2009; 61(3): 381-9.
12. Raghavan S. A to Z Spices. In: Raghavan S, editor. *Handbook of Spices, Seasonings, and Flavorings*. New York: CRC Press; 2006. p. 63-186.
13. Marieschi M, Torelli A, Bianchi A, Bruni R. Development of a SCAR marker for the identification of *Olea europaea* L.: A newly detected adulterant in commercial Mediterranean oregano. *Food Chemistry*. 2011; 126(2): 705-9.
14. De Masi L, Siviero P, Esposito C, Castaldo D, Siano F, Laratta B. Assessment of agronomic, chemical and genetic variability in common basil (*Ocimum basilicum* L.). *European Food Research and Technology*. 2006; 223(2): 273-81.
15. Wetzel SB, Krüger H, Hammer K, Bachmann K. Investigations on morphological, biochemical and molecular variability of *Ocimum* L. species. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*. 2002; 9(2-3): 183-7.

16. Vieira RF, Simon JE. Chemical characterization of basil (*Ocimum* spp.) based on volatile oils. *Flavour and Fragrance Journal*. 2006; 21(2): 214-21.
17. Liber Z, Carović - Stanko K, Politeo O, Strikić F, Kolak I, Milos M, et al. Chemical characterization and genetic relationships among *Ocimum basilicum* L. cultivars. *Chemistry & Biodiversity*. 2011; 8(11): 1978-89.
18. Labra M, Miele M, Ledda B, Grassi F, Mazzei M, Sala F. Morphological characterization, essential oil composition and DNA genotyping of *Ocimum basilicum* L. cultivars. *Plant Science*. 2004; 167(4): 725-31.
19. Gupta S, Shukla R, Roy S, Senv N, Sharma A. In silico SSR and FDM analysis through EST sequences in *Ocimum basilicum*. *Plant OMICS: Journal of Plant Molecular Biology & Omics*. 2010; 3(4): 121-8.
20. El-Beshbishy H, Bahashwan S. Hypoglycemic effect of basil (*Ocimum basilicum*) aqueous extract is mediated through inhibition of α -glucosidase and α -amylase activities an in vitro study. *Toxicology and Industrial Health*. 2012; 28(1): 42-50.
21. Dhanya K, Syamkumar S, Siju S, Sasikumar B. SCAR markers for adulterant detection in ground chilli. *British Food Journal*. 2011; 113(5): 656-68.
22. Dhanya K, Sasikumar B. Molecular marker based adulteration detection in traded food and agricultural commodities of plant origin with special reference to spices. *Current Trends in Biotechnology & Pharmacy*. 2010; 4(1): 454-89.
23. Dhanya K, Syamkumar S, Sasikumar B. Development and application of SCAR marker for the detection of papaya seed adulteration in traded black pepper powder. *Food Biotechnology*. 2009; 23(2): 97-106.
24. Jiang Y, Liu J. Evaluation of genetic diversity in *Piper* spp using RAPD and SRAP markers. *Genetic and Molecular Research*. 2011; 10(4): 2934-43.
25. Khan S, Mirza KJ, Anwar F, Abdin MZ. Development of RAPD markers for authentication of *Piper nigrum* (L.). *Environment We International Journal Science Technology*. 2010; 5: 47-56.
26. Gülçin İ. The antioxidant and radical scavenging activities of black pepper (*Piper nigrum*) seeds. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 2005; 56(7): 491-9.
27. Pintão AM, SILVA I, editors. A verdade sobre o Açafrão. Workshop Plantas Medicinais e Fitoterapêuticas nos Trópicos IICT/CCCM Lisboa; 2008.
28. Ashraf K, Mujeeb M, Ahmad A, Amir M, Mallick MN, Sharma D. Validated HPTLC analysis method for quantification of variability in content of curcumin in *Curcuma longa* L. (turmeric) collected from different geographical region of India. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2012; 2(2): S584-S8.
29. Jan HU, Rabbani MA, Shinwari ZK. Assessment of genetic diversity of indigenous turmeric (*Curcuma longa* L.) germplasm from Pakistan using RAPD markers. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2011; 5(5): 823-30.
30. Hayakawa H, Kobayashi T, Minaniya Y, Ito K, Miyazaki A, Fukuda T, et al. Development of a molecular marker to identify a candidate line of turmeric (*Curcuma*

- longa* L.) with a high curcumin content. *American Journal of Plant Sciences*. 2011; 2: 15-26.
31. Dhanya K, Syamkumar S, Siju S, Sasikumar B. Sequence characterized amplified region markers: A reliable tool for adulterant detection in turmeric powder. *Food Research International*. 2011; 44(9): 2889-95.
 32. Joshi RK, Kuanar A, Mohanty S, Subudhi E, Nayak S. Mining and characterization of EST derived microsatellites in *Curcuma longa* L. *Bioinformation*. 2010; 5(3): 128-31.
 33. Ekin Z. Resurgence of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) utilization: A global view. *Journal of Agronomy*. 2005; 4(2): 83-7.
 34. Dajue L, Mündel H-H. Uses and world distribution. In: Dajue L, Mündel H-H, editors. *Safflower Carthamus tinctorius L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops*. 7. Rome: Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research; 1996. p. 25-35.
 35. Lee YS, Choi CW, Kim JJ, Ganapathi A, Udayakumar R, Kim SC. Determination of mineral content in methanolic safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seed extract and its effect on osteoblast markers. *International Journal of Molecular Sciences*. 2009; 10(1): 292-305.
 36. Mir SM, Devi CS, Mohanasrinivasan V. Methods of genomic fingerprinting of foods - A molecular perspective. *Journal of Pharmacy Research*. 2010; 3(8): 2023-30.
 37. Singhal R, Kulkarni P. Herbs and Spices. In: Lees M, editor. *Food Authenticity and Traceability*. New York: CRC press; 2003. p. 386-414.
 38. Dhanya K, Syamkumar S, Jaleel K, Sasikumar B. Random amplified polymorphic DNA technique for detection of plant based adulterants in chilli powder (*Capsicum annum*). *Journal of Spices and Aromatic Crops*. 2011; 17(2): 75-81.
 39. Hernandez A, Aranda E, Martin A, Benito MJ, Bartolome T, Córdoba MdGa. Efficiency of DNA typing methods for detection of smoked paprika “pimenton de la vera” adulteration used in the elaboration of dry-cured Iberian pork sausages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010; 58(22): 11688-94.
 40. Sen A, Gupta PS, Dastidar NG. Detection of *Curcuma zedoaria* and *Curcuma aromatica* in *Curcuma longa* (turmeric) by thin-layer chromatography. *Analyst*. 1974; 99(1176): 153-5.
 41. Sasikumar B, Syamkumar S, Remya R, John Zachariah T. PCR based detection of adulteration in the market samples of turmeric powder. *Food Biotechnology*. 2005; 18(3): 299-306.
 42. Marieschi M, Torelli A, Bruni R. Quality control of saffron (*Crocus sativus* L.): development of SCAR markers for the detection of plant adulterants used as bulking agents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012; 60(44): 10998-1004.
 43. Shaw PC, Ngan FN, But PPH, Wang J. Molecular Markers in Chinese Medicinal Materials. In: Shaw P-C, Wang J, But PP-H, editors. *Authentication of Chinese Medicinal Materials by DNA Technology*. Hong Kong: World Scientific Publishing Co; 2002. p. 1-23.

44. Reiter R. PCR-based marker systems. In: Phillips RL, Vasil IK, editors. *DNA-Based Markers in Plants*. 6. Netherlands: Springer; 2001. p. 9-29.
45. Zhang Y, Shaw P, Sze C, Wang Z, Tong Y. Molecular authentication of Chinese herbal materials. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2007; 15(1): 1-9.
46. Trindade H. Molecular biology of aromatic plants and spices. A review. *Flavour and Fragrance Journal*. 2010; 25(5): 272-81.
47. Kumar P, Gupta V, Misra A, Modi D, Pandey B. Potential of Molecular Markers in Plant Biotechnology. *Plant OMICS: Journal of Plant Molecular Biology & Omics*. 2009; 2(4): 141-62.
48. Mafra I, Oliveira MB. Organismos geneticamente modificados e alimentos derivados: II. Métodos de detecção e quantificação. *Alimentação Humana*. 2005; 11: 71-89.
49. Broll H. Polymerase Chain Reaction. In: Popping B, Diaz-Amigo C, Hoenicke K, editors. *Molecular Biological and Immunological Techniques and Applications for Food Chemists*. Hoboken: John Wiley & Sons; 2010. p. 41-58.
50. Schubbert R. Molecular Biology Laboratory Layout. In: Popping B, Diaz-Amigo C, Hoenicke K, editors. *Molecular Biological and Immunological Techniques and Applications for Food Chemists*. Hoboken: John Wiley & Sons; 2010. p. 3-40.
51. Yip PY, Chau CF, Mak CY, Kwan HS. DNA methods for identification of Chinese medicinal materials. *Chinese medicine*. 2007; 2(9): 9.
52. Sucher NJ, Carles MC. Genome-based approaches to the authentication of medicinal plants. *Planta medica*. 2008; 74(6): 603-23.
53. Kiran U, Khan S, Mirza KJ, Ram M, Abdin MZ. SCAR markers: a potential tool for authentication of herbal drugs. *Fitoterapia*. 2010; 81(8): 969-76.
54. Spooner D, van Treuren R, de Vicente M. Overview of Molecular Technologies. In: Spooner D, van Treuren R, de Vicente M, editors. *Molecular Markers for Genebank Management*. IPGRI Technical Bulletin. 10. Rome: International Plant Genetic Resource Institute; 2005. p. 3-23.
55. Aghaei M, Darvishzadeh R, Hassani A. Molecular characterization and similarity relationships among iranian basil (*Ocimum basilicum* L.) accessions using inter simple sequence repeat markers. *Revista Ciência Agronômica*. 2012; 43(2): 312-20.
56. Broll H. Quantitative Real-Time PCR. In: Popping B, Diaz-Amigo C, Hoenicke K, editors. *Molecular Biological and Immunological Techniques and Applications for Food Chemists*. Hoboken: John Wiley & Sons; 2010. p. 59-84.
57. Woolfe M, Primrose S. Food forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud. *Trends in biotechnology*. 2004; 22(5): 222-6.
58. Mohamada NA, Sheikhaa AFE, Mustafaa S, Mokhtara NFK. Comparison of gene nature used in real-time PCR for porcine identification and quantification: A review. *Food Research International*. 2013; 50(1): 330-8.
59. Druml B, Cichna-Markl M. High resolution melting (HRM) analysis of DNA--its role and potential in food analysis. *Food Chemistry*. 2014; 158: 245-54.

60. Madesis P, Ganopoulos I, Sakaridis I, Argiriou A, Tsiftaris A. Advances of DNA-based methods for tracing the botanical origin of food products. *Food Research International*. 2014; 60: 163-72.
61. Costa J, Mafra I, Oliveira MBPP. High resolution melting analysis as a new approach to detect almond DNA encoding for Pru du 5 allergen in foods. *Food Chemistry*. 2012; 133(3): 1062-9.
62. Garcia-Canas V, Cifuentes A, Gonzalez R. Detection of genetically modified organisms in foods by DNA amplification techniques. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2004; 44(6): 425-36.
63. Smith CJ, Osborn AM. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS microbiology ecology*. 2009; 67(1): 6-20.
64. Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2004; 10(3): 190-212.
65. Santos G. Desenvolvimento de metodologias de biologia molecular para a autenticação de produtos cárneos com designação Halal. Porto: Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto; 2013.
66. Hebert PD, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings Biological sciences / The Royal Society*. 2003; 270(1512): 313-21.
67. 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 Research International*. 2013; 50(1): 55-63.
68. Hebert PD, Ratnasingham S, deWaard JR. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society* 2003. p. S96-S9.
69. Mower JP, Touzet P, Gummow JS, Delph LF, Palmer JD. Extensive variation in synonymous substitution rates in mitochondrial genes of seed plants. *BMC Evolutionary Biology*. 2007; 7(1): 135.
70. Hollingsworth ML, Andra CA, Forrest LL, Richardson J, Pennington RT, Long DG, et al. Selecting barcoding loci for plants: evaluation of seven candidate loci with species-level sampling in three divergent groups of land plants. *Molecular Ecology Resources*. 2009; 9(2): 439-57.
71. Li DZ, Gao LM, Li HT, Wang H, Ge XJ, Liu JQ, et al. Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011; 108(49): 19641-6.
72. Feliner GN, Rosselló JA. Better the devil you know? Guidelines for insightful utilization of nrDNA ITS in species-level evolutionary studies in plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2007; 44(2): 911-9.
73. Babaei S, Talebi M, Bahar M. Developing an SCAR and ITS reliable multiplex PCR-based assay for safflower adulterant detection in saffron samples. *Food Control*.

2014; 35(1): 323-8.

74. Kress W, Wurdack K, Zimmer E, Weigt L, Janzen D. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005; 102(23): 8369-74.
75. Hollingsworth P, Graham S, Little D. Choosing and using a plant DNA barcode. *PLoS One*. 2011; 6(5): e19254.
76. Chen S, Yao H, Han J, Liu C, Song J, Shi L, et al. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS One*. 2010; 5(1): e8613.
77. Shaw J, Lickey EB, Schilling EE, Small RL. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. *American Journal of Botany*. 2007; 94(3): 275-88.
78. Fazekas AJ, Kesanakurti PR, Burgess KS, Percy DM, Graham SW, Barrett SC, et al. Are plant species inherently harder to discriminate than animal species using DNA barcoding markers? *Molecular Ecology Resources*. 2009; 9(1): 130-9.
79. Lou SK, Wong KL, Li M, Pui-Hay BP, Kwok-Wing TS, Shaw PC. An integrated web medicinal materials DNA database: MMDBD (Medicinal Materials DNA Barcode Database). *BMC Genomics*. 2010; 11(1): 402.
80. De Mattia F, Gentili R, Bruni I, Galimberti A, Sgorbati S, Casiraghi M, et al. A multi - marker DNA barcoding approach to save time and resources in vegetation surveys. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 2012; 169(3): 518-29.
81. Burgess KS, Fazekas AJ, Kesanakurti PR, Graham SW, Husband BC, Newmaster SG, et al. Discriminating plant species in a local temperate flora using the *rbcL+matK* DNA barcode. *Methods in Ecology and Evolution*. 2011; 2(4): 333-40.
82. Srivastava R, Ahmed H, Dixit R. *Crocus sativus* L.: a comprehensive review. *Pharmacognosy Reviews*. 2010; 4(8): 200-8.
83. Santana O. Crocus Bank Project 2007; Consultado em: Maio 2013. Disponível em: <http://www.crocusbank.org/Index22En.htm>.
84. Rubio-Moraga A, Castillo-López R, Gómez-Gómez L, Ahrazem O. Saffron is a monomorphic species as revealed by RAPD, ISSR and microsatellite analyses. *BMC Research Notes*. 2009; 2(1): 189.
85. Winterhalter P, Straubinger M. Saffron - renewed interest in an ancient spice. *Food Reviews International*. 2000; 16(1): 39-59.
86. Champalal KD, Nilakshi N, Vijay GR, Abhyankar M. Detailed profile of *Crocus sativus*. *International Journal of Pharma & Bio Sciences*. 2011; 2(1): 530-40.
87. Bathaie SZ, Mousavi SZ. New applications and mechanisms of action of saffron and its important ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2010; 50(8): 761-86.
88. Hasan I, Ansari AH, Sherwani A, Zulkifle M. The incredible health benefits of saffron:

A review. *Journal of Pharmacy Research*. 2011; 4(7): 2156-8.

89. Nasri S, Hosseini SY, Sahraei H, Zardouz H. Inhibition of pain and inflammation induced by formalin in male mice by ethanolic extract of saffron (*Crocus sativus*) and its constituents; crocin and safranal. *Kowsar Medical Journal*. 2011; 15(4): 189-95.
90. Karimi E, Oskoueian E, Hendra R, Jaafar HZ. Evaluation of *Crocus sativus* L. stigma phenolic and flavonoid compounds and its antioxidant activity. *Molecules*. 2010; 15(9): 6244-56.
91. Abdullaev F, Frenkel G. The effect of saffron on intracellular DNA, RNA and protein synthesis in malignant and non-malignant human cells. *BioFactors* 1992; 4(1): 43-5.
92. Escribano J, Alonso GL, Coca-Prados M, Fernández JA. Crocin, safranal and picrocrocin from saffron (*Crocus sativus* L.) inhibit the growth of human cancer cells in vitro. *Cancer Letters*. 1996; 100(1): 23-30.
93. Garc-Olmo DC, Riese HH, Escribano J, Ontan J, Fernandez JA, Atiénzar M, et al. Effects of long-term treatment of colon adenocarcinoma with crocin, a carotenoid from saffron (*Crocus sativus* L.): an experimental study in the rat. *Nutrition and Cancer*. 1999; 35(2): 120-6.
94. Tarantilis P, Morjani H, Polissiou M, Manfait M. Inhibition of growth and induction of differentiation of promyelocytic leukemia (HL-60) by carotenoids from *Crocus sativus* L. *Anticancer Research*. 1994; 14(5A): 1913-8.
95. Wang CJ, Lee MJ, Chang MC, Lin JK. Inhibition of tumor promotion in benzo [a] pyrene-initiated CD-1 mouse skin by crocetin. *Carcinogenesis*. 1995; 16(2): 187-91.
96. El Daly E. Protective effect of cysteine and vitamin E, *Crocus sativus* and *Nigella sativa* extracts on cisplatin-induced toxicity in rats. *Journal de Pharmacie de Belgique*. 1997; 53(2): 87-93; discussion -5.
97. Rios J, Recio M, Giner R, Manez S. An update review of saffron and its active constituents. *Phytotherapy Research*. 1996; 10(3): 189-93.
98. Bors W, Saran M, Michel C. Radical intermediates involved in the bleaching of the carotenoid crocin. Hydroxyl radicals, superoxide anions and hydrated electrons. *International Journal of Radiation Biology*. 1982; 41(5): 493-501.
99. Abe K, Saito H. Effects of saffron extract and its constituent crocin on learning behaviour and long - term potentiation. *Phytotherapy Research*. 2000; 14(3): 149-52.
100. Xu G, Yu S, Gong Z, Zhang S. Study of the effect of crocin on rat experimental hyperlipemia and the underlying mechanisms. *China Journal of Chinese Materia Medica*. 2005; 30(5): 369-72.
101. Hosseinzadeh H, Sadeghnia HR. Safranal, a constituent of *Crocus sativus* (saffron), attenuated cerebral ischemia induced oxidative damage in rat hippocampus. *Journal of Pharmaceutical Science*. 2005; 8(3): 394-9.
102. Bajbouj K, Schulze-Luehrmann J, Diermeier S, Amin A, Schneider-Stock R. The anticancer effect of saffron in two p53 isogenic colorectal cancer cell lines. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2012; 12(1): 69.

103. ISO 3632-2:2010. Spices – Saffron (*Crocus sativus* L.) – Part 2: Test methods. Geneva: International Organization for Standardization.
104. Sabatino L, Scordino M, Gargano M, Belligno A, Traulo P, Gagliano G. HPLC/PDA/ESI-MS evaluation of saffron (*Crocus sativus* L.) adulteration. *Natural Product Communications*. 2011; 6(12): 1873-6.
105. Zougagh M, Simonet BM, Rios A, Valcarcel M. Use of non-aqueous capillary electrophoresis for the quality control of commercial saffron samples. *Journal of Chromatography A*. 2005; 1085(2): 293-8.
106. Zalacain A, Ordoudi SA, Diaz-Plaza EM, Carmona M, Blazquez I, Tsimidou MZ, et al. Near-infrared spectroscopy in saffron quality control: determination of chemical composition and geographical origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005; 53(24): 9337-41.
107. Torelli A, Marieschi M, Bruni R. Authentication of saffron (*Crocus sativus* L.) in different processed, retail products by means of SCAR markers. *Food Control*. 2014; 36(1): 126-31.
108. Reference Framework. 2007. In: Saffron in Europe, White Book. p. 21-54. Consultado em: Maio 2013. Disponível em: <http://www.europeansaffron.eu/archivos/Whitebookenglish>.
109. Javanmardi N, Bagheri A, Moshtaghi N, Sharifi A, Hemati Kakhki A. Identification of Safflower as a fraud in commercial Saffron using RAPD/SCAR. *Journal of Cell and Molecular Research*. 2011; 3(1): 31-7.
110. Mafra I, Silva S, Moreira E, Ferreira da Silva C, Oliveira MB. Comparative study of DNA extraction methods for soybean derived food products. *Food Control*. 2008; 19(2): 1183-90.
111. Somma M. Extraction and Purification of DNA (Session 4). In: Protection JRCIfHaC, editor.: World Health Organization; 2006.
112. Rodrigues BC. Desenvolvimento de metodologias de biologia molecular para a avaliação da autenticidade de plantas medicinais contendo *Hypericum androsaemum* e *Hypericum perforatum*. Porto: Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto; 2012.
113. Caiola MG, Caputo P, Zanier R. RAPD analysis in *Crocus sativus* L. accessions and related *Crocus* species. *Biologia Plantarum* 2004; 48(3): 375-80.
114. Noyes RD, Rieseberg LH. Two independent loci control agamospermy (Apomixis) in the triploid flowering plant *Erigeron annuus*. *Genetics*. 2000; 155(1): 379-90.
115. Brandizzi F, Caiola MG. Flow cytometric analysis of nuclear DNA in *Crocus sativus* and allies (Iridaceae). *Plant Systematics and Evolution*. 1998; 211(3-4): 149-54.
116. He W, Xie L, Li T, Liu S, Xiao J, Hu J, et al. The formation of diploid and triploid hybrids of female grass carp × male blunt snout bream and their 5S rDNA analysis. *BMC Genetics*. 2013; 14(1): 110.
117. Alvarez I, Wendel JF. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2003; 29(3): 417-34.

118. Caiola MG. Reproduction biology of saffron and its allies. In: Negbi M, editor. *Saffron, Crocus sativus L.* Medicinal and Aromatic Plants-Industrial Profiles. 8. Amsterdam: CRC Press; 1999. p. 31-44.
119. Caiola MG, Di Somma D, Lauretti P. Comparative study of pollen and pistil in *Crocus sativus* L. (Iridaceae) and allied species. . *Annali di Botanica*. 2000; 58: 73-82.
120. Ghaffari S, Bagheri A. Stigma variability in saffron (*Crocus sativus* L.). *African Journal of Biotechnology*. 2009; 8(4): 601-4.
121. Selvaraj D, Sarma R, Sathishkumar R. Phylogenetic analysis of chloroplast matK gene from Zingiberaceae for plant DNA barcoding. *Bioinformation*. 2008; 3(1): 24-7.
122. Busconi M, Sebastiani L, Fogher C. Development of SCAR markers for germplasm characterization in olive tree (*Olea europea* L.). *Molecular Breeding*. 2006; 17(1): 59-68.
123. Scheef E, Casler M, Jung G. Development of species-specific SCAR markers in bentgrass. *Crop Science*. 2003; 43(1): 345-9.
124. BioRad-Laboratories. Precision Melt Analysis™ Software, Instruction Manual. 2009.
125. Li R, Dao Z. Identification of *Meconopsis* species by a DNA barcode sequence: the nuclear internal transcribed spacer (ITS) region of ribosomal deoxyribonucleic acid (DNA). *African Journal of Biotechnology*. 2013; 10(70): 15805-7.