



***Determinação da autenticidade do bacalhau do
Atlântico (Gadus morhua) e subprodutos
comercializados em Portugal por meio de ferramentas
moleculares***

Ivan Santos Soares

2015



***Determinação da autenticidade do bacalhau do
Atlântico (Gadus morhua) e subprodutos
comercializados em Portugal por meio de ferramentas
moleculares***

Ivan Santos Soares

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Gestão da Qualidade e
Segurança Alimentar

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação da Professora Doutora Clélia
Paulete Correia Neves Afonso e coorientação da Professora Doutora Maria Manuel
Sampaio Cristóvão

2015

Determinação da autenticidade do bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*) e subprodutos comercializados em Portugal por meio de ferramentas moleculares

Copyright ©: Ivan Santos Soares

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar de Peniche

Instituto Politécnico de Leiria

2015

A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Quero deixar o meu agradecimento a todas as pessoas que me acompanharam ao longo do desenvolvimento deste trabalho. Assim começo por agradecer, à minha orientadora, Professora Doutora, Clélia Paulete Correia Neves pela bibliografia cedida, ensinamentos e disponibilidade demonstrada ao longo do desenvolvimento desta tese de mestrado. Aos meus colegas de trabalho. À minha colega e grande amiga Andreia Miranda pelas horas passadas no laboratório e fora dele e pelo apoio prestado em todos os momentos, mas principalmente nos momentos menos bons. Por fim, mas principalmente, aos meus pais e irmãos pelo apoio incondicional, incentivo e paciência. A todas estas pessoas o meu sincero Obrigado!

Resumo

A necessidade de existência de métodos moleculares eficazes, expeditos e capazes de identificar e comprovar que as espécies presentes num dado alimento processado são realmente as indicadas no rótulo de cada produto torna-se hoje fundamental. Esta necessidade deriva não só da crescente globalização e introdução de novas espécies pesqueiras no mercado europeu, com um conseqüente aumento do consumo de produtos da pesca, essencialmente produtos processados, onde as características morfológicas foram adulteradas ou eliminadas, assim como do crescente consumo de produtos congelados, enlatados e filetados. Devido às recentes crises no sector alimentar, desde a “doença das vacas loucas” da década de 90 até ao mais recente caso da presença de carne de cavalo em preparados de carne de suíno e bovino, a confiança dos consumidores foi abalada. Por estes motivos a existência de métodos que comprovem a autenticidade dos produtos é de extrema importância não só pelo crescimento das exigências do consumidor mas, principalmente, por razões de fraude e de legislação imposta pela União Europeia.

Para a determinar a autenticidade de produtos e subprodutos de várias espécies da família dos gadídeos foi feito o desenvolvimento de um método de PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism). Para tal, um fragmento pertencente ao citocromo *b* mitocondrial de aproximadamente 332 pb foi amplificado por PCR. A técnica testada incluída a digestão pelas enzimas de restrição, AluI, SspI e EcoRV, e visualização dos padrões de restrição obtidos por eletroforese em gel de agarose. O método de PCR-RFLP desenvolvido não permitiu a correta identificação das espécies em estudo, pelo que se apresenta e discute uma série de fatores que poderão ter condicionado o sucesso do método desenvolvido dos quais podemos salientar o grau de incerteza associado às sequências provenientes de base de dados internacionais, a análise de amostras degradadas por tratamentos industriais e a necessidade de refinar e melhorar o desenho dos primers, assim como a escolha das enzimas de restrição.

Palavras-chave: Métodos moleculares, PCR-RFLP, gadídeos, citocromo *b* mitocondrial, enzimas de restrição.

Abstract

The need for the existence of effective molecular methods, expeditious and able to identify and certify that the fish species that were packed are really the ones indicated on the label of each product has become essential. This need is not only due to the globalization and introduction of new fish species in the European market with a consequent increase in the consumption of fishery products, mainly products that have been processed, where the morphological features were adulterated or eliminated, as well as the increasing consumption of frozen products, canned and filleted. Due to recent food crisis, from the "mad cow disease" of the 90's to the latest scandal of the discovery of horse meat in products made of pork and beef, which have shaken consumer confidence. For these reasons the existence of methods to prove the authenticity of the products is of utmost importance not only by the growth of consumer demand but mainly for reasons of fraud and legislation imposed by the European Union.

To determine the authenticity of products and sub-products of various species of the gadoids family it was developed and applied the PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism) method. For this purpose, a fragment belonging to the mitochondrial cytochrome *b* approximately of 332 bp was amplified by PCR. Following digestion by restriction enzymes *AluI*, *SspI* and *EcoRV*, and restriction profiles were observed by electrophoresis on an agarose gel. The PCR-RFLP method did not allow correct identification of the species under study, so various factors are presented in this study that probably may have influenced the success of the method developed, which we can emphasize the degree of uncertainty associated with sequences from international data base, the analysis of degraded samples by industrial treatments and the need to refine and improve the design of the primers, as well as choice of restriction enzymes.

Keywords: molecular methods, PCR-RFLP, gadoids, mitochondrial cytochrome *b*, restriction enzymes.

Índice

Agradecimentos	iii
Resumo	v
Abstract	vii
Índice	ix
Índice de Figuras	xi
Índice de Tabelas	xiii
1. Introdução	1
1.1. Identificação e autenticação de espécies pesqueiras	1
1.1.1. Legislação Europeia e Portuguesa	1
1.2. Identificação morfológica e classificação taxonómica de gadídeos	4
1.2.1. Caracterização morfológica e taxonómica do Bacalhau (<i>Gadus morhua</i>)	5
1.3. Importância económica do Bacalhau	6
1.4. Técnicas de autenticação e identificação de espécies	8
1.4.1. Métodos baseados na análise de proteínas	9
1.4.1.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (<i>SDS-PAGE</i>)	9
1.4.1.2. Focalização isoeétrica (<i>IEF</i>)	10
1.4.1.3. Eletroforese em gradiente de gel	10
1.4.1.4. Eletroforese capilar	10
1.4.1.5. Eletroforese bidimensional	11
1.4.1.6. Métodos cromatográficos	11
1.4.1.7. Espectrometria de massa (<i>MS</i>)	12
1.4.1.8. Métodos imunológicos	12
1.4.2. Métodos genéticos	12
1.4.2.1. <i>PCR</i> espécie-específica	13
1.4.2.2. <i>PCR-RFLP</i> (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)	14
1.4.2.3. <i>PCR-SSCP</i> (<i>Single Strand Conformation Polymorphism</i>)	14
1.4.2.4. <i>PCR-RAPD</i> (<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>)	15
1.4.2.5. <i>PCR-DGGE</i> (<i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i>)	15
1.4.2.6. <i>AFLP</i> (<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>)	16
1.4.2.7. <i>FINS</i> (<i>Forensically Informative Nucleotide Sequencing</i>)	16
1.4.2.8. <i>Microarrays</i>	16
1.4.2.9. <i>PCR</i> a tempo real	17

1.5. Identificação/autenticação através da utilização da técnica PCR – RFLP (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)	17
1.6. Problemática da identificação de espécies em alimentos por PCR – RFLP	21
1.7. Eletroforese em gel de agarose	22
2. Alinhamento, desenho dos <i>primers</i> e identificação de enzimas de restrição para identificação de espécies de peixes da família dos gadídeos utilizando a técnica de PCR-RFLP	25
2.1. Alinhamento das sequências de ADN	25
2.2. Desenho dos oligonucleótidos de iniciação (<i>primers</i>)	28
2.3. Enzimas de restrição	28
3. Material e Métodos	31
3.1. Espécies Analisadas	31
3.2. Extração de ADN	31
3.3. Amplificação do material genético pela reação de polimerização em cadeia (<i>PCR</i>)	32
3.4. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de <i>PCR</i>	33
3.5. Identificação de sítios de restrição	33
3.6. Utilização da técnica <i>PCR – RFLP</i>	34
4. Resultados e Discussão	35
3.7. Métodos de extração utilizados	35
3.8. Amplificação do material genético pela técnica de <i>PCR</i>	41
3.9. Análises por <i>PCR-RFLP</i>	50
5. Conclusão e Perspetivas Futuras	53
6. Referências Bibliográficas	57
7. Anexos	61
Anexo I – Lista Consolidada de Denominações Comerciais de Espécies de Pescado da Direção-Geral de Recursos Naturais, Segurança e Serviços Marítimos	61

Índice de Figuras

Figura 1.1 – Taxonomia dos gadídeos.	5
Figura 1.2 – Taxonomia do bacalhau (<i>Gadus morhua</i>).	6
Figura 3.1 – Esquema da divisão de volumes de cada mistura com os respetivos pares de <i>primers</i> por cada tubo de PCR. Onde as letras A, B e C correspondem a amostras de ADN e X ao número total de amostras e os números 1 e 2, à mistura com os <i>primers</i> Hip1 e à mistura com os <i>primers</i> Hip2, respetivamente.	32
Figura 4.1 – Eletroforese em gel de agarose para a extração de ADN genómico de <i>Gadus morhua</i> pelo método Ureia-SDS-Proteinase K.	36
Figura 4.2 – Eletroforese em gel de agarose para a extração de ADN genómico de <i>Gadus morhua</i> pelo método Ureia-SDS-Proteinase K e pelo <i>kit</i> de extração <i>G-spin</i> .	36
Figura 4.3 – Eletroforese em gel de agarose para os produtos amplificados por PCR derivados da extração de ADN genómico de <i>Gadus morhua</i> utilizando vários métodos de extração.	38
Figura 4.4 – Eletroforese em gel de agarose para a extração de ADN genómico de bacalhau desfiado (<i>Gadus macrocephalus</i>) pelo método fenol-clorofórmio	39
Figura 4.5 - Eletroforese em gel de agarose para a extração de ADN genómico de amostras de alimentos processados a partir do método modificado fenol-clorofórmio.	40
Figura 4.6 – Eletroforese em gel de agarose para a extração de ADN genómico de amostras de alimentos processados e consequente PCR.	41
Figura 4.7 – Eletroforese em gel de agarose para o PCR de amostras de alimentos processados.	42
Figura 4.8 – Eletroforese em gel de agarose para o PCR de amostras de alimentos processados.	44
Figura 4.9 – Eletroforese em gel de agarose para o PCR de amostras de bacalhau.	44
Figura 4.10 – Eletroforese em gel de agarose para o PCR com gradiente de temperaturas de annealing a 49°, 50° e 51°C para uma amostra de lasanha de bacalhau.	45
Figura 4.11 – Eletroforese em gel de agarose para o PCR de amostras de bacalhau e espécies afins.	46
Figura 4.12 – Eletroforese em gel de agarose para o PCR de amostras de bacalhau e espécies afins.	47

Figura 4.13 – Eletroforese em gel de agarose das digestões com as enzimas de restrição AluI, SspI e EcoRV dos produtos de PCR de amostras de bacalhau e espécies afins.

50

Índice de Tabelas

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

33