

Desenvolvimento de métodos moleculares para a diferenciação de espécies de crustáceos em alimentos

Catarina Ribeiro da Silva

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

Trabalho realizado sob a orientação de:
Doutora Isabel Maria Sousa Gomes Mafra
Professora Doutora Maria Beatriz Prior Pinto Oliveira

Novembro 2016

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

Agradecimentos

A realização deste trabalho não teria sido possível sem a colaboração direta e indireta de um conjunto de pessoas, às quais não posso deixar de expressar a minha sincera gratidão:

À Doutora Isabel Mafra pela oportunidade que me deu para desenvolver este trabalho, pela ajuda e disponibilidade constante, pelos conhecimentos transmitidos e pela orientação da minha dissertação.

À Professora Doutora Beatriz Oliveira por ter disponibilizado todos os recursos necessários para a realização deste trabalho.

Ao Telmo Fernandes pela ajuda contínua dada ao longo deste trabalho, pela disponibilidade constante e por todos os conhecimentos científicos transmitidos, sem os quais este trabalho teria sido difícil de realizar. Muito obrigada por tudo!

À Joana Costa por toda a ajuda prestada durante este trabalho e por estar sempre disponível para esclarecer todas as dúvidas que foram surgindo.

Às minhas colegas Cíntia Mendes e Inês Sousa pela amizade, apoio, companheirismo e por todos os bons momentos que partilhámos durante esta etapa académica.

À Caterina Villa, Liliana Grazina, Liliana Meira e Sónia Soares pela simpatia, pela ajuda e pelo esclarecimento de dúvidas que apareceram no decorrer do trabalho laboratorial.

À minha família e amigos por todo o apoio dado ao longo deste percurso.

Aos meus pais pela paciência e apoio durante os momentos mais complicados desta etapa, pela ajuda constante ao longo da minha formação académica e porque sem eles este percurso teria sido muito mais difícil de concluir, um enorme obrigada!

Comunicações em encontros científicos no âmbito deste trabalho

Trabalho apresentado sob a forma de comunicação oral:

Catarina Silva, Telmo J. R. Fernandes, Joana Costa, M. Beatriz P.P. Oliveira, Isabel Mafra. Clustering of shrimp and prawn species by DNA barcoding and HRM analysis. IJUP – 9th Meeting of young researchers of University of Porto, Porto, 17-19 de fevereiro de 2016, Porto.

Trabalho apresentado sob a forma de poster:

Catarina Silva, Telmo J. R. Fernandes, Joana Costa, M. Beatriz P.P. Oliveira, Isabel Mafra. Penaeid shrimp species discrimination based on DNA barcoding coupled to HRM analysis, 13º Encontro de Química dos Alimentos, Porto, 14-16 de setembro de 2016, livro de resumos, p53.

Resumo

Os camarões são um alimento muito apreciado em todo o mundo e a sua produção global (captura e aquacultura) representa mais de 50% da produção total de crustáceos. A família de camarões Penaeidae caracteriza-se por englobar espécies de elevado valor comercial. Como consequência desse valor e das semelhanças fenotípicas existentes entre os camarões da família Penaeidae, estas espécies tornam-se potenciais alvos de adulteração, existindo, por isso, a necessidade de desenvolver métodos analíticos eficientes para a sua diferenciação em alimentos. Ao longo dos anos foram desenvolvidos vários métodos para a identificação e avaliação da autenticidade de espécies de camarão baseados essencialmente na análise de proteínas, porém hoje em dia os métodos baseados na análise de DNA têm demonstrado ser mais adequados para a diferenciação de espécies, principalmente quando estas se encontram processadas.

O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de metodologias moleculares para a diferenciação de 5 espécies de camarão da família Penaeidae (*Penaeus monodon*, *Fenneropenaeus indicus*, *Metapenaeus affinis*, *Litopenaeus vannamei* e *Melicertus kerathurus*) e posterior aplicação na identificação dessas espécies em alimentos processados. Primeiramente, os extratos de DNA das espécies selecionadas de camarões foram amplificados por PCR qualitativa tendo como alvo uma região do gene COI, considerada um *DNA barcode*. De dois pares de *primers* desenhados, apenas um permitiu amplificar as 5 espécies selecionadas, tendo apresentado maior especificidade. Posteriormente, foi desenvolvido um método de PCR em tempo real usando o corante EvaGreen acoplado a uma análise de HRM que possibilitou a discriminação das espécies de camarão selecionadas. A análise de HRM quando aplicada em 8 das 25 amostras comerciais adquiridas permitiu identificar espécies de camarão em 7 dessas amostras e detetar uma não conformidade com a rotulagem na única amostra comercial que indicava o nome científico das espécies no rótulo. Através da sequenciação, foi possível confirmar que as amostras de camarão da família Penaeidae selecionadas para este trabalho, à exceção da amostra da espécie *M. affinis*, correspondiam à espécie indicada no rótulo, constatando-se assim a existência de outro erro de rotulagem. Assim, este estudo demonstrou que o método desenvolvido permite diferenciar e detetar a substituição de espécies de camarão, de forma eficiente, podendo ser considerado uma ferramenta valiosa para estudos de autenticidade.

Palavras-chave: Camarões, PCR em tempo real, HRM, *DNA barcoding*, autenticidade.

Abstract

Shrimps are a kind of food highly appreciated worldwide and its global production (capture and aquaculture) accounts for over 50% of total production of crustaceans. The Penaeidae family is characterized by including shrimp species of high commercial value. As a result of their value and existing phenotypic similarities among penaeid shrimps, they are potential adulteration targets, stressing the need for the development of efficient analytical methods for their differentiation in foods. Over the years, several methods based primarily on protein analysis were developed for the shrimp species identification and for authentication assessment, but nowadays DNA-based methods have proved to be more suitable for species differentiation, especially in processed samples.

The present study aimed at developing molecular methodologies for the differentiation of 5 shrimp species belonging to the family Penaeidae (*Penaeus monodon*, *Fenneropenaeus indicus*, *Metapenaeus affinis*, *Litopenaeus vannamei* and *Melicertus kerathurus*) and subsequent application on the identification of these species in processed foodstuffs. Firstly, DNA extracts of selected shrimp species were amplified by qualitative PCR targeting a COI gene region considered a DNA barcode. From the two designed pairs of primers, only one allowed amplifying the selected 5 species and showed higher specificity. Subsequently, a real-time PCR using EvaGreen dye coupled to HRM analysis was developed and enabled the discrimination of the selected shrimp species. The HRM analysis, when applied to 8 of 25 commercial samples, allowed identifying shrimp species in 7 of these samples and detecting an incompliance with labelling in the only commercial sample indicating the scientific species name. Based on sequencing, it was possible to confirm that the selected penaeid shrimp species in the present work, except the *M. affinis* species, corresponded to the species indicated on the label, verifying the existence of other mislabelling sample. Thus, this study has shown that the developed method allows differentiating and detecting shrimp species substitution, effectively, being considered a valuable tool for authenticity studies.

Keywords: Shrimps, real-time PCR, HRM, DNA barcoding, authenticity.

Índice

Agradecimentos	iii
Comunicações em encontros científicos no âmbito deste trabalho.....	iv
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 Descrição dos crustáceos utilizados na alimentação.....	4
1.2 Morfologia externa dos crustáceos.....	5
1.3 Importância alimentar e comercial dos crustáceos	8
2 Crustáceos: uma fonte de alergénios	9
2.1 Alergénios dos crustáceos	12
2.1.1 Tropomiosina	12
2.1.2 Arginina cinase	12
2.1.3 Proteína de ligação ao cálcio sarcoplasmático.....	14
2.1.4 Miosinas de cadeia leve	14
2.1.5 Troponina C e I	15
2.1.6 Triose-fosfato isomerase.....	15
2.1.7 Proteína relacionada com o desenvolvimento do ovário.....	15
3 Metodologias utilizadas na identificação de espécies de crustáceos.....	15
3.1 Métodos baseados na análise de proteínas	16
3.2 Métodos baseados na análise de DNA	17
3.2.1 Técnica da PCR.....	18
3.2.2 PCR-RFLP	20
3.2.3 RAPD.....	21
3.2.4 AFLP	22
3.2.5 PCR-SSCP	24
3.2.6 PCR em tempo real.....	25

3.2.7	PCR-sequenciação.....	31
3.2.8	<i>DNA barcoding</i>	32
4	Estudos sobre a identificação de espécies de crustáceos	33
5	Objetivos e âmbito do trabalho	38
	Componente experimental	39
6	Metodologia	41
6.1	Descrição e preparação das amostras.....	41
6.2	Reagentes e soluções	43
6.3	Extração de DNA	44
6.4	Avaliação do DNA extraído	45
6.5	Amplificação por PCR.....	45
6.5.1	<i>Primers</i>	45
6.5.2	PCR qualitativa	47
6.5.3	PCR em tempo real e análise de <i>High Resolution Melting</i> (HRM).....	49
6.5.4	PCR sequenciação	49
7	Resultados e Discussão	51
7.1	Avaliação da qualidade do DNA extraído	51
7.2	PCR qualitativa	54
7.2.1	Avaliação da capacidade de amplificação dos extratos	54
7.2.2	Amplificação do gene COI das espécies de camarão	56
7.2.3	Aplicação da PCR qualitativa nas amostras comerciais.....	62
7.3	PCR em tempo real e análise de HRM.....	63
7.3.1	Desenvolvimento e otimização do método.....	63
7.3.2	Aplicação do método na identificação de espécies de camarão em amostras comerciais	68
7.4	PCR sequenciação.....	72
8	Conclusão.....	77
9	Referências bibliográficas	79

Índice de figuras

Figura 1 - Classificação do Subfilo Crustacea, de acordo com Martin & Davis (2001).....	4
Figura 2 - Morfologia externa de um camarão. Adaptado de Chan, (1998).	7
Figura 3 - Morfologia externa das lagostas do género <i>Metanephros</i> . Adaptado de Chan (2008).....	7
Figura 4 - Morfologia externa dos caranguejos da infraordem Brachyura (Família Portunidae). (A) Visão dorsal. (B) Visão ventral. Adaptado de Chan (1998).....	8
Figura 5 - Mecanismo da alergia alimentar mediada pela IgE. Adaptado de Steve & Susan (2005).....	10
Figura 6 - Representação esquemática das etapas da PCR.	19
Figura 7 - Representação esquemática do método PCR-RFLP. As espécies (A, B e C) são identificadas através da corrida dos fragmentos de restrição numa eletroforese em gel. Adaptado de Pereira et al. (2008).....	21
Figura 8 - Representação esquemática da técnica de RAPD. As espécies (A, B e C) são identificadas através da corrida dos fragmentos amplificados numa eletroforese em gel. Adaptado de Pereira et al. (2008).....	22
Figura 9 - Representação esquemática do método AFLP. Adaptado de Liu & Cordes (2004).	23
Figura 10 - Padrões de SSCP de três espécies de camarão. As siglas SS e DS significam cadeias simples e duplas de DNA, respetivamente. Fonte: Khamnamtong et al. (2005). 24	24
Figura 11 - Princípio da deteção usando o SYBR Green. Adaptado de Rodriguez-Lazaro et al. (2013).....	26
Figura 12 - Exemplo de uma análise de HRM. Adaptado de Taylor et al. (2010).....	28
Figura 13 - Mecanismo de ação da sonda TaqMan. Adaptado de Navarro et al. (2015). 28	28
Figura 14 - Mecanismo de ação das diferentes sondas. (A) Sonda FRET: na etapa de hibridação, as sondas hibridam adjacente à sequência alvo, permitindo ao <i>quencher</i> emitir fluorescência, devido a ter sido excitado pela energia libertada pelo <i>reporter</i> . (B) Sonda Molecular Beacon: durante a hibridação, a sonda liga-se à sequência alvo ocorrendo a separação do <i>reporter</i> e do <i>quencher</i> , que conduz a emissão de fluorescência. (C) Sonda- <i>primer</i> Scorpion: na etapa de desnaturação, o <i>reporter</i> é separado do <i>quencher</i> , verificando-se a emissão de fluorescência. Adaptado de Navarro et al. (2015).....	29
Figura 15 - Curva de amplificação obtida por PCR em tempo real e as suas diferentes fases. Adaptado de Rodriguez-Lazaro et al. (2013).....	30
Figura 16 - Representação esquemática da sequenciação pelo Método de Sanger. Adaptado de Alberts et al. (1994).....	31
Figura 17 - Diferentes espécies de camarão da família Penaeidae utilizadas neste trabalho. A a E - <i>Penaeus monodon</i> , <i>Fenneropenaeus indicus</i> , <i>Metapenaeus affinis</i> , <i>Litopenaeus vannamei</i> e <i>Melicertus kerathurus</i> , respetivamente.....	41

Figura 18 - Algumas amostras comerciais utilizadas neste trabalho.	43
Figura 19 - Alinhamento das sequências de genes de COI disponíveis na base de dados do NCBI para as espécies <i>L. vannamei</i> , <i>P. monodon</i> , <i>F. indicus</i> , <i>M. affinis</i> e <i>M. kerathurus</i> . As setas pretas indicam as regiões dos primers Crust1-F e Crust1-R, as setas azuis correspondem aos primers Crust2-F e Crust2-R, e as setas laranjas assinalam os primers Crust3-F e Crust3-R.....	46
Figura 20 - Eletroforese em gel de agarose de DNA genómico das amostras de camarão pelo método Nucleospin Food com RNase (A) e sem RNase (B). Linha 1 - <i>Penaeus monodon</i> (C1); Linha 2 - <i>Fenneropenaeus indicus</i> (C2); Linha 3 - <i>Metapenaeus affinis</i> (C3); Linha 4 - <i>Litopenaeus vannamei</i> (C4); Linha 5 - <i>Melicertus kerathurus</i> (C5). M - Marcador molecular HyperLadder I. B - Branco.	52
Figura 21 - Eletroforese em gel de agarose de DNA genómico das amostras comerciais extraídas pelo método NucleoSpin Food com RNase. (A) Linha 1 a 29 – AC1 a AC17b. (B) Linha 1 a 6 – AC18a a AC21. (C) Linha 1 a 5 – AC 22a a AC25. M – Marcador molecular HyperLadder I. B – Branco.....	52
Figura 22 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR conseguidos a partir da amplificação dos extratos das amostras de camarão obtidos pelo método Nucleospin Food com RNase (A) utilizando os primers EG-F/EG-R e sem RNase utilizando os primers EG-F/EG-R (B) e os primers 18SRG-F/18SRG-R (C). Linha 1 - <i>Penaeus monodon</i> (C1); Linha 2 - <i>Fenneropenaeus indicus</i> (C2); Linha 3 - <i>Metapenaeus affinis</i> (C3); Linha 4 - <i>Litopenaeus vannamei</i> (C4); Linha 5 - <i>Melicertus kerathurus</i> (C5). M – Marcador molecular 100 pb DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CN – Controlo negativo.....	55
Figura 23 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação das amostras comerciais com os primers EG-F/EG-R. (A) Linha 1 a 28 – AC1 a AC17a. (B) Linha 1 a 7 – AC17b a AC21. (C) Linha 1 a 7 – AC 22a a AC25. M – Marcador molecular 100 pb DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CN – Controlo negativo.	55
Figura 24 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR conseguidos a partir da amplificação dos extratos das amostras de camarão da família Penaeidae obtidos pelo método Nucleospin Food com RNase (A) e sem RNase (B), utilizando os primers CRUST1-F/CRUST1-R. Linha 1 – <i>Penaeus monodon</i> (C1); Linha 2 – <i>Fenneropenaeus indicus</i> (C2); Linha 3 – <i>Metapenaeus affinis</i> (C3); Linha 4 – <i>Litopenaeus vannamei</i> (C4); Linha 5 – <i>Melicertus kerathurus</i> (C5). M – Marcador molecular 100 pb DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CN – Controlo negativo.	57
Figura 25 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação das amostras de carne, peixe, plantas para estudo da reatividade cruzada, utilizando os primers Crust1-F/Crust1-R. Linha 1 a 36 – Bacalhau fresco (<i>Gadus morhua</i>), Paloco (<i>Pollachius virens</i>), Paloco (<i>Theragra chalcogramma</i>), Linguado (<i>Molva molva</i>), Salmão (<i>Salmo solar</i>), Dourada (<i>Sparus aurata</i>), Linguado (<i>Solea solea</i>), Sardinha (<i>Sardina pilchardus</i>), Bacalhau seco (<i>Gadus morhua</i>), Atum (<i>Thunnus albacares</i>), Coelho selvagem 1, Coelho selvagem 2, Vaca, Galinha, Perú, Veado, Borrego, Cabrito, Avestruz, Soja, Milho, Caju, <i>Calluna vulgaris</i> , <i>Lavandula angustifolia</i> , Mel multifloral, Erva príncipe, Funcho, Dente-de-leão, Cavalinha, Cidreira, Camomila, Chá verde, Salvia, Hortelã-pimenta, Borututu e Carqueja. M – Marcador molecular 100 pb DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CP – Controlo positivo (<i>Litopenaeus vannamei</i> (C4)) e CN – Controlo negativo.	57

Figura 26 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação das amostras de crustáceos (camarões da família Solenoceridae) para o estudo da reatividade cruzada, utilizando os *primers* Crust1-F/Crust1-R. Linha 1 a 4 - *Pleoticus muelleri*, *Solenocera melantho*, *S. crassicornis* e *Haliporoides triarthrus*. M – Marcador molecular 100 pb DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CN – Controlo negativo. 58

Figura 27 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação das amostras de carne, peixe, plantas para estudo da reatividade cruzada, utilizando os *primers* Crust1-F/Crust1-R. Linha 1 a 22 - Pescada (*Merluccius merluccius*); Linha 2 - Pescada (*M. productus*), Pescada (*M. australis*), Pescada (*M. hubbris*), Pescada (*M. capensis*), Pescada (*M. paradoxus*), Mexilhão (*Mytillus spp.*), Ameijoia (*Paphia undulata*), Caranguejo (*Portunus validus*), Sapateira (*Cancer pagarus*), Lagosta (*Panulirus argus*), Lagostim (*Nephrops norvegicus*), Sene, Mate verde, Tília, Uva-ursina, Erva-de-S. Roberto, Passiflora, Boldo, Verbera, Espinheiro alvar, Caldo Mariano e Orégãos. M – Marcador molecular 100 pb DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CN – Controlo negativo. 58

Figura 28 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR conseguidos a partir da amplificação dos extratos das amostras de camarão da família Penaeidae obtidos pelo método Nucleospin Food com RNase (A) e sem RNase (B), utilizando os *primers* Crust2-F/Crust2-R. Linha 1 – *Penaeus monodon* (C1); Linha 2 – *Fenneropenaeus indicus* (C2); Linha 3 – *Metapenaeus affinis* (C3); Linha 4 – *Litopenaeus vannamei* (C4); Linha 5 – *Melicertus kerathurus* (C5). M – Marcador molecular 100 pb DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CN – Controlo negativo. 59

Figura 29 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos das amostras de carne e peixe para estudo da reatividade cruzada, utilizando os *primers* Crust2-F/Crust2-R. Linhas 1 a 17 - Bacalhau (*Gadus morhua*), Paloco (*Pollachius virens*), Paloco (*Theragra chalcogramma*), Linguado (*Molva molva*), Salmão (*Salmo solar*), Dourada (*Sparus aurata*), Linguado (*Solea solea*), Sardinha (*Sardina pilchardus*), Atum (*Thunnus albacares*), Bacalhau seco (*Gadus morhua*), Coelho selvagem 1, Coelho selvagem 2, Vaca, Galinha, Peru, Veado e Borrego. M - Marcador molecular 100 pb DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CP- Controlo Positivo (*Litopenaeus vannamei* (C4)) e CN- Controlo Negativo..... 60

Figura 30 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos das amostras de plantas para estudo da reatividade cruzada, utilizando os *primers* Crust2-F/Crust2-R. Linhas 1 a 17 - Soja, Milho, Caju, *Calluna vulgaris*, *Lavandula angustifolia*, Mel multiflora, Erva príncipe, Funcho, Dente-de-leão, Cavalinha, Cidreira, Camomila, Chá verde, Hortelã-pimenta, Borututu, Carqueja e Malvas. M – Marcador molecular 100 pb DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CP – Controlo positivo (*Litopenaeus vannamei* (C4)) e CN – Controlo negativo..... 60

Figura 31 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos das amostras de peixe e plantas para estudo da reatividade cruzada, utilizando os *primers* Crust2-F/Crust2-R. Linha 1 a 17 - Pescada (*Merluccius merluccius*), Pescada (*M. productus*), Pescada (*M. australis*), Pescada (*M. hubbris*), Pescada (*M. capensis*), Pescada (*M. paradoxus*), Sene, Mate verde, Tília, Uva-ursina, Erva de S. Roberto, Passiflora, Boldo, Verbera, Espinheiro alvar, Caldo Mariano e Orégãos. M - Marcador molecular 100 pb DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CP – Controlo positivo (*Litopenaeus vannamei* (C4)) e CN – Controlo negativo..... 61

Figura 32 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos das amostras de crustáceos e moluscos para estudo da

reatividade cruzada, utilizando os *primers* Crust2-F/Crust2-R. Linha 1 a 6 - Mexilhão (*Mytillus spp.*), Ameijoia (*Paphia undulata*), Caranguejo (*Portunus validus*), Sapateira (*Cancer pagarus*), Lagosta (*Panulirus argus*) e Lagostim (*Nephrops norvegicus*). M – Marcador molecular 100 pb DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CN – Controlo negativo.61

Figura 33 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR conseguidos a partir da amplificação dos extratos das amostras de crustáceos (camarões da Família Solenoceridae), utilizando os *primers* Crust2-F/Crust2-R. Linha 1 a 4 – *Pleoticus muelleri*, *Solenocera melantho*, *S. crassicornis* e *Haliporoides triarthrus*. M – Marcador molecular 100 pb DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CN – Controlo negativo.....61

Figura 34 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação das amostras comerciais com os *primers* Crust2-F/Crust2-R. (A) Linha 1 a 28 – AC1 a AC17a. (B) Linha 1 a 7 – AC17b a AC21. (C) Linha 1 a 7 – AC22a a AC25. M – Marcador molecular 100 pb DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CN – Controlo negativo.62

Figura 35 - Resultado da amplificação por PCR em tempo real com os *primers* CRUST2-F/CRUST2-R dos extratos obtidos com uso de RNase das espécies de camarão sob as condições de amplificação do programa 1, e respetiva análise de HRM. (A) Curvas de amplificação; (B) Curvas de desnaturação; (C) Curvas de desnaturação normalizada; (D) Curvas de diferença. Curvas verdes - C1; curvas azuis - C2; curvas violetas - C3; curvas vermelhas - C4 e curvas laranjas - C5.64

Figura 36 - Resultado da amplificação por PCR em tempo real dos extratos obtidos sem uso de RNase das espécies de camarão, com os *primers* CRUST2-F/CRUST2-R sob as condições de amplificação do programa 1, e respetiva análise de HRM. (A) Curvas de amplificação; (B) Curvas de desnaturação; (C) Curvas de desnaturação normalizada; (D) Curvas de diferença. Curvas verdes - C1; curvas azuis - C2; curvas violetas - C3; curvas vermelhas - C4 e curvas laranjas - C5.65

Figura 37 - Resultado da amplificação por PCR em tempo real dos extratos obtidos com o uso de RNase das espécies de camarão, com os *primers* CRUST2-F/CRUST2-R, sob as condições do programa 2, e respetiva análise de HRM. (A) Curvas de amplificação; (B) Curvas de desnaturação; (C) Curvas de desnaturação normalizada; (D) Curvas de diferença obtidas por análise HRM. Curvas verdes - C1; curvas azuis - C2; curvas violetas - C3; curvas vermelhas - C4 e curvas laranjas - C5.66

Figura 38 - Resultado da amplificação por PCR em tempo real dos extratos obtidos sem uso de RNase das espécies de camarão, com os *primers* CRUST2-F/CRUST2-R, sob as condições do programa 2, e respetiva análise de HRM. (A) Curvas de amplificação; (B) Curvas de desnaturação; (C) Curvas de desnaturação normalizadas; (D) Curvas de diferença. Curvas verdes - C1; curvas azuis - C2; curvas violetas - C3; curvas vermelhas - C4 e curvas laranjas - C5.....67

Figura 39 - Resultado da amplificação por PCR em tempo real dos extratos obtidos com uso de RNase das espécies de camarão e das espécies com reatividade cruzada, com os *primers* CRUST2-F/CRUST2-R, condições do programa 2, e respetiva análise de HRM. (A) Curvas de amplificação; (B) Curvas de desnaturação; (C) Curvas de desnaturação normalizadas; (D) Curvas de diferença. Curvas verdes - C1; curvas azuis - C2; curvas violetas - C3; curvas vermelhas - C4; curvas laranjas - C5; curvas rosas - *Pleoticus muelleri*; curvas roxas - *Solenocera melantho*; curvas cinzentas – *S. crassicorni*; curvas amarelas - *Haliporoides triarthrus*; curvas azuis claras – *Nephrops norvegicus*.....67

- Figura 40 - Resultado da amplificação PCR em tempo e análise de HRM real dos extratos das amostras comerciais, juntamente com as espécies de camarão referência obtidos com uso de RNase e com os *primers* CRUST2-F/CRUST2-R. (A) Curvas de amplificação; (B) Curvas de desnaturação; (C) Curvas de desnaturação normalizadas; (D) Curvas de diferença. Curvas verdes - C1; curvas azuis - C2; curvas violetas - C3 e AC7b; curvas vermelhas - C4, AC7a, AC7c, AC8a e AC10; e curvas laranjas - C5..... 68
- Figura 41 - Alinhamento da sequência obtida por amplificação com os *primers* CRUST1-F/CRUST2-R para a espécie C1 (*Penaeus monodon*) com a sequência consenso da base de dados do NCBI (KM528138.1) utilizada para o desenho dos *primers*..... 72
- Figura 42 - Alinhamento da sequência obtida por amplificação com os *primers* CRUST1-F/CRUST2-R para a espécie C4 (*Litopenaeus vannamei*) com a sequência consenso da base de dados do NCBI (KJ679916.1) utilizada para o desenho dos *primers*..... 73
- Figura 43 - Alinhamento da sequência obtida por amplificação com os *primers* CRUST3-F/CRUST3-R para a espécie C2 (*Fenneropenaeus indicus*) com a sequência consenso da base de dados do NCBI (KF604889.1) utilizada para o desenho dos *primers*..... 74
- Figura 44 - Alinhamento da sequência obtida por amplificação com os *primers* CRUST3-F/CRUST3-R para a espécie C5 (*Melicertus kerathurus*) com a sequência consenso da base de dados do NCBI (KC789253.1) utilizada para o desenho dos *primers*. 75
- Figura 45 - Alinhamento da sequência obtida por amplificação com os *primers* CRUST3-F/CRUST3-R para os extratos da amostra nº 17, AC17a (A) e AC17b (B) com uma das sequências da base de dados do NCBI com 99% de semelhança (KM528140.1)..... 75

Índice de tabelas

Tabela 1 - Lista dos 31 alergénios dos crustáceos relacionados com alergias alimentares presentes na base de dados WHO/IUIS Allergen (ALLERGEN, 2016).....	13
Tabela 2 - Estudos sobre a identificação de espécies de crustáceos baseados na análise de DNA.	35
Tabela 3 – Descrição das diferentes espécies de camarão da família Penaeidae utilizadas neste trabalho.	41
Tabela 4 - Descrição das amostras comerciais utilizadas neste trabalho e as respetivas informações relevantes presentes no rótulo.	42
Tabela 5 - Primers utilizados na PCR qualitativa.....	47
Tabela 6 - Componentes e respetivas quantidades em µL utilizadas na PCR qualitativa para os diferentes <i>primers</i>	48
Tabela 7 - Condições utilizadas na amplificação por PCR qualitativa para os diferentes <i>primers</i>	48
Tabela 8 – Condições testadas para a otimização da PCR em tempo real e na análise de HRM.	49
Tabela 9 - Concentrações e purezas do DNA extraído das amostras de camarão pelo método Nucleospin Food com e sem RNase.....	51
Tabela 10 - Concentrações e purezas do DNA extraído das amostras de comerciais pelo método Nucleospin Food com RNase.	53
Tabela 11 - Resumo dos resultados obtidos por PCR qualitativa e PCR em tempo real com análise de HRM para a identificação de espécies de camarão em amostras comerciais.	70

Lista de abreviaturas

AFLP – Polimorfismos no comprimento de fragmentos amplificados (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*)

BOLD – *Barcode of life database*

Ct – *Cycle treshold*

COI – Citocromo c oxidase subunidade I

cytb – Gene do citocromo b

DHA – ácido docosaheptaenóico

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dNTP – desoxirribonucleótido trifosfato

ddNTP – didesoxirribonucleótido trifosfato

ELISA – *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

EPA – Ácido eicosapentaenóico

FRET – *Fluorescence Resonance Emission Transfer*

IEF – Focagem isoelétrica

IgE – Imunoglobulina E

MS – Espectrometria de massa

mtDNA – DNA mitocondrial

nDNA – DNA nuclear

NGS – *Next Generation Sequencing*

PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida

pb – Pares de bases

PCR – Reação em cadeia da polimerase

RAPD – Amplificação aleatória de DNA polimórfico (*Random Amplified Polymorphic DNA*)

RFLP – Polimorfismos no comprimento de fragmentos de restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

RNA – Ácido ribonucleico

RNase – Ribonuclease

SDS – dodecilsulfato de sódio

SSCP – Polimorfismos conformacionais de cadeia simples (*Single Stranded Conformational Polymorphisms*)

Componente Teórica

1 Introdução

A identificação de espécies presentes nos alimentos tem ganho cada vez mais importância devido a questões de saúde pública, económicas e legais (Bottero & Dalmaso, 2011). A ocorrência de crises alimentares, como a encefalopatia espongiforme bovina (BSE) e a gripe das aves, bem como a existência de más práticas por parte de alguns produtores alimentares, motivos religiosos e alergias alimentares tem levado a que os consumidores tomem cada vez mais atenção à composição dos alimentos. No entanto, os rótulos dos alimentos não fornecem garantia suficiente sobre o verdadeiro conteúdo do produto, sendo necessário identificar e/ou avaliar a autenticidade dos componentes dos alimentos (Teletchea et al., 2005).

Hoje em dia, a avaliação da autenticidade dos alimentos tornou-se muito importante não só para prevenir casos de fraude comercial, mas também para evitar a introdução não declarada de quaisquer ingredientes/constituintes que possam prejudicar a saúde humana por serem potencialmente alergénicos ou tóxicos, ou outros que possam contrariar as opções alimentares dos consumidores (Ortea et al., 2012; Rasmussen & Morrissey, 2008).

No caso concreto dos crustáceos (camarões, caranguejos, lagostas e lagostins), o aumento do consumo e o facto de algumas espécies apresentarem um elevado valor comercial torna-os potenciais alvos de fraude comercial, que se caracteriza pela substituição de espécies de elevado valor por outras similares, mas com valor comercial inferior (Ortea et al., 2012; Pascoal et al., 2008). Além da suscetibilidade a adultrações, os crustáceos são considerados um dos grupos de alimentos que apresenta maior prevalência de alergias alimentares (Lopata et al., 2010; Pedrosa et al., 2014), por isso a sua correta rotulagem é de extrema importância para prevenir potenciais riscos para a vida das pessoas alérgicas ou sensibilizadas a crustáceos (Fernandes et al., 2015).

Atualmente, o Regulamento (EU) N^o 1169/2011 obriga a que todos os alimentos que contenham crustáceos e produtos à base de crustáceos declarem a sua presença no rótulo, uma vez que fazem parte da lista dos 14 alimentos potencialmente alergénicos. Para além deste, o Regulamento (EU) N^o 1379/2013 determina ainda que os “crustáceos, mesmo sem casca, vivos, frescos, refrigerados, congelados, secos, salgados ou em salmoura; crustáceos com casca, cozidos em água ou vapor, mesmo refrigerados, congelados, secos, salgados ou em salmoura; farinhas, pó e *pellets* de crustáceos, próprios para alimentação humana” só podem ser colocados à venda ao consumidor final ou a um estabelecimento de restauração se o rótulo indicar um conjunto de informações, como é o caso da denominação comercial da espécie e o seu nome científico. Existe, portanto, uma grande necessidade de desenvolver métodos rápidos e eficientes para identificar espécies

de crustáceos, a fim de garantir e comprovar o cumprimento das leis, e desta forma, proteger também os consumidores.

1.1 Descrição dos crustáceos utilizados na alimentação

Os crustáceos compreendem um grande e diverso grupo de animais artrópodes pertencentes ao subfilo Crustacea, ao qual pertencem espécies comestíveis bem conhecidas como os **camarões**, as **lagostas**, os **caranguejos** e os **lagostins** (Hickman et al., 2011). O subfilo Crustacea engloba aproximadamente 52000 espécies descritas e segundo a classificação atualizada de Martin e Davis (Figura 1) contém seis classes, nomeadamente, a Branchiopoda, a Remipedia, a Cephalocarida, a Maxillopoda, a Ostracoda e a Malacostraca (Martin & Davis, 2001).

Reino	Filo	Subfilo	Classe	Subclasse	Ordem
Animalia	Arthropoda	Crustacea	Branchiopoda	Phyllocarida Hoplocarida Eumalacostraca	Bathynellacea
			Remipedia		Anaspidacea
			Cephalocarida		Spelaeogriphacea
			Maxillopoda		Thermosbaenacea
			Ostracoda		Lophogastrida
			Malacostraca		Mysida
					Mictacea
					Amphipoda
					Isopoda
					Tanaidacea
					Cumacea
					Euphausiacea
					Amphionidacea
					Decapoda

Figura 1 - Classificação do Subfilo Crustacea, de acordo com Martin & Davis (2001).

A classe que engloba o maior número de crustáceos, mais de 20,000 espécies, é designada de **Malacostraca**, apresentando uma grande diversidade que se reflete na sua extensa classificação. Esta classe contém 3 subclasses (Phyllocarida, Hoplocarida e Eumalacostraca), 16 ordens, e várias subordens, infraordens e superfamílias (Hickman et al., 2011; Martin & Davis, 2001; Noga et al., 2012). Das 16 ordens existentes nesta classe, a **ordem Decapoda** destaca-se, uma vez que esta reúne cerca de 18,000 espécies e agrupa todos os crustáceos comestíveis, sendo o maior e mais diferenciado grupo de espécies de crustáceos (Hickman et al., 2011; Moltschaniwskyj, 2005).

A ordem Decapoda contém espécies comestíveis com elevada importância económica, como é o caso dos camarões da superfamília Penaeoidea, as lagostas das famílias Palinuridae e Nephropidae e dos caranguejos da família Portunidae e da

superfamília Xanthoidea (Martin & Davis, 2001). Os crustáceos utilizados na alimentação são também usualmente incluídos num grupo de alimentos que abrange também espécies de moluscos chamado “marisco”, contudo esta designação não é taxonómica (Fernandes et al., 2015).

Relativamente aos nomes comuns utilizados para distinguir as várias espécies de crustáceos comestíveis, têm sido alvo de várias confusões com grande frequência. É, por exemplo, frequente existir confusão no uso dos nomes comuns: lagosta e lagostim. Apesar de a distinção ser feita taxonomicamente, geralmente, as lagostas são espécies marinhas e o nome lagostim é dado às espécies que habitam em meios de água doce, encontrando-se agrupados nas famílias Cambaridae, Astacidae, Parastacidae (Moltschaniwskyj, 2005).

Apesar de existirem algumas espécies de crustáceos terrestres, todos os comestíveis estão presentes em meios aquáticos, sendo que a maioria ocupa habitats marinhos e estuarinos, existindo contudo algumas lagostas e camarões que são encontrados em habitats de água doce (Hickman et al., 2011; Moltschaniwskyj, 2005). Estes são organismos bentónicos, mas altamente móveis, por exemplo, os camarões nadam regularmente e algumas lagostas realizam longas migrações (Moltschaniwskyj, 2005).

Em relação aos hábitos alimentares, os crustáceos comestíveis antes de atingirem a forma adulta são animais predadores, alimentando-se ativamente de fitoplâncton e zooplâncton. No entanto, quando se encontram em grandes densidades, podem-se tornar canibais. Quando atingem as formas adultas, estes invertebrados apresentam vários modos de alimentação, pois muitos dos crustáceos comestíveis são necrófagos e/ou predadores e muitas espécies são também onívoras. Os crustáceos necrófagos, como é o caso dos camarões, alimentam-se de uma grande variedade de plantas mortas e matéria animal (Hickman et al., 2011; Moltschaniwskyj, 2005). Já os predadores, por exemplo, as lagostas e os caranguejos alimentam-se geralmente de minhocas, outros crustáceos, moluscos e peixes. Na forma adulta, o canibalismo também pode ocorrer quando os crustáceos estão em condições de cultura com densidades muito elevadas, especialmente, no caso dos caranguejos quando estes ainda não apresentam uma carapaça espessa (Moltschaniwskyj, 2005).

1.2 Morfologia externa dos crustáceos

Os camarões, as lagostas, os lagostins e os caranguejos apresentam um corpo formado por duas partes: o **cefalotórax** (fusão da cabeça e o tórax) e o **abdómen** (Hickman et al., 2011; Moltschaniwskyj, 2005). O cefalotórax e o abdómen são constituídos por uma série de segmentos, porém o número e a especialização dos segmentos varia entre as

espécies. Os segmentos do cefalotórax não são visíveis externamente, pois a superfície do cefalotórax é coberta por uma carapaça que pode ser lisa ou espinhosa, dependendo da espécie. Contrariamente ao cefalotórax, o abdómen encontra-se claramente segmentado. A estas duas partes encontram-se anexadas pares de apêndices especializados, cujo número depende da taxonomia e função do apêndice (Moltschaniwskyj, 2005).

Em torno da cabeça e da boca destes invertebrados existe um conjunto de apêndices que estão envolvidos no processo de alimentação, nomeadamente, as **mandíbulas**, as **maxilas** e os **maxilípedes**. Além destes, na cabeça estão também presentes outros apêndices como é o caso das **antenas**, das **anténulas** e dos **olhos**. Os restantes apêndices localizados no cefalotórax, os **pereiópodes**, estão adaptados para permitir a locomoção, sendo uma característica típica dos crustáceos decápodes apresentarem cinco pares de pereiópodes (Hickman et al., 2011; Moltschaniwskyj, 2005; Noga et al., 2012). Os caranguejos e algumas lagostas possuem o seu primeiro par de pereiópodes modificado (**quelípedes**), apresentando uma pinça na extremidade (**quela**). Os apêndices localizados no abdómen são chamados de **pleópodes**, sendo estes utilizados para nadar e em algumas espécies para carregar ovos, como é o caso dos caranguejos e dos camarões do género *Macrobrachium*.

Na extremidade anterior do corpo destes animais encontra-se presente uma estrutura não segmentada (**rosto**) e na extremidade posterior o **telsón**, também ele uma estrutura não segmentada, que juntamente com o último par de pleópodes (**urópodes**) formam um leque caudal, utilizado para a locomoção (Moltschaniwskyj, 2005).

O corpo dos crustáceos apresenta-se coberto por um exosqueleto quitinoso que fornece uma proteção exterior a estes animais. Os camarões possuem um corpo geralmente cilíndrico e lateralmente comprimido, podendo atingir até 35 centímetros de comprimento. Estes apresentam um abdómen bem desenvolvido e um exosqueleto que é geralmente fino e flexível (Chan, 1998) (Figura 2).

À semelhança dos camarões, as lagostas e os lagostins têm um abdómen prolongado e bem desenvolvido (Figura 3) (Chan, 1998; Moltschaniwskyj, 2005; Ruppert & Barnes, 1994). Além de apresentarem um exosqueleto mais grosso e forte, as lagostas possuem também a zona dorsoventral do corpo mais achatada e os pleópodes menos desenvolvidos do que os camarões (Chan, 1998). As lagostas espinhosas (*Jasus*, *Palinurus*, e *Panulirus* spp.), presentes em águas tropicais e temperadas, não apresentam quelípedes (Moltschaniwskyj, 2005). O corpo das lagostas pode atingir mais de 60 centímetros de comprimento (Chan, 1998).

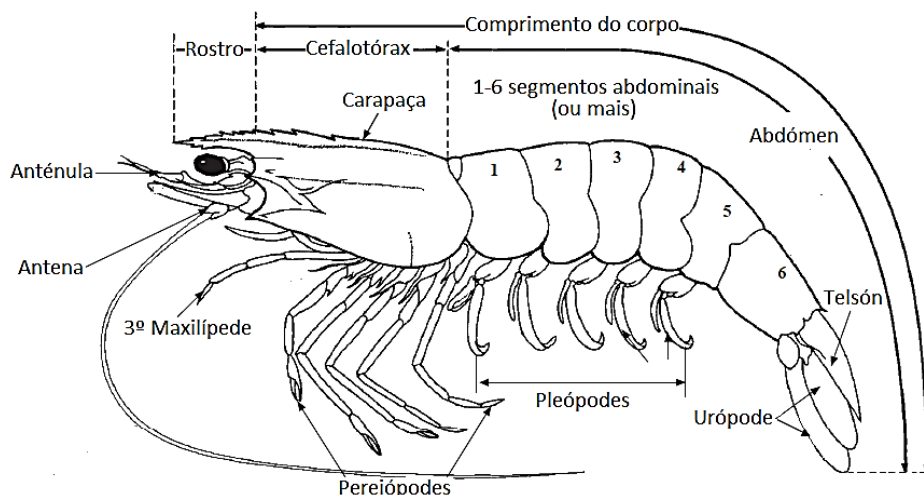


Figura 2 - Morfologia externa de um camarão. Adaptado de Chan, (1998).

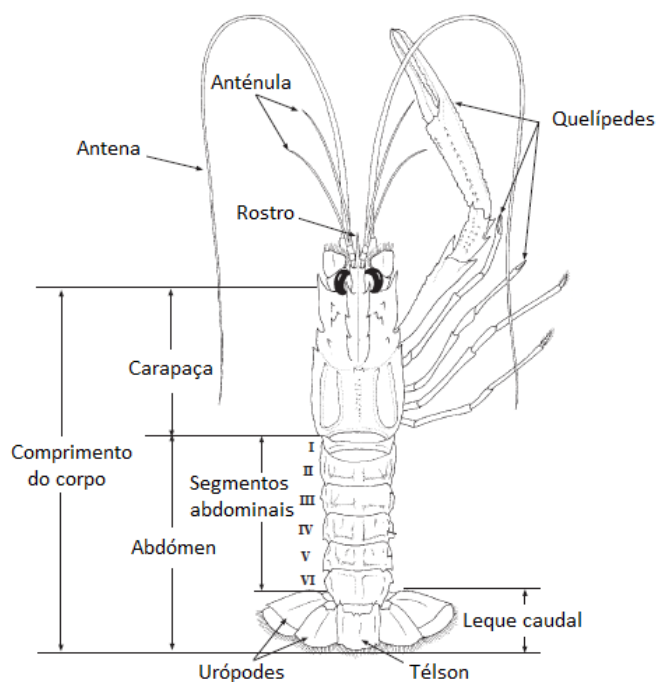


Figura 3 - Morfologia externa das lagostas do género *Metanephros*. Adaptado de Chan (2008).

Tal como as lagostas, os caranguejos têm a zona dorsoventral do corpo achatada e um exosqueleto grosso e forte (Figura 4). O abdómen dos caranguejos é reduzido e encontra-se encaixado e dobrado sob o cefalotórax. O facto de os caranguejos possuírem um abdómen reduzido permite-lhes rastejar rapidamente e moverem-se lateralmente. Este grupo de crustáceos não contém urópodes e os seus pereiópodes são grandes e fortes. Os crustáceos decápodes são animais dioicos e no caso dos caranguejos realiza-se facilmente a distinção entre os machos e as fêmeas visualizando a forma do seu abdómen. Os machos apresentam um o abdómen com aspeto triangular, enquanto as fêmeas têm

um abdómen mais largo, geralmente semicircular, que em muitas espécies cobre a maior parte da superfície ventral (Figura 4-B) (Chan, 1998).

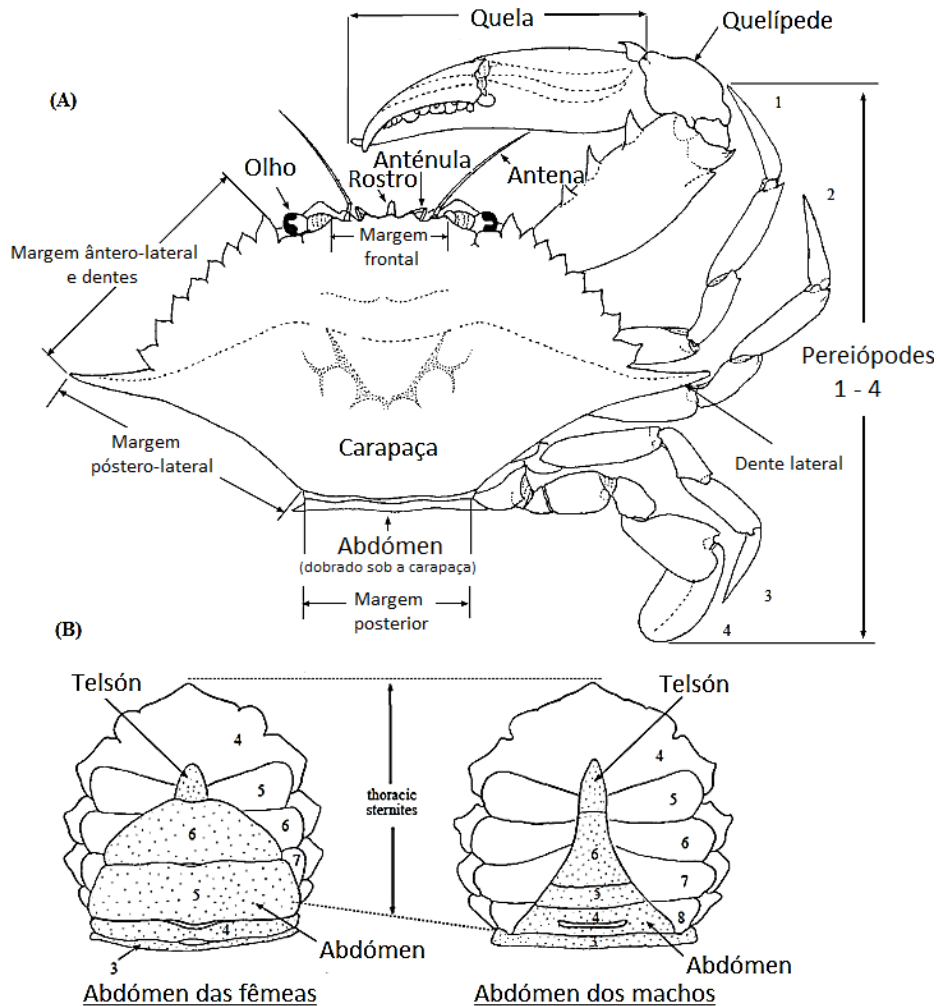


Figura 4 - Morfologia externa dos caranguejos da infraordem Brachyura (Família Portunidae). (A) Visão dorsal. (B) Visão ventral. Adaptado de Chan (1998).

1.3 Importância alimentar e comercial dos crustáceos

Em todo o mundo, os crustáceos são um tipo de alimento muito apreciado e considerado de luxo. Embora o seu consumo frequente não seja aconselhado, em geral, por causa de possíveis reações alérgicas ou pelo conteúdo de colesterol, há um número crescente de estudos que promovem o consumo de crustáceos (Barrento et al., 2019, 2010). Apesar desta controvérsia, os crustáceos são amplamente consumidos, nomeadamente nos países mediterrânicos. Em Portugal, segundo as estatísticas mais recentes referentes ao ano de 2011, existe um consumo anual de crustáceos de 2,84 kg *per capita* (FAOSTAT, 2016).

Não é possível estabelecer uma composição bioquímica exata dos tecidos edíveis dos crustáceos por ser influenciada pelos hábitos nutricionais, idade, sexo, tempo, temperatura da água do mar, salinidade e espécie. Contudo, a maioria dos estudos descreve os crustáceos como sendo excelentes fontes de proteína, minerais e ácidos gordos insaturados, tais como o EPA e o DHA, que segundo vários estudos estão associados à diminuição do risco de doença cardíaca coronária e cancro (Chen et al., 2007; Sriket et al., 2007).

Relativamente ao comércio de crustáceos, em 2014 a produção global (captura e aquacultura) de crustáceos atingiu as 13 785 140 toneladas, segundo dados da FAO (FAO, 2014b). É importante destacar que os camarões são o produto comercializado mais importante em termos de valor, representando, em 2012, cerca de 15% do valor total de produtos de pesca comercializados internacionalmente (FAO, 2014a). Apesar de existirem 2500 espécies de camarão em todo o mundo, apenas 12 espécies são cultivadas, todas elas pertencentes à família Penaeidae. Contudo, as duas espécies de camarão, nomeadamente *Penaeus monodon* e *Litopenaeus vannamei* são as mais cultivadas, representando cerca de 90 a 95% da produção global de camarões em aquacultura (Jory & Cabrera, 2012).

2 Crustáceos: uma fonte de alergénios

Os crustáceos são um dos 8 grupos de alimentos responsáveis por mais de 90% das alergias alimentares reportadas em todo o mundo. As alergias alimentares são definidas como reações adversas resultantes de uma resposta imunológica específica, que ocorre de forma repetida quando existe exposição a um dado alimento (Boyce et al., 2011). Tendo em conta o tipo de resposta imunológica desencadeada, as alergias alimentares podem ser divididas em dois grupos. Um dos grupos corresponde às reações de hipersensibilidade imediata, quando a resposta adversa é mediada pelos anticorpos específicos da imunoglobulina E (IgE) para um dado alergénio (Muraro et al. 2014). Estas reações caracterizam-se pelo aparecimento dos sintomas em poucos minutos até algumas horas após a ingestão do alimento alergénico. O outro grupo corresponde às reações de hipersensibilidade retardada que são mediadas pelas células T do sistema imunitário, sendo que os sintomas resultantes destas reações aparecem cerca de 24 a 48 horas após a ingestão do alimento alergénico (Costa et al., 2012b).

Os crustáceos comestíveis incluem-se nos alimentos que podem induzir reações de hipersensibilidade mediadas por IgE após a ingestão, contacto direto ou inalação de vapores provenientes da cocção dos crustáceos (Lopata et al., 2010; Poi-Wah & Steve,

2010). O mecanismo da alergia alimentar mediada pela IgE encontra-se representado na Figura 5. Durante a primeira exposição do sistema imunitário a um dado alergénio, desencadeia-se a produção de anticorpos IgE específicos para o alergénio pelas células B. Estes anticorpos ligam-se às superfícies dos mastócitos nos tecidos e dos basófilos no sangue. Esta fase inicial denomina-se por fase de sensibilização e caracteriza-se por ser assintomática (Steve & Susan, 2005). Em seguida, após uma nova exposição ao alergénio específico, este liga-se aos anticorpos IgE dos mastócitos ou basófilos sensibilizados. A interação alergénio-anticorpo induz a desgranulação das células sensibilizadas, permitindo a libertação dos mediadores responsáveis pelos sintomas alérgicos (ex. histamina), que se encontram dentro dos grânulos dos mastócitos e dos basófilos (Steve & Susan, 2005).

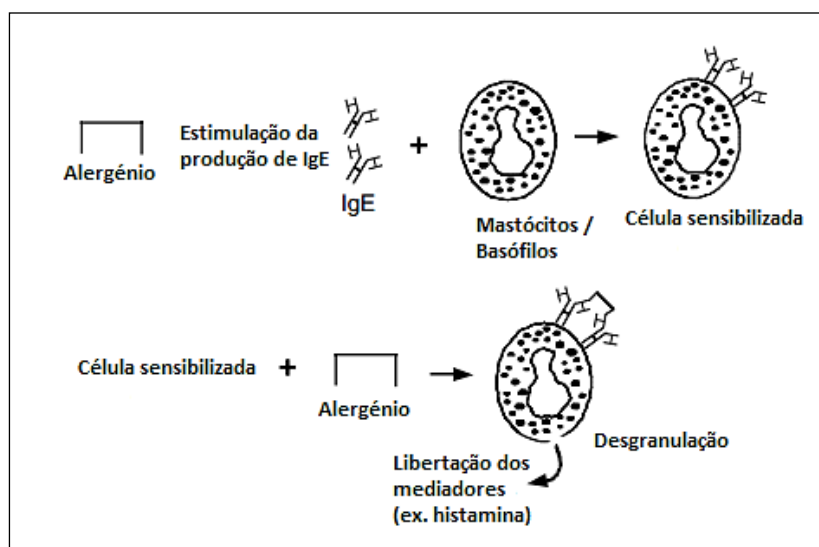


Figura 5 - Mecanismo da alergia alimentar mediada pela IgE. Adaptado de Steve & Susan (2005).

As manifestações clínicas que advêm das alergias aos crustáceos incluem a síndrome de alergia oral, urticária, angioedema, sintomas gastrointestinais e reações anafiláticas. A exposição aos vapores de cozedura destes invertebrados pode, também, provocar manifestações de urticária, angioedema e sintomatologia respiratória em indivíduos altamente sensibilizados (Carrapatoso, 2004).

Na alergia aos crustáceos é comum ocorrer um fenómeno designado por reatividade cruzada entre alergénios de espécies filogeneticamente próximas (Boyce et al., 2011; Carrapatoso, 2004; Wild & Lehrer, 2005). Durante este fenómeno os anticorpos específicos de um determinado alergénio ligam-se a outras moléculas homólogas da mesma família de proteínas, embora o indivíduo não tenha sido sensibilizado para o alergénio homólogo. Por exemplo, um indivíduo que seja alérgico às tropomiosinas presentes numa lagosta pode desencadear uma reação alérgica a outros alimentos que contenham tropomiosinas semelhantes (ex. camarões e peixes) (Lorenz et al., 2015).

Até ao momento existem poucos estudos relativos à dose mínima necessária de um crustáceo para desencadear uma alergia alimentar. Um estudo clínico realizado num número limitado de pessoas demonstrou que a dose mínima de camarão necessária para provocar uma resposta alérgica é de dois a quatro camarões (Poi-Wah & Steve, 2010).

Estima-se que 4% da população mundial possa ser afetada por alergias alimentares, sendo a frequência maior entre a população jovem com níveis de prevalência na ordem dos 8% (Hengel, 2010). Ao contrário de outras alergias alimentares, a sensibilização aos crustáceos ocorre frequentemente em idades mais avançadas, este dado provavelmente dever-se-á ao facto de o consumo destes alimentos tender a ocorrer com menor frequência durante a infância sendo, por isso, a prevalência de alergia aos crustáceos superior nos adultos (Poi-Wah & Steve, 2010). Nos Estados Unidos da América, a prevalência de alergia aos crustáceos é de 0,5% nas crianças e de 2,5% nos adultos (Boyce et al., 2011). Na Europa, os estudos sobre a prevalência de alergias alimentares e mais concretamente aos crustáceos são escassos e muitos deles são apenas baseados em dados auto-reportados (EFSA, 2014). O primeiro estudo que incluiu uma grande amostra multinacional e analisou o soro de 4522 pessoas que viviam em 12 países europeus e em Portland (EUA), com o objetivo de determinar a prevalência de sensibilização alimentar a 24 alimentos potencialmente alergénicos, demonstrou uma prevalência relativamente elevada de sensibilização ao camarão (5,4%), estando entre os 3 alimentos potencialmente alergénicos que provocaram mais sensibilização (Burney et al., 2010).

No caso concreto de Portugal, foi realizada uma revisão de registos clínicos de 4879 doentes com idade igual ou inferior a 18 anos, observados durante o ano de 1998 no Serviço de Imunoalergologia do Hospital de Dona Estefânia, verificando-se que 414 (8,5%) doentes apresentavam alergias alimentares. Este estudo demonstrou também que apenas 13 (2,7%) das crianças apresentavam alergia aos crustáceos. Contudo, ao estratificar a população estudada por grupos etários verificou-se que a importância dos diferentes alimentos variou com a idade e que a partir dos 12 anos, os crustáceos foram o principal alimento responsável pelas alergias alimentares (Almeida et al., 1999). Um estudo mais recente, no qual foram analisados os processos clínicos seguidos no Departamento de Alergia do Centro Hospitalar São João entre Janeiro de 2009 e Outubro de 2012, concluiu que 43 (24%) dos 142 indivíduos adultos seguidos nesse departamento apresentavam alergias alimentares e que os crustáceos foram responsáveis por 36% dessas alergias (Couto et al., 2013).

2.1 Alergênios dos crustáceos

Os alergênios alimentares são definidos como os componentes específicos dos alimentos ou ingredientes que são reconhecidos por células imunes específicas ao alergénio e desencadeiam reações imunológicas, resultando em sintomas característicos (Boyce et al., 2011). Bioquimicamente, os alergénios são maioritariamente proteínas ou glicoproteínas, solúveis em água e resistentes à digestão (Costa et al., 2012b).

A tropomiosina foi o primeiro alergénio identificado em crustáceos, contudo posteriormente outros alergénios foram caracterizados, como é o caso da arginina cinase, das miosinas de cadeia leve, da proteína de ligação ao cálcio sarcoplasmático, entre outros (Lopata et al., 2010; Pedrosa et al., 2014). Atualmente, na base de dados WHO/IUIS Allergen, que contém os alergénios aprovados e reconhecidos pela Organização Mundial de Saúde e pela União Internacional de Sociedades de Imunologia, consta a presença de 31 alergénios de crustáceos da ordem Decapoda relacionados com alergias alimentares (Tabela 1).

2.1.1 Tropomiosina

A tropomiosina foi identificada pela primeira vez em camarões (Pen a 1) em 1981, sendo o principal alergénio presente nos crustáceos (Pedrosa et al., 2014). Esta proteína está presente em todos os tecidos musculares, estando envolvida nos processos de regulação da contração de muscular (Lee & Taylor, 2011; Leung et al., 2014; Pedrosa et al., 2014). Este alergénio termoestável apresenta um peso molecular que varia entre os 34 e os 38 kDa, dependendo da espécie na qual se encontra (Leung et al., 2014; Pedrosa et al., 2014).

As tropomiosinas apresentam uma grande homologia na sequência de aminoácidos, representando panalergénios responsáveis por casos de reatividade cruzada entre crustáceos, insetos, ácaros, nemátodos e moluscos (Carrapatoso, 2004; Pedrosa et al., 2014). Nos crustáceos, a homologia entre as tropomiosinas é tão elevada que, para os indivíduos alérgicos a uma determinada espécie de crustáceo, o risco de reação a uma segunda espécie é de aproximadamente 75% (Carrapatoso, 2004).

2.1.2 Arginina cinase

Em 2003, a arginina cinase foi identificada como sendo um novo alergénio presente em camarões da espécie *Penaeus monodon* (Pen m 2), apresentando um peso molecular de 40 kDa (Yu et al., 2003). A arginina cinase desempenha um papel importante no

metabolismo dos invertebrados, pois catalisa a transferência reversível do grupo fosforil a partir do ATP para a arginina, formando-se ADP e N-fosfoarginina (Yu et al., 2003).

Tabela 1 - Lista dos 31 alergénios dos crustáceos relacionados com alergias alimentares presentes na base de dados WHO/IUIS Allergen (ALLERGEN, 2016).

Classificação bioquímica	Alergénio	Nome comum do crustáceo	Espécie de crustáceo
Tropomiosina	Cha f 1	Caranguejo	<i>Charybdis feriatus</i>
	Cra c 1	Camarão do Mar do Norte	<i>Crangon crangon</i>
	Hom a 1	Lagosta americana	<i>Homarus americanus</i>
	Lit v 1	Camarão de patas brancas	<i>Litopenaeus vannamei</i>
	Mac r 1	Camarão gigante de água doce	<i>Macrobrachium rosenbergii</i>
	Mel l 1	Camarão rei	<i>Melicertus latisulcatus</i>
	Met e 1	Camarão grande	<i>Metapenaeus ensis</i>
	Pan b 1	Camarão do Mar do Norte	<i>Pandalus borealis</i>
	Pan s 1	Lagosta espinhosa	<i>Panulirus stimpsoni</i>
	Pen a 1	Camarão castanho	<i>Penaeus aztecus</i>
	Pen i 1	Camarão branco da Índia	<i>Penaeus indicus</i>
	Pen m 1	Camarão tigre gigante	<i>Penaeus monodon</i>
	Por p 1	Caranguejo azul	<i>Portunus pelagicus</i>
	Arginina cinase	Cra c 2	Camarão do Mar do Norte
Lit v 2		Camarão de patas brancas	<i>Litopenaeus vannamei</i>
Pen m 2		Camarão tigre gigante	<i>Penaeus monodon</i>
Proteína de ligação ao cálcio sarcoplasmático	Cra c 4	Camarão do Mar do Norte	<i>Crangon crangon</i>
	Lit v 4	Camarão de patas brancas	<i>Litopenaeus vannamei</i>
	Pen m 4	Camarão tigre gigante	<i>Penaeus monodon</i>
	Pon l 4	Lagostim	<i>Pontastacus leptodactylus</i>
Miosina de cadeia leve 1	Cra c 5	Camarão do Mar do Norte	<i>Crangon crangon</i>
Miosina de cadeia leve 2	Hom a 3	Lagosta americana	<i>Homarus americanus</i>
	Lit v 3	Camarão de patas brancas	<i>Litopenaeus vannamei</i>
	Pen m 3	Camarão tigre gigante	<i>Penaeus monodon</i>
Troponina C	Cra c 6	Camarão do Mar do Norte	<i>Crangon crangon</i>
	Hom a 6	Lagosta americana	<i>Homarus americanus</i>
	Pen m 6	Camarão tigre gigante	<i>Penaeus monodon</i>
Troponina I	Pon l 7	Lagostim	<i>Pontastacus leptodactylus</i>
Triose-fosfato isomerase	Arc s 8	Camarão	<i>Archaeopotamobius sibiriensis</i>
	Cra c 8	Camarão do Mar do Norte	<i>Crangon crangon</i>
Proteína relacionada com o desenvolvimento ovário	Eri s 2	Caranguejo chinês	<i>Eriocheir sinensis</i>

Este alergénio é termolábil, verificando-se a redução da sua alergenicidade após processamento térmico (Fernandes et al., 2015; Pedrosa et al., 2014). Tal como a tropomiosina, a arginina cinase é um panalergénio, identificado noutros invertebrados, como por exemplo em moluscos, ácaros, aranhas, moscas da fruta e baratas (Pedrosa et al., 2014).

2.1.3 Proteína de ligação ao cálcio sarcoplasmático

Em 2008, foi descrito um alergénio com um peso molecular de 20 kDa em camarões da espécie *Penaeus monodon* (Pen m 4), que foi identificado como uma proteína de ligação ao cálcio sarcoplasmático. Existem algumas evidências de reatividade cruzada com proteínas semelhantes presentes no camarão kuruma, na lagosta americana e no camarão rosa, contudo noutras duas espécies de camarão este fenómeno não se verificou (Shiomi et al., 2008).

A função biológica da proteína de ligação ao cálcio sarcoplasmático não é conhecida, mas acredita-se que tenha um papel semelhante à parvalbumina – o principal alergénio dos peixes – que promove o relaxamento muscular por translocação do Ca^{2+} das miofibrilas para o retículo sarcoplasmático (Pedrosa et al., 2014; Poi-Wah & Steve, 2010).

2.1.4 Miosinas de cadeia leve

As miosinas são uma grande superfamília de proteínas musculares que fazem parte de um complexo que envolve outras proteínas como a actina, a tropomiosina e a troponina, sendo fundamentais para a contração muscular (Fernandes et al., 2015). A miosina é composta por duas cadeias pesadas e quatro cadeias leves. Cada cadeia pesada da miosina é rodeada por duas cadeias leves com um peso molecular de 20kDa (Ayuso et al., 2008; Fernandes et al., 2015; Pedrosa et al., 2014).

Em 2008, Ayuso et al. identificou uma miosina de cadeia leve como sendo um novo alergénio presente em camarões da espécie *Litopenaeus vannamei* (Lit v 3). É constituído por 177 aminoácidos, apresentando um peso molecular de 20 kDa e um ponto isoelétrico calculado de 4,2. No mesmo estudo, também foi verificado que a sequência de aminoácidos da miosina de cadeia leve é 66% semelhante e 51% idêntica à sequência de aminoácidos do alergénio Bla g 8, presente em baratas (*Blattella germanica*). Esta semelhança das sequências de aminoácidos entre as miosinas de cadeia leve pode levar a casos de reatividade cruzada entre camarões e baratas (Ayuso et al., 2008). Mais tarde, as miosinas de cadeia leve foram também descritas como alergénios noutras espécies de camarão e de lagosta (Pedrosa et al., 2014).

2.1.5 Troponina C e I

A troponina é um complexo constituído por três proteínas: a troponina C, a troponina I e a troponina T (Kobayashi et al., 1989). A troponina C faz parte de um grande grupo de proteínas de ligação ao Ca^{2+} , que também inclui a calmodulina, a calpaina, a parvalbumina, calbindina e a miosina de cadeia leve (Kalyanasundaram & Santiago, 2015). Esta proteína com 21 kDa foi identificada pela primeira vez em 2011 como sendo um alergénio de crustáceos (Crac 6), mais concretamente em camarões da espécie *Crangon crangon*, tendo sido anteriormente identificada em baratas (Blag 6) (Bauermeister et al., 2011).

A troponina I foi identificada como sendo um alergénio em lagostins da espécie *Pontastacus leptodactylus* (Pon I 7), apresentando um peso molecular de aproximadamente 30 kDa (ALLERGEN, 2016).

2.1.6 Triose-fosfato isomerase

A triose-fosfato isomerase foi descrita em 2011 como sendo um novo alergénio de camarões (Crac 8), com um peso molecular de aproximadamente 28 kDa. Outros alergénios desta família de proteínas já tinham sido anteriormente identificados em peixes, mosquitos e várias plantas (Bauermeister et al., 2011).

2.1.7 Proteína relacionada com o desenvolvimento do ovário

A proteína relacionada com o desenvolvimento do ovário é o mais recente alergénio introduzido na base de dados WHO/IUIS Allergen. Este foi identificado em caranguejos da espécie *Eriocheir sinensis* (Eris 2), apresentando um peso molecular de 28,2 kDa (ALLERGEN, 2016).

3 Metodologias utilizadas na identificação de espécies de crustáceos

A identificação de espécies de animais provenientes da pesca é realizada tradicionalmente através de análise morfológica (Bottero & Dalmaso, 2011; Ortea et al., 2012). No caso concreto dos crustáceos, a identificação de espécies através da análise das características morfológicas é particularmente difícil, devido às semelhanças fenotípicas existentes entre determinadas espécies e também ao facto de estes serem frequentemente sujeitos a vários tipos de processamento alimentar que destroem essas características.

De forma a ultrapassar as dificuldades na identificação decorrentes da análise morfológica, têm sido desenvolvidas metodologias analíticas que permitem uma diferenciação mais específica. Essas metodologias baseiam-se essencialmente na análise de marcadores moleculares de DNA ou de proteínas (Pascoal et al., 2011). Nas próximas secções, será realizada uma descrição desses métodos aplicados na identificação de espécies de crustáceos.

3.1 Métodos baseados na análise de proteínas

Os métodos baseados na análise de proteínas utilizados na identificação de espécies e avaliação da autenticidade de crustáceos incluem metodologias clássicas, tais como os ensaios imunológicos e as técnicas eletroforéticas (Ortea et al., 2012). Estas metodologias são geralmente fiáveis quando aplicadas em amostras frescas ou congeladas, porém isto não se verifica quando aplicadas em amostras sujeitas a processamentos mais agressivos, como tratamentos térmicos, que levam à destruição de propriedades bioquímicas e da integridade estrutural das proteínas, dificultando assim estas análises (Rasmussen & Morrissey, 2008).

Os **ensaios imunológicos** caracterizam-se pela deteção de uma proteína-alvo (antigénio) com base numa ligação específica antigénio-anticorpo. Os anticorpos devem, por isso, possuir elevada afinidade e seletividade para o antigénio de forma a permitir a deteção de quantidades vestigiais do antigénio e evitar resultados em que existam falsos positivos (van Ruth et al., 2010). Algumas das técnicas aplicadas em estudos de crustáceos incluem: os ensaios em tiras de fluxo lateral (Koizumi et al., 2014), ELISA (Werner et al., 2007) e *Western blot* (Fuller et al., 2006). Estas técnicas baseiam-se na deteção de alergénios presentes nos crustáceos, como a tropomiosina ou a arginina cinase. Porém, na maioria dos estudos estas técnicas apenas possibilitaram a deteção genérica de crustáceos, não permitindo a diferenciação de espécies, devido à ocorrência frequente de fenómenos de reatividade cruzada com várias espécies.

No que diz respeito às **técnicas eletroforéticas**, estas baseiam-se na migração das proteínas ao longo de um gel de agarose ou poliacrilamida, causada por forças electrostáticas que atraem estas moléculas para os elétrodos carregados negativamente no campo elétrico (Wojciech & Dagmara, 2010). As técnicas eletroforéticas aplicadas com sucesso na identificação de espécies de crustáceos incluem a eletroforese em gel de poliacrilamida e dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) (An et al., 1988) e a focagem isoelétrica (IEF) (Ortea et al., 2010)

Mais recentemente, os **métodos proteómicos** baseados na utilização de espectrometria de massa (MS) foram propostos como estratégias promissoras para a

avaliação da autenticidade dos alimentos (Gallardo et al., 2013). A proteómica é definida como a análise em larga escala de proteínas, que inclui não só o estudo da sua estrutura e função, mas também a análise das modificações, as interações entre elas, a sua localização intracelular e a sua quantificação (Carrera et al., 2013; Gallardo et al., 2013). As técnicas de espetrometria de massa, nomeadamente MS com *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight* (MALDI-TOF) e com *electrospray-ion trap* (ESI-IT), bem como o tratamento bioinformático dos dados são reconhecidos como ferramentas indispensáveis para os estudos de proteómica (Carrera et al., 2013; Ortea et al., 2012). Numa fase inicial, os estudos proteómicos exploram de forma abrangente o proteoma a fim de identificarem potenciais biomarcadores (proteínas e péptidos), recorrendo a técnicas de eletroforese e de MS (Carrera et al., 2013; Gallardo et al., 2013; Ortea, Canas, & Gallardo, 2009). Numa fase posterior, uma vez identificados os biomarcadores, poder-se-á partir para a sua deteção com o objetivo de avaliar a autenticidade dos alimentos.

Apesar de a aplicação das técnicas proteómicas ainda não apresentar atualmente uma grande expressão na identificação de espécies de crustáceos e avaliação da autenticidade, os trabalhos presentes na literatura demonstram que estas realizam com sucesso a diferenciação de espécies de camarão, apontando a arginina cinase como um potencial marcador molecular para a diferenciação de algumas espécies de camarão estreitamente relacionadas (Ortea et al., 2009; Ortea et al., 2011; Pascoal et al., 2012).

3.2 Métodos baseados na análise de DNA

Nos últimos anos, o desenvolvimento de métodos baseados na análise de DNA permitiu ultrapassar algumas dificuldades existentes na aplicação dos métodos clássicos baseados na análise de proteínas para a identificação de espécies e avaliação da autenticidade de alimentos. Os métodos baseados na análise de DNA apresentam várias vantagens relativamente à análise de proteínas, nomeadamente, maior especificidade, sensibilidade e melhores performances em amostras com elevado grau de processamento. Estas vantagens devem-se ao facto das moléculas de DNA serem mais estáveis termicamente do que as proteínas, sendo menos suscetíveis à degradação resultante do processamento dos alimentos. Além disso, as moléculas de DNA podem ser encontradas em qualquer substrato, porque estão presentes em quase todas as células de um organismo. Adicionalmente, devido à degenerescência do código genético e à presença de muitas regiões não codificantes, o DNA fornece também mais informação do que as proteínas (Hellberg & Morrissey, 2011; Teletchea, 2009).

Os métodos de DNA aplicados em estudos de identificação de espécies de crustáceos baseiam-se essencialmente na amplificação de sequências marcadoras,

recorrendo à reação em cadeia da polimerase (PCR) (Rasmussen & Morrissey, 2008; Wojciech & Dagmara, 2010). Essas sequências devem ser altamente polimórficas, apresentar elevada reprodutibilidade e comportamento seletivo neutro, ou seja, as sequências de DNA devem ser neutras a diferentes condições ambientais ou práticas de manuseamento (Jonah et al., 2011). A identificação de espécies de crustáceos pode ser determinada analisando o DNA mitocondrial (mtDNA) ou o DNA nuclear (nDNA), sendo o mtDNA utilizado com maior frequência do que o nDNA, pelas seguintes razões (Rasmussen & Morrissey, 2008; Wojciech & Dagmara, 2010):

1. Apresenta um tamanho muito menor do que o nDNA;
2. É mais simples, devido à ausência de intrões, pseudogenes, elementos de transposição e DNA repetitivo;
3. A sua extração é mais fácil;
4. Não sofre rearranjos genéticos como a recombinação;
5. Apresenta maior resistência à degradação induzida pelo calor;
6. Apresenta várias cópias.

Os métodos de DNA utilizados para a identificação ou avaliação da autenticidade de crustáceos incluem: (i) técnicas que não requerem informação prévia sobre a sequência de DNA, tais como a amplificação aleatória de DNA polimórfico (RADP – *Random amplified polymorphic DNA*) e a análise de polimorfismos no comprimento de fragmentos amplificados (AFLP – *Amplified fragment length polymorphism*); e (ii) técnicas que necessitam do conhecimento prévio da sequência de DNA alvo, como a PCR com análise de polimorfismos nos fragmentos de restrição (RFLP – *Restriction fragment length polymorphism*), a PCR com análise de polimorfismos conformacionais de cadeia simples (SSCP – *Single stranded conformational polymorphism*), a PCR sequenciação, a PCR em tempo real e a abordagem de DNA *barcoding*.

3.2.1 Técnica da PCR

Kary B. Mullis foi o responsável pela descoberta da técnica da PCR em 1985, que lhe permitiu receber o prêmio Nobel da Química em 1993. A técnica consiste numa amplificação exponencial de um fragmento de DNA, na qual o DNA de cadeia dupla é desnaturado, dando origem a DNA de cadeia simples, que em seguida é duplicado, sendo o seu princípio baseado no mecanismo de replicação do DNA *in vivo* (Rodriguez-Lazaro & Hernandez, 2013). A PCR envolve uma série de ciclos consecutivos, geralmente 20 a 40 ciclos, cada um composto por três etapas de temperaturas diferentes (Figura 6) (Iannone, 2014; Rasmussen & Morrissey, 2008):

1. **Etapa de Desnaturação** – ocorre a separação do DNA de cadeia dupla em DNA de cadeia simples e todas as reações enzimáticas param. Para que a desnaturação ocorra, a temperatura é elevada até aos 94-98°C durante 20 a 30 segundos;
2. **Etapa de Hibridação** – a temperatura é descida até aos 50-65°C durante aproximadamente 20 a 40 segundos, permitindo a ligação dos *primers* às regiões complementares do DNA de cadeia simples;
3. **Etapa de Extensão** – a temperatura desta etapa depende da temperatura ótima da polimerase de DNA utilizada. A polimerase da Taq (*Thermus aquaticus*) é a enzima geralmente utilizada, tornando necessário o aumento da temperatura até aos 72°C para otimizar a sua atividade. Nesta etapa, a polimerase de DNA sintetiza as novas cadeias complementares, a partir dos *primers*.

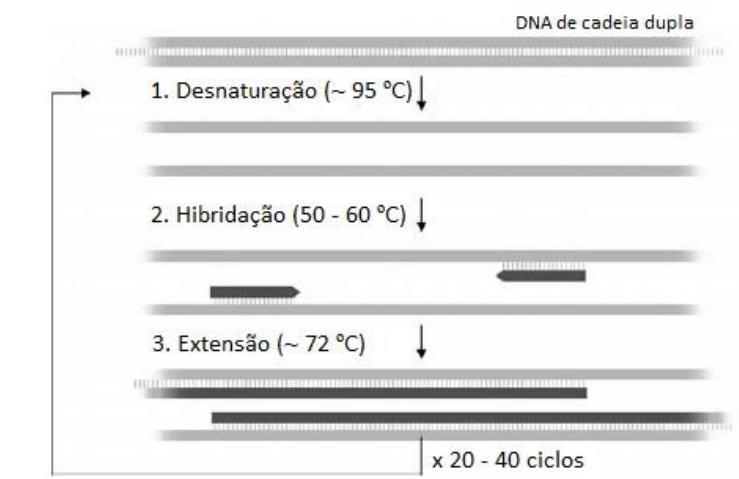


Figura 6 - Representação esquemática das etapas da PCR.

Para estas etapas serem desenvolvidas com sucesso é necessária a presença dos seguintes componentes na reação (Iannone, 2014; Somma & Querci, 2006):

1. **Extrato de DNA:** Pelo menos, uma cópia intacta do DNA alvo deverá estar presente no extrato a amplificar. O extrato deve estar o mais puro possível, de forma a evitar a existência de inibição enzimática durante o processo de amplificação.
2. **Primers:** Pequenas sequências de DNA de cadeia simples com 16 a 30 nucleótidos que são complementares à sequência de DNA alvo.
3. **Polimerase de DNA:** A polimerase da Taq foi a primeira polimerase de DNA termoestável utilizada numa PCR e apesar de atualmente estarem disponíveis comercialmente outras polimerases de DNA, esta é a mais usada em PCR. Esta

enzima sintetiza as novas cadeias de DNA complementares à sequência alvo na direção 5'-3'.

4. **MgCl₂**: A concentração de magnésio na PCR é crucial para que amplificação ocorra com sucesso, pois o íon Mg²⁺ é um cofator essencial para as polimerases de DNA. Geralmente, concentrações baixas de Mg²⁺ resultam em rendimentos de reação baixos, porém quando estão presentes em excesso podem conduzir à acumulação de produtos não específicos.
5. **Tampão da reação**: Proporciona um ambiente químico adequado à atividade e estabilidade da polimerase de DNA.
6. **Desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTP)**: Os desoxirribonucleótidos trifosfatados livres, nomeadamente, o desoxiadenina trifosfato (dATP), o desoxicitosina trifosfato (dCTP), a desoxiguanina trifosfato (dGTP) e o desoxitimina trifosfato (dTTP) são necessários durante a etapa de extensão para formar as novas cadeias de DNA. Estes quatro dNTP devem estar presentes na reação em concentrações equivalentes para evitar erros de incorporação.

O desenho de *primers* específicos, que apenas hibridam com o DNA de uma determinada espécie, permite o desenvolvimento da técnica de PCR específica de espécie, detetando uma dada espécie de forma simples através da presença ou ausência de produto de amplificação por PCR num gel de eletroforese, sem a necessidade de outros procedimentos analíticos, tais como, a sequenciação, RFLP ou SSCP (Rasmussen & Morrissey, 2008). Esta técnica apenas pode ser desenvolvida quando existe o conhecimento detalhado das sequências de DNA da espécie alvo, contudo esta informação está cada vez mais disponível devido à criação de bases de dados genéticos. De forma a evitar a existência de um resultado falso positivo ou negativo, deve-se incluir na reação um controlo positivo e um controlo negativo, pois por vezes a falta do fragmento amplificado no gel deve-se a problemas técnicos, e não à ausência de DNA alvo (Rasmussen & Morrissey, 2008; Teletchea, 2009).

3.2.2 PCR-RFLP

A PCR-RFLP é uma das técnicas mais usadas na identificação de espécies. Envolve a amplificação de fragmentos de DNA previamente selecionados com *primers* universais, os quais são sujeitos posteriormente a uma digestão com endonucleases de restrição. Estas enzimas reconhecem pequenas sequências específicas (4 a 6 nucleótidos) do fragmento amplificado e cortam o DNA nesses locais, originando um conjunto de

fragmentos com diferentes comprimentos que podem ser separados e visualizados de acordo com o seu peso molecular, recorrendo a eletroforese em gel de agarose (Figura 7) (Hellberg & Morrissey, 2011; Pereira et al., 2008; Rasmussen & Morrissey, 2008). O perfil de RFLP característico de cada espécie resulta de uma distribuição genómica única dos locais de reconhecimento e da distância entre eles (Pereira et al., 2008).

Esta técnica é relativamente rápida, reprodutível e não requer equipamento muito caro, contudo apresenta como principal desvantagem a possibilidade de existirem mutações intraespecíficas nos locais de restrição, levando a que indivíduos da mesma espécie exibam perfis de restrição diferentes, originando, assim, falsos resultados (Pereira et al., 2008; Rasmussen & Morrissey, 2008).

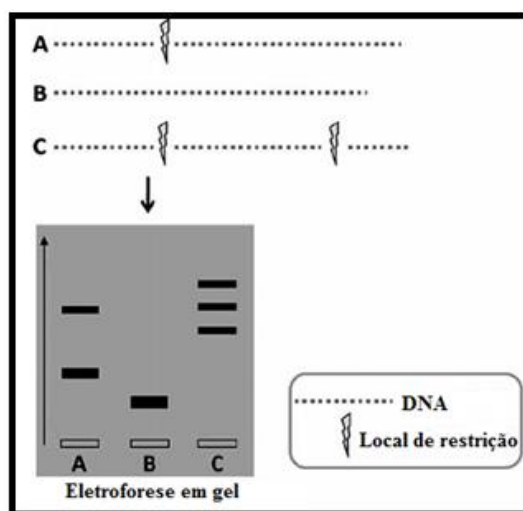


Figura 7 - Representação esquemática do método PCR-RFLP. As espécies (A, B e C) são identificadas através da corrida dos fragmentos de restrição numa eletroforese em gel. Adaptado de Pereira et al. (2008).

3.2.3 RAPD

A técnica RAPD consiste na amplificação aleatória de fragmentos desconhecidos de DNA nuclear através de uma PCR. Durante a amplificação é utilizado um *primer* arbitrário com 8 a 10 pares de bases, concebido sem conhecimento prévio da sequência de DNA alvo, o que leva à amplificação aleatória de fragmentos do DNA (Figura 8) (Liu & Cordes, 2004; Rasmussen & Morrissey, 2008). Devido às variações existentes no código genético, a análise de RAPD em espécies diferentes resulta em padrões únicos de fragmentos de DNA. Após amplificação, os produtos obtidos são analisados recorrendo a uma eletroforese em gel. Se os padrões das bandas resultantes forem específicos para a espécie em análise, é possível estabelecer um DNA *fingerprint* para essa espécie. Quando uma amostra desconhecida é analisada utilizando o mesmo *primer*, o seu padrão de

bandas pode ser comparado com os de amostras conhecidas para determinar a sua espécie (Rasmussen & Morrissey, 2008).

A RAPD é considerada uma técnica simples, rápida e relativamente barata. Para além destas vantagens, apresenta também o facto de não necessitar de uma elevada quantidade de DNA e permitir a criação de marcadores genómicos sem o conhecimento prévio das sequências a amplificar (Rasmussen & Morrissey, 2008; Vaseeharan et al., 2013). Uma das principais desvantagens está relacionada com a sua baixa reprodutibilidade, especialmente quando o DNA está ligeiramente degradado (Rasmussen & Morrissey, 2008). Outra desvantagem é a determinação subjetiva da ausência ou presença de bandas e a dificuldade da análise, devido ao grande número de fragmentos amplificados (Vaseeharan et al., 2013).

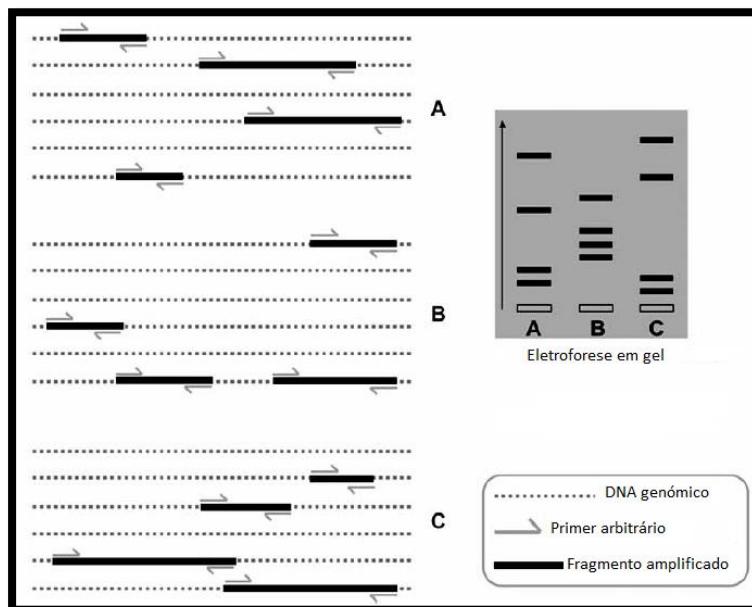


Figura 8 - Representação esquemática da técnica de RAPD. As espécies (A, B e C) são identificadas através da corrida dos fragmentos amplificados numa eletroforese em gel. Adaptado de Pereira et al. (2008).

3.2.4 AFLP

A técnica de AFLP foi descrita pela primeira vez em 1995 e baseia-se na amplificação seletiva de fragmentos de restrição obtidos a partir da digestão total do DNA genómico, recorrendo à PCR (Pereira et al., 2008; Vos et al., 1995). Envolve inicialmente a digestão do DNA com duas enzimas de restrição, geralmente a EcoR I e a MseI, e a ligação de adaptadores de cadeia dupla às extremidades dos fragmentos de restrição obtidos durante a digestão do DNA. Em seguida, ocorre uma pré-amplificação seletiva recorrendo a *primers* complementares às sequências dos adaptadores e dos locais de

restrição. Estes *primers* contêm uma base arbitrária adicional na extremidade 3' e, por conseguinte, apenas permitem amplificar um subconjunto (1/16) dos fragmentos de DNA disponíveis (Liu & Cordes, 2004; Rasmussen & Morrissey, 2008; Vaseeharan et al., 2013). Posteriormente, os produtos amplificados são utilizados como DNA molde numa segunda amplificação mais seletiva por PCR. Esta maior seletividade deve-se à adição de mais 2 bases arbitrárias nas extremidades 3' dos *primers*, que permite reduzir ainda mais o número de fragmentos de DNA disponíveis (1/4096), resultando, após esta amplificação, cerca de 122 fragmentos (Liu & Cordes, 2004). Por último, os polimorfismos são detetados através das diferenças no comprimento dos fragmentos amplificados, recorrendo a eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (Figura 9).

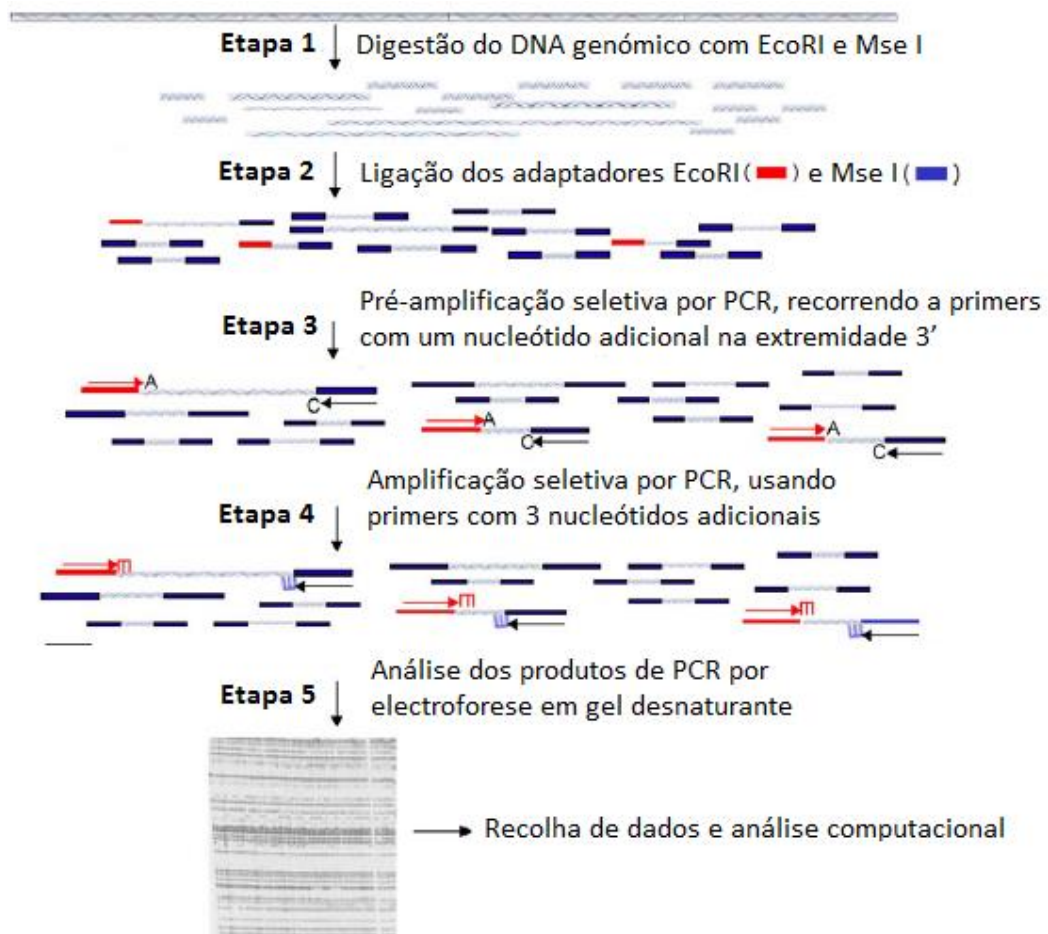


Figura 9 - Representação esquemática do método AFLP. Adaptado de Liu & Cordes (2004).

Como resultado global desta técnica, obtém-se um DNA *fingerprint* específico, no qual os polimorfismos inter e intraespecíficos são descobertos pela presença ou ausência de fragmentos específicos (Rasmussen & Morrissey, 2008). A técnica AFLP tem um número de vantagens que a torna uma ferramenta interessante para a identificação de espécies. O método pode ser realizado independentemente da origem ou da complexidade do DNA alvo e os padrões das bandas AFLP são altamente complexos e ricos em informação. Embora seja uma técnica semelhante à RAPD na medida em que não requer conhecimento prévio da sequência de DNA, a análise AFLP mostra maiores níveis de reprodutibilidade e de polimorfismo (Rasmussen & Morrissey, 2008; Vaseeharan et al., 2013).

3.2.5 PCR-SSCP

A análise de SSCP requer a amplificação por PCR de um fragmento de DNA específico para todas as espécies em análise, geralmente o gene do citocromo b (*cytb*) do mtDNA. Os fragmentos amplificados são então desnaturados, originando fragmentos de DNA de cadeia simples (Figura 10). As variações nas sequências, como por exemplo variações de um único nucleótido, poderão ser detetadas pelas diferenças na mobilidade eletroforética dos fragmentos numa eletroforese em gel de poliacrilamida. As bandas de SSCP obtidas são comparadas com as de espécies conhecidas, permitindo a identificação correta da espécie desconhecida (Puyet & Bautista, 2009; Rasmussen & Morrissey, 2008).

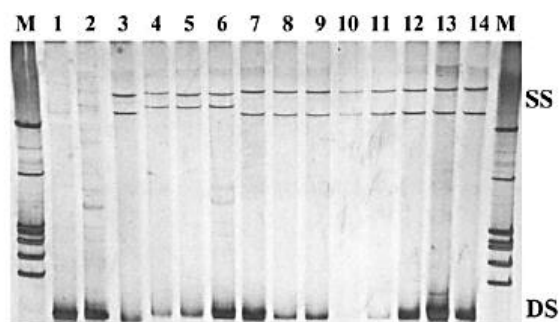


Figura 10 - Padrões de SSCP de três espécies de camarão. As siglas SS e DS significam cadeias simples e duplas de DNA, respetivamente. Fonte: Khamnamtong et al. (2005).

A PCR-SSCP é uma boa alternativa para outras técnicas como a PCR-sequenciação ou a PCR-RFLP, especialmente quando as espécies em análise são estreitamente relacionadas. Embora a PCR-RFLP tenha sido relatada como sendo mais simples e robusta, a PCR-SSCP é muito sensível e menos problemática do que a PCR-RFLP ou a RAPD, em caso de existência de variações intraespecíficas. Estudos

demonstram que esta técnica é especialmente útil na análise de pequenos fragmentos de DNA, com aproximadamente 100 pb, e na detecção de espécies em amostras contendo misturas (Puyet & Bautista, 2009; Rasmussen & Morrissey, 2008).

3.2.6 PCR em tempo real

A PCR em tempo real, também conhecida por PCR quantitativa (qPCR), foi desenvolvida com base na PCR convencional, sendo esta uma técnica que permite a detecção e quantificação de sequências específicas de DNA numa amostra (Bio-Rad, 2006; Hellberg & Morrissey, 2011; Pereira et al., 2008). Na PCR convencional, apenas é possível realizar a detecção dos produtos amplificados após a reação ter terminado, seguida de eletroforese em gel de agarose. Em contraste, a PCR em tempo real permite a monitorização da síntese de novos amplicões ao longo da reação e não necessita que ocorra manipulação dos produtos amplificados no final da reação, reduzindo assim o tempo de análise e o risco de contaminações (Bio-Rad, 2006; Heid et al., 1996; Hellberg & Morrissey, 2011).

A monitorização em tempo real dos produtos amplificados é possível devido à adição de moléculas fluorescentes na reação, cujo aumento do sinal de fluorescência é proporcional ao aumento da quantidade de DNA inicial (Bio-Rad, 2006). Os dois métodos comumente utilizados para a detecção de produtos de PCR em tempo real são: os corantes fluorescentes não específicos que se intercalam com qualquer DNA de cadeia dupla (método não específico) e as sondas de DNA de sequência específica que são constituídas por oligonucleótidos marcados com fluoróforos, permitindo a detecção dos amplicões só após a hibridação da sonda com a sequência de DNA alvo complementar (método específico) (Iannone, 2014).

O SYBR Green I é o corante fluorescente mais usado em PCR em tempo real. Este quando se encontra livre em solução exibe pouca fluorescência, porém esta aumenta mais de 1000 vezes quando se liga às cadeias duplas do DNA. O aumento do sinal de fluorescência ocorre durante a etapa de extensão ao longo de cada ciclo da qPCR, verificando-se um decréscimo do sinal quando o DNA é desnaturado (Figura 11). Consequentemente, as medições de fluorescência são realizadas no final da etapa de extensão de cada ciclo (Bio-Rad, 2006; Navarro et al., 2015; Rodriguez-Lazaro & Hernandez, 2013).

Este método evita a necessidade de desenhar sondas fluorescentes específicas, utilizando apenas um par de *primers*, sendo, por isso, menos dispendioso do que o

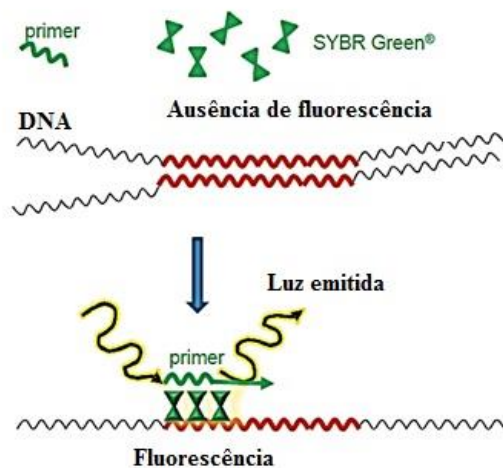


Figura 11 - Princípio da detecção usando o SYBR Green. Adaptado de Rodriguez-Lazaro et al. (2013).

método de detecção específico. No entanto, a sua principal desvantagem relaciona-se com a especificidade, pois é totalmente determinada pelo par de *primers* usado na reação, por isso, o risco de amplificar produtos não específicos e dímeros de *primers* tem de ser considerado durante a otimização da técnica. Devido a este facto, é importante verificar a especificidade dos fragmentos amplificados através da análise da curva de desnaturação. Esta análise baseia-se na determinação da temperatura de desnaturação dos fragmentos obtidos através do aumento gradual da temperatura, entre os 50°C e os 95°C, após o último ciclo da qPCR. No início da análise, o sinal de fluorescência é elevado devido ao grande número de amplicões de DNA de cadeia dupla presentes no tubo de PCR. Posteriormente, à medida que a temperatura aumenta verifica-se a dissociação das cadeias duplas de DNA, ocorrendo, por isso, uma diminuição do sinal de fluorescência. A temperatura de desnaturação dos amplicões pode ser determinada a partir do ponto de inflexão da curva de desnaturação ou a partir do pico de desnaturação que pode ser obtido traçando o gráfico da derivada negativa da fluorescência (F) em relação à temperatura (T) ($-dF/dT$) em função da temperatura. Recorrendo a qualquer um dos gráficos, é possível averiguar se durante a reação ocorreu amplificação de produtos não específicos ou de dímeros de *primers*, uma vez que estes são desnaturados a temperaturas geralmente mais baixas do que os produtos específicos, apresentado assim entre eles diferentes temperaturas de desnaturação (Druml & Cichna-Markl, 2014; Navarro et al., 2015).

A análise da curva de desnaturação utilizando o corante SYBR Green apresenta a desvantagem de não ter a capacidade de discriminar amplicões que apresentem pequenas variações nas sequências. Mais recentemente, surgiram novos corantes fluorescentes, como é o caso do EvaGreen, que em relação ao SYBR Green I tem a vantagem de poder ser utilizado em concentrações mais elevadas, gerando sinais de fluorescência superiores

e uma maior sensibilidade sem causar inibição da PCR (Costa et al., 2012a). O aparecimento destes novos corantes fluorescentes e de instrumentação de elevada resolução permitiu desenvolver uma nova forma de análise da curva de desnaturação denominada por **High Resolution Melting (HRM)**. Em contraste com a análise clássica da curva de desnaturação, a análise de HRM permite a deteção de mutações e polimorfismos de nucleótido único, permitindo assim a diferenciação de espécies (Druml & Cichna-Markl, 2014). A análise de HRM é realizada após o último ciclo da qPCR e envolve a desnaturação dos amplicões através de pequenos incrementos graduais de temperatura (0,1°C/2s). De seguida, o *software* de HRM identifica áreas de pré e pós-desnaturação com intensidade de fluorescência estável (Figura 12A) e os seus sinais são automaticamente normalizados para valores relativos de 1 e 0, respetivamente (Figura 12B), para eliminar diferenças na fluorescência de fundo e aumentar também a capacidade de detetar diferenças subtis nos perfis de desnaturação (Taylor et al., 2010). A fim de discriminar e destacar pequenas diferenças entre as curvas de desnaturação individuais, são criadas curvas de diferença, obtidas subtraindo a curva de desnaturação normalizada das amostras à curva de desnaturação normalizada da amostra de referência (Figura 12C) (Taylor et al., 2010). Geralmente, a sobreposição completa das curvas de diferença das amostras e da amostra de referência indica que ambas as amplicões têm a mesma sequência. Além disso, o *software* permite também agrupar as amostras em grupos (*clusters*), com base nas semelhanças da forma das curvas de desnaturação (Druml & Cichna-Markl, 2014).

Ultimamente, têm sido desenvolvidos vários trabalhos na área alimentar que recorrem à análise de HRM para identificar e diferenciar espécies estreitamente relacionadas, a fim de detetar casos de adulteração de alimentos (Jin et al., 2015; Sakaridis et al., 2013), e também para a deteção de alergénios (Costa et al., 2012a). Contudo, até ao momento não se encontra publicado nenhum trabalho sobre identificação e diferenciação de espécies em crustáceos.

O método de deteção específico em PCR em tempo real baseia-se no uso de sondas, geralmente, constituídas por oligonucleótidos que contêm um fluoróforo (*reporter*) numa extremidade e um inibidor de fluorescência (*quencher*) na extremidade oposta da sonda, como é o caso da sonda de hidrólise do tipo TaqMan (Figura 13), que é a mais utilizada na identificação de espécies de peixe e marisco (Iannone, 2014). Quando a sonda está intacta, a proximidade do fluoróforo ao *quencher* impede que o fluoróforo emita fluorescência. Durante a etapa de hibridação, os *primers* e a sonda emparelham com a sequência alvo. Posteriormente, ocorre a polimerização das novas cadeias de DNA que se inicia a partir dos *primers*. Quando a polimerase de DNA atinge a sonda, verifica-se a sua degradação, separando fisicamente o fluoróforo do *quencher*, o que resulta na emissão de fluorescência (Figura 13). Desta forma, a fluorescência é detetada e medida em tempo real,

sendo o aumento do sinal de fluorescência proporcional ao aumento dos produtos amplificados (Iannone, 2014).

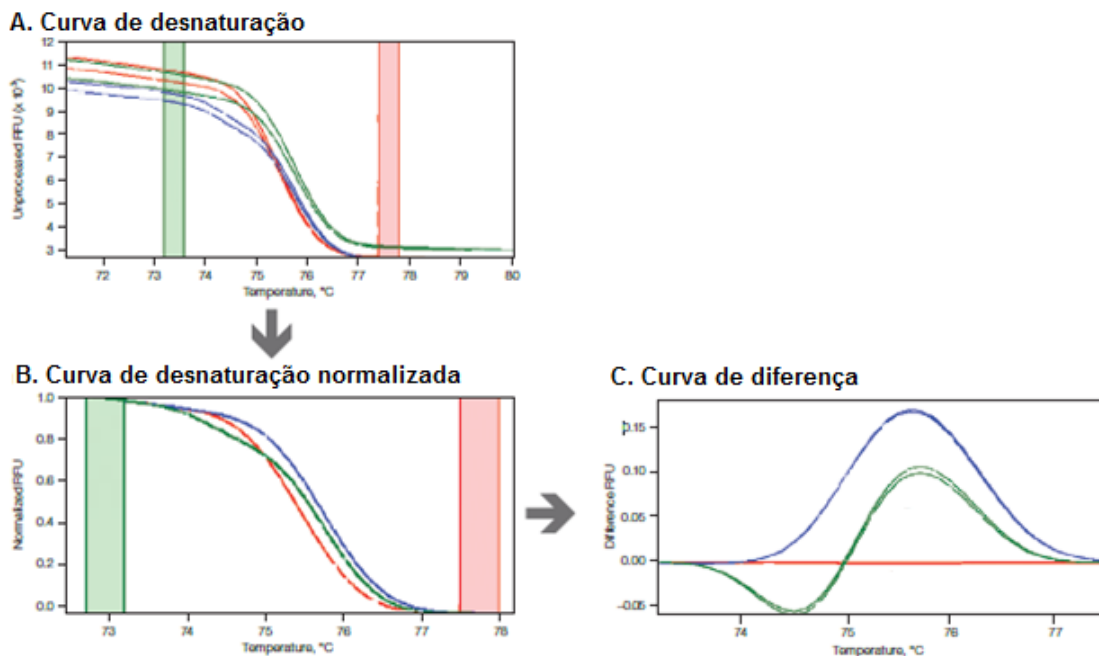


Figura 12 - Exemplo de uma análise de HRM. Adaptado de Taylor et al. (2010).



Figura 13 - Mecanismo de ação da sonda TaqMan. Adaptado de Navarro et al. (2015).

Para além deste tipo de sondas, existem ainda as sondas de hibridação (ex. sondas FRET – *Fluorescence Resonance Emission Transfer* – e Molecular Beacons) e as sondas-primer, que combinam um primer e a sonda na mesma molécula (ex. sondas Scorpions). Os mecanismos de ação destas sondas estão presentes na Figura 14.

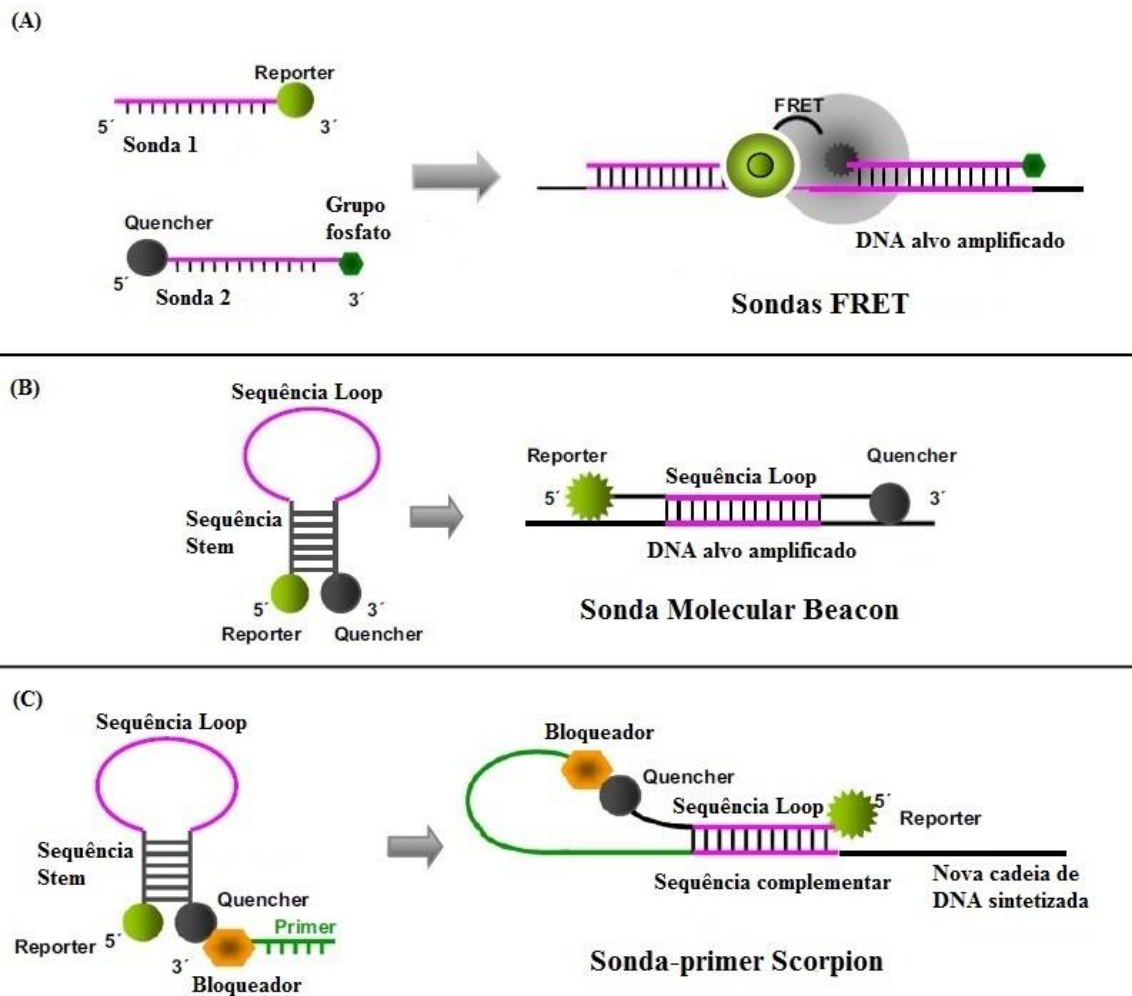


Figura 14 - Mecanismo de ação das diferentes sondas. (A) Sonda FRET: na etapa de hibridação, as sondas hibridam adjacente à sequência alvo, permitindo ao *quencher* emitir fluorescência, devido a ter sido excitado pela energia libertada pelo *reporter*. (B) Sonda Molecular Beacon: durante a hibridação, a sonda liga-se à sequência alvo ocorrendo a separação do *reporter* e do *quencher*, que conduz a emissão de fluorescência. (C) Sonda-*primer* Scorpion: na etapa de desnaturação, o *reporter* é separado do *quencher*, verificando-se a emissão de fluorescência. Adaptado de Navarro et al. (2015).

Como referido anteriormente, a emissão de fluorescência durante a PCR em tempo real é proporcional à síntese de DNA e pode ser monitorizada através da curva de amplificação, que tipicamente apresenta três fases diferentes: a fase inicial, a fase exponencial e a fase *plateau* (Figura 15). A fase inicial ocorre durante os primeiros ciclos da reação de amplificação, nos quais não é possível distinguir a fluorescência emitida da linha de base. A linha de base refere-se ao sinal de fluorescência durante os primeiros ciclos de PCR, normalmente entre 3^o e 15^o ciclos, nos quais existe pouca alteração do sinal de fluorescência, que pode ser equiparado ao ruído da reação (Life technologies, 2012; Rodriguez-Lazaro & Hernandez, 2013). Durante a fase exponencial, existe um aumento exponencial da fluorescência, sendo nesta fase possível realizar a quantificação do DNA

(Rodriguez-Lazaro & Hernandez, 2013). Na fase *plateau*, ocorre o esgotamento de um ou mais reagentes e diminuição da atividade enzimática, não se observando aumento da fluorescência (Rodriguez-Lazaro & Hernandez, 2013).

Na curva de amplificação, é definida uma linha designada por *threshold*, que permite distinguir o sinal de fluorescência correspondente à amplificação do sinal de ruído (Figura 15). Geralmente, o *software* do instrumento da qPCR define automaticamente a linha *threshold* em 10 vezes o desvio padrão do valor da fluorescência da linha de base. O ciclo no qual o sinal de fluorescência da reação cruza a linha *threshold* é designado por ciclo *threshold* (Ct). Portanto, o Ct é considerado o número de ciclos necessários para a existência de sinal de fluorescência estatisticamente acima do sinal de ruído e é utilizado para calcular a quantidade de DNA inicial, pois o seu valor está inversamente relacionado com a quantidade inicial do alvo (Life technologies, 2012).

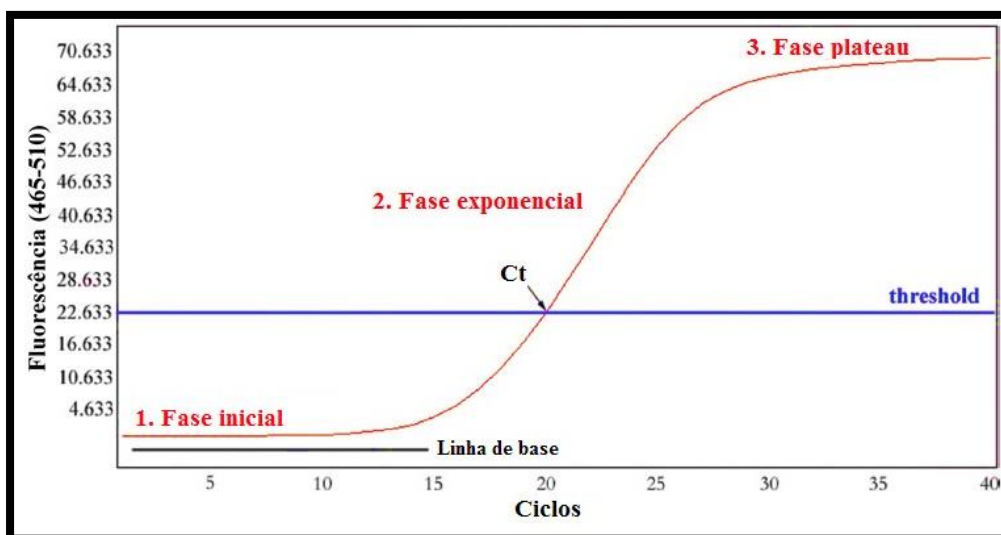


Figura 15 - Curva de amplificação obtida por PCR em tempo real e as suas diferentes fases. Adaptado de Rodriguez-Lazaro et al. (2013).

A quantificação do DNA pode ser realizada recorrendo a um método de quantificação absoluto ou relativo. A quantificação absoluta baseia-se na construção de uma curva padrão obtida através do uso de padrões com concentrações conhecidas diluídos de forma seriada. A curva padrão produz uma relação linear entre os Ct e o logaritmo das quantidades de DNA inicial, permitindo determinar a quantidade de DNA no início da reação por interpolação do seu valor de Ct. Na quantificação relativa, as alterações na expressão do gene de interesse na amostra são medidas com base num padrão externo ou numa amostra de referência, também conhecida por calibrador. Os resultados são expressos por uma razão alvo/referência (Wong & Medrano, 2005).

3.2.7 PCR-sequenciação

A PCR-sequenciação, também conhecida por PCR-FINS (*Forensically informative nucleotide sequencing*), é uma técnica que envolve a determinação da sequência nucleotídica de um fragmento de DNA específico, previamente amplificado por PCR (Iannone, 2014; Rasmussen & Morrissey, 2008).

A sequenciação dos fragmentos de DNA é geralmente realizada segundo o método de Sanger (Figura 16). De acordo com este método, a amostra de DNA é dividida em quatro reações de sequenciação separadas, cada uma contendo os quatro dNTP, a polimerase de DNA e os *primers*. Além destes componentes, em cada reação é também adicionado um didesoxirribonucleótido (ddNTP) diferente para cada reação e seguidamente inicia-se a replicação do DNA. Durante a extensão, os dNTP e os ddNTP ligam-se de forma complementar às bases nucleotídicas das cadeias simples de DNA, sob a ação da polimerase de DNA. Contudo, como os ddNTP não contêm o grupo 3'-OH, que é essencial à formação da ligação fosfodiéster entre dois nucleótidos, quando ocorre a ligação destes à cadeia de DNA a extensão termina. Terminada a replicação, os fragmentos de DNA são desnaturados e separados através de uma eletroforese em gel. Em seguida, a sequência de DNA pode ser determinada analisando o gel de eletroforese (Iannone, 2014).

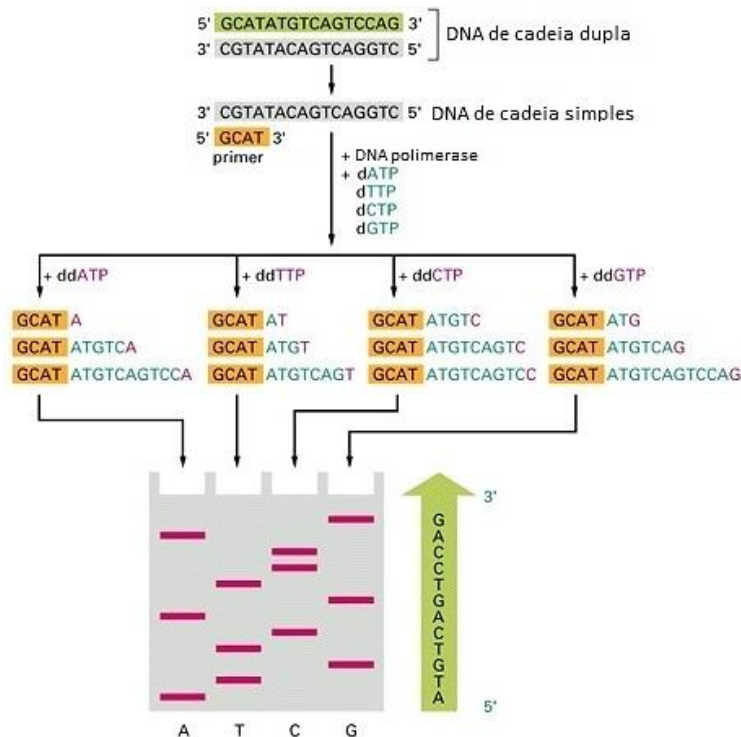


Figura 16 - Representação esquemática da sequenciação pelo Método de Sanger. Adaptado de Alberts et al. (1994).

A identificação de espécies tem sido realizada através da comparação da sequência obtida com outras relacionadas e presentes em base de dados (Rasmussen & Morrissey, 2008). Esta técnica apresenta como desvantagem o facto de não ser adequada para a análise de amostras que contêm várias espécies e por vezes ser inadequada para a identificação, especialmente quando está envolvido um grande número de amostras. Contudo, os avanços tecnológicos, como a automatização da técnica, permitiram o desenvolvimento de protocolos mais simples e fáceis, tornando esta técnica mais viável para a identificação de espécies (Rasmussen & Morrissey, 2008).

Nos últimos anos, tem havido um enorme progresso nas tecnologias de sequenciação de DNA. A nova geração de tecnologias de sequenciação (*Next Generation Sequencing* – NGS) tem revolucionado a análise do DNA, em termos de velocidade de leitura, juntamente com uma forte redução no custo por base. Em comparação com os métodos de sequenciação de primeira geração, tais como a sequenciação de Sanger, os novos métodos compartilham três grandes melhorias: (i) baseiam-se na preparação de bibliotecas de NGS num sistema isento de células, sem a necessidade de clonagem bacteriana de fragmentos de DNA; (ii) produzem milhares a vários milhões de reações de sequenciação em paralelo, em vez de centenas; (iii) a saída de sequenciação é detetada diretamente, sem a necessidade de uma análise pós-reação, tal como eletroforese, sendo a consulta de bases de nucleótidos realizada de forma cíclica e em paralelo (van Dijk et al., 2014).

3.2.8 DNA barcoding

Em 2003, um novo sistema de identificação de espécies foi desenvolvido no Canadá por investigadores da Universidade de Guelph, o *DNA barcoding*. Esta metodologia baseia-se na análise da variabilidade dentro de uma região específica do genoma, designada por *DNA barcode*. Esta metodologia não é totalmente inovadora, uma vez que recorre a técnicas já utilizadas na identificação de espécies, nomeadamente a PCR e a sequenciação, contudo apresenta a vantagem de combinar três inovações importantes: a molecularização dos processos de identificação, ou seja, a investigação da variabilidade do DNA para discriminar entre os taxa, a normalização do procedimento e a informatização (Galimberti et al., 2013).

As regiões de *DNA barcode* devem apresentar elevada variabilidade interespecífica e baixa variabilidade intraespecífica, de forma a assegurar a correta identificação de espécies, com base nas diferenças interespecíficas existentes nas sequências do *DNA barcode* (Galimberti et al., 2013; Hellberg & Morrissey, 2011).

Em 2003, o gene mitocondrial que codifica o citocromo c oxidase subunidade I (Couto et al.) foi proposto como *DNA barcode* para o reino animal. Os investigadores identificaram uma região composta por cerca de 650 nucleótidos próxima da extremidade 5' do gene COI que pode ser amplificada com *primers* universais e sequenciada para um vasto grupo de espécies animais. Além deste, outros genes mitocondriais têm sido sugeridos como marcadores *barcode*, nomeadamente, o gene *cytb*, o 16S rDNA, entre outros (Nicolè et al., 2012).

Com base nestes resultados promissores foi criada a base de dados BOLD (*Barcode of Life Database*), coordenada pelo *International Barcode of Life Project* (iBOL) que contém toda a coleção de *DNA barcodes*, com o objetivo de criar uma biblioteca de referência para todas as espécies vivas. Consequentemente, os *DNA barcodes* amplificados e sequenciados a partir de espécies desconhecidas podem ser comparados com os *DNA barcodes* presentes na BOLD, de forma a identificar a sua espécie (Hebert et al., 2003; Hellberg & Morrissey, 2011; Nicolè et al., 2012).

A abordagem *DNA barcoding* tem demonstrado ser promissora na identificação de espécies e na avaliação da autenticidade de crustáceos, existindo uma crescente aplicação desta técnica (Haye et al., 2012; Nagalakshmi et al., 2016; Vartak et al., 2015).

4 Estudos sobre a identificação de espécies de crustáceos

As vantagens associadas ao uso de métodos baseados na análise de DNA, como foi referido anteriormente, estão relacionadas com a sua simplicidade, especificidade e sensibilidade, sendo por isso largamente usados na identificação de espécies em alimentos, incluindo os crustáceos. Por este motivo, na presente secção serão apresentados alguns dos principais estudos publicados sobre a identificação de espécies de crustáceos com base na análise de marcadores de DNA (Tabela 2).

Dentro das técnicas utilizadas para a identificação de espécies de crustáceos, destaca-se a PCR-RFLP, como sendo utilizada com grande frequência neste tipo de estudos. Pascoal et al. (2008a) desenvolveram um método rápido e fácil de realizar baseado na PCR-RFLP para permitir a identificação de espécies de camarão e avaliar a incidência de rotulagem incorreta de camarões em alimentos comerciais sujeitos a diferentes tipos de processamento. Neste sentido, foi realizada uma amplificação por PCR com *primers* direcionados para uma região com 530 pb dos genes mitocondriais 16S rRNA e tRNA^{Val}, e posteriormente recorreu a uma análise de restrição com as endonucleases *AluI*, *TaqI* e *HinfI*. Este estudo permitiu a identificação de 17 espécies de camarão em 41

alimentos comerciais, verificando-se também que 10 (24,4%) dos 41 produtos testados apresentavam rotulagem incorreta e 16 (39%) exibiam rotulagem incompleta (Pascoal et al., 2008a). À semelhança do estudo anterior, os mesmos autores desenvolveram um outro método de PCR-RFLP para a identificação de seis espécies de camarão comercialmente relevantes (*Penaeus monodon*, *Litopenaeus vannamei*, *Farfantepenaeus notialis*, *Penaeus longirostris*, *Pleoticus muelleri* e *Fenneropenaeus merguensis*) em alimentos crus e processados (Pascoal et al., 2008b). Contudo, neste estudo foi amplificada uma região mais pequena com apenas 181 pb do gene mitocondrial do *cytb*, que mostrou ser um eficiente marcador molecular para espécies de camarão. Este método mostrou ser útil na análise de amostras contendo DNA fragmentado, como é o caso de alimentos processados congelados e pré-cozinhados (Pascoal et al., 2008b). Mais recentemente, outro estudo baseado na técnica PCR-RFLP permitiu diferenciar a espécie de camarão *Pandalus borealis*, pertencente à superfamília Pandalioidea, a partir de 30 crustáceos diferentes que incluíam 19 espécies de camarão comercialmente relevantes da mesma superfamília Penaeoidea e 11 outras espécies de crustáceos, incluindo camarões, lagostas e caranguejos (Pascoal et al., 2012). Para este efeito, foi realizada uma amplificação das regiões mitocondriais 16S rRNA/tRNAVal/12S rRNA, sendo os produtos resultantes digeridos com as enzimas de restrição AluI, TaqI e HinfI, o que permitiu obter padrões de restrição específicos para a espécie *Pandalus borealis* e assim diferenciá-la das restantes.

Apesar de não existirem muitos estudos que utilizem a técnica AFLP para a identificação de crustáceos, Wang et al. (2004) demonstrou a sua utilidade na identificação de 6 espécies de camarão do género *Penaeus* (*P. monodon*, *P. chinensis*, *P. merguensis*, *P. latisulcatus*, *P. canaliculatus* e *P. japonicus*). Neste estudo, os AFLP *fingerprinting* das diferentes espécies foram comparados utilizando três conjuntos de *primers* seletivos na amplificação por PCR (Wang et al., 2004).

A técnica RAPD tem sido descrita como outra ferramenta utilizada na identificação de espécies de crustáceos. Meruane et al. (1997) aplicaram esta técnica com sucesso na identificação de duas espécies de camarão (*Penaeus japonicus* e *Metapenaeus ensis*). Neste trabalho, foram testados 40 *primers*, dos quais dois permitiram a obtenção de bandas que demonstraram ser marcadores úteis para a identificação destas espécies. Mais recentemente, Guerra et al. (2010), através de RAPD, conseguiram diferenciar 2 espécies de camarão do género *Macrobrachium* (*M. jelskii* e *M. amazonicum*). Para isso, utilizaram 10 *primers* aleatórios diferentes para a amplificação do DNA, produzindo 182 fragmentos. Desses fragmentos, 3 demonstraram ser monomórficos e exclusivos para a espécie *M. amazonicum* ou para a espécie *M. jelskii*, podendo ser utilizados como marcadores moleculares específicos para identificar estas duas espécies.

Tabela 2 - Estudos sobre a identificação de espécies de crustáceos baseados na análise de DNA.

Método	Espécies	Gene alvo	Referência
PCR-RFLP	17 espécies de camarão <i>Penaeus</i>	16S rRNA/tRNA ^{val}	Pascoal et al. (2008a)
	<i>Penaeus monodon</i> , <i>Litopenaeus vannamei</i> , <i>Farfantepenaeus notialis</i> , <i>Penaeus longirostris</i> , <i>Pleoticus muelleri</i> e <i>Fenneropenaeus merguensis</i>	<i>cytb</i>	Pascoal et al. (2008b)
	<i>Pandalus borealis</i>	16S rRNA/tRNA ^{val} / 12S rRNA	Pascoal et al. (2012)
RAPD	<i>Penaeus japonicus</i> e <i>Metapenaeus ensis</i>	-	Meruane et al. (1997)
	<i>Macrobrachium jelskii</i> e <i>Macrobrachium amazonicum</i>	-	Guerra et al. (2010)
AFLP	<i>Penaeus monodon</i> , <i>Penaeus chinensis</i> , <i>Penaeus merguensis</i> , <i>Penaeus latisulcatus</i> , <i>Penaeus canaliculatus</i> e <i>Penaeus japonicus</i>	-	Wang et al. (2004)
PCR-SSCP	<i>Penaeus monodon</i> , <i>Penaeus semisulcatus</i> , <i>Fenneropenaeus merguensis</i> , <i>Litopenaeus vannamei</i> e <i>Marsupenaeus japonicus</i>	16S rRNA	Khamnamtong et al. (2005)
PCR-sequenciação	<i>Penaeus merguensis</i> , <i>Penaeus indicus</i> e <i>Penaeus silasi</i>	COI	Hualkasin et al. (2003)
	<i>Litopenaeus vannamei</i> , <i>Penaeus monodon</i> e <i>Fenneropenaeus indicus</i>	16S rRNA/ tRNA ^{Val}	Pascoal et al. (2011)
DNA barcoding	<i>Metacarcinus edwardsii</i> , <i>Romaleon polyodon</i> , <i>Cancer porteri</i> , <i>Cancer plebejus</i> e <i>Homalapsis plana</i>	COI	Haye et al. (2012)
	11 espécies de caranguejo		Vartak et al. (2015)
PCR em tempo real	<i>Penaeus monodon</i> , <i>Litopenaeus vannamei</i> , <i>Fenneropenaeus chinensis</i> , <i>Farfantepenaeus californiensis</i> , <i>Litopenaeus stylirotris</i> , <i>Marsupenaeus japonicus</i> e <i>Callinectes sapidus</i> .	12S rRNA/ 16S rRNA <i>cytb</i> /COI	Eischeid et al. (2013)
	<i>Panulirus japonicus</i> , <i>Panulirus versicolor</i> , <i>Panulirus ornatos</i> , <i>Panulirus homarus</i> , <i>Panulirus stimpsoni</i> e <i>Homarus americanus</i>	12S rRNA	Eischeid (2016)

Khamnamtong et al. (2005) através da amplificação por PCR de uma região do gene mitocondrial 16S rRNA e posterior análise de SSCP conseguiram diferenciar 5 espécies de camarão (*Penaeus monodon*, *P. semisulcatus*, *Fenneropenaeus merguensis*, *Litopenaeus vannamei* e *Marsupenaeus japonicus*) (Khamnamtong et al., 2005).

Hualkasin et al. (2003), recorrendo a PCR-sequenciação, conseguiram diferenciar a espécie de camarão *Penaeus merguensis* de outras duas morfologicamente semelhantes (*Penaeus indicus* e *Penaeus silasi*), através da sequenciação do gene mitocondrial COI, previamente amplificado por PCR (Hualkasin et al., 2003). Pascoal et al. (2011) conseguiram desenvolver uma metodologia que permitiu a identificação de três espécies

de camarão comercialmente relevantes (*Litopenaeus vannamei*, *Penaeus monodon* e *Fenneropenaeus indicus*) através da PCR-sequenciação. Para isso, realizaram a sequenciação preliminar de um fragmento com 530 pb da região mitocondrial 16S rRNA/tRNAVal previamente amplificado por PCR. A análise das sequências obtidas permitiu o desenho de *primers* específicos, permitindo assim o desenvolvimento da PCR específica para estas espécies (Pascoal et al., 2011).

O sistema de *DNA barcoding*, apesar de ser uma metodologia mais recente, tem vindo a ser muito utilizado em estudos de identificação e avaliação da autenticidade de espécies de crustáceos. Haye et al. (2012) conseguiram determinar as espécies de caranguejo que estavam presentes em 7 tipos de amostras comerciais através da *DNA barcoding*, recorrendo a uma região do gene mitocondrial COI e a uma análise filogenética. Este método permitiu verificar a existência de rotulagem incorreta numa das amostras (Haye et al., 2012). Vartak et al. (2015) identificaram 11 espécies de caranguejos edíveis através de *DNA barcodes* do gene mitocondrial COI. Os *barcodes* desenvolvidos foram utilizados como marcadores de referência para detetar possíveis rotulagens inadequadas em 50 amostras de caranguejo presentes em restaurantes. Este estudo demonstrou que todas as amostras se encontravam mal rotuladas para encobrir adulterações por substituição de espécies de caranguejo de valor inferior (Vartak et al., 2015).

No caso dos crustáceos, a técnica de PCR em tempo real tem sido utilizada no desenvolvimento de métodos que permitem a deteção específica de pequenas quantidades de crustáceos em matrizes alimentares complexas, permitindo assim a deteção indireta de alergénios. Eischeid et al. (2013) desenvolveram ensaios de PCR em tempo real que permitiram detetar seis espécies de camarões da família Penaeidae (*Penaeus monodon*, *Litopenaeus vannamei*, *Fenneropenaeus chinensis*, *Farfantepenaeus californiensis*, *L. stylirotris* e *Marsupenaeus japonicus*) e um caranguejo da espécie *Callinectes sapidus*. Neste estudo, foram desenhados *primers* e sondas direcionados para os genes 12S e 16S rRNA dos camarões e no caso da espécie de caranguejo com alvo nos genes mitocondriais *cytb* e COI. O método foi testado utilizando carne de camarão e caranguejo adicionada, com níveis entre os 0,1 e os 10⁶ mg/kg, em diferentes tipos de alimentos. Os dados da PCR em tempo real foram utilizados para obter curvas padrão lineares e os ensaios foram avaliados em relação à gama linear e à eficiência da reação. Os resultados indicaram que os ensaios apresentavam boa performance numa variedade de alimentos, obtendo eficiências de reação elevadas (96,8-104,5%) e limites de deteção entre 0,1-1 mg/kg (Eischeid et al., 2013). Mais recentemente, Eischeid (2016) desenvolveu outro ensaio que permitiu a deteção específica de lagostas (*Panulirus japonicus*, *P. versicolor*, *P. ornatos*, *P. homarus*, *P. stimpsoni* e *Homarus americanus*). Para isso, desenharam uma sonda e 5 *primers* específicos com alvo no gene 12S rRNA das espécies

de lagostas, de forma a evitar a amplificação de outras espécies de crustáceos. Para a preparação de misturas de referência, diferentes níveis de carne de lagosta entre $0,1-10^5$ mg/kg foram adicionados a diversas matrizes alimentares. Além dos ensaios serem aplicados em diferentes matrizes de alimentos, a performance do método foi determinada utilizando condições desafiadoras em análises de PCR, nomeadamente matrizes alimentares com baixa quantidade de DNA e com diferentes níveis de pH ácido, bem como alimentos tratados com elevadas temperatura e pressão combinada. A partir dos dados obtidos, foram geradas curvas padrão que permitiram concluir que este ensaio apresentou um limite de deteção entre 0,1-1 mg/kg e eficiências da reação de $100\pm 10\%$. No caso particular das amostras sujeitas a tratamento térmico e pH ácido, verificou-se um grande atraso ou perda completa dos sinais de amplificação (Eischeid, 2016).

5 Objetivos e âmbito do trabalho

Os crustáceos edíveis, particularmente os camarões da família Penaeidae, devido à sua elevada importância comercial e à difícil identificação morfológica de espécies, tornam-se frequentes alvos de adulteração. A adulteração de espécies de crustáceos constitui muitas vezes uma fraude comercial, uma vez que geralmente é efetuada intencionalmente com a finalidade de o produtor obter um maior ganho económico. Contudo, envolve também questões de saúde pública por estes alimentos serem potencialmente alergénicos e a presença não declarada nos rótulos pode levar o consumidor sensibilizado à ingestão de produtos que podem por em risco a sua saúde. A prática corrente de adulterações levou à criação de legislação específica na UE que proíbe a substituição não declarada de espécies e que determina que a rotulagem de crustáceos deve indicar o nome científico da espécie comercializada. De forma a proteger o consumidor e averiguar o cumprimento da legislação, torna-se fundamental o desenvolvimento de métodos que permitam a identificação de espécies de crustáceos e a deteção de adulterações, promovendo a autenticidade dos produtos.

Assim, o principal objetivo deste trabalho focou-se no desenvolvimento de um método molecular para a diferenciação de 5 espécies de camarão da família Penaeidae (*Penaeus monodon*, *Fenneropenaeus indicus*, *Metapenaeus affinis*, *Litopenaeus vannamei* e *Melicertus kerathurus*), recorrendo às técnicas de PCR qualitativa e PCR em tempo real acoplada a análise de HRM com alvo em *DNA barcode*, nomeadamente no gene mitocondrial COI. Pretendeu-se também estudar a influência do uso de RNase na extração e amplificação do DNA dos espécimes de camarão selecionados. Por fim, pretendeu-se demonstrar a aplicabilidade do método desenvolvido na identificação de espécies de camarão em alimentos comerciais processados.

Componente experimental

6 Metodologia

6.1 Descrição e preparação das amostras

Para a realização deste estudo foram adquiridas 5 espécies de camarão da família Penaeidae em Novembro de 2015. Na tabela 3 estão descritas as espécies de camarão utilizadas no presente trabalho e outras informações disponíveis no rótulo. Estas amostras foram utilizadas como amostras de referência para a identificação de espécies de camarão em amostras comerciais.

Tabela 3 – Descrição das diferentes espécies de camarão da família Penaeidae utilizadas neste trabalho.

Código	Espécie	Nome comum	Outras informações
C1	<i>Penaeus monodon</i>	Camarão tigre gigante	Camarão inteiro congelado
C2	<i>Fenneropenaeus indicus</i>	Camarão branco da Índia	Camarão selvagem inteiro congelado
C3	<i>Metapenaeus affinis</i>	Camarão jinga	Miolo ultracongelado, capturado no Oceano Pacífico por redes de pesca
C4	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Camarão de patas brancas	Camarão inteiro congelado
C5	<i>Melicertus kerathurus</i>	Camarão caramote	Camarão inteiro ultracongelado, capturado no mar por redes de arrasto no Oceano Atlântico Centro Este



Figura 17 - Diferentes espécies de camarão da família Penaeidae utilizadas neste trabalho. A a E - *Penaeus monodon*, *Fenneropenaeus indicus*, *Metapenaeus affinis*, *Litopenaeus vannamei* e *Melicertus kerathurus*, respetivamente.

Para este estudo, foram também adquiridas 25 amostras comerciais em Janeiro de 2016 (Figura 18). Na tabela 4 encontram-se descritas as amostras comerciais utilizadas e a respetiva informação relevante presente no rótulo.

Tabela 4 - Descrição das amostras comerciais utilizadas neste trabalho e as respetivas informações relevantes presentes no rótulo.

Nº da amostra	Código	Nome da Amostra	Informação relevante
1	AC1	Patanisca de bacalhau	Pode conter vestígios de crustáceos.
2	AC2a	Rissol de Camarão (inteiro)	Massa e cobertura (62%): não contém camarão. Recheio (38%): camarão em pó.
	AC2b	Rissol de Camarão (recheio)	
3	AC3a	Risotto do Mar (só camarão)	Contém moluscos, peixe, peixe em pó, camarão em pó e gambas.
	AC3b	Risotto do Mar (Todo)	
4	AC4a	Paella (só camarão)	Contém mexilhão, gambas e lulas.
	AC4b	Paella (Todo)	
5	AC5a	Açorda de Marisco (inteira)	Contém miolo de camarão, mexilhão, berbigão, condimento à base de camarão.
	AC5b	Açorda de Marisco (só camarão)	
6	AC6a	Rissóis de camarão e pescada (recheio)	Contém camarão, pescada e condimento à base de camarão.
	AC6b	Rissóis de camarão e pescada (inteiros)	
7	AC7a	Preparado para arroz de marisco (só camarão <i>L. vannamei</i>)	O rótulo indicava que o camarão inteiro correspondia a camarão da espécie <i>Litopenaeus vannamei</i> e o miolo de camarão à espécie <i>Penaeus indicus</i> .
	AC7b	Preparado para arroz de marisco (só camarão <i>P. indicus</i>)	
	AC7c	Preparado para arroz de marisco (só delícias do mar)	
8	AC8a	Eurogamba (só camarão)	Contém 40% de camarão e pode conter vestígios de peixe, moluscos, ovo, leite, aipo, soja e mostarda.
	AC8b	Eurogamba (inteira)	
9	AC9a	Petisco do mar (recheio)	Contém paloco-do-pacífico e crustáceos.
	AC9b	Petisco do mar (inteiro)	
10	AC10	Crema de marisco	Contém camarão (6%), peixe (4,1%), extrato de lagosta (0,7%) e pode conter moluscos.
11	AC11	Crema de marisco receita económica	Contém camarão (6%), peixe (4,1%), extrato de lagosta (0,7%) e pode conter moluscos
12	AC12	Sopa do mar	Contém camarão (0,3%), peixe (5,2%), e pode conter moluscos.
13	AC13	Noddles com sabor a camarão	Contém sabor a camarão.
14	AC14	Caldo de marisco	Contém camarão (2,4%), peixe (5,2%), e pode conter moluscos.
15	AC15a	Rissóis de camarão (recheio)	Contém camarão e pó de camarão.
	AC15b	Rissóis de camarão (inteiro)	
16	AC16a	Feijoada de camarão (só camarão)	Contém camarão, extrato de lagosta, delícias do mar e crema de marisco.
	AC16b	Feijoada de camarão (Todo)	
17	AC17a	Açorda de Gambas (só camarão)	Contém água de camarão [água, camarão (13%) e azeite] e miolo de gambas.
	AC17b	Açorda de Gambas (Todo)	
18	AC18	Pastéis de bacalhau	Pode conter crustáceos.
19	AC19a	Açorda de Camarão (só camarão)	Contém 20% de camarão.
	AC19b	Açorda de Camarão (Todo)	
20	AC20	Bacalhau à Brás Monissa (Todo)	Pode conter crustáceos.
21	AC21	Bacalhau com Natas Gratinado (Todo)	Pode conter crustáceos.
22	AC22a	Rissóis de Camarão (recheio)	Contém camarão e camarão em pó.
	AC22b	Rissóis de Camarão (Todo)	
23	AC23a	Rissóis Camarão Forno (recheio)	Contém camarão, peixe e delícias do mar.
	AC23b	Rissóis Camarão Forno (Todo)	
24	AC24	Pizza Ristorante mare (só camarão)	O rótulo não especifica a espécie.
25	AC25a	Mini Rissóis Camarão (interior)	Contém camarão e camarão em pó.
	AC25b	Mini Rissóis Camarão (interior)	



Figura 18 - Algumas amostras comerciais utilizadas neste trabalho.

As amostras comerciais, bem como as amostras de camarão, foram trituradas recorrendo a um moinho de laboratório (Grindomix GM200, Retsch, Alemanha). De realçar que às amostras comerciais que apresentavam camarões visíveis ou recheio de camarão, foi realizada uma trituração com uma porção do camarão visível ou do recheio e outra trituração da amostra inteira, realizando posteriormente extrações independentes para averiguar se a técnica que se pretendeu desenvolver para a identificação de espécies de camarão era influenciada pela matriz na qual os camarões se encontravam. De forma a evitar possíveis contaminações, todo o material utilizado na trituração de amostras foi previamente descontaminado recorrendo a uma solução de hipoclorito de sódio e detergente. Todas as amostras foram armazenadas a uma temperatura de -20°C em recipientes esterilizados e devidamente rotulados.

6.2 Reagentes e soluções

1. Solução de RNase (2 mg/mL)

Pesaram-se 20 mg de RNase A (AppliChem GmbH, Darmstadt, Alemanha) e adicionaram-se 1 mL de água ultrapura. Posteriormente, realizou-se uma diluição de 1/10, de forma a obter uma solução de RNase com concentração de 2 mg/mL.

2. Tampão SGTB 1x

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

3. Solução de dNTP

Adicionaram-se 50 μL de cada dNTP a 1800 μL de água ultrapura. Posteriormente, armazenou-se a solução à temperatura de -20°C .

4. Tampão de carregamento 6x

Dissolveram-se 4 g de sacarose e 5 mg de azul de bromofenol em 5 mL de água desionizada. Adicionaram-se 2,4 mL de EDTA (0,5 M) e fez-se o volume até aos 10 mL com água desionizada. A solução foi autoclavada e armazenada a -20°C.

6.3 Extração de DNA

A extração de DNA das amostras utilizadas neste estudo foi realizada recorrendo ao kit comercial NucleoSpin® Food (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha). Pesaram-se 200 mg de cada amostra para tubos estéreis de 2 mL, aos quais se adicionaram 550 µL do tampão de lise CF, previamente aquecido a 65°C, e 10 µL de proteinase K para promover a lise das células. Os tubos foram incubados a 65°C durante 60 min num termobloco (Eppendorf Thermomixer Comfort, Hamburg, Alemanha) a 900 rpm, realizando a cada 15 min uma agitação vigorosa em vortex. Após a incubação, adicionaram-se 2 µL de RNase (2 mg/mL), misturou-se por inversão e incubou-se no termobloco a 37°C durante 5 min. A adição de RNase é uma etapa opcional, pelo que neste trabalho efetuou-se a extração das espécies de camarão de referência com e sem RNase de forma a avaliar a sua influência na qualidade dos extratos e amplificação do DNA. No caso das amostras comerciais, os extratos foram obtidos com utilização de RNase. Posteriormente, efetuou-se uma centrifugação a 17000xg durante 10 min a 4°C e recolheu-se o sobrenadante para tubos estéreis de 1,5 mL. Ao sobrenadante, adicionou-se um volume idêntico do tampão C4 e de etanol absoluto, para ajustar as condições de ligação do DNA à coluna, e misturou-se por inversão. Montou-se a coluna no tubo de recolha, pipetaram-se no máximo 700 µL de cada amostra e centrifugou-se durante 1 min a 11000xg. O líquido eluído foi rejeitado e repetiu-se este procedimento com a restante amostra. Para lavagem da coluna, adicionaram-se 400 µL do tampão CQW, centrifugou-se durante 1 min a 11000xg e rejeitou-se o líquido eluído. Adicionaram-se 700 µL do tampão C5 à coluna, realizou-se uma nova centrifugação durante 1 min a 11000xg e rejeitou-se o líquido eluído. Para finalizar a lavagem, adicionaram-se 200 µL do tampão C5 e centrifugou-se mais uma vez a 11000xg durante 2 min para remover completamente o tampão. A coluna foi colocada num novo tubo estéril de 1,5 mL e adicionaram-se 100 µL do tampão de eluição CE, pré-aquecido a 70°C. Após 5 min de incubação à temperatura ambiente, centrifugou-se 1 min a 11000xg de modo a eluir o DNA, obtendo-se desta forma os extratos de DNA. Os extratos foram armazenados a -20°C. Em cada extração realizada, foi efetuado um branco para detetar possíveis contaminações durante o processo de extração.

6.4 Avaliação do DNA extraído

A avaliação do DNA extraído foi realizada com base na determinação da sua concentração, pureza e integridade. A concentração e pureza do DNA extraído foi determinada por espectrofotometria UV recorrendo a um leitor de Microplacas Multidetecção Synergy™ HT (Biotek Instruments, Winooski, EUA) e ao *software* de análise de dados Gen 5 a partir da leitura das absorvências (A) a 260 nm e a 280 nm. A leitura das absorvências é realizada nestes comprimentos de onda, pois as moléculas de DNA e as proteínas apresentam absorvências máximas a 260 nm e 280 nm, respetivamente. Uma vez que as moléculas de DNA e as proteínas também absorvem parcialmente a 280 nm e a 260 nm, respetivamente, a razão entre as leituras nestes comprimentos de onda (A_{260}/A_{280}) fornece uma estimativa da pureza do DNA. Os extratos de DNA são considerados de elevada pureza quando o valor desta razão é aproximadamente 1,8 (Somma, 2006). A concentração do DNA dos extratos foi determinada pelo *software* e posteriormente procedeu-se à diluição dos extratos para uma concentração de 50 ng/μL.

A integridade do DNA extraído foi avaliada recorrendo a uma eletroforese de DNA 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, EUA) durante 25 min a 200 V. Em cada poço do gel de eletroforese, adicionaram-se 4 μL de tampão de carregamento 6x com 5 μL de cada extrato, previamente misturados. Em cada gel de eletroforese, foi também adicionado num dos poços 4 μL de marcador de massa molecular HiperLadder I (Biolone, Londres, Reino Unido). Após a eletroforese, o gel foi observado num transiluminador de luz UV e a imagem digital foi obtida por um sistema fotográfico Gel Doc™ EZ Imager (Bio-Rad, CA, EUA).

6.5 Amplificação por PCR

6.5.1 *Primers*

Os *primers* utilizados neste trabalho foram desenhados após o alinhamento de sequências nucleotídicas da região COI das espécies de camarão, presentes na base de dados GenBank. As sequências foram alinhadas recorrendo ao *software* BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) e as regiões com poucas diferenças nucleotídicas foram utilizadas para o desenho dos *primers* (Figura 19, Tabela 5).

Tabela 5 - Primers utilizados na PCR qualitativa.

Espécie	Primers	Sequência (5' → 3')	Ampliação (pb)	Gene Alvo	Referência
Camarão (<i>L. vannamei</i>)	CRUST1-F	GCTTGAGCTGGAATAGTAGG	175	COI	KJ679916.1*
	CRUST1-R	GTCAATTACCAAATCCTCCA			
	CRUST2-F	ACAGGAATAACTATAGACCG	106	COI	KJ679916.1*
	CRUST2-R	GTATAGTAATAGCTCCTGCTAC			
	CRUST1-F	GCTTGAGCTGGAATAGTAGG	556	COI	KJ679916.1*
	CRUST2-R	GTATAGTAATAGCTCCTGCTAC			
	CRUST3-F	TGGAGGATTTGGTAATTGAC	316	COI	KJ679916.1*
	CRUST3-R	CGGTCTATAGTTATTCCTGT			
Eucariotas	EG-F	TCGATGGTAGGATAGTGGCCTACT	109	18S rRNA	Villa et al. (2016)
	EG-R	TGCTGCCTTCCTGGATGTGGTA			
	18SRG-F	CTGCCCTATCAACTTTCGATGGTA	113	18S rRNA	Costa et al. (2013)
	18SRG-R	TTGGATGTGGTAGCCGTTCTCA			

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

O *software* Oligo Calc (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>) também foi utilizado para verificar as propriedades dos *primers* e a ausência de *hairpins* e de auto-hibridação. De seguida, a especificidade dos *primers* foi estudada recorrendo à ferramenta *Primer-Blast* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) que possibilita a identificação de possíveis homologias de um par de *primers* em relação a todas as sequências nucleotídicas existentes na base de dados do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) e também realizando um estudo de reatividade cruzada recorrendo à PCR qualitativa com extratos de DNA de amostras de plantas, carne e peixe, bem como de crustáceos e moluscos. A síntese dos *primers* foi realizada pela STABVIDA (Lisboa, Portugal).

6.5.2 PCR qualitativa

De forma a realizar a amplificação por PCR qualitativa preparou-se uma reação com os seguintes componentes: água ultrapura (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), tampão (67 mM Tris-HCl, pH 8.8, 160 mM (NH₄)₂SO₄, 0,1% Tween 20), MgCl₂, dNTP (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha), enzima SuperHot Taq Polymerase™ (Genaxxon Bioscience GmbH, Alemanha), *primers* (Tabela 5) e extrato de DNA, sendo o volume final de 25 µL. As quantidades adicionadas de cada componente encontram-se descritas na Tabela 6. As reações de amplificação foram efetuadas num termociclador MJ Mini™ Gradient Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, EUA) com condições de tempo e temperatura diferentes para cada *primer* que são descritas na Tabela 7.

Tabela 6 - Componentes e respectivas quantidades em μL utilizadas na PCR qualitativa para os diferentes *primers*.

<i>Primers</i> Componente	CRUST1-F/ CRUST1-R	CRUST2-F/ CRUST2-R	CRUST1-F/ CRUST2-R	CRUST3-F/ CRUST3-R	EG-F/ EG-R	18SRG-F/ 18SRG-R
Água ultrapura	15,2	14,4	14,9	14,9	13,9	15,6
Tampão (10x)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
MgCl ₂ (25 mM)	1,5	2,5	2	2	3	1,5
dNTP (200 μM de cada)	2	2	2	2	2	2
Primer Forward (10 pmol/ μL)	0,8	0,7	0,7	0,7	0,7	0,6
Primer Reverse (10 pmol/ μL)	0,8	0,7	0,7	0,7	0,7	0,6
Taq polimerase (5 U/ μL)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Extrato de DNA	2	2	2	2	2	2
Volume final	25	25	25	25	25	25

Tabela 7 - Condições utilizadas na amplificação por PCR qualitativa para os diferentes *primers*.

<i>Primers</i>	CRUST1-F/ CRUST1-R		CRUST2-F/ CRUST2-R		CRUST1-F/ CRUST2-R		CRUST3-F/ CRUST3-R		EG-F/ EG-R		18SRG-F/ 18SRG-R	
Etapas	Temperatura (°C)	Duração	Temperatura (°C)	Duração	Temperatura (°C)	Duração	Temperatura (°C)	Duração	Temperatura (°C)	Duração	Temperatura (°C)	Duração
Desnaturação	95	5 min	95	5 min	95	5 min	95	5 min	95	5 min	95	5 min
Amplificação	95	30 s	95	30 s	95	45 s	95	30 s	95	30 s	95	30 s
	55	30 s	55	30 s	55	45 s	55	45 s	63	30 s	65	30 s
	72	45 s	72	30 s	72	75 s	72	60 s	72	30 s	72	30 s
Nº Ciclos	40		40		40		40		35		35	
Extensão	72	5 min	72	5 min	72	5 min	72	5 min	72	5 min	72	5 min

Em cada ensaio preparado um controlo negativo (CN) no qual foi substituído o extrato de DNA por água ultrapura. Os produtos da PCR foram visualizados após eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão SGTB 1x e corado com Gel Red 1x (Biotium, Hayward, CA, EUA) durante 25 min a 200 V. Em cada poço do gel de eletroforese, adicionaram-se 4 μL de tampão de carregamento 6x com 20 μL de produto da PCR, previamente misturados. Em cada gel de eletroforese, foi também adicionado num dos poços 2 μL de marcador molecular 100 bp (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha) com 4 μL de tampão de carregamento 6x. Após a eletroforese, as bandas obtidas foram visualizadas num transiluminador de luz UV e a imagem digital foi obtida por um sistema fotográfico Gel Doc™ EZ Imager (Bio-Rad, CA, EUA).

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

Para realizar a diferenciação de espécies de camarão, procedeu-se à realização de uma PCR em tempo real acoplada a uma análise de HRM. Os *primers* escolhidos para realizar esta técnica foram o par CRUST2-F/CRUST2-R.

As amplificações por PCR em tempo real foram realizadas numa mistura reacional com volume final de 20 µL. Essa mistura continha 6,8 µL de água ultrapura, 10 µL de SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad Laboratories, EUA), 0,6 µL de cada *primer* e 2 µL de extrato de ADN (10 ng/µL). Todas as amostras foram amplificadas em triplicado e cada ensaio foi realizado em duplicado. Em cada um dos ensaios incluiu-se um controlo negativo para poder identificar a existência de possíveis contaminações.

Tabela 8 – Condições testadas para a otimização da PCR em tempo real e na análise de HRM.

Programa	PCR em tempo real				Análise de HRM	
	Etapas	Temperatura	Duração	Nº de ciclos	Temperatura	Duração
1	Ativação/desnaturação	95°C	5 min	1	95°C	1 min
	Desnaturação	95°C	15 s	45	65°C	3 min
	Hibridação/Extensão	60°C	45 s		65°C a 95°C	0,2°C/10 s
2	Ativação/desnaturação	95°C	5 min	1	95°C	1 min
	Desnaturação	95°C	10 s	45	60°C	3 min
	Hibridação	55°C	15 s		60°C a 90°C	0,2°C/10 s
	Extensão	72°C	20 s			

Finalizadas as amplificações, procedeu-se a análise de HRM, na qual se favoreceu a hibridação das cadeias duplas de DNA seguida da criação de uma curva de desnaturação por aplicação de incrementos de 0,2°C a cada 10 segundos, até se atingirem os 90 ou 95°C. As condições de tempo e temperatura testadas na PCR em tempo real e na análise por HRM estão descritas na tabela 8.

6.5.4 PCR sequenciação

De forma, a certificar que as espécies das amostras de camarão da família Penaeidae utilizadas como referência estavam corretamente identificadas/rotuladas e para complementar os resultados obtidos através da PCR em tempo real acoplada à análise de HRM, realizou-se a sequenciação das amostras de camarão e de uma amostra comercial. Para garantir uma maior fiabilidade dos resultados da sequenciação da região COI para cada amostra de camarão realizaram-se duas réplicas, uma no sentido *forward*

e outra no sentido *reverse*.

Os produtos de PCR a sequenciar foram amplificados recorrendo aos *primers* CRUST1-F/CRUST2-R ou CRUST3-F/CRUST3-R sob as condições presentes nas tabelas 6 e 7. Posteriormente, foi efetuada a purificação dos produtos de PCR através do Kit GRS – PCR & Gel Band Purification (Grisp[®], Porto, Portugal). Após a purificação, a sequenciação foi realizada pela empresa GATC Biotech (Constance, Alemanha). Os resultados obtidos a partir da sequenciação foram analisados e editados manualmente recorrendo aos *softwares* BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) e FinchTV (<http://www.geospiza.com/Products/finchtv.shtml>).

7 Resultados e Discussão

7.1 Avaliação da qualidade do DNA extraído

Neste trabalho o DNA das amostras de camarão, bem como das amostras comerciais foi extraído recorrendo ao Kit NucleoSpin Food. Primeiramente, procedeu-se à avaliação da influência da RNase na extração de DNA das amostras de camarão. Para isso utilizaram-se dois protocolos de extração do mesmo método, um com o passo de digestão na presença de RNase e o outro sem este passo. Os resultados da avaliação da concentração e pureza dos extratos das 5 espécies de camarão com os dois protocolos de extração apresentam-se na Tabela 9. Pode-se constatar que na extração utilizando RNase se obtiveram extratos de DNA com concentrações em geral um pouco mais baixas, porém apresentaram valores de purezas mais próximos do valor ótimo (1,8) do que na extração sem RNase. Os valores de pureza dos extratos obtidos sem recorrer à RNase variaram entre os 1,96 e os 2,19, o que poderá estar relacionado com a presença de RNA nos extratos.

Tabela 9 - Concentrações e purezas do DNA extraído das amostras de camarão pelo método Nucleospin Food com e sem RNase.

Amostra	Nucleospin Food com RNase		Nucleospin Food sem RNase	
	Concentração (ng/μL)	Pureza (A260/A280)	Concentração (ng/μL)	Pureza (A260/A280)
C1	36,0	1,99	53,8	2,13
C2	27,4	1,88	42,2	2,14
C3	49,4	1,95	33,6	1,96
C4	66,9	1,87	41,2	2,08
C5	11,2	1,88	25,5	2,19

A integridade do DNA genómico dos extratos obtidos a partir das amostras de camarão foi avaliada através de uma eletroforese em gel de agarose. Na Figura 20 pode-se visualizar que, tanto os extratos com e sem RNase apresentaram arrastamento sem bandas, à exceção da amostra C4 (*L. vannamei*) extraída sem RNase (Figura 20B, Linha 4) que apesar de apresentar arrastamento apresenta uma banda ténue de elevada massa molecular (>10000 pb). Estes arrastamentos sugerem a presença de DNA degradado e a existência de RNA nos extratos.

De acordo com os resultados da extração das amostras de camarão, procedeu-se à extração das amostras comerciais recorrendo também ao Kit NucleoSpin Food com utilização de RNase.

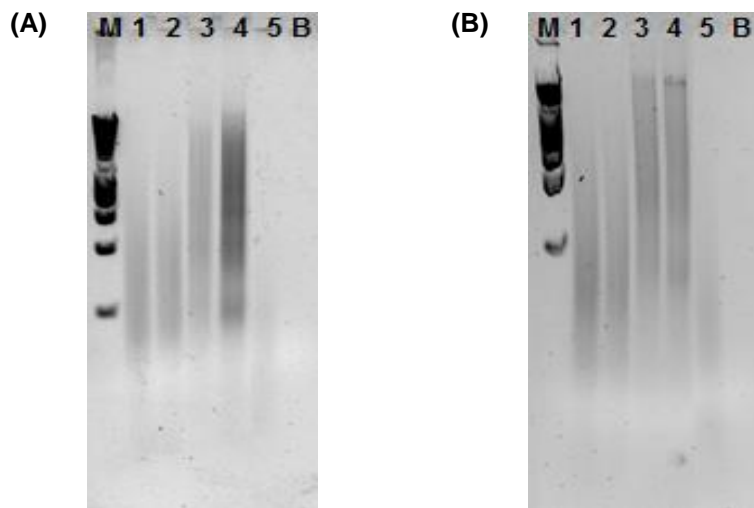


Figura 20 - Eletroforese em gel de agarose de DNA genómico das amostras de camarão pelo método Nucleospin Food com RNase (A) e sem RNase (B). Linha 1 - *Penaeus monodon* (C1); Linha 2 - *Fenneropenaeus indicus* (C2); Linha 3 - *Metapenaeus affinis* (C3); Linha 4 - *Litopenaeus vannamei* (C4); Linha 5 - *Melicertus kerathurus* (C5). M - Marcador molecular HyperLadder I. B - Branco.

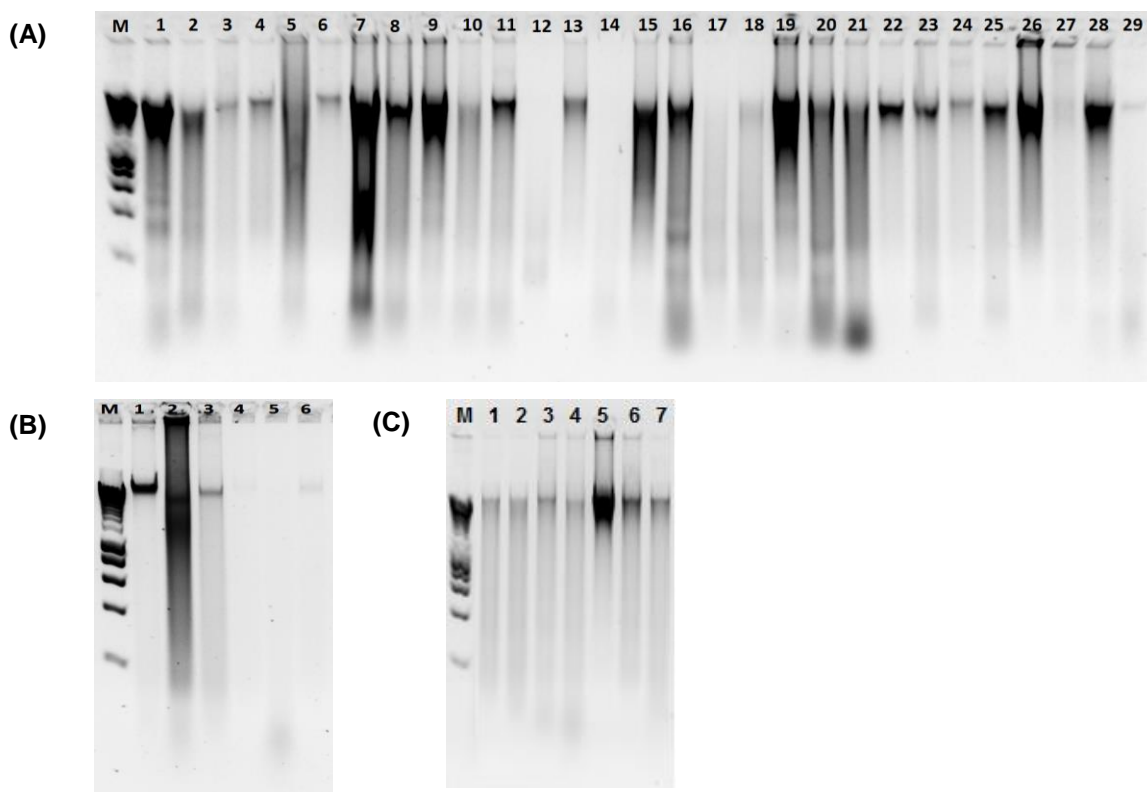


Figura 21 - Eletroforese em gel de agarose de DNA genómico das amostras comerciais extraídas pelo método NucleoSpin Food com RNase. (A) Linha 1 a 29 – AC1 a AC17b. (B) Linha 1 a 6 – AC18a a AC21. (C) Linha 1 a 5 – AC 22a a AC25. M – Marcador molecular HyperLadder I. B – Branco.

Tabela 10 - Concentrações e purezas do DNA extraído das amostras de comerciais pelo método Nucleospin Food com RNase.

Nº da amostra	Código dos extratos	Concentração (ng/µL)	Pureza (A260/A280)
1	AC1	208,3	1,9
2	AC2a	99,1	1,9
	AC2b	61,7	2,0
3	AC3a	27,2	1,8
	AC3b	694,6	2,1
4	AC4a	13,4	1,9
	AC4b	701,7	2,0
5	AC5a	310,9	2,1
	AC5b	116,5	2,0
6	AC6a	72,5	2,0
	AC6b	69,4	1,9
7	AC7a	12,8	2,3
	AC7b	29,9	1,9
	AC7c	19,1	1,9
8	AC8a	75,5	1,9
	AC8b	186,0	2,0
9	AC9a	40,8	1,9
	AC9b	62,8	1,4
10	AC10	151,7	1,9
11	AC11	215,7	2,0
12	AC12	254,2	2,0
13	AC13	47,3	1,9
14	AC14	80,5	2,0
15	AC15a	39,3	1,9
	AC15b	48,6	1,9
16	AC16a	236,0	2,0
	AC16b	32,9	1,8
17	AC17a	66,8	1,9
	AC17b	47,7	2,0
18	AC18	51,9	1,9
19	AC19a	301,8	2,0
	AC19b	78,5	1,9
20	AC20	61,1	2,0
21	AC21	29,9	1,7
22	AC22a	51,6	1,9
	AC22b	49,4	2,0
23	AC23a	79,4	1,9
	AC23b	88,2	1,9
24	AC24	138,1	1,9
25	AC25a	72,0	1,9
	AC25b	55,6	1,9

Os valores de concentração e pureza do DNA extraído das amostras comerciais (Tabela 10) mostram rendimentos que variaram bastante, entre os 12,8 ng/µL e os 701,7 ng/µL, e que a maioria dos extratos apresentaram purezas entre 1,8 a 2,0. É de destacar também que nas amostras em que foi possível realizar dois tipos de trituração, uma triturando apenas uma porção do camarão visível ou o recheio de camarão e a outra

utilizando a amostra inteira, se verificou que os extratos obtidos a partir da porção de camarões ou recheio apresentaram, em geral, concentrações mais baixas do que os extratos das respectivas amostras inteiras, como é o caso da amostra AC 3a e AC 3b. Tal deverá ser provavelmente devido ao facto de os camarões apresentarem uma elevada percentagem de água e os recheios de camarão serem altamente processados.

A integridade do DNA genómico dos extratos de DNA das amostras comerciais foi avaliada recorrendo a uma eletroforese em gel de agarose (Figura 21), constatando-se que a maioria dos extratos apresentava bandas de elevada massa molecular (> 10000 pb), porém com algum arrastamento, o que indica a existência de algum DNA degradado.

7.2 PCR qualitativa

7.2.1 Avaliação da capacidade de amplificação dos extratos

Primeiramente, de forma a confirmar a capacidade de amplificação dos extratos de DNA, estes foram submetidos a uma PCR qualitativa com *primers* específicos (EG-F/EG-R e 18SRG-F/18SRG-R) para um gene universal (18S rRNA), que está presente em todas as espécies eucariotas e posterior eletroforese em gel de agarose dos produtos obtidos.

No caso das amostras de camarão da família Penaeidae, após a amplificação do gene universal dos extratos de DNA obtidos com utilização de RNase e com os *primers* EG-F/EG-R, verificou-se que todas as amostras amplificaram com o aparecimento de bandas fortes com o tamanho esperado (109 pb), mostrando uma boa capacidade de amplificação (Figura 22A). Contudo, as mesmas amostras extraídas sem uso de RNase (Figura 22B) e amplificadas com os mesmos *primers* apresentaram apenas arrastamentos, à exceção da amostra C4 que apresentou uma banda ténue, o que sugere a existência de inibidores em todos os extratos e que não permitiram a amplificação de DNA.

Uma vez que a maioria dos extratos obtidos sem uso de RNase não amplificaram com os *primers* EG-F/EG-R, realizou-se uma amplificação utilizando os *primers* 18SRG-F/18SRG-R que têm como alvo o mesmo gene (18S rRNA), mas numa região diferente. Na Figura 22C, podem-se visualizar os resultados dessa amplificação e constatar que todas as amostras amplificaram, apresentando bandas com o tamanho esperado (113 pb). Contudo, apenas a amostra C4 apresentou uma banda forte, o que esteve em concordância com o ensaio anterior com os *primers* EG-F/EG-R (Figura 22B).

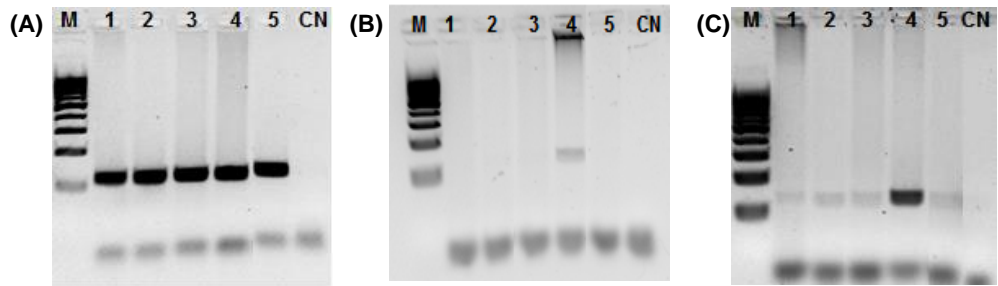


Figura 22 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR conseguidos a partir da amplificação dos extratos das amostras de camarão obtidos pelo método Nucleospin Food com RNase (A) utilizando os *primers* EG-F/EG-R e sem RNase utilizando os *primers* EG-F/EG-R (B) e os *primers* 18SRG-F/18SRG-R (C). Linha 1 - *Penaeus monodon* (C1); Linha 2 - *Fenneropenaeus indicus* (C2); Linha 3 - *Metapenaeus affinis* (C3); Linha 4 - *Litopenaeus vannamei* (C4); Linha 5 - *Melicertus kerathurus* (C5). M – Marcador molecular 100 pb DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CN – Controlo negativo.

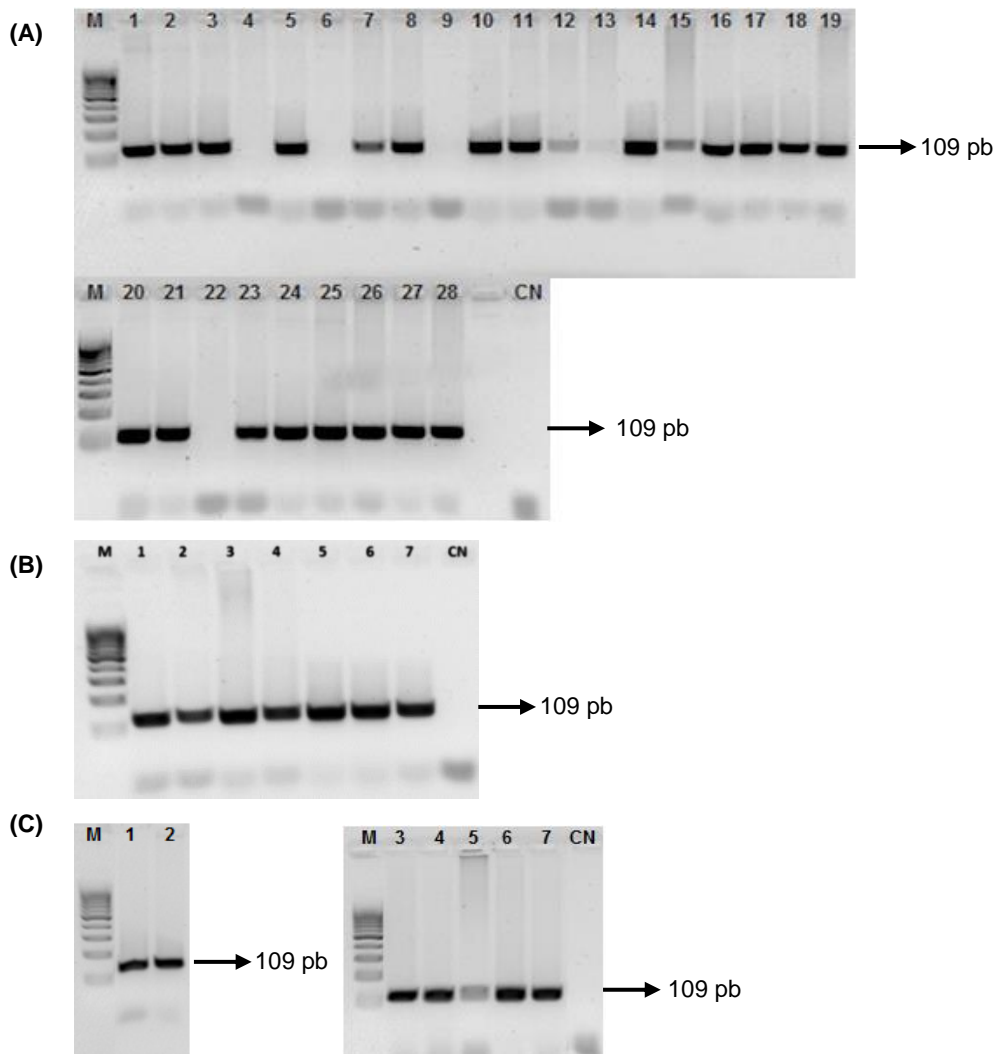


Figura 23 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação das amostras comerciais com os *primers* EG-F/EG-R. (A) Linha 1 a 28 – AC1 a AC17a. (B) Linha 1 a 7 – AC17b a AC21. (C) Linha 1 a 7 – AC 22a a AC25. M – Marcador molecular 100 pb DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CN – Controlo negativo.

No caso das amostras comerciais, a capacidade de amplificação dos extratos foi avaliada também através de uma PCR qualitativa com os *primers* EG-F/EG-R (Figura 23). A maioria das amostras comerciais apresentou bandas fortes com o tamanho esperado, sugerindo a existência de uma boa capacidade de amplificação dos extratos. Contudo, 3 amostras apresentaram amplificação com bandas de intensidade média e uma levou ao aparecimento de uma banda ténue. Em 4 dos 41 extratos analisados não se observou amplificação com os *primers* EG-F/EG-R, o que pode ser explicado pelo facto de as amostras terem sido sujeitas a um elevado grau processamento, que levou à degradação do DNA.

7.2.2 Amplificação do gene COI das espécies de camarão

Como referido anteriormente, o gene COI é muito utilizado em análises de *DNA barcoding* que demonstraram que esta região contém variações suficientes para identificar com precisão uma grande variedade de animais geneticamente próximos, incluindo crustáceos (Galimberti et al., 2013; Shen et al., 2016). Assim, de forma a desenvolver um método capaz de diferenciar as espécies de camarão selecionadas, desenharam-se *primers* direcionados para uma região do gene COI dessas espécies. Para este estudo, foram desenhados dois pares de *primers*, CRUST1-F/CRUST1-R e CRUST2-F/CRUST2-R, tendo-se procedido à otimização das condições de amplificação por PCR para cada um deles e à avaliação da especificidade dos ensaios através de testes de reatividade cruzada.

Primeiramente, procedeu-se à otimização da PCR com os *primers* CRUST1-F/CRUST1-R, amplificando as espécies de camarão selecionadas (C1 a C5). Na Figura 24, podem-se observar os fragmentos obtidos com e sem utilização de RNase na extração. Sem o uso de RNase apenas se constatou a amplificação do fragmento esperado (175 pb) em três das cinco amostras, a amostra C3 amplificou positivamente com banda ténue e as amostras C4 e C5 com bandas fortes (Figura 24B). No que respeita aos extratos dos camarões obtidos com uso de RNase (Figura 24A), quatro das espécies apresentaram bandas com diferentes intensidades, mas o espécime de *Penaeus monodon* não amplificou qualquer fragmento, podendo dever-se ao facto de existirem pequenas diferenças nas sequências nucleotídicas complementares aos *primers*.

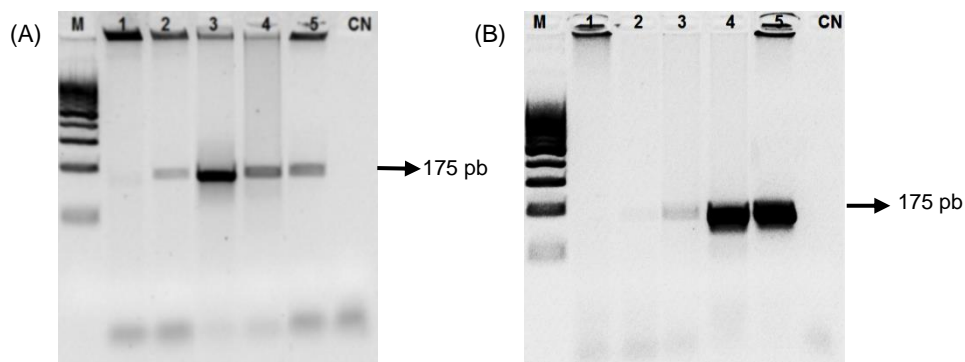


Figura 24 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR conseguidos a partir da amplificação dos extratos das amostras de camarão da família Penaeidae obtidos pelo método Nucleospin Food com RNase (A) e sem RNase (B), utilizando os *primers* CRUST1-F/CRUST1-R. Linha 1 – *Penaeus monodon* (C1); Linha 2 – *Fenneropenaeus indicus* (C2); Linha 3 – *Metapenaeus affinis* (C3); Linha 4 – *Litopenaeus vannamei* (C4); Linha 5 – *Melicertus kerathurus* (C5). M – Marcador molecular 100 pb DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CN – Controlo negativo.

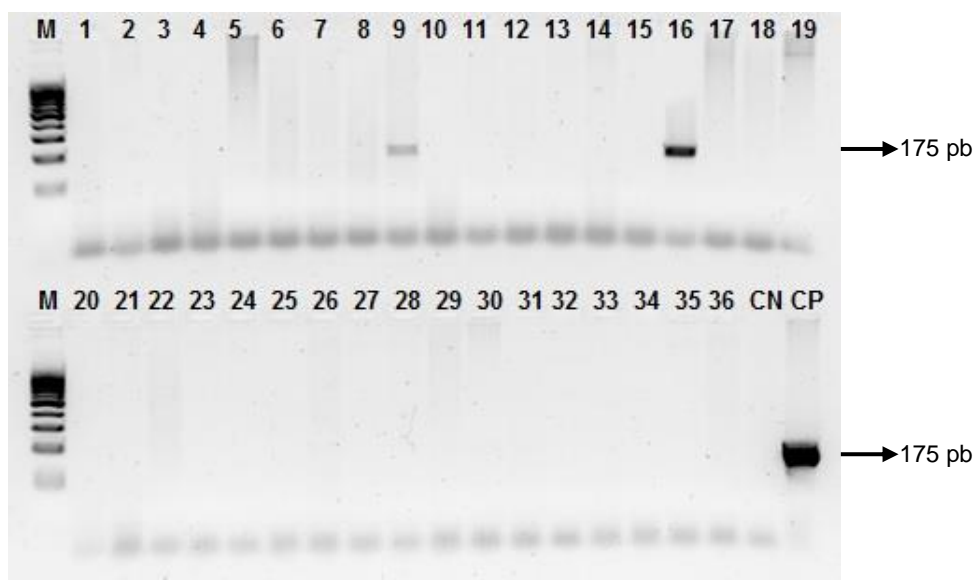


Figura 25 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação das amostras de carne, peixe, plantas para estudo da reatividade cruzada, utilizando os *primers* Crust1-F/Crust1-R. Linha 1 a 36 – Bacalhau fresco (*Gadus morhua*), Paloco (*Pollachius virens*), Paloco (*Theragra chalcogramma*), Linguado (*Molva molva*), Salmão (*Salmo solar*), Dourada (*Sparus aurata*), Linguado (*Solea solea*), Sardinha (*Sardina pilchardus*), Bacalhau seco (*Gadus morhua*), Atum (*Thunnus albacares*), Coelho selvagem 1, Coelho selvagem 2, Vaca, Galinha, Perú, Veado, Borrego, Cabrito, Avestruz, Soja, Milho, Caju, *Calluna vulgaris*, *Lavandula angustifolia*, Mel multifloral, Erva príncipe, Funcho, Dente-de-leão, Cavalinha, Cidreira, Camomila, Chá verde, Salvia, Hortelã-pimenta, Borututu e Carqueja. M – Marcador molecular 100 pb DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CP – Controlo positivo (*Litopenaeus vannamei* (C4)) e CN – Controlo negativo.

Seguidamente, avaliou-se a especificidade dos *primers* CRUST1-F/CRUST1-R através de testes de reatividade cruzada com diferentes espécies de plantas ($n=29$) e

animais, incluindo peixes ($n=15$), mamíferos e aves ($n=9$), crustáceos ($n=8$) e moluscos ($n=2$) que podem estar presentes em alimentos comerciais. Das 62 espécies testadas, 8 exibiram amplificação (Figuras 25, 26 e 27). De referir que apenas 3 dessas 8 espécies apresentaram bandas de elevada intensidade (Veado, *Haliporoides thriarthurus* (camarão da família Solenoceridae) e *Portunus validus* (caranguejo)), sendo que outras 3 exibiram bandas de menor intensidade (Atum, *Thunnus albacares*), *Solenocera crassicornis* (camarão da família Solenoceridae) e Lagostim (*Nephrops norvegicus*), enquanto as restantes apresentaram bandas muito ténues (Pescada (*Merluccius australis*) e Lagosta (*Panulirus argus*). Estes resultados demonstraram que os *primers* CRUST1-F/CRUST1-R desenhados não são específicos para as 5 espécies de camarão selecionadas.

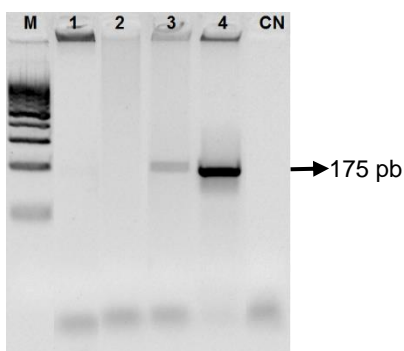


Figura 26 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação das amostras de crustáceos (camarões da família Solenoceridae) para o estudo da reatividade cruzada, utilizando os *primers* Crust1-F/Crust1-R. Linha 1 a 4 - *Pleoticus muelleri*, *Solenocera melantho*, *S. crassicornis* e *Haliporoides triarthrus*. M – Marcador molecular 100 pb DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CN – Controlo negativo.

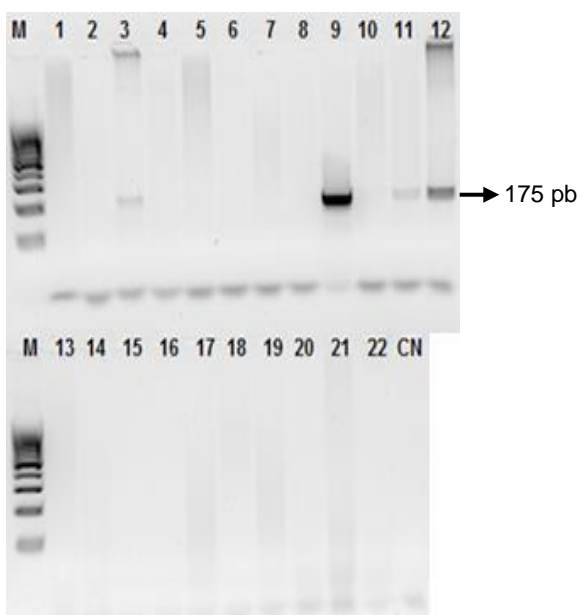


Figura 27 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação das amostras de carne, peixe, plantas para estudo da reatividade cruzada, utilizando os *primers* Crust1-F/Crust1-R. Linha 1 a 22 - Pescada (*Merluccius merluccius*); Linha 2 - Pescada (*M. productus*), Pescada (*M. australis*), Pescada (*M. hubbris*), Pescada (*M. capensis*), Pescada (*M. paradoxus*), Mexilhão (*Mytillus* spp.), Ameijoia (*Paphia undulata*), Caranguejo (*Portunus validus*), Sapateira (*Cancer pagarus*), Lagosta (*Panulirus argus*), Lagostim (*Nephrops norvegicus*), Sene, Mate verde, Tília, Uva-ursina, Erva-de-S. Roberto, Passiflora, Boldo, Verbera, Espinheiro alvar, Caldo Mariano e Orégãos. M – Marcador molecular 100 pb DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CN – Controlo negativo.

De seguida, passou-se à otimização da técnica de PCR qualitativa com o segundo par de *primers* desenhados (CRUST2-F/CRUST2-R) e testou-se a amplificação dos extratos de DNA obtidos das espécies de camarão selecionadas (C1 a C5) com e sem utilização de RNase. A eletroforese em gel de agarose dos produtos obtidos permitiu verificar a existência de amplificação do fragmento esperado de 106 pb para ambos os tipos de extratos das diferentes espécies de camarão, à exceção do extrato obtido com uso de RNase da amostra C5 (*Melicertus kerathurus*) (Figura 28). Contudo, as bandas obtidas não amplificaram todas com a mesma intensidade, sendo que os produtos dos extratos obtidos sem RNase (Figura 28B) apresentaram maior intensidade do que os dos extratos obtidos com RNase (Figura 28A). Tal facto sugere que o uso de RNase na extração leva a uma diminuição do rendimento da amplificação dos extratos através da PCR com os *primers* CRUST2-F/CRUST2-R.

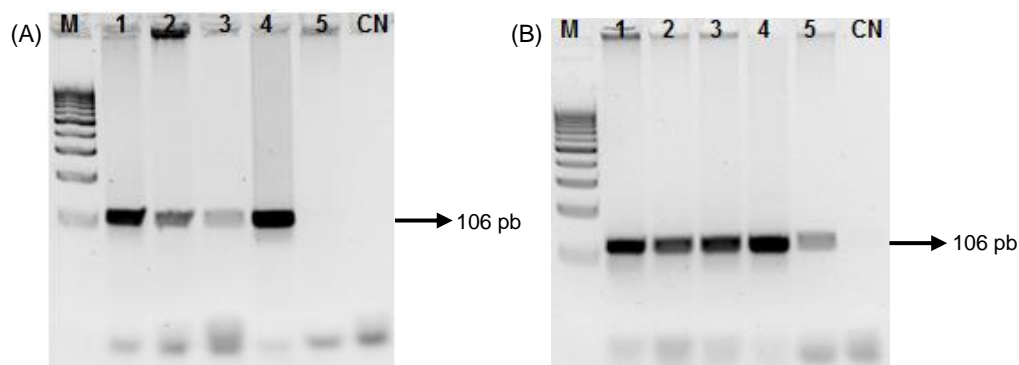


Figura 28 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR conseguidos a partir da amplificação dos extratos das amostras de camarão da família Penaeidae obtidos pelo método Nucleospin Food com RNase (A) e sem RNase (B), utilizando os *primers* Crust2-F/Crust2-R. Linha 1 – *Penaeus monodon* (C1); Linha 2 – *Fenneropenaeus indicus* (C2); Linha 3 – *Metapenaeus affinis* (C3); Linha 4 – *Litopenaeus vannamei* (C4); Linha 5 – *Melicertus kerathurus* (C5). M – Marcador molecular 100 pb DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CN – Controlo negativo.

Posteriormente, procedeu-se à avaliação da especificidade da PCR com os *primers* CRUST2-F/CRUST2-R de forma idêntica à efetuada para os *primers* CRUST1-F/CRUST1-R. Os resultados mostraram a amplificação de 4 das 62 espécies testadas, nomeadamente a amostra de lagostim (*Nephrops norvegicus*) e 3 amostras de camarão da família Solenoceridae (*Solenocera melantho*, *Solenocera crassicornis* e *Haliporoides triarthrus*) (Figuras 29 a 33). Relativamente aos *primers* CRUST1-F/CRUST1-R, os *primers* CRUST2-F/CRUST2-R demonstraram ser mais específicos e permitiram amplificar de forma mais eficaz os extratos de DNA das amostras de camarão selecionadas (C1 a C5), por isso foram selecionados para prosseguir o desenvolvimento do método.

Apesar dos *primers* CRUST2-F/CRUST2-R não serem totalmente específicos para as espécies de camarão que se pretenderam diferenciar, prosseguiu-se para a aplicação

da técnica de PCR qualitativa em amostras comerciais e posterior otimização da técnica PCR em tempo real acoplada com análise de HRM. Esta decisão foi tomada pelo facto de a análise de HRM permitir a deteção de polimorfismos de nucleótido único e teoricamente poderem existir diferenças nas sequências nucleotídicas das espécies com reatividade cruzada e das espécies de camarão seleccionadas (amostras de referência).

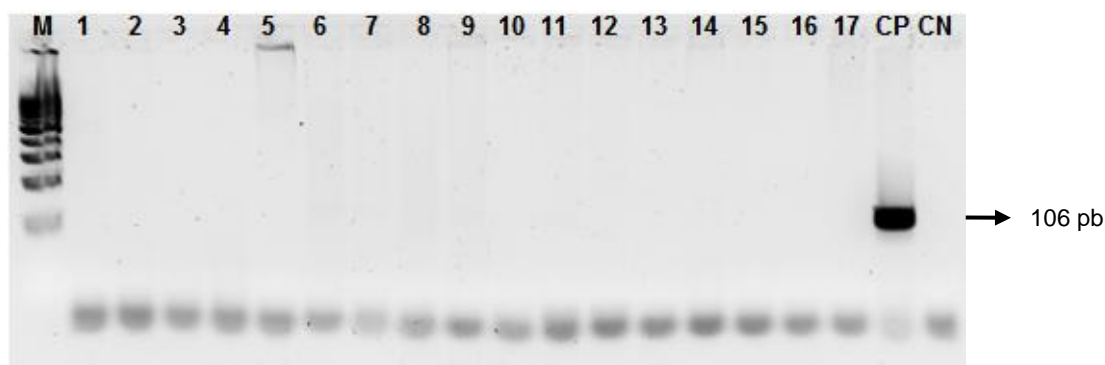


Figura 29 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos das amostras de carne e peixe para estudo da reatividade cruzada, utilizando os *primers* Crust2-F/Crust2-R. Linhas 1 a 17 - Bacalhau (*Gadus morhua*), Paloco (*Pollachius virens*), Paloco (*Theragra chalcogramma*), Linguado (*Molva molva*), Salmão (*Salmo solar*), Dourada (*Sparus aurata*), Linguado (*Solea solea*), Sardinha (*Sardina pilchardus*), Atum (*Thunnus albacares*), Bacalhau seco (*Gadus morhua*), Coelho selvagem 1, Coelho selvagem 2, Vaca, Galinha, Peru, Veado e Borrego. M - Marcador molecular 100 pb DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CP- Controlo Positivo (*Litopenaeus vannamei* (C4)) e CN- Controlo Negativo.

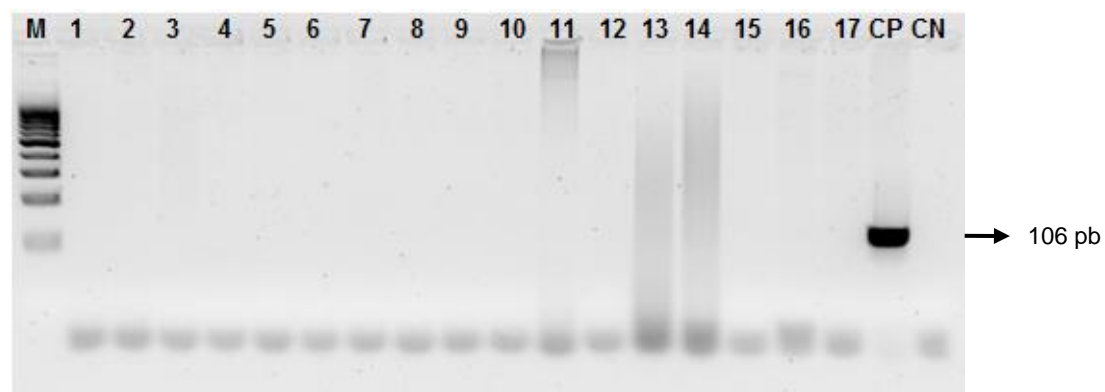


Figura 30 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos das amostras de plantas para estudo da reatividade cruzada, utilizando os *primers* Crust2-F/Crust2-R. Linhas 1 a 17 - Soja, Milho, Caju, *Calluna vulgaris*, *Lavandula angustifolia*, Mel multiflora, Erva príncipe, Funcho, Dente-de-leão, Cavalinha, Cidreira, Camomila, Chá verde, Hortelã-pimenta, Borututu, Carqueja e Malvas. M – Marcador molecular 100 pb DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CP – Controlo positivo (*Litopenaeus vannamei* (C4)) e CN – Controlo negativo.

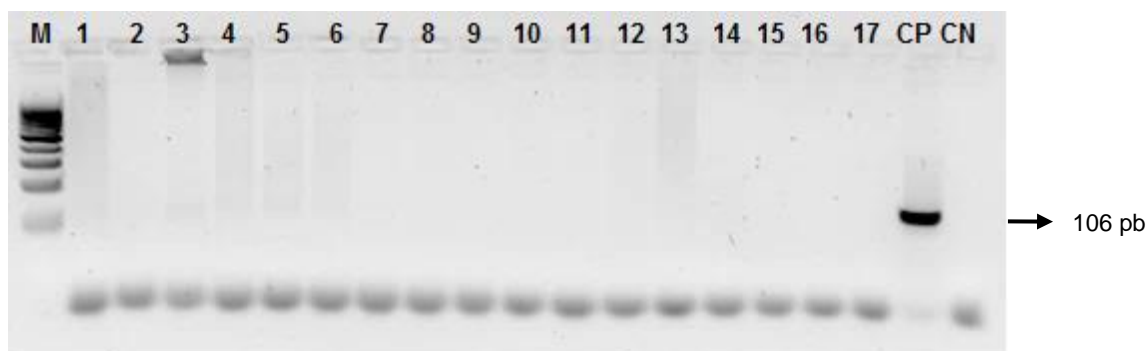


Figura 31 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos das amostras de peixe e plantas para estudo da reatividade cruzada, utilizando os primers Crust2-F/Crust2-R. Linha 1 a 17 - Pescada (*Merluccius merluccius*), Pescada (*M. productus*), Pescada (*M. australis*), Pescada (*M. hubbris*), Pescada (*M. capensis*), Pescada (*M. paradoxus*), Sene, Mate verde, Tília, Uva-ursina, Erva de S. Roberto, Passiflora, Boldo, Verbera, Espinheiro alvar, Caldo Mariano e Oregãos. M - Marcador molecular 100 pb DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CP - Controlo positivo (*Litopenaeus vannamei* (C4)) e CN - Controlo negativo.

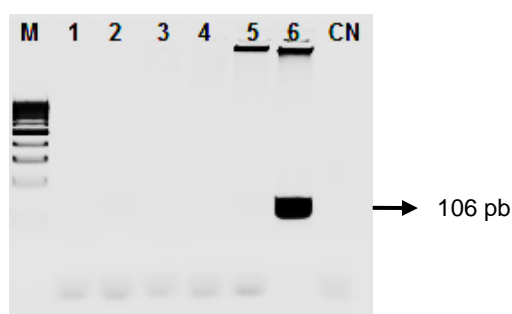


Figura 32 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos das amostras de crustáceos e moluscos para estudo da reatividade cruzada, utilizando os primers Crust2-F/Crust2-R. Linha 1 a 6 - Mexilhão (*Mytilus spp.*), Ameijoia (*Paphia undulata*), Caranguejo (*Portunus validus*), Sapateira (*Cancer pagarus*), Lagosta (*Panulirus argus*) e Lagostim (*Nephrops norvegicus*). M - Marcador molecular 100 pb DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CN - Controlo negativo.

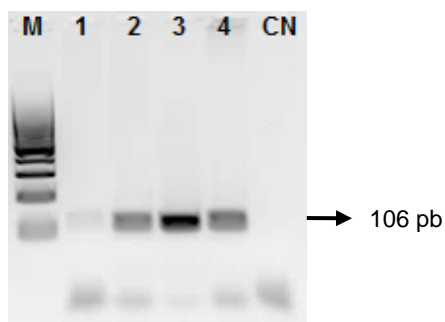


Figura 33 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR conseguidos a partir da amplificação dos extratos das amostras de crustáceos (camarões da Família Solenoceridae), utilizando os primers Crust2-F/Crust2-R. Linha 1 a 4 - *Pleoticus muelleri*, *Solenocera melantho*, *S. crassicornis* e *Haliporoides triarthrus*. M - Marcador molecular 100 pb DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CN - Controlo negativo.

7.2.3 Aplicação da PCR qualitativa nas amostras comerciais

Após otimização e avaliação da especificidade da técnica PCR qualitativa com os *primers* CRUST2-F/CRUST2-R, procedeu-se à sua aplicação em amostras de alimentos processados disponíveis comercialmente. Devido ao elevado nível de processamento das amostras analisadas, numa fase inicial avaliou-se a capacidade de amplificação dos extratos com os *primers* EG-F/EG-R tendo como alvo o gene 18S rRNA, um gene universal para espécies eucariotas, de forma a evitar quaisquer falsos negativos (Figura 23). De seguida prosseguiu-se à amplificação específica de espécies de camarão nas amostras comerciais com os *primers* CRUST2-F/CRUST2-R (Figura 34).

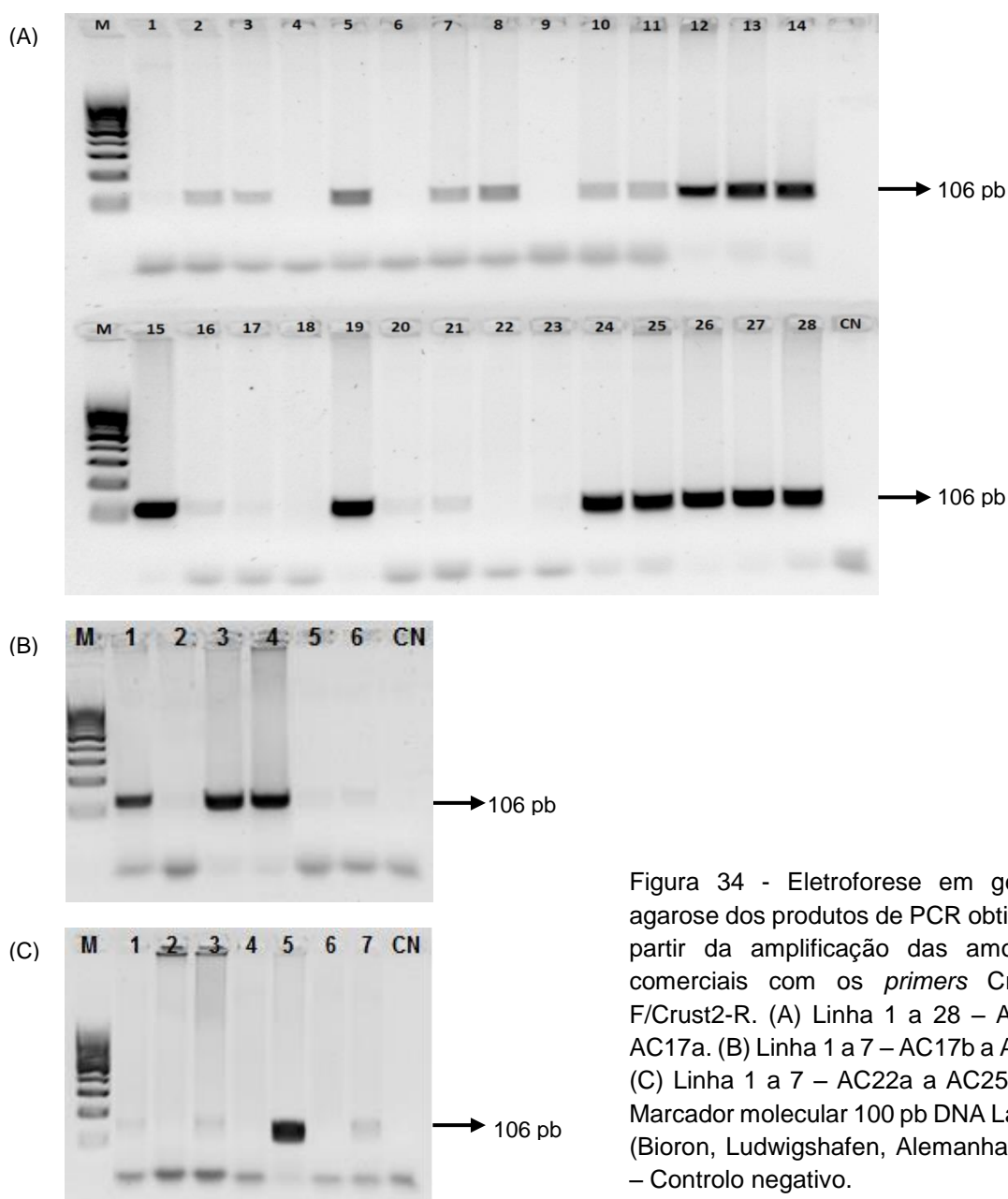


Figura 34 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação das amostras comerciais com os *primers* Crust2-F/Crust2-R. (A) Linha 1 a 28 – AC1 a AC17a. (B) Linha 1 a 7 – AC17b a AC21. (C) Linha 1 a 7 – AC22a a AC25. M – Marcador molecular 100 pb DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CN – Controlo negativo.

De realçar que nas amostras comerciais se analisaram as partes com camarão visível e recheios separadamente, para além das amostras inteiras totalmente homogeneizadas, de forma a verificar se a identificação de espécies de camarão foi influenciada pela matriz. Pelo que, das 25 amostras adquiridas, obtiveram-se 41 extratos. Como é possível verificar analisando a Figura 34, apenas 14 (8 amostras comerciais) dos 41 extratos levaram à produção de bandas fortes que apresentaram o tamanho esperado de 106 pb. Deve-se realçar que 6 extratos apresentaram amplificação positiva com bandas médias e outros 8 amplificaram com bandas ténues. Os extratos que não amplificaram anteriormente com os *primers* EG-F/EG-R voltaram a não amplificar (Figura 34A - Linhas 4, 6, 9 e 22), constatando-se também que para além destes outros 6 extratos não apresentaram amplificação com os *primers* CRUST2-F/CRUST2-R.

7.3 PCR em tempo real e análise de HRM

7.3.1 Desenvolvimento e otimização do método

Uma vez otimizada a técnica de PCR qualitativa e avaliada a sua especificidade, procedeu-se à otimização da técnica de PCR em tempo real com os *primers* CRUST2-F/CRUST2-R acoplada a uma análise de HRM, com o objetivo de conseguir a diferenciação das 5 espécies de camarão relacionadas geneticamente (C1 a C5) e posteriormente aplicar o método na identificação dessas espécies em amostras comerciais. Essa diferenciação deverá ser possível pelo facto da análise de HRM permitir a deteção de pequenas variações nas sequências nucleotídicas amplificadas e com base nessas variações agrupar as amostras em diferentes *clusters*. Como referido anteriormente, os *primers* CRUST2-F/CRUST2-R foram os escolhidos, por estes serem mais específicos e amplificarem as espécies de camarão alvo (C1 a C5) de forma mais eficaz do que os *primers* CRUST1-F/CRUST1-R.

Para a otimização do método, testaram-se dois programas de temperatura que podem ser consultados na Tabela 8. A diferença mais relevante entre os programas situa-se nas etapas de amplificação. No programa 1 a hibridação e extensão do DNA ocorrem numa só etapa, enquanto no programa 2 ocorrem em etapas distintas com temperatura e tempo diferentes. Uma vez que através da PCR qualitativa se verificou que o uso de RNase nas extrações influenciou a amplificação dos extratos das amostras de camarão, constatou-se que era de elevada relevância testar a amplificação por PCR em tempo real e análise de HRM tanto dos extratos obtidos com RNase como os obtidos sem RNase.

Em primeiro lugar realizou-se a PCR em tempo real acoplada à análise de HRM sob as condições do programa 1 e de seguida sob as condições do programa 2, sendo que os dois tipos de extratos de cada uma das amostras de camarão foram analisados em ensaios independentes. Analisando os resultados obtidos sob as condições do programa 1 para os dois tipos de extratos (Figura 35 e 36), constatou-se que o uso de RNase nas extrações favoreceu a amplificação dos extratos. As curvas de amplificação dos extratos obtidos com uso de RNase (Figura 35A) apresentaram uma melhor cinética e através delas foi possível verificar também que a amplificação ocorreu mais cedo (entre os 17 e os 34 ciclos) do que a dos extratos obtidos sem uso de RNase (entre os 24 e os 42 ciclos) (Figura 36A). Os dados da análise de HRM demonstraram que tanto no ensaio com os extratos obtidos com uso de RNase (Figura 35C e 35D) como no ensaio com os extratos obtidos sem uso de RNase (Figura 36C e 36D) foi possível diferenciar as cinco espécies de camarão, incluindo cada uma e as suas respetivas réplicas em *clusters* diferentes com níveis de confiança superiores a 99% e 98%, respetivamente.

Contudo, os picos de desnaturação da espécie C5 apresentaram um duplo pico (Figuras 35B e 36B), este resultado insatisfatório levou a que se prosseguisse para a avaliação da amplificação sob as condições do programa 2.

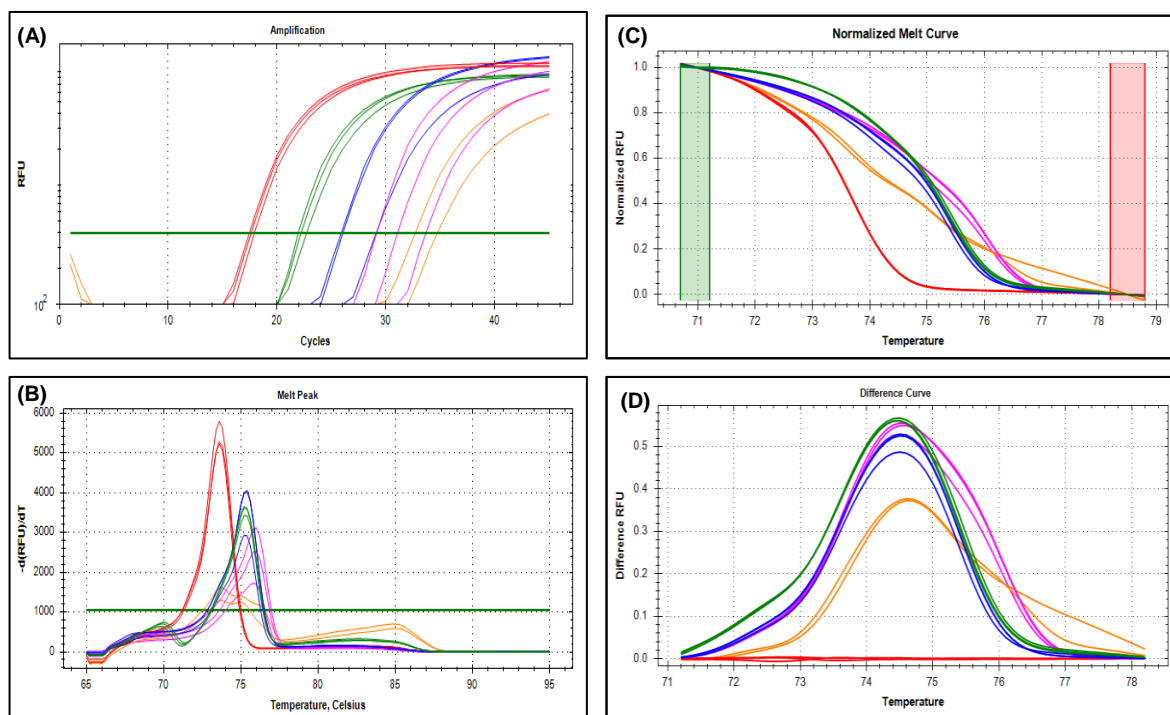


Figura 35 - Resultado da amplificação por PCR em tempo real com os *primers* CRUST2-F/CRUST2-R dos extratos obtidos com uso de RNase das espécies de camarão sob as condições de amplificação do programa 1, e respetiva análise de HRM. (A) Curvas de amplificação; (B) Curvas de desnaturação; (C) Curvas de desnaturação normalizada; (D) Curvas de diferença. Curvas verdes - C1; curvas azuis - C2; curvas violetas - C3; curvas vermelhas - C4 e curvas laranjas - C5.

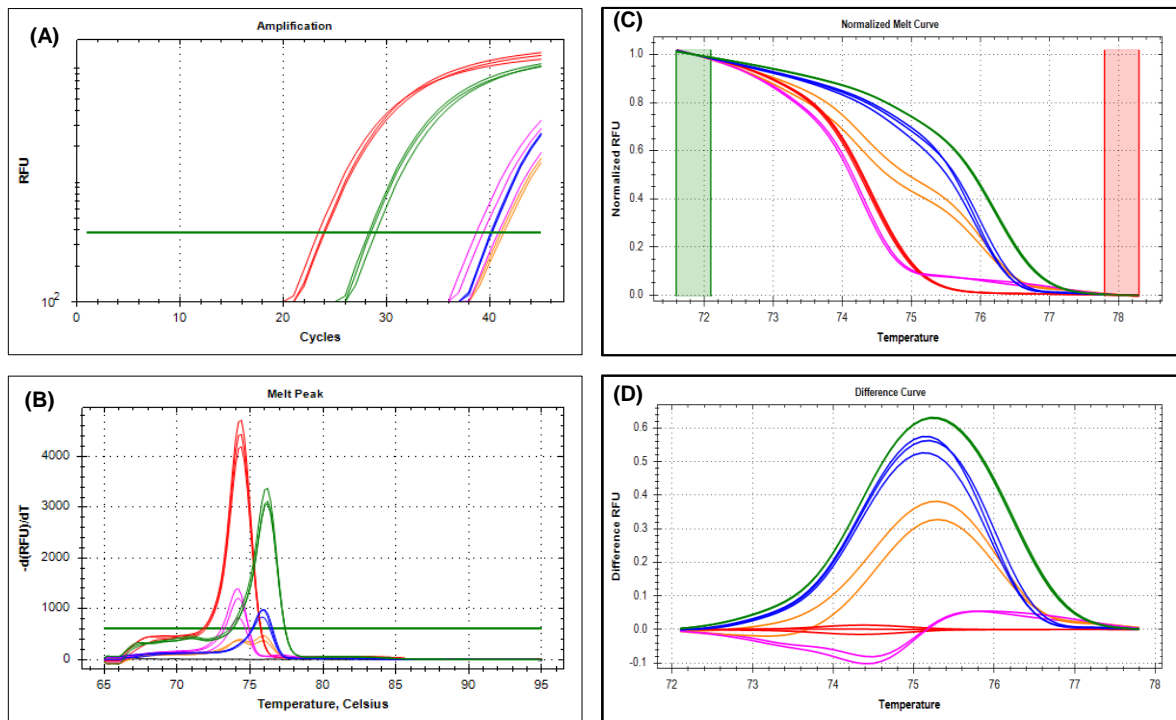


Figura 36 - Resultado da amplificação por PCR em tempo real dos extratos obtidos sem uso de RNase das espécies de camarão, com os *primers* CRUST2-F/CRUST2-R sob as condições de amplificação do programa 1, e respectiva análise de HRM. (A) Curvas de amplificação; (B) Curvas de desnaturação; (C) Curvas de desnaturação normalizada; (D) Curvas de diferença. Curvas verdes - C1; curvas azuis - C2; curvas violetas - C3; curvas vermelhas - C4 e curvas laranjas - C5.

Nas Figuras 37 e 38, podem-se observar os resultados obtidos da amplificação por PCR em tempo real dos dois tipos de extratos das 5 espécies de camarão nas condições do programa 2 e a respectiva análise de HRM. As curvas de amplificação permitiram visualizar que as amplificações dos dois tipos de extratos ocorreram entre os 19 e os 32 ciclos, tendo as espécies C1, C2 e C3 extraídas com RNase apresentado Ct mais próximos, o que sugere que as cinéticas de amplificação sejam semelhantes. A análise de desnaturação convencional (Figuras 37B e 38B) demonstrou a existência de dois grupos principais de temperatura de desnaturação, um grupo por volta dos 73°C (amostra C4) e outro entre 75-76°C (amostras C1, C2, C3 e C5), porém verificou-se que a espécie C5 extraída sem RNase apresentou 2 picos de desnaturação (Figura 38B). No entanto, pela análise de HRM realizada nos dois ensaios com (Figura 37C e 37D) e sem uso de RNase (Figura 38C e 38D) foi possível diferenciar cada espécie de camarão e as suas respectivas réplicas, agrupando-as em *clusters* diferentes com um nível de confiança superior a 99%.

Comparando os resultados dos ensaios de PCR em tempo real e análise de HRM obtidos sob as condições dos programas 1 e 2, concluiu-se que o programa mais favorável para a amplificação e diferenciação dos extratos de camarão foi o programa 2 e que a utilização de RNase na extração das amostras influenciou positivamente a amplificação dos extratos.

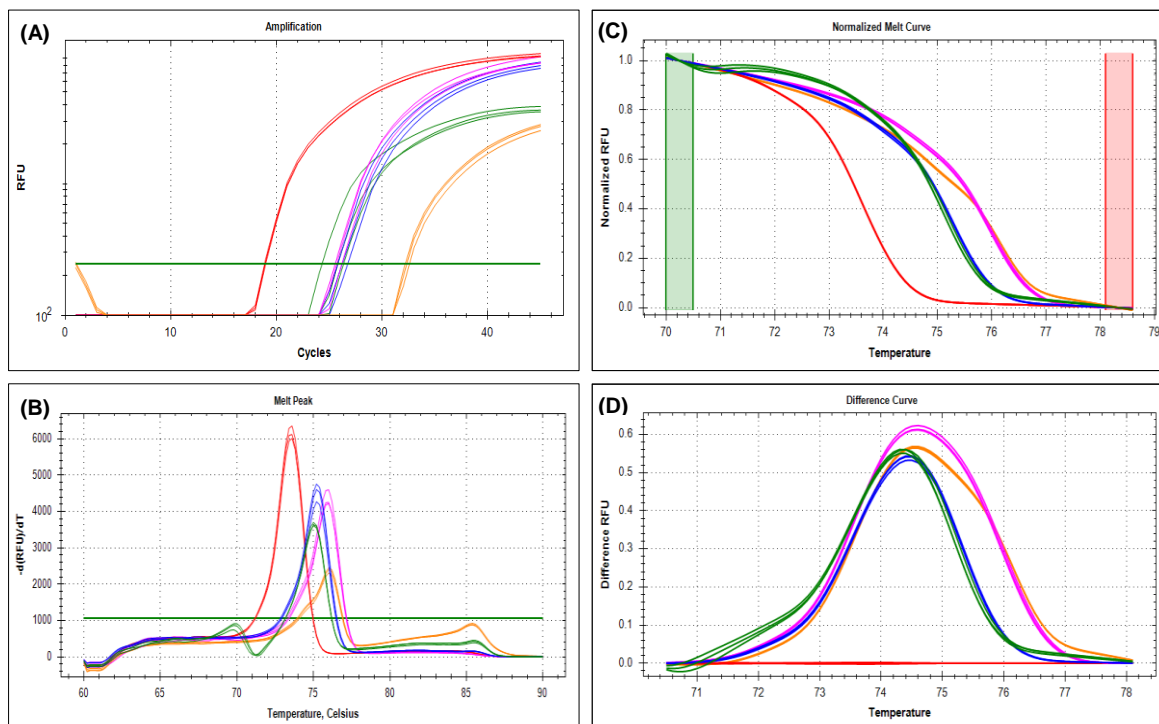


Figura 37 - Resultado da amplificação por PCR em tempo real dos extratos obtidos com o uso de RNase das espécies de camarão, com os *primers* CRUST2-F/CRUST2-R, sob as condições do programa 2, e respetiva análise de HRM. (A) Curvas de amplificação; (B) Curvas de desnaturação; (C) Curvas de desnaturação normalizada; (D) Curvas de diferença obtidas por análise HRM. Curvas verdes - C1; curvas azuis - C2; curvas violetas - C3; curvas vermelhas - C4 e curvas laranjas - C5.

É de realçar que, ao contrário do sucedido na amplificação do extrato da espécie C5 (*M. kerathurus*) obtido com uso de RNase por PCR qualitativa com os *primers* CRUST2-F/CRUST2-R, na PCR em tempo real sob as condições dos dois programas testados foi possível verificar a amplificação desse extrato, resultado que pode ser justificado pela maior sensibilidade desta técnica.

Por fim, averiguou-se se a técnica otimizada permite diferenciar as espécies de camarão (C1-C5) da família Penaeidae de outras da família Solenoceridae e de lagostim, uma vez que amplificaram no estudo de reatividade cruzada utilizando os *primers* CRUST2-F/CRUST2-R. Os resultados do ensaio de PCR em tempo real com análise por HRM aplicado às espécies de camarão das referidas famílias e lagostim mostraram que as espécies de camarões Penaeidae se diferenciaram das outras, nomeadamente os camarões *Pleoticus muelleri*, *Solenocera melantho*, *S. crassicorni* e *Haliporoides triarthrus* incluindo cada uma em *clusters* diferentes, bem como o espécime de lagostim (*Nephrops norvegicus*) com níveis de confiança superiores a 98% (Figura 39).

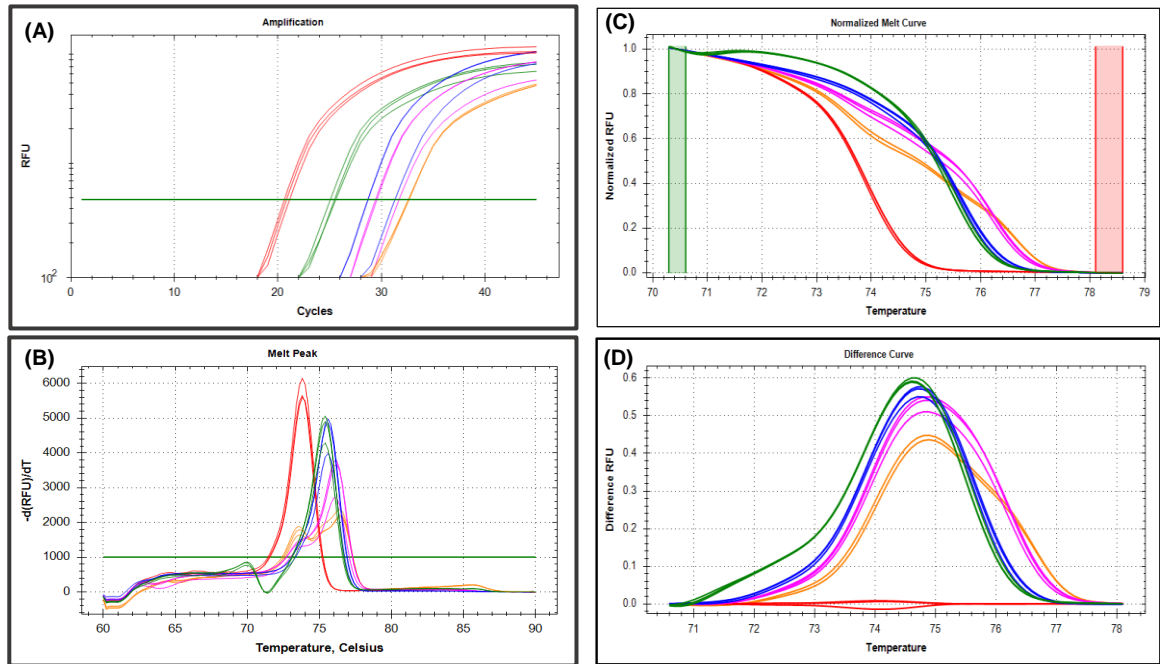


Figura 38 - Resultado da amplificação por PCR em tempo real dos extratos obtidos sem uso de RNase das espécies de camarão, com os *primers* CRUST2-F/CRUST2-R, sob as condições do programa 2, e respectiva análise de HRM. (A) Curvas de amplificação; (B) Curvas de desnaturação; (C) Curvas de desnaturação normalizadas; (D) Curvas de diferença. Curvas verdes - C1; curvas azuis - C2; curvas violetas - C3; curvas vermelhas - C4 e curvas laranjas - C5.

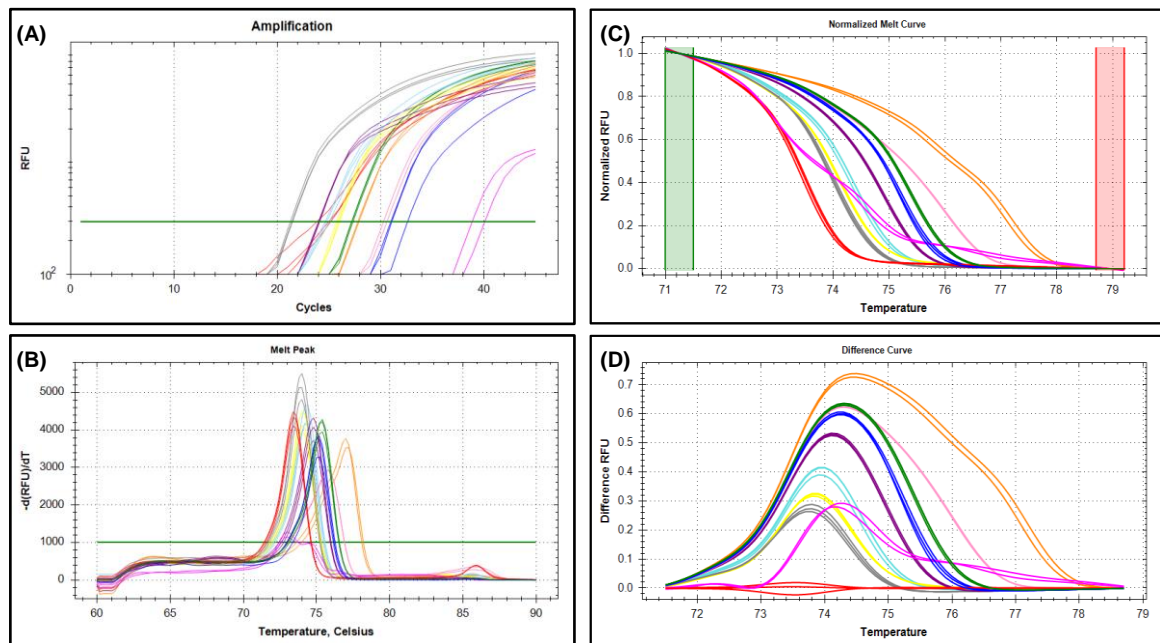


Figura 39 - Resultado da amplificação por PCR em tempo real dos extratos obtidos com uso de RNase das espécies de camarão e das espécies com reatividade cruzada, com os *primers* CRUST2-F/CRUST2-R, condições do programa 2, e respectiva análise de HRM. (A) Curvas de amplificação; (B) Curvas de desnaturação; (C) Curvas de desnaturação normalizadas; (D) Curvas de diferença. Curvas verdes - C1; curvas azuis - C2; curvas violetas - C3; curvas vermelhas - C4; curvas laranjas - C5; curvas rosas - *Pleoticus muelleri*; curvas roxas - *Solenocera melantho*; curvas cinzentas - *S. crassicorni*; curvas amarelas - *Haliporoides triarthrus*; curvas azuis claras - *Nephrops norvegicus*.

Em suma, o método PCR em tempo real acoplado a análise de HRM com alvo no gene COI foi aplicado com sucesso, sendo capaz de diferenciar as cinco espécies de camarão pertencentes à família Penaeidae (C1-C5) e as outras que apresentavam reatividade cruzada, demonstrando ser uma metodologia eficaz para a avaliação de autenticidade de alimentos.

7.3.2 Aplicação do método na identificação de espécies de camarão em amostras comerciais

Após otimizada a técnica de PCR em tempo real acoplada à análise de HRM para a diferenciação de espécies de camarão, prosseguiu-se para a sua aplicação na identificação de amostras comerciais processadas, no seguimento dos resultados positivos na PCR qualitativa anteriormente obtidos. Na Figura 40 apresenta-se um resultado exemplo de um ensaio de PCR em tempo real com os *primers* CRUST2-F/CRUST2-R e análise de HRM aplicado a amostras comerciais onde se pode verificar claramente que uma amostra pertence ao *cluster* de *M. affinis* (C3) e as restantes ao *cluster* de *L. vannamei* (C4).

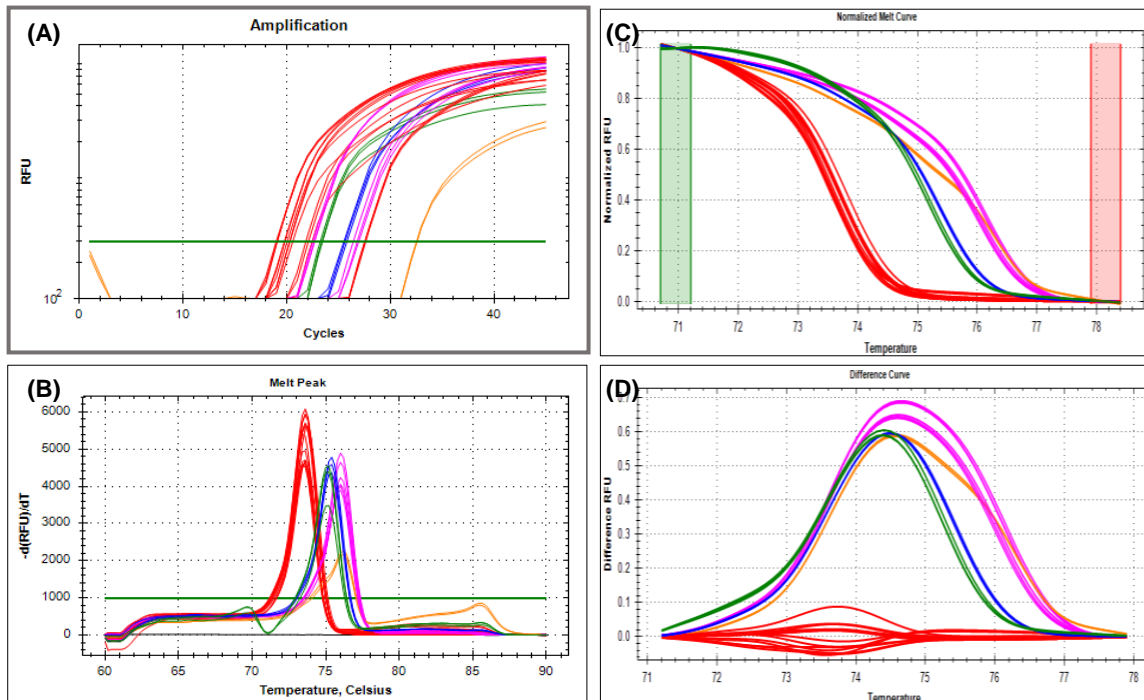


Figura 40 - Resultado da amplificação PCR em tempo e análise de HRM real dos extratos das amostras comerciais, juntamente com as espécies de camarão referência obtidos com uso de RNase e com os *primers* CRUST2-F/CRUST2-R. (A) Curvas de amplificação; (B) Curvas de desnaturação; (C) Curvas de desnaturação normalizadas; (D) Curvas de diferença. Curvas verdes - C1; curvas azuis - C2; curvas violetas - C3 e AC7b; curvas vermelhas - C4, AC7a, AC7c, AC8a e AC10; e curvas laranjas - C5.

Na Tabela 11 apresenta-se o resumo dos resultados obtidos na amplificação das amostras comerciais por PCR qualitativa com os *primers* EG-F/EG-R e os *primers* CRUST2-F/CRUST2-R, juntamente com os dados de análise de HRM para a identificação das espécies de camarão. A análise por PCR em tempo real e HRM apenas se aplicou a 8 de 25 amostras, cujos extratos amplificaram positivamente com bandas fortes (14 dos 41 extratos), pois verificou-se que as amostras que apresentavam bandas médias ou tênues não permitiram obter resultados fiáveis em termos de amplificação e identificação de espécies por análise de HRM. Em 11 dos 14 extratos analisados foi possível identificar as espécies de camarão presentes nas 7 amostras a partir das quais se obteve esses extratos.

Das 25 amostras comerciais adquiridas, a amostra nº 7, um preparado para arroz de marisco, era a única cujo rótulo continha a informação das espécies de camarão incluídas na amostra. Através da análise de HRM, observou-se que o extrato obtido a partir do camarão com casca (AC7a), que o rótulo indicava ser da espécie *Litopenaeus vannamei*, ficou incluído no *cluster* da amostra de referência C4, verificando-se que a espécie indicada no rótulo era a correta. Contudo, o mesmo não se verificou para o miolo de camarão presente no preparado (AC7b), que o rótulo referia ser da espécie *Penaeus indicus*, não tendo ficado incluído no *cluster* de *Fenneropenaeus indicus*, o que sugere a rotulagem incorreta da espécie. É de referir que *Penaeus indicus* e *Fenneropenaeus indicus* são a mesma espécie, porém atualmente a primeira designação é considerada inválida (ITIS, 2016). Constatou-se também que o extrato AC7b foi agrupado no *cluster* de *Metapenaeus affinis*, porém não se pode afirmar que o miolo de camarão analisado seja dessa espécie, pois o resultado da sequenciação mostrou que a amostra provavelmente continha uma mistura de espécies. As delícias do mar presentes na amostra nº 7 (AC7c) também foram analisadas por HRM, tendo ficado agrupadas no *cluster* da espécie *L. vannamei* com elevado nível de confiança ($97,4 \pm 1,4\%$) (Tabela 11).

Através da análise de HRM também se conseguiu identificar com elevados níveis de confiança (~99%) a espécie de camarão presente nas amostras comerciais nº 8, 10 e 24, uma vez que todas elas foram incluídas no *cluster* da espécie *L. vannamei* (Tabela 11), não podendo, contudo, comparar os resultados obtidos com a informação rotulada uma vez que não foram declaradas as espécies de camarão usadas nessas amostras.

No que diz respeito aos extratos AC15a e AC15b da amostra nº 15, constatou-se que a análise de HRM agrupou-os no mesmo *cluster*, mas diferente dos *clusters* das espécies de referência com um nível de confiança igual a $99,7 \pm 0,2\%$, o que sugere que a espécie de camarão presente nesta amostra não corresponde a nenhuma das amostras de referência utilizadas neste estudo (Tabela 11).

Tabela 11 - Resumo dos resultados obtidos por PCR qualitativa e PCR em tempo real com análise de HRM para a identificação de espécies de camarão em amostras comerciais.

Nº da amostra	Código dos extratos	Amostra	PCR qualitativa ^a		Análise de HRM	
			EG-F/ EG-R	CRUST2-F/ CRUST2-R	Cluster	Nível de confiança (média ± DP, %) ^b
1	AC1	Patanisca de bacalhau	+++	+	NA ^c	NA
2	AC2a	Rissol de Camarão (inteiro)	+++	++	NA	NA
	AC2b	Rissol de Camarão (recheio)	+++	++		
3	AC3a	Risotto do Mar (camarão)	-	-	NA	NA
	AC3b	Risotto do Mar (Todo)	+++	++		
4	AC4a	Paella (só camarão)	-	-	NA	NA
	AC4b	Paella (Todo)	+++	++		
5	AC5a	Açorda de Marisco (inteira)	+++	++	NA	NA
	AC5b	Açorda de Marisco (camarão)	-	-		
6	AC6a	Rissol de camarão e pescada (recheio)	+++	++	NA	NA
	AC6b	Rissol de camarão e pescada (inteiro)	+++	++		
7	AC7a	Preparado para arroz de marisco (camarão <i>L. vannamei</i>)	++	+++	<i>L. vannamei</i>	99,0±0,8
	AC7b	Preparado para arroz de marisco (camarão <i>P. indicus</i>)	+	+++	<i>M. affinis</i>	99,6±0,2
	AC7c	Preparado para arroz de marisco (delícias do mar)	+++	+++	<i>L. vannamei</i>	97,4±1,4
8	AC8a	Eurogamba (camarão)	++	+++	<i>L. vannamei</i>	99,3±0,3
	AC8b	Eurogamba (inteira)	+++	+	NA	NA
9	AC9a	Petisco do mar (recheio)	+++	+	NA	NA
	AC9b	Petisco do mar (inteiro)	+++	-		
10	AC10	Creme de marisco	+++	+++	<i>L. vannamei</i>	99,3±0,7
11	AC11	Creme de marisco receita económica	+++	+	NA	NA
12	AC12	Sopa do mar	+++	+	NA	NA
13	AC13	Noddles com sabor a camarão	-	-	NA	NA
14	AC14	Caldo de marisco	+++	-	NA	NA
15	AC15a	Rissóis de camarão (recheio)	+++	+++	Outro ^d	99,7±0,2
	AC15b	Rissóis de camarão (inteiro)	+++	+++		
16	AC16a	Feijoada de camarão (camarão)	+++	+++	<i>F. indicus</i>	99,5±0,2
	AC16b	Feijoada de camarão (Todo)	+++	+++		
17	AC17a	Açorda de Gambas (camarão)	+++	+++	<i>F. indicus</i>	99,7±0,2
	AC17b	Açorda de Gambas (Todo)	+++	+++		
18	AC18	Pastéis de bacalhau	+++	-	NA	NA
19	AC19a	Açorda de Camarão (camarão)	+++	+++	<i>F. indicus</i>	99,7±0,1
	AC19b	Açorda de Camarão (Todo)	+++	+++		
20	AC20	Bacalhau à Brás Monissa (Todo)	+++	+	NA	NA
21	AC21	Bacalhau com Natas Gratinado (Todo)	+++	+	NA	NA
22	AC22a	Rissóis de Camarão (recheio)	+++	+	NA	NA
	AC22b	Rissóis de Camarão (Todo)	+++	-		
23	AC23a	Rissóis Camarão Forno (recheio)	+++	+	NA	NA
	AC23b	Rissóis Camarão Forno (Todo)	+++	-		
24	AC24	Pizza Ristorante mare (camarão)	+++	+++	<i>L. vannamei</i>	99,0±0,3
25	AC25a	Mini Rissóis Camarão (recheio)	+++	-	NA	NA
	AC25b	Mini Rissóis Camarão (inteira)	+++	+		

^a(+) amplificação positiva com banda ténue; (++) amplificação positiva com banda média; (+++) amplificação positiva com banda forte; (-) amplificação negativa; ^bValores médios ± desvio padrão (DP) das réplicas de cada amostra analisada em dois ensaios independentes. ^cNA – Não aplicável. ^dNão incluído em *cluster* de referência.

Relativamente às amostras nº 16 e 19, verificou-se que os dois tipos de extratos analisados de cada amostra foram agrupados no *cluster* da espécie *F. indicus* com níveis de confiança de $99,5\pm 0,2\%$ e $99,7\pm 0,1\%$, respetivamente, revelando a espécie incluída na produção dessas amostras, cuja informação não constava nos rótulos (Tabela 11).

No caso da amostra nº 17, quando analisadas as duas porções (camarão e amostra inteira), estas ficaram incluídas em *clusters* diferentes. O extrato obtido a partir do miolo de camarão (AC17a) foi agrupado no *cluster* da espécie de referência *F. indicus* com um nível de confiança $99,7\pm 0,1\%$, enquanto o extrato obtido a partir da amostra inteira (AC17b) foi incluído num *cluster* distinto, diferente de todas as espécies usadas como referência (Tabela 11). Tal dever-se-á provavelmente ao facto de a amostra completa conter, para além do miolo de camarão, outros ingredientes na sua lista como água de camarão que é composta por 13% de camarão, sugerindo a existência de uma mistura de espécies na amostra, que levou a que os extratos fossem incluídos em *clusters* distintos.

É de realçar que o Regulamento (UE) Nº 1379/2013 contém um artigo que determina que os “crustáceos, mesmo sem casca, vivos, frescos, refrigerados, congelados, secos, salgados ou em salmoura; crustáceos com casca, cozidos em água ou vapor, mesmo refrigerados, congelados, secos, salgados ou em salmoura; farinhas, pó e *pellets* de crustáceos, próprios para alimentação humana” só podem ser comercializados se o rótulo indicar, entre outras informações, o nome científico da espécie. Porém, apenas uma (amostra nº 7), das 25 amostras comerciais adquiridas, indicava essa informação no rótulo. O facto de este regulamento não indicar de forma explícita se os alimentos, que incluem crustáceos como ingredientes nas formas indicadas no regulamento, necessitam de indicar o nome científico da espécie, poderá levar a diferentes interpretações. Algumas das amostras podem também não conter esta informação, devido ao regulamento permitir que os produtos rotulados antes de dia 13 de Dezembro de 2014 que não satisfaçam este artigo sejam comercializados até ao seu esgotamento.

Em resumo, a técnica de PCR em tempo real acoplada à análise de HRM desenvolvida neste trabalho permitiu identificar de forma eficaz espécies de camarão em amostras comerciais. Este estudo permitiu verificar também que a análise de HRM não é afetada pela matriz desde que a amostra a analisar não contenha uma mistura de espécies de camarão.

7.4 PCR sequenciação

Com o objetivo de validar as espécies de camarão da família Penaeidae utilizadas como referências (C1-C5) para a diferenciação e identificação de espécies e para complementar os resultados obtidos através da PCR em tempo real acoplada à análise de HRM, procedeu-se à sequenciação dos produtos de PCR das 5 espécies de camarão (Figuras 41-44) e de uma amostra comercial (nº 17) (Figura 45) que suscitou dúvidas no resultado de HRM obtido.

Inicialmente a sequenciação foi realizada com os *primers* CRUST1-F/CRUST2-R com alvo numa região COI com 556 pb, porém estes *primers* apenas permitiram amplificar e sequenciar as espécies *Penaeus monodon* (C1) e *Litopenaeus vannamei* (C4). Os eletroferogramas obtidos para as espécies C1 (Figura 41) e C4 (Figura 42) apresentaram elevada resolução, possibilitando a sequenciação de 549 pb da região alvo em ambas as sequências, onde apenas se eliminaram algumas bases nas regiões iniciais e finais que apresentavam menor resolução. Nas Figuras 41 e 42 podem-se observar as diferenças entre as espécies C1 e C4 sequenciadas e as respectivas sequências consenso da base de dados do NCBI utilizadas para o desenho dos *primers*. A sequência obtida para a espécie C1 mostrou 38 diferenças relativamente à sequência consenso

```

P. monodon KM528138.1 G C T T G A G C A G G A A T A G T A G G T A C A G C T C T T A G T C T T A T T A T T C G T G C T G A A T T A G G T C A A
Amostra C1          . . . . . G C T . . . . . C . . . . .
P. monodon KM528138.1 C C A G G A A G C C T T A T T G G A G A T G A T C A A A T T T A C A A T G T A G T G G T T A C A G C T C A C G C T T T C
Amostra C1          . . . . . C . . . . . A . . . . .
P. monodon KM528138.1 G T T A T A A T T T T T T A T A G T T A T A C C T A T T A T G A T T G G A G G T T T T G G A A A T T G A C T T G T C
Amostra C1          . . . . . C . . . . . G . . . . . A . . . . . C . . G . . . G . . . . .
P. monodon KM528138.1 C C T T T A A T A T T A G G C G C C C C A G A T A T A G C A T T T C C C C G A A T A A A T A A T A T A A G T T T C T G A
Amostra C1          . . . . . G . . . . . T . . T . . . . . G . . . . .
P. monodon KM528138.1 C T T T T A C C A C C T T C A T T G A C T T T A C T T T T G T C T A G A G G T A T A G T T G A A A G A G G A G T T G G A
Amostra C1          . . . . . C . . . . . G C . A . . . . . A . . . . . C . . . . . G . . . .
P. monodon KM528138.1 A C T G G A T G A A C A G T A T A C C C T C C T T T G T C A G C C A G A A T T G C T C A T G C A G G T G C T T C A G T T
Amostra C1          . . . . . A . . . . . A . . . . . C . . . . .
P. monodon KM528138.1 G A C C T A G G T A T T T T T T C A T T G C A C T T A G C A G G G T T T C A T C A A T C T T A G G T G C T G T A A A C
Amostra C1          . . T . . . . . A . . T . . . . . C . . . . . A . . . . .
P. monodon KM528138.1 T T T A T A A C G A C C G T T A T C A A T A T A C G A T C G A C A G G A A T A A C T A T A G A C C G A A T A C C A C T T
Amostra C1          . . . . . T . . . . . G . . . . .
P. monodon KM528138.1 T T T G T T T G A G C A G T G T T T A T T A C A G C C C T A C T T C T A T T A C T A T C T T T A C C A G T C C T A G C A
Amostra C1          . . . . . A . . . . . T . . . . . C . G T W . . . . .
P. monodon KM528138.1 G G A G C T A T T
Amostra C1          . . . . .

```

Figura 41 - Alinhamento da sequência obtida por amplificação com os *primers* CRUST1-F/ CRUST2-R para a espécie C1 (*Penaeus monodon*) com a sequência consenso da base de dados do NCBI (KM528138.1) utilizada para o desenho dos *primers*.

```

L. vannamei KJ679916.1 G C T T G A G C T G G A A T A G T A G G T A C C G C T C T T A G A C T T A T T A T C C G A G C T G A A T T A G G T C A A
Amostra C4          . . . . . G . C . . . . .
L. vannamei KJ679916.1 C C T G G G A G C C T C A T T G G G G A T G A T C A A A T T T A T A A C G T A G T T G T C A C A G C T C A C G C T T T T
Amostra C4          . . . . .
L. vannamei KJ679916.1 G T A A T A A T T T T T T T A T A G T T A T A C C A A T T A T A A T T G G A G G A T T T G G T A A T T G A C T A G T A
Amostra C4          . . . . .
L. vannamei KJ679916.1 C C T T T A A T G T T A G G T G C T C C A G A T A T A G C C T T C C C T C G A A T G A A T A A T A A A G C T T C T G A
Amostra C4          . . . . . C . . . . . G
L. vannamei KJ679916.1 T T A T T A C C T C C T T C T C T C A C A T T G C T T T T A T C A A G A G G A A T G G T T G A A A G A G G T G T C G G A
Amostra C4          . . . . . T . . . . .
L. vannamei KJ679916.1 A C C G G A T G A A C G G T A T A C C C T C C T T T A T C T G C C A G T A T T G C T C A C G C T G G A G C T T C A G T A
Amostra C4          . . . . .
L. vannamei KJ679916.1 G A T C T T G G A A T T T T C T C T C T T C A C T T A G C T G G G G T A T C T T C T A T T C T G G G A G C A G T A A A C
Amostra C4          . . . . . A . . . . .
L. vannamei KJ679916.1 T T T A T A A C A A C T G T A A T C A A T A T A C G A T C T A C A G G A A T A A C T A T A G A C C G T A T A C C T C T A
Amostra C4          . . . . .
L. vannamei KJ679916.1 T T T G T A T G A G C A G T A T T T A T C A C T G C T T T A T T A C T A C T T T T A T C A T T A C C A G T C T T A G C A
Amostra C4          . . . . .
L. vannamei KJ679916.1 G G A G C T A T T
Amostra C4          . . . . .

```

Figura 42 - Alinhamento da sequência obtida por amplificação com os *primers* CRUST1-F/ CRUST2-R para a espécie C4 (*Litopenaeus vannamei*) com a sequência consenso da base de dados do NCBI (KJ679916.1) utilizada para o desenho dos *primers*.

(KM528138.1), o que equivale a 93% de semelhança. Contudo, após realizar uma pesquisa BLAST, verificou-se que a base de dados continha 11 sequências da espécie *P. monodon* que apresentavam 99% de semelhança com a sequência obtida, o que sugere que a sequência KM528138.1 apresenta alguns erros de sequenciação. Em relação aos resultados da sequenciação da espécie C4, verificou-se a existência de apenas 6 diferenças relativamente à sequência consenso da base de dados NCBI utilizada para o desenho dos *primers* (KJ679916.1), constatando-se uma semelhança entre sequências de 99%.

Posteriormente, de forma a conseguir sequenciar as restantes espécies e amostra (C2, C3, C5, AC17a e AC17b) foram desenhados novos *primers* para sequenciação (CRUST3-F/CRUST3-R), com alvo numa região COI de 316 pb. O eletroferograma obtido para a espécie C2 apresentou elevada resolução, permitindo a sequenciação de 315 pb da região alvo, cujo resultado pode ser observado na Figura 43. A sequência determinada para a amostra C2 apresentou 97% de semelhança com a sequência consenso da base de dados NCBI utilizada para o desenho dos *primers* (KF604889.1), ou seja, 9 diferenças. Porém, a base de dados NCBI contém 8 sequências desta espécie que apresentam 99% de semelhança com a sequência obtida para a espécie C2.

```

F. indicus KF604889.1 TGGGGGATTTGGAAATTGACTAGTACCTTTAATGTTAGGTGCTCCTGATATAGCTTTTCC
Amostra C2      . . . A . . . . . T . . . . .

F. indicus KF604889.1 ACGAATAAACAAATATGAGTTTCTGGCTACTACCTCCTTCACTGACACTACTTCTTTCTAG
Amostra C2      . . . . . C . . . . . A . . . . .

F. indicus KF604889.1 AGGTATAGTTGAAAGAGGAGTAGGAACAGGATGAACTGTTTACCCCTTTTATCAGCCAG
Amostra C2      . . . . . T . . . . .

F. indicus KF604889.1 TATTGCTCACGCTGGGGCTTTCGGTAGATTTAGGAATTTTCTCTCTGCACCTTGGCAGGTGT
Amostra C2      . . . . . T . . . . . A . . . . .

F. indicus KF604889.1 TTCTTCAATTTTAGGAGCTGTAAATTTTATGACAACCTGTTATTAACATACGATCTACGGG
Amostra C2      . . . . . A . . . . .

F. indicus KF604889.1 GATAACTATAGACCG
Amostra C2      A . . . . .

```

Figura 43 - Alinhamento da sequência obtida por amplificação com os *primers* CRUST3-F/ CRUST3-R para a espécie C2 (*Fenneropenaeus indicus*) com a sequência consenso da base de dados do NCBI (KF604889.1) utilizada para o desenho dos *primers*.

Os *primers* CRUST3-F/CRUST3-R permitiram amplificar a espécie C3, contudo após observação dos eletroferogramas verificou-se que estes apresentavam baixa resolução, não se podendo retirar deles uma informação fiável, suspeitando-se da existência de mistura de espécies nesta amostra. Dados estes resultados, mais tarde procedeu-se à aquisição de uma nova amostra de camarão rotulada como sendo também *Metapenaeus affinis* e à sua sequenciação para garantir a sua autenticidade e para ser posteriormente utilizada como referência para a análise de HRM. Após sequenciação com os *primers* CRUST3-F/CRUST3-R, verificou-se que esta nova amostra tinha uma semelhança com a sequência consenso da base de dados NCBI utilizada para o desenho de *primers* de 98%, porém apresentava também a mesma percentagem de semelhança com sequências das espécies *Metapenaeus monoceros* e *Metapenaeus ensis* presente na mesma base de dados, sendo este resultado inconclusivo.

Relativamente à sequenciação da espécie C5, os resultados podem ser vistos na Figura 44. Para esta espécie foi possível realizar a sequenciação de 314 dos 316 pb da região alvo com elevada resolução, verificando-se a presença de 5 diferenças (98% de semelhança) relativamente à sequência consenso na base de dados NCBI utilizada para o desenho dos *primers* (KC789253.1). Contudo, constatou-se a existência de 53 sequências depositadas nessa mesma base de dados com 99% de semelhança com a sequência obtida para este espécime C5.

Na Figura 45, podem-se observar as sequências obtidas para os extratos AC17a e AC17b utilizando *primers* CRUST3-F/CRUST3-R. Através de uma pesquisa BLAST verificou-se que a sequência obtida para o extrato AC17a apresentou 99% de semelhança com 42 sequências presentes na base de dados NCBI identificadas como sendo da espécie *F. indicus*, o que confirma o resultado obtido por análise de HRM. Já no caso do extrato AC17b, a sequência obtida apresentou 99% de semelhanças com 5 sequências da

espécie *Penaeus semisulcatus*, o que justifica que estes extratos apesar de pertencerem à mesma amostra não tenham sido incluídos no mesmo *cluster*.

```

M. kerathurus KC789253.1 TGGAGGATTTGGAAATTGACTAGTCCCTTTAATATTAGGTGCCCTGATATAGCTTTCCC
Amostra C5                .....T.....
M. kerathurus KC789253.1 ACGAATAAATAATATAAGTTTTTGGCTTTTACCCCATCTCTTACTTTACTTTGTCTAG
Amostra C5                .....
M. kerathurus KC789253.1 TGGAAATAGTTGAAAGTGGAGTAGGAACAGGATGAACAGTCTACCCCTCCCTTATCAGCTGG
Amostra C5                A.....A.....A..
M. kerathurus KC789253.1 AATCGCGCATGCGGGAGCTTTCGGTAGATTTAGGGATTTTTTCTTTGCATTTAGCAGGGGT
Amostra C5                .....A..
M. kerathurus KC789253.1 CTCATCAATCTTTGGGTGCTGTTAACTTTATAACAACCGTAATTAATATACGATCTACAGG
Amostra C5                .....
M. kerathurus KC789253.1 AATGACTATAGACCG
Amostra C5                .....

```

Figura 44 - Alinhamento da sequência obtida por amplificação com os *primers* CRUST3-F/ CRUST3-R para a espécie C5 (*Melicertus kerathurus*) com a sequência consenso da base de dados do NCBI (KC789253.1) utilizada para o desenho dos *primers*.

```

(A) F. indicus HM214663.1 TGGAGGATTTGGAAATTGACTAGTACCTTTAATGTTAGGTGCTCCTGATATGGCTTTTCC
AC17a                .....T.....
F. indicus HM214663.1 ACGAATAAACAATATGAGTTTCTGGCTCCTACCTCCTTCACTAACACTACTTCTTTCTAG
AC17a                .....
F. indicus HM214663.1 AGGTATAGTTGAAAGAGGAGTAGGAACAGGATGAACAGTCTTACCTCCTTTATCAGCCAG
AC17a                .....
F. indicus HM214663.1 TATTGCTCATGCTGGGGCTTTCGGTAGATTTAGGAATTTTTCTCCCTACACTTGGCAGGTGT
AC17a                .....
F. indicus HM214663.1 TTCCTTCAATTTTAGGAGCTGTAATTTTATGACAACCTGTTATTAACATACGATCTACGGG
AC17a                .....A..
F. indicus HM214663.1 AATAACTATAGACCG
AC17a                .....C.....

(B) P. semisulcatus KM528140.1 TGGAGGATTTGGTAACTGACTAGTTCCCTCTAATATTAGGAGCTCCAGATATAGCTTTCCC
AC17b                .....T.....
P. semisulcatus KM528140.1 TCGTATAAATAATATAAGCTTCTGGCTTTTACCTCCTTCACTAACCTTACTTTTATCTAG
AC17b                .....
P. semisulcatus KM528140.1 AGGTATAGTAGAAAGAGGAGTAGGAACAGGTTGAACAGTATACCCCTCCTTTATCTGCCAG
AC17b                .....
P. semisulcatus KM528140.1 AATTGCTCACGCAGGTGCTTCAGTAGACTTAGGGATCTTCTCACTTCATCTAGCAGGTGT
AC17b                .....
P. semisulcatus KM528140.1 ATCATCTATTTTAGGAGCCGTAATTTTATAACAACCGTTATTAATATACGATCTACTGG
AC17b                .....A..
P. semisulcatus KM528140.1 AATAACTATAGACCG
AC17b                .....

```

Figura 45 - Alinhamento da sequência obtida por amplificação com os *primers* CRUST3-F/ CRUST3-R para os extratos da amostra nº 17, AC17a (A) e AC17b (B) com uma das sequências da base de dados do NCBI com 99% de semelhança (KM528140.1).

Assim, a sequenciação confirmou que as espécies indicadas nos rótulos das amostras que foram utilizadas como espécies de referência neste estudo estavam corretas, à exceção da amostra C3 que indicava ser da espécie *Metapenaeus affinis*. Adicionalmente, permitiu comprovar e justificar os resultados obtidos pela análise de HRM para os extratos da amostra nº 17 (AC17a e AC17b).

8 Conclusão

Os camarões da família Penaeidae, como é o caso das espécies utilizadas neste estudo, são um alimento bastante apreciado e consumido nos países mediterrânicos, incluindo Portugal. Algumas das espécies dessa família, nomeadamente *Penaeus monodon* e *Litopenaeus vannamei*, possuem um elevado valor comercial que, associado a uma difícil identificação morfológica pelas semelhanças fenotípicas que existem entre as espécies, leva a que este tipo de alimento seja frequentemente alvo de adulteração.

Uma vez que as adulterações alimentares se tornaram uma prática corrente por parte de alguns produtores alimentares para obterem um maior ganho económico, foi criado um regulamento na UE (Regulamento (UE) N° 1379/2013) que proíbe a substituição não declarada de produtos de pesca e aquacultura e determina que os crustáceos só podem ser comercializados se o rótulo indicar o nome científico da espécie comercializada, entre outras informações.

Para averiguar o cumprimento da legislação e avaliar a autenticidade dos alimentos contendo crustáceos foram desenvolvidas diversas técnicas baseadas na análise de proteínas, porém estas nem sempre demonstraram serem eficazes na análise de algumas matrizes, nomeadamente as sujeitas a processamentos térmicos. As dificuldades sentidas na identificação de espécies através da análise de proteínas foram mais tarde ultrapassadas pelo desenvolvimento de técnicas baseadas em marcadores de DNA, verificando-se que a identificação de espécies através do DNA apresenta maior especificidade, sensibilidade e permite obter melhores resultados em amostras submetidas a vários tipos de processamento.

Assim, o presente estudo levou ao desenvolvimento de metodologias moleculares baseadas nas técnicas de PCR qualitativa e PCR em tempo real acoplada a análise de HRM para a diferenciação de espécies de camarão da família Penaeidae e a identificação dessas espécies em amostras comerciais. Para este trabalho foram selecionadas 5 espécies de camarão da família Penaeidae, nomeadamente, *P. monodon*, *F. indicus*, *M. affinis*, *L. vannamei* e *M. kerathurus* e para a sua diferenciação foram desenhados *primers* para uma região do gene mitocondrial COI, considerado um *DNA barcode*.

Através da amplificação do gene COI por PCR qualitativa, concluiu-se que os *primers* CRUST2-F/CRUST2-R conseguiram amplificar todas as espécies de camarão selecionadas, apresentando menor reatividade cruzada do que os *primers* CRUST1-F/CRUST1-R. Por outro lado, também se constatou que o uso de RNase na extração do DNA das amostras influenciou, em geral, positivamente a amplificação da região COI.

A técnica de PCR em tempo real acoplada a uma análise de HRM com alvo na região COI foi desenvolvida com sucesso, permitindo a diferenciação das cinco espécies de camarão pertencentes à família Penaeidae e das amostras que apresentavam reatividade cruzada com elevados níveis de confiança, demonstrando ser uma metodologia eficaz para a diferenciação de espécies em matrizes complexas e processadas. Ao contrário do resultado obtido na PCR qualitativa, concluiu-se que na PCR em tempo real o uso de RNase nos extratos favorece a amplificação da região COI. Esta técnica, quando aplicada em amostras comerciais, conseguiu também identificar de forma eficaz algumas das espécies de camarão selecionadas em amostras comerciais e detetar uma rotulagem não conforme. Assim, esta metodologia comprovou a eficácia da região COI na distinção de espécies de camarão da família Penaeidae. Este estudo permitiu também concluir que a análise de HRM não é afetada pela matriz da amostra, desde que a amostra a analisar não contenha uma mistura de espécies de camarão.

De forma a confirmar a identidade dos espécimes de camarão selecionados para este estudo e comprovar os resultados da análise de HRM de uma amostra comercial, procedeu-se à sequenciação. Os resultados confirmaram que todas as amostras de camarão selecionadas da família Penaeidae correspondiam à espécie indicada no rótulo, exceto a amostra C3 que não estava conforme a rotulagem e que suscitou dúvidas na sua identidade. No caso de uma amostra comercial, que suscitou dúvidas nas espécies identificadas por análise de HRM, os resultados da sequenciação foram concordantes confirmando essas espécies. Os resultados das sequenciações dos espécimes de camarão selecionados demonstraram também a existência de alguns erros nas sequências depositadas na base de dados do NCBI.

A metodologia desenvolvida para a diferenciação de espécies de camarão e a sua identificação em amostras comerciais demonstrou elevada fiabilidade, sendo possível concluir que através deste estudo foi construída uma ferramenta de análise útil e eficaz para a deteção de adulterações em produtos contendo camarão.

Como perspetiva futura e de forma a complementar este trabalho seria interessante avaliar o limite de deteção da metodologia desenvolvida, bem como outros parâmetros de desempenho da metodologia para potencial análise quantitativa.

9 Referências bibliográficas

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Watson, J. D. (1994). The Fragmentation, Separation, and Sequencing of DNA Molecules. In *Molecular Biology of the Cell* 3rd ed. New York: Garland Science.
- ALLERGEN, official site for the systematic allergen nomenclature. (Acedido em 20 Janeiro 2016). Disponível em: <http://www.allergen.org/>.
- Almeida, M. M. d., Prates, S., Pargana, E., Arêde, C., Godinho, N., Tavares, C., Martins, P., Rosa, E., Pires, G., Gaspar, Â., & Pinto, J. R. (1999). Alergia alimentar em crianças numa consulta de imunoalergologia. *Revista Portuguesa de Imunoalergologia*, 7(3), 167-171.
- An, H., Marshall, M. R., Otwell, W. S., & Wei, C. I. (1988). Electrophoretic Identification of Raw and Cooked Shrimp using Various Protein Extraction Systems. *Journal of Food Science*, 53(2), 313-318.
- Ayuso, R., Grishina, G., Bardina, L., Carrillo, T., Blanco, C., Ibanez, M. D., Sampson, H. A., & Beyer, K. (2008). Myosin light chain is a novel shrimp allergen, Lit v 3. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 122(4), 795-802.
- Barrento, S., Marques, A., Teixeira, B., Mendes, R., Bandarra, N., Vaz-Pires, P., & Nunes, M. L. (2010). Chemical composition, cholesterol, fatty acid and amino acid in two populations of brown crab *Cancer pagurus*: Ecological and human health implications. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(7), 716-725.
- Barrento, S., Marques, A., Teixeira, B., Vaz-Pires, P., & Nunes, M. L. (2009). Nutritional Quality of the Edible Tissues of European Lobster *Homarus gammarus* and American Lobster *Homarus americanus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(9), 3645-3652.
- Bauermeister, K., Wangorsch, A., Garoffo, L. P., Reuter, A., Conti, A., Taylor, S. L., Lidholm, J., DeWitt, A. M., Enrique, E., Vieths, S., Holzhauser, T., Ballmer-Weber, B., & Reese, G. (2011). Generation of a comprehensive panel of crustacean allergens from the North Sea Shrimp *Crangon crangon*. *Mol Immunol*, 48(15), 1983-1992.
- Bio-Rad.(2006). Real Time PCR Applications Guide. (Acedido em 2 Fevereiro 2016). Disponível em: http://www.biorad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_5279.pdf.
- Bottero, M. T., & Dalmaso, A. (2011). Animal species identification in food products: Evolution of biomolecular methods. *Veterinary Journal*, 190(1), 34-38.
- Boyce, J. A., Assa'a, A., Burks, A. W., Jones, S. M., Sampson, H. A., Wood, R. A., Plaut, M., Cooper, S. F., Fenton, M. J., Arshad, S. H., Bahna, S. L., Beck, L. A., Byrd-Bredbenner, C., Camargo Jr, C. A., Eichenfield, L., Furuta, G. T., Hanifin, J. M., Jones, C., Kraft, M., Levy, B. D., Lieberman, P., Luccioli, S., McCall, K. M., Schneider, L. C., Simon, R. A., Simons, F. E. R., Teach, S. J., Yawn, B. P., & Schwaninger, J. M. (2011). Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States: Summary of the NIAID-Sponsored Expert Panel Report. *Nutrition*, 27(2), 253-267.

- Burney, P., Summers, C., Chinn, S., Hooper, R., van Ree, R., & Lidholm, J. (2010). Prevalence and distribution of sensitization to foods in the European Community Respiratory Health Survey: a EuroPrevall analysis. *Allergy*, 65(9), 1182-1188.
- Carrapatoso, I. (2004). Grupos de alimentos com maior reactividade cruzada: artigo de revisão. *Revista Portuguesa de Imunoalergologia*, XII, 103-113.
- Carrera, M., Cañas, B., & Gallardo, J. M. (2013). Proteomics for the assessment of quality and safety of fishery products. *Food Research International*, 54(1), 972-979.
- Chan, T. Y. (1998). *The Living Marine Resources Of The Western Central Pacific*. Rome: FAO. Available from: <http://www.fao.org/docrep/009/w7192e/w7192e00.htm>.
- Chen, D.-W., Zhang, M., & Shrestha, S. (2007). Compositional characteristics and nutritional quality of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). *Food Chemistry*, 103(4), 1343-1349.
- Costa, J., Mafra, I., & Oliveira, M. B. P. P. (2012a). High resolution melting analysis as a new approach to detect almond DNA encoding for Pru du 5 allergen in foods. *Food Chemistry*, 133(3), 1062-1069.
- Costa, J., Oliveira, M. B. P. P., & Mafra, I. (2012b). Alergénios Alimentares: o que são, o que provocam e como detectá-los? *Boletim da Sociedade Portuguesa de Química*, 127(II), 33-38.
- Costa, J., Oliveira, M. B. P. P., & Mafra, I. (2013). Effect of thermal processing on the performance of the novel single-tube nested real-time PCR for the detection of walnut allergens in sponge cakes. *Food Research International*, 54, 1722-1729.
- Couto, M., Coimbra, A., Silva, D., Santos, N., Pereira, A., & Plácido, J. L. (2013). Food allergy in adults: the experience of a center in the north of Portugal. *Clinical and Translational Allergy*, 3(Suppl 3), P66-P66.
- Druml, B., & Cichna-Markl, M. (2014). High resolution melting (HRM) analysis of DNA – Its role and potential in food analysis. *Food Chemistry*, 158, 245-254.
- EFSA. (2014). Scientific Opinion on the evaluation of allergenic foods and food ingredients for labelling purposes. *EFSA Journal*, 12(11), 1-286.
- Eisheid, A. C. (2016). Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection of lobster, a crustacean shellfish allergen. *Food Control*, 59, 393-399.
- Eisheid, A. C., Kim, B. H., & Kasko, S. M. (2013). Two Quantitative Real-Time PCR Assays for the Detection of Penaeid Shrimp and Blue Crab, Crustacean Shellfish Allergens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(24), 5669-5674.
- FAO (2014a). *FAO yearbook. Fishery and Aquaculture Statistics. 2012*. Rome. (Acedido em 3 Dezembro 2014). Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-i3740t.pdf>.
- FAO (2014b). Global Production Statistics 1950-2014. (Acedido em 12 Abril 2016). Disponível em: http://www.fao.org/figis/servlet/SQServlet?file=/work/FIGIS/prod/webapps/figis/temp/hqp_5971354037083027276.xml&outtype=html.

- FAOSTAT, Food and Agriculture Organization of the United Nations - Statistics Division. (Acedido em 20 Abril 2016). Disponível em: <http://faostat.fao.org/>.
- Fernandes, T. J. R., Costa, J., Oliveira, M., & Mafra, I. (2015). An overview on fish and shellfish allergens and current methods of detection. *Food and Agricultural Immunology*, 26(6), 848-869.
- Fuller, H. R., Goodwin, P. R., & Morris, G. E. (2006). An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the major crustacean allergen, tropomyosin, in food. *Food and Agricultural Immunology*, 17(1), 43-52.
- Galimberti, A., De Mattia, F., Losa, A., Bruni, I., Federici, S., Casiraghi, M., Martellos, S., & Labra, M. (2013). DNA barcoding as a new tool for food traceability. *Food Research International*, 50(1), 55-63.
- Gallardo, J. M., Ortea, I., & Carrera, M. (2013). Proteomics and its applications for food authentication and food-technology research. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 52, 135-141.
- Guerra, A. L., Lima, A. V. B., Taddei, F. G., & Castiglioni, L. (2010). Genetic polymorphism, molecular characterization and relatedness of Macrobrachium species (Palaemonidae) based on RAPD-PCR. *Genetics and Molecular Research*, 9(4), 2317-2327.
- Haye, P. A., Segovia, N. I., Vera, R., Gallardo, M. D., & Gallardo-Escarate, C. (2012). Authentication of commercialized crab-meat in Chile using DNA Barcoding. *Food Control*, 25(1), 239-244.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & deWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270(1512), 313-321.
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., & Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6, 986-94.
- Hellberg, R. S. R., & Morrissey, M. T. (2011). Advances in DNA-Based Techniques for the Detection of Seafood Species Substitution on the Commercial Market. *Jala*, 16(4), 308-321.
- Hengel, A. J. v. (2010). Introduction. In *Food Allergens*, (pp. 1-11). Boca Raton: CRC Press.
- Hickman, C. P., Roberts, L. S., Keen, S. L., Eisenhour, D. J., Larson, A., & l'Anson, H. (2011). Crustaceans. In *Integrated Principles of Zoology* 15th ed., (pp. 421-443). New York: McGraw-Hill.
- Hualkasin, W., Sirimontaporn, P., Chotigeat, W., Querci, J., & Phongdara, A. (2003). Molecular phylogenetic analysis of white prawns species and the existence of two clades in *Penaeus merguensis*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 296(1), 1-11.
- Iannone, E. (2014). Biochemical Assays and Sequencing Techniques. In *Labs on Chip*, (pp. 183-276). Boca Raton: CRC Press.

- ITIS, the Integrated Taxonomic Information System. (Acedido em 20 Agosto 2016). Disponível em: <http://www.itis.gov/>.
- Jin, Y. L., Li, Q., Kong, L. F., Yu, H., & Zhong, X. X. (2015). High-resolution melting (HRM) analysis: a highly sensitive alternative for the identification of commercially important *Crassostrea* oysters. *Journal of Molluscan Studies*, 81, 167-170.
- Jonah, P. M., Bello, L. L., Lucky, O., Midau, A., & Moruppa, S. M. (2011). Review : The Importance of Molecular Markers in Plant Breeding Programmes. *Global Journal of Science Frontier Research*, 11(5), 4-12.
- Jory, D., & Cabrera, T. (2012). Marine Shrimp. In J. S. Lucas & P. C. Southgate (Eds.), *Aquaculture: Farming aquatic animals and plants 2nd ed.*, (pp. 476-512). Chichester: Blackwell Publishing.
- Kalyanasundaram, A., & Santiago, T. C. (2015). Identification and characterization of new allergen troponin C (Pen m 6.0101) from Indian black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *European Food Research and Technology*, 240(3), 509-515.
- Khamnamtong, B., Klinbunga, S., & Menasveta, P. (2005). Species identification of five penaeid shrimps using PCR-RFLP and SSCP analyses of 16S ribosomal DNA. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 38(4), 491-499.
- Kobayashi, T., Takagi, T., Konishi, K., & Cox, J. A. (1989). Amino-acid sequence of crayfish troponin-I. *Journal of Biological Chemistry*, 264(3), 1551-1557.
- Koizumi, D., Shiota, K., Akita, R., Oda, H., & Akiyama, H. (2014). Development and validation of a lateral flow assay for the detection of crustacean protein in processed foods. *Food Chemistry*, 150(0), 348-352.
- Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Ståhlberg, A., & Zoric, N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(2-3), 95-125.
- Leung, N. Y. H., Wai, C. Y. Y., Shu, S. A., Wang, J. J., Kenny, T. P., Chu, K. H., & Leung, P. S. C. (2014). Current Immunological and Molecular Biological Perspectives on Seafood Allergy: A Comprehensive Review. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 46(3), 180-197.
- Life technologies (2012). *Real-time PCR handbook*. (Acedido em 20 Fevereiro 2016). Disponível em: <http://www.gene-quantification.com/real-time-pcr-handbook-life-technologies-update-flr.pdf>.
- Liu, Z. J., & Cordes, J. F. (2004). DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*, 238(1-4), 1-37.
- Lopata, A. L., O'Hehir, R. E., & Lehrer, S. B. (2010). Shellfish allergy. *Clinical and Experimental Allergy*, 40(6), 850-858.
- Lorenz, A. R., Scheurer, S., & Vieths, S. (2015). Food allergens: molecular and immunological aspects, allergen databases and cross-reactivity. *Chemical Immunology and Allergy*, 101, 18-29.

- Martin, J. W., & Davis, G. E. (2001). *An Updated Classification of the Recent Crustacea* Los Angeles, California: Natural History Museum of Los Angeles County.
- Meruane, J., Takagi, M., & Taniguchi, N. (1997). Species identification and polymorphisms using RAPD-PCR in penaeid prawns *Penaeus japonicus* and *Metapenaeus ensis*. *Fisheries Science*, 63(1), 149-150.
- Moltschaniwskyj, N. A. (2005). Edible Shellfish. In *Handbook of Food Science, Technology, and Engineering - 4 Volume Set*. Boca Raton: CRC Press.
- Muraro, A., Werfel, T., Hoffmann-Sommergruber, K., Roberts, G., Beyer, K., Bindsløv-Jensen, C., Cardona, V., Dubois, A., duToit, G., Eigenmann, P., Rivas, M. F., Halken, S., Hickstein, L., Host, A., Knol, E., Lack, G., Marchisotto, M. J., Niggemann, B., Nwaru, B. I., Papadopoulos, N. G., Poulsen, L. K., Santos, A. F., Skypala, I., Schoepfer, A., Van Ree, R., Venter, C., Worm, M., Vlieg-Boerstra, B., Panesar, S., de Silva, D., Soares-Weiser, K., Sheikh, A., Ballmer-Weber, B. K., Nilsson, C., de Jong, N. W., Akdis, C. A., & Anaphylaxis, E. F. A. (2014). EAACI Food Allergy and Anaphylaxis Guidelines: diagnosis and management of food allergy. *Allergy*, 69(8), 1008-1025.
- Nagalakshmi, K., Annam, P.-K., Venkateswarlu, G., Pathakota, G.-B., & Lakra, W. S. (2016). Mislabeling in Indian seafood: An investigation using DNA barcoding. *Food Control*, 59, 196-200.
- Navarro, E., Serrano-Heras, G., Castano, M. J., & Solera, J. (2015). Real-time PCR detection chemistry. *Clinica Chimica Acta*, 439, 231-250.
- Nicolè, S., Negrisolo, E., Eccher, G., Mantovani, R., Patarnello, T., Erickson, D. L., Kress, W. J., & Barcaccia, G. (2012). DNA Barcoding as a Reliable Method for the Authentication of Commercial Seafood Products. *Food Technology and Biotechnology*, 50(4), 387-398.
- Noga, E. J., Hancock, A. L., & Bullis, R. A. (2012). Crustaceans. In G. A. Lewbart (Ed.), *Invertebrate Medicine* 2nd ed., (pp. 235-240) Chichester: Wiley-Blackwell.
- Ortea, I., Canas, B., Calo-Mata, P., Barros-Velazquez, J., & Gallardo, J. M. (2009). Arginine Kinase Peptide Mass Fingerprinting as a Proteomic Approach for Species Identification and Taxonomic Analysis of Commercially Relevant Shrimp Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(13), 5665-5672.
- Ortea, I., Cañas, B., Calo-Mata, P., Barros-Velázquez, J., & Gallardo, J. M. (2010). Identification of commercial prawn and shrimp species of food interest by native isoelectric focusing. *Food Chemistry*, 121(2), 569-574.
- Ortea, I., Canas, B., & Gallardo, J. M. (2009). Mass Spectrometry Characterization of Species-Specific Peptides from Arginine Kinase for the Identification of Commercially Relevant Shrimp Species. *Journal of Proteome Research*, 8(11), 5356-5362.
- Ortea, I., Canas, B., & Gallardo, J. M. (2011). Selected tandem mass spectrometry ion monitoring for the fast identification of seafood species. *Journal of Chromatography A*, 1218(28), 4445-4451.

- Ortea, I., Pascoal, A., Canas, B., Gallardo, J. M., Barros-Velazquez, J., & Calo-Mata, P. (2012). Food authentication of commercially-relevant shrimp and prawn species: From classical methods to Foodomics. *Electrophoresis*, 33(15), 2201-2211.
- Pascoal, A., Barros-Velazquez, J., Cepeda, A., Gallardo, J. M., & Calo-Mata, P. (2008a). Identification of shrimp species in raw and processed food products by means of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism method targeted to cytochrome b mitochondrial sequences. *Electrophoresis*, 29(15), 3220-3228.
- Pascoal, A., Barros-Velazquez, J., Cepeda, A., Gallardo, J. M., & Calo-Mata, P. (2008b). Survey of the authenticity of prawn and shrimp species in commercial food products by PCR-RFLP analysis of a 16S rRNA/tRNAVal mitochondrial region. *Food Chemistry*, 109(3), 638-646.
- Pascoal, A., Barros-Velázquez, J., Ortea, I., Cepeda, A., Gallardo, J. M., & Calo-Mata, P. (2011). Molecular identification of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*), the white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and the Indian white shrimp (*Fenneropenaeus indicus*) by PCR targeted to the 16S rRNA mtDNA. *Food Chemistry*, 125(4), 1457-1461.
- Pascoal, A., Ortea, I., Gallardo, J. M., Cañas, B., Barros-Velázquez, J., & Calo-Mata, P. (2012). Species identification of the Northern shrimp (*Pandalus borealis*) by polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism and proteomic analysis. *Analytical Biochemistry*, 421(1), 56-67.
- Pedrosa, M., Boyano-Martínez, T., García-Ara, C., & Quirce, S. (2014). Shellfish Allergy: a Comprehensive Review. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 1-14.
- Pereira, F., Carneiro, J., & Amorim, A. (2008). Identification of species with DNA-based technology: current progress and challenges. *Recent patents on DNA & gene sequences*, 2(3), 187-199.
- Poi-Wah, L., & Steve, L. T. (2010). Fish, Crustaceans and Mollusks. In *Food Allergens: Analysis Instrumentation and Methods*, (pp. 177-205). Boca Raton: CRC Press.
- Puyet, A., & Bautista, J. M. (2009). Detection of Adulterations. In *Handbook of Seafood and Seafood Products Analysis*, (pp. 687-712). Boca Raton: CRC Press.
- Rasmussen, R. S., & Morrissey, M. T. (2008). DNA-Based methods for the identification of commercial fish and seafood species. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 7(3), 280-295.
- Regulamento (UE) Nº. 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho de 25 de Outubro de 2011 relativo à prestação de informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios, que altera os Regulamentos (CE) nº 1924/2006 e (CE) nº 1925/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho e revoga as Directivas 87/250/CEE da Comissão, 90/496/CEE do Conselho, 1999/10/CE da Comissão, 2000/13/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, 2002/67/CE e 2008/5/CE da Comissão e o Regulamento (CE) nº 608/2004 da Comissão. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 304, 18-63.
- Regulamento (UE) Nº. 1379/2013 do Parlamento Europeu e do Conselho de 11 de dezembro de 2013 que estabelece a organização comum dos mercados dos

produtos da pesca e da aquicultura, altera os Regulamentos (CE) nº 1184/2006 e (CE) nº 1224/2009 do Conselho e revoga o Regulamento (CE) nº 104/2000 do Conselho. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 354, 1-21.

- Rodriguez-Lazaro, D., & Hernandez, M. (2013). Real-time PCR in Food Science: Introduction. *Current Issues in Molecular Biology*, 15(2), 25-37.
- Ruppert, E. E., & Barnes, R. D. (1994). *Crustaceans* (6th ed.). Philadelphia: Saunders College Publishing.
- Sakaridis, I., Ganopoulos, I., Argiriou, A., & Tsiftaris, A. (2013). High resolution melting analysis for quantitative detection of bovine milk in pure water buffalo mozzarella and other buffalo dairy products. *International Dairy Journal*, 28(1), 32-35.
- Shiomi, K., Sato, Y., Hamamoto, S., Mita, H., & Shimakura, K. (2008). Sarcoplasmic calcium-binding protein: identification as a new allergen of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *International Archives of Allergy and Immunology*, 146(2), 91-98.
- Somma, M. (2006). *Extraction and Purification of DNA*: European Commission, Joint Research Center. (Acedido em 4 Agosto 2016). Disponível em: <http://mbg.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/documentation.htm>.
- Somma, M., & Querci, M. (2006). *The Polymerase Chain Reaction (PCR)*: European Commission, Joint Research Center. (Acedido em 20 Setembro 2015). Disponível em: <http://mbg.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/documentation.htm>.
- Sriket, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., & Kijroongrojana, K. (2007). Comparative studies on chemical composition and thermal properties of black tiger shrimp - (*Penaeus monodon*) and white shrimp (*Penaeus vannamei*) meats. *Food Chemistry*, 103(4), 1199-1207.
- Steve, L. T., & Susan, L. H. (2005). Introduction to Food Allergy. In *Nutraceutical Proteins and Peptides in Health and Disease*, (pp. 393-410). Boca Raton: CRC Press.
- Taylor, S., Scott, R., Kurtz, R., Fisher, C., & Patel, V. A. (2010). *Practical Guide to High Resolution Melt Analysis Genotyping*. (Acedido em 12 Agosto 2016). Disponível em: http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6004.pdf.
- Teletchea, F. (2009). Molecular identification methods of fish species: reassessment and possible applications. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 19(3), 265-293.
- Teletchea, F., Maudet, C., & Hänni, C. (2005). Food and forensic molecular identification: update and challenges. *Trends in Biotechnology*, 23(7), 359-366.
- van Dijk, E. L., Auger, H., Jaszczyszyn, Y., & Thermes, C. (2014). Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends in Genetics*, 30(9), 418-426.
- van Ruth, S. M., Bremer, M. G. E. G., & Frankhuizen, R. (2010). Detection of Adulterations. In *Safety Analysis of Foods of Animal Origin*, (pp. 851-863). Boca Raton: CRC Press.

- Vartak, V. R., Narasimmalu, R., Annam, P. K., Singh, D. P., & Lakra, W. S. (2015). DNA barcoding detected improper labelling and supersession of crab food served by restaurants in India. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(2), 359-366.
- Vaseeharan, B., Rajakamaran, P., Jayaseelan, D., & Vincent, A. Y. (2013). Molecular markers and their application in genetic diversity of penaeid shrimp. *Aquaculture International*, 21(2), 219-241.
- Villa, C., Costa, J., Oliveira, M. B. P. P., Mafra, I. (2016). Novel quantitative real-time PCR approach to determine safflower (*Carthamus tinctorius*) adulteration in saffron (*Crocus sativus*) (submetido).
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., & Kuiper, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23(21), 4407-4414.
- Wang, Z. Y., Tsoi, K. H., & Chu, K. H. (2004). Applications of AFLP technology in genetic and phylogenetic analysis of penaeid shrimp. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32(4), 399-407.
- Werner, M. T., Faeste, C. K., & Egaas, E. (2007). Quantitative sandwich ELISA for the determination of tropomyosin from crustaceans in foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(20), 8025-8032.
- Wild, L. G., & Lehrer, S. B. (2005). Fish and shellfish allergy. *Current Allergy and Asthma Reports*, 5(1), 74-79.
- Wojciech, S., & Dagmara, M. K. (2010). Sea Fish and Shellfish Authentication Issues. In *Environmental Effects on Seafood Availability, Safety, and Quality*, (pp. 275-294). Boca Raton: CRC Press.
- Wong, M. L., & Medrano, J. F. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 39(1), 75-85.
- Yu, C. J., Lin, Y. F., Chiang, B. L., & Chow, L. P. (2003). Proteomics and immunological analysis of a novel shrimp allergen, Pen m 2. *Journal of Immunology*, 170(1), 445-453.