

Marina Terni Lamas

Métodos analíticos para a identificação de espécies animais

Botucatu, 2011

Marina Terni Lamas

Métodos analíticos para a identificação de espécies animais

Trabalho de conclusão de curso apresentado à graduação visando à obtenção do grau de médico veterinário.

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Júlio de Mesquita Filho (UNESP) – Botucatu, SP.

Área de concentração: Inspeção de Alimentos de Origem Animal e Saúde Pública

Preceptor: Prof. Dr. José Paes de Almeida Nogueira Pinto

Coordenador de estágios: Profª Dra. Titular Jane Megid

Universidade Julio de Mesquita Filho (UNESP)

Botucatu, 2011

RESUMO

A indústria alimentícia tem se modernizado rapidamente, e com isso a disponibilização e o consumo de alimentos industrializados vem crescendo continuamente. Esses produtos perdem suas características morfológicas originais, necessitando portanto de testes rápidos e confiáveis que permitam a identificação das espécies animais, visto que a maioria das fraudes tanto em leite e derivados, quanto em carnes e pescados, se dá pela troca parcial ou total da matéria prima original por outra de menor valor no mercado. Atualmente existem diversas técnicas que podem ser utilizadas para a identificação de espécies animais, baseando-se em análises de proteínas musculares ou DNA. No caso das técnicas baseadas em análises de proteínas, pode-se citar diversos tipos de eletroforese, e métodos imunológicos como o ELISA. No caso nas técnicas baseadas em DNA existem diversos ensaios, que utilizam como base a amplificação de fragmentos de DNA, conhecida como PCR. Todas essas técnicas apresentam vantagens e desvantagens que variam de acordo com fatores como o estado de conservação da amostra, e o grau de proximidade entre as espécies analisadas. Por esse motivo faz-se necessário um estudo em busca do aperfeiçoamento das técnicas atualmente disponíveis, visto que a confirmação da autenticidade de um alimento é necessária para assegurar o valor do produto, o cumprimento dos regulamentos de rotulagem, e proteger o consumidor de fraudes.

Palavras chave: Identificação; Espécies; Eletroforese; ELISA; PCR.

ABSTRACT

The food industry has been rapidly modernized, and with this the disposal and the consumption of industrialized food has been increasing continually. These products lose their original morphological characteristics, requiring fast and reliable tests that could help to identify the species in question, as most fraudulent behavior in the milk and dairy industry (meat and fish) is carried out where there is partial or total exchange of the original material for other with less value at market. Nowadays there is a lot of techniques that can be used for the identification of animal species, based on muscle protein, or DNA analysis. In the case of protein based analysis, we can mention several types of electrophoresis and immunologic methods, as ELISA. In the case of DNA based methods, we have several assays that use the amplification of DNA fragments, known as PCR, as proof. All these techniques have advantages and disadvantages that can be affected by factors- the sample condition, or the degree of relation between the species in question. Because of this, it's necessary that a continuous study looking for the improvement of the available techniques, making sure that the confirmation of food authenticity is in place. This is to ensure the true product value, to comply with labeling regulation and protect the consumer of frauds.

Key words: Identification; Species; Electrophoresis; ELISA; PCR.

Sumário

Resumo	3
Abstract	4
Introdução	6
Técnicas baseadas na análise de proteínas.....	7
Técnicas cromatográficas	11
Técnicas imunoenzimáticas	12
Técnicas baseadas na análise de DNA	14
Conclusão	18
Referencias bibliográficas	18

1. Introdução.

Garantir a autenticidade dos alimentos de origem animal é tarefa nem sempre fácil. A maioria das fraudes tanto em leite e derivados, quanto em carnes e pescados, se dá pela troca parcial ou total da matéria prima original por outra de menor valor no mercado, permitindo assim aumento do lucro do produtor. Com o aumento do consumo de alimentos industrializados a identificação de espécies tem se tornado cada vez mais importante, visto que produtos industrializados perdem suas características morfológicas originais, exigindo testes de identificação cada vez mais rápidos, confiáveis, e reproduzíveis. A confirmação da autenticidade de um alimento é necessária para assegurar o valor do produto, o cumprimento dos regulamentos de rotulação, e proteger o consumidor de fraudes, que criam competições desleais e distorções de mercado, podendo ter impacto na economia local ou global. Além disso as fraudes são prejudiciais aos consumidores por razões relacionadas a intolerância ou alergia, religião, objeções étnicas ou culturais e requerimentos legais.

Diversas técnicas podem ser utilizadas para a identificação de espécies animais, sejam elas genéticas ou imunológicas. Entretanto os métodos atuais para reconhecimentos de espécies são baseados no descobrimento do polimorfismo protéico ou características do ácido desoxirribonucléico (DNA) que são únicas para cada espécie, ou na análise de proteínas musculares por métodos de eletroforeses ou técnicas imunológicas.

Quando se fala de técnicas baseadas em DNA, deve-se levar em consideração que é necessário primeiramente o estabelecimento de uma impressão digital otimizada para a espécie do produto sob investigação, que seja capaz de produzir resultados reproduzíveis e inconfundíveis, e que provem a identificação da espécie. (Woolfe and Primrose 2004). Complicações podem surgir quando certo numero de espécies tem impressões digitais similares, ou quando indivíduos da mesma espécie mostram impressões digitais diferentes, devido a variações intra-espécies. Além disso, sabe-se que algumas etapas de

processamento desnaturam proteínas e degradam parcialmente o DNA, fazendo com que a análise alimentos processados seja especialmente exigente. (Mackie and others 1999; Chapela and others 2002). Alguns componentes adicionados aos alimentos processados também podem servir como inibidores da amplificação do DNA durante a reação de cadeia polimerase (PCR) (Teletchea and others 2005).

O diagnóstico analítico de peixes e frutos do mar tem sido tradicionalmente baseado em eletroforese espécie - específica, cromatografia ou características imunológicas de proteínas. (Civera 2003; Moretti and others 2003). Alguns métodos comuns incluem foco isoelétrico (IEF), eletroforese capilar (CE), cromatografia líquida de alta performance (HPCL), e sistemas de imunoenaios. Enquanto esses métodos são em geral confiáveis para o uso em tecido fresco ou congelado, tratamentos com calor intenso ou secagem podem destruir propriedades bioquímicas e a integridade de proteínas, tornando impraticável a análise com alguns dos métodos acima citados. (Mackie and others 1999; Akasaki and others 2006).

Um método baseado em proteína que pode revelar-se útil, até mesmo em produtos esterilizados por calor, é o Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), que foi usado para a identificação de várias espécies de peixes e produtos lácteos e cárneos (Carrera and others 1997; Asensio and others, 2008). Entretanto, imunoenaios podem ser inefetivos em diferenciar espécies intimamente relacionadas, e requerem o desenvolvimento de um anticorpo contra a proteína específica de interesse (Sotelo and others 1993; Woolfe and Primrose 2004), método que pode ser muito trabalhoso.

Quando comparamos o uso de métodos baseados em DNA com os métodos baseados em proteínas, o uso de DNA apresenta como vantagens maior especificidade, sensibilidade, e performance confiável com amostras altamente processadas. (Lenstra 2003). Entretanto, nas técnicas baseadas em análises de proteínas, as amostras podem ser analisadas rapidamente, o custo dos reativos é relativamente baixo, e as técnicas são fáceis de aprender.

2. Métodos baseados na análise de proteínas

2.1 Técnicas eletroforéticas

A eletroforese é um procedimento analítico baseado na separação de moléculas carregadas em meio aquoso, sob a influência de campo elétrico aplicado entre dois eletrodos, um positivo e outro negativo. O movimento das moléculas, neste caso proteínas, dependerá de seu tamanho e da carga que apresentem no Ph do tampão selecionado para a análise. Aquelas moléculas que tenham uma carga maior, tenderão a mover-se mais rapidamente que aquelas com menor carga. No caso de que estas sejam iguais, as moléculas menores de moverão com maior rapidez.

A identificação de espécies se realiza comparando o perfil eletroforético obtido a partir das proteínas musculares das amostras problemas, com os padrões de bandas de amostras de referencia. A comparação pode ser visual, ou utilizando densitômetro ou analisador de imagens. Habitualmente, porém com algumas exceções, para comparar os padrões de bandas é necessário analisar as amostras de referencia no mesmo gel que as desconhecidas, já que pequenas mudanças nas condições experimentas podem alterar os perfis protéicos obtidos(AOAC,1990).

As técnicas eletroforéticas incluem vários sistemas de separação. A seleção de um ou outro vai depender do grau de resolução que se deseje obter, assim como o tipo de amostra que se quer analisar: fresca ou congelada, submetida a tratamento térmico leve ou a processo de esterilização.

Em geral, as técnicas eletroforéticas em gel tem sido pouco utilizadas devido a seu baixo poder de resolução. Sem duvida, o isoeletroenfoque (IEF), a eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) e a eletroforese capilar (EC) são os sistemas eletroforéticos mais utilizados na identificação de espécies animais.

2.1.1. Isoeletroenfoque (IEF)

É uma técnica que permite separar componentes que se diferem em até 0,001 unidades de Ph. Quando se aplica campo elétrico, as proteínas migram em direção aos diferentes eletrodos segundo sua carga elétrica. A proteína entra em zonas de ph mais baixas e mais altas de acordo com a relação carga neta/curva de ph, motivo pelo qual vai perdendo sua carga neta. Quando a proteína alcança seu ponto de isoeletroenfoque a separação depende do ponto isoeletrico da proteína e não de sua carga ou tamanho.

A técnica de isoeletroenfoque pode ser realizada tanto em géis de poliacrilamida, como em géis de agarosa tratada quimicamente (agarosa IEF). A agarosa não apresenta os inconvenientes de neurotoxicidade, e dificuldades na polimerização que tem a acrilamida. Sem dúvida, a resolução que se obtém com os géis de agarosa é menor, ainda que em ocasiões suficiente para identificar inclusive espécies filogeneticamente próximas (Santín y Centrich, 1997). Por outro lado, os inconvenientes de polimerização da poliacrilamida se podem resolver mediante o emprego de géis comerciais.

Esta técnica tem sido utilizada na identificação de numerosas espécies de animais de abate, e seu grande poder de resolução tornou possível sua aplicação tanto em produtos frescos como naqueles submetidos a tratamentos térmicos.

Slattery y Sinclair (1983) empregaram com êxito esta técnica para diferenciar carnes frescas procedentes de distintas espécies animais como bovina, bubalina e canguru. Entretanto, não puderam diferenciar carnes procedentes de espécies estreitamente relacionadas como a ovelha e a cabra, ou o cavalo e o burro.

Bauer y Hofmann (1989) identificaram mediante isoeletroenfoque em gel de poliacrilamida a presença de carne de vaca, porco, frango, peru, cavalo e ovelha em uma grande variedade de preparados e produtos cárneos (carnes picadas, hambúrgueres, embutidos crus e curados, salsichas, etc).

Em comparação com outras técnicas eletroforéticas, o IEF apresenta numerosas vantagens: melhor resolução e sensibilidade; a possibilidade de modificação da técnica em muitos aspectos ajustando-se as necessidades analíticas, as variações nos parâmetros experimentais influenciarem pouco no padrão protéico obtido, o que permite utilizar fotografias de amostras de referencia obtidas anteriormente na comparação com as amostras de interesse, além da utilização de géis preparados comercialmente e aparelhos semi automatizados, que permitem maior reprodutibilidade dos resultados assim como uma diminuição no tempo requerido para cada análise.

A técnica de IEF, sem dúvida, apresenta também inconvenientes importantes: os perfis protéicos obtidos tem grande numero de bandas e sua interpretação pode ser complicada em alguns casos; se trata de técnica laboriosa que requer operários especializados e

instrumental adequado, e é cara, o que dificulta sua implantação em laboratórios de análises de alimentos.

2.1.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE)

Esta técnica consiste em dissolver as proteínas da amostra em soluções de detergente aniônico dodecil sulfato sódico (SDS). Deste modo, as proteínas perdem suas cargas individuais adquirindo uma carga neta negativa como resultado do complexo proteína-anion SDS formado (Weber y Osborn, 1969). A quantidade de detergente que se incorpora por unidade de massa e a mesma para todas as proteínas, e em consequência, a mobilidade na eletroforese vai depender exclusivamente da massa. A separação das proteínas, uma vez dissolvidas, se realiza em géis de poliacrilamida adicionados de SDS. A eletroforese em géis de poliacrilamida com SDS tem sido utilizado amplamente para a identificação de espécies em amostras submetidas a tratamento térmico, já que o detergente SDS permite a extração das proteínas desnaturalizadas que se encontram neste tipo de amostras. Por meio desta técnica já foi possível detectar fraudes em mesclas de carne de cavalo, vaca e porco e foie grãs de pato, em níveis a partir de 10% de incorporação de outra espécie. Também já foi possível, ainda que com algumas modificações na técnica, a identificação de espécies em amostras submetidas a esterilização ou fortes tratamentos térmicos (Carrion y col, 1981).

Quanto aos inconvenientes para a técnica de SDS-PAGE, se pode dizer que são os mesmo que foram mencionados para a IEF. Ou seja, a complexidade nos perfis protéicos obtidos e a necessidade de operários e instrumental especializado.

2.1.3. Eletroforese Capilar (EC)

A eletroforese capilar é uma técnica eletroforética que também tem sido aplicada na diferenciação de espécies. Esta técnica se baseia na utilização de capilares como câmeras de separação, onde um capilar de sílica é preenchido com um tampão e submetido a um campo elétrico. Sob estas condições, os cátions presentes na amostra migram até o cátodo em função de sua relação carga/massa. A vantagem que este método apresenta com respeito as outras técnicas de análise, é que permite detectar e quantificar simultaneamente diferentes

moléculas, já que o equipamento está dotado de sistema que elimina o tampão de preenchimento da coluna e o substitui por outro de forma automática, permitindo analisar os diferentes componentes da amostra sem necessidade de intervir. Outras vantagens deste método são a rapidez da análise, que pode ser feita em menos de 10 minutos ainda que tenha estabelecido tempo médio de 20 minutos, e o pequeno volume necessário. Apesar de inicialmente ter se atribuído a técnica falta de sensibilidade, este problema está sendo sanado na atualidade mediante a introdução de melhoras nos sistemas de detecção. Sua principal limitação reside, sem dúvida, no ajuste de sistemas de detecção adequados para cada composta que, além disso, tem que ser muito sensíveis devido aos pequenos volumes que são utilizados. No caso das proteínas, normalmente são utilizados sistemas de detecção ultravioleta (UV) (Cancalon, 1995).

Existem distintos tipos de EC, porém a mais comum é a eletroforese capilar de zona (ECZ), que utiliza reativos de amplo intervalo de pH para separar os distintos componentes em uma amostra. A análise mediante ECZ da fração sarcoplasmática das proteínas do músculo, permitiram a identificação de distintas espécies de animais de abate, tanto frescas quanto congeladas.

Cota Rivas e Vallejo-Córdoba (1997, 1998) diferenciaram espécies como bovina, suína e peru utilizando esta técnica. Os perfis de proteínas sarcoplasmáticas obtidos para cada uma das espécies estudadas, resultaram ser espécie-específicos.

A eletroforese capilar permite análise completamente automatizada de proteínas. Isto supõe importante vantagem frente aos atuais métodos eletroforéticos, que são laboriosos e requerem operários especializados.

2.2. Técnicas cromatográficas

2.2.1. Cromatografia líquida de alta resolução (HPLC).

A cromatografia líquida de alta resolução (HPLC, High Performance Liquid Chromatography) é um procedimento analítico baseado na separação de moléculas em função de sua diferente polaridade. A técnica de HPLC em fase reversa (RP-HPCL), é a que mais se tem utilizado na identificação de espécies animais, e permite separar as proteínas distribuindo-as entre uma fase móvel polar e uma fase orgânica que está fixa em

uma matriz. Deste modo obtém-se perfis cromatográficos de proteínas característicos de cada espécie, que permitem sua identificação mediante comparação com cromatogramas de referencia.

Os cromatogramas das proteínas sarcoplasmáticas obtidos mediante RP-HPLC tem permitido a identificação de bom numero de espécies animais, tanto frescas como congeladas. Entre elas suínos, aves (peru, pato, frango) bovina e ovina.

Espinoza y col (1996) identificaram e quantificaram ao redor de 50 espécies animais diferentes, analisando mediante RP-HPLC a hemoglobina sanguínea.

Toorop y col (1997) identificaram amostras frescas de bovinos, ovinos, suínos e aves mediante HPLC empregando proteínas miofibrilares. Em outro trabalho, Toorop y col (1997b) aplicaram a técnica de HPLC para detectar a porcentagem de incorporação de carne suína em amostras frescas, congeladas e cozidas de carne bovina.

O RP_HPLC apresenta vantagens importantes frente as técnicas eletroforéticas: é rápido, simples, tem grande poder de resolução, não se utilizam reativos tóxicos e uma vez obtidos os cromatogramas, não é necessária a análise conjunta de amostras de referencia graças a grande reprodutibilidade dos resultados. Além disso, o uso desta técnica é especialmente interessante desde o ponto de vista da quantificação, já que os sistemas de detecção poderiam ser empregados para estimar a quantidade de proteínas pertencente a uma espécie presente em uma mescla. (Toorop y col, 1997).

2.3. Técnicas Imunoenzimáticas (ELISA)

As técnicas imunológicas são procedimentos analíticos baseados na reação específica entre um antígeno e seu anticorpo correspondente. A aplicação dessas técnicas para a identificação de espécies apresenta importantes vantagens frente ao emprego de técnicas eletroforéticas e de HPLC, como a diminuição da quantidade de amostra necessária, redução do tempo e do custo da análise, utilização de instrumental pouco complexo, possibilidade de automatização e de aplicação em provas de campo e kits miniaturizados.

As técnicas de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assays), que são amplamente utilizadas na atualidade, se caracterizam pelo emprego de marcadores enzimáticos para a detecção e amplificação das reações antígeno anticorpo. Nessas técnicas um dos elementos da reação imunológica (antígeno ou anticorpo) se fixa à fase sólida, normalmente uma

placa de poliestireno. A interação antígeno-anticorpo se detecta mediante a reação colorimétrica produzida pela enzima ao degradar o substrato correspondente. A medida da absorvância nos poços da placa permite quantificar a reação imunológica.

Para a realização deste tipo de ensaio, podemos utilizar 2 tipos de anticorpos: os monoclonais, e os policlonais. Os monoclonais, são células homogêneas derivadas de uma célula produtora de anticorpos, e possuem a mesma especificidade necessária para um antígeno. Os policlonais são clones de células únicas propagadas em meio de cultura com uma única especificidade. Geralmente, os anticorpos são altamente específicos, e ao reagirem com o antígeno, formam um complexo precipitado. Segundo Hurley(2004) o tipo de anticorpo utilizado pode alterar a eficiência do ELISA, pois os anticorpos policlonais podem ser menos específicos que os anticorpos monoclonais. Segundo Benjamini(2002), esse fato se dá devido à reação cruzada de anticorpos policlonais, onde essas células, por terem especificidade um pouco menor, reagem com duas moléculas que apresentam o mesmo antígeno, mas que são diferentes em outros aspectos.

As técnicas imunoenzimáticas tem se desenvolvido em diversos formatos atendendo ao componente da reação que se fixa em primeiro lugar, a fase sólida utilizada e se usam ou não concentrações limitantes de antígeno e anticorpo. Há inúmeras aplicações dessas técnicas na diferenciação de espécies em carnes e produtos cárneos bem como em produtos lácteos. De fato, atualmente existem a disposição no mercado kits comerciais rápidos, para a identificação de espécies em mesclas cárneas ou lácteas, e também para a detecção dessas proteínas em outros produtos alimentícios.

2.3.1. Immunodotting

A técnica de immunodotting é uma modificação do ELISA indireto, em que o ensaio é feito em matriz de celulose, ao invés de placa de poliestireno, e os substratos utilizados são outros. Neste caso, o produto da reação enzimática é insolúvel e precipita no local de formação, permitindo a visualização de bandas manchadas. A técnica de immunodotting apresenta como vantagens sobre o ELISA, a possibilidade de unir e imobilizar número maior de moléculas que as placas de poliestireno, além da utilização de menor quantidade

de amostra, e da maior rapidez e facilidade na realização do ensaio. Seu principal inconveniente no entanto, é se tratar de uma técnica qualitativa.

2.3.2. ELISA Direto ou sanduíche

O método de sanduíche, ou captura, é indicado para identificação de antígenos, e este antígeno fica entre dois anticorpos. Assim, um anticorpo primário específico ao antígeno é adsorvido no poço da microplaca. Em seguida o antígeno na solução problema é adicionado. Depois o segundo anticorpo específico ao antígeno e marcado com uma enzima é adicionado. Esta enzima degrada o substrato fazendo com que ele mude de cor. A presença de cor nos poços indica a presença do antígeno, e os poços que não mudarem de cor indica a ausência do antígeno em questão. Nesse caso, a intensidade da reação é proporcional à quantidade de antígeno presente.

2.3.3. ELISA Competitivo

O método competitivo é mais usado para identificação de antígenos, mas pode também ser empregado para a detecção de anticorpos. Neste método primeiro se adsorve o anticorpo no poço da microplaca. Após a adsorção do anticorpo, uma solução que possivelmente contém o antígeno é adicionada sobre os anticorpos adsorvidos. O próximo passo é adicionar o antígeno marcado enzimaticamente. Os poços que não possuem o antígeno primário (da solução problema) aderido ao anticorpo ficam coloridos, enquanto que os poços que possuem antígenos aderidos aos anticorpos não mudam de cor.

2.3.4. ELISA indireto

Nesta técnica, o antígeno se adsorve em primeiro lugar a uma fase sólida. Em seguida se adiciona o anticorpo, que se une ao antígeno imobilizado. Este anticorpo pode estar diretamente conjugado à enzima, ou pode-se adicionar um segundo anticorpo marcado enzimaticamente que reconheça como antígeno o anterior. Finalmente, se adiciona o substrato específico da enzima. A degradação do substrato pela enzima produz reação colorimétrica, quantificável por espectrofotometria.

2.4 Técnicas Baseadas na análise de DNA

Técnicas baseadas na análise de ácidos nucléicos, como o DNA mitocondrial ou genômico, apresentam diversas vantagens sobre técnicas baseadas em proteínas. Primeiramente, o fato de todas as células de um indivíduo apresentarem informação genética idêntica, é possível realizar análises independentemente da origem do material. Além disso, a molécula de DNA contém mais informação e é mais estável do que as proteínas, mais permitindo sua extração de diferentes tipos de amostras e até mesmo de amostras danificadas. Outro ponto importante é o uso do DNA mitocondrial, que evolui muito mais rapidamente, e contém maior diversidade seqüencial que o DNA nuclear, facilitando portanto a identificação de espécies intimamente relacionadas. (PCR-RFLP).

2.4.1. FINS

Forensically informative nucleotide sequencing (FINS). FINS é um procedimento DNA-baseado. Para identificar uma espécie usando FINS, um fragmento de DNA específico é amplificado por PCR, sua seqüência de nucleotídeos é determinada, e a seqüência é então comparada com seqüências relacionadas em banco de dados usando análise filogenética. A seqüência com menor distância genética, ou número de substituições de nucleotídeos do fragmento alvo, representa o grupo de espécies do qual a amostra original pertence. (Barlett and Davidson 1992). Como FINS é baseado em seqüência de substituição de nucleotídeos, é importante selecionar um fragmento que exiba alta variabilidade interespecies e baixa variabilidade intraespecie, para evitar ambigüidades na determinação das espécies (Bossier 1999), por ter essa característica, uma escolha comum é o uso do citocromo B ribossomal.

Apesar do seqüenciamento ter sido provado como o mais direto e confiável método de obtenção de informação dos fragmentos de PCR, é também caro e demorado, tornando impraticável seu uso na rotina de muitos laboratórios. Além disso o seqüenciamento não é apropriado para a análise de amostras contendo mais de uma espécie. (Lenstra 2003).

2.4.2. RFLP

Uma alternativa popular ao FINS é o PCR-RFLP, o qual é baseado no polimorfismo do comprimento de fragmentos particularmente restringidos do código genético. Em alguns

casos, as variações espécie-específicas de comprimento dos fragmentos selecionados podem ser analisada pela amplificação por PCR e visualização em gel de agarose.

Entretanto, quando a variação é muito pequena (menor que 100bp), as amplificações podem ser digeridas com enzimas de restrição (endonucleases), que são analisadas usando gel de eletroforese.

Para estabelecer um protocolo de identificação de espécies por PCR-RFLP, o fragmento alvo de DNA precisa inicialmente ser amplificado por PCR e então sequenciado para identificar polimorfismos na espécie de interesse. Em seguida, são escolhidas enzimas de restrição apropriadas para reconhecer e cortar sequências específicas de DNA, resultando num padrão de fragmentos específicos que variam com as espécies (Liu e Cordes 2004). Uma vez que a sequência do fragmento tenha sido estabelecida, os passos iniciais não são mais necessários, pois o fragmento de interesse é facilmente replicado com as enzimas de restrição pré-selecionadas, e então comparado com as amostras de referencia, para a identificação da espécie. Assim como no FINS, o fragmento de DNA mais comumente utilizado é o citocromo B mitocondrial., que já foi utilizado na identificação de diversas espécies de pescado, entre elas os atuns, e na detecção de carne de porco em misturas de carne bovina cozida, em níveis menores que 1% (Meyer R., 1995)

Os resultados desses estudos mostraram que o PCR-RFLP é adequado para a análise de espécies intimamente relacionadas, amostras contendo mais de uma espécie misturadas, e amostras que foram submetidas a diversos níveis de processamentos, incluindo esterilização por calor.

Apesar do PCR-RFLP ter se tornado um método proeminente no campo da identificação de espécies, ele também apresenta algumas desvantagens. A maior delas é a possibilidade de variações intra espécies, onde indivíduos da mesma espécie exibem padrões de restrição diferentes, devido a degeneração do DNA do fragmento analisado. (Mackie and others 1999; Lockley and Bardsley 2000; Akasaki and others 2006). Então, para evitar falsos negativos, é necessário analisar grandes números de indivíduos de uma mesma espécie, para encontrar um padrão de restrição. Devido a essas limitações, é recomendado que a identificação de espécies por este método seja feita com cautela quando não houver informações suficientes sobre o polimorfismo das espécies analisadas.

O uso de polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) também tem sido usado para autenticar pescados enlatados (Ram et al., 1996; Quinteiro ET AL., 1998) Os resultados indicaram que esse método proporciona uma alternativa simples e de bom custo-benefício para o seqüenciamento na identificação de espécies.

2.3.3. Single-Stranded Conformational Polymorphism (SSCP)

É alternativa para métodos como FINS ou RFLP, especialmente quando estão sendo analisadas espécies intimamente relacionadas, pois é uma técnica altamente sensível. Em geral, a análise por SSCP tem sido baseada em variações na sequência do citocromo b mitocondrial. Apesar de não ter sido utilizado tão amplamente quanto PCR-RFLP ou métodos de seqüenciamento, o SSCP já foi capaz de identificar certa variedade de peixes, como salmonídeos, atuns, e sardinhas. (Rehbein and others 1997). Apesar de seu sucesso, a técnica ainda é mais exigente que o RFLP e continua tendo certas desvantagens como a alta reprodutibilidade sem diferenças nas condições de uma análise para outra, e a necessidade de realizar os ensaios das amostras de referencia e das amostras desconhecidas no mesmo gel.

2.3.4. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

Diferente os métodos citados acima, o RAPD não tem como alvo fragmentos pré-determinados de DNA. Um primer arbitrário é designado sem prévio conhecimento da sequência alvo de DNA,, e durante o PCR esse primer aplica segmentos de DNA aleatoriamente. Devido as variações no código genético, as análises em diferentes espécies resultam padrões únicos de fragmentos de DNA. RAPD tem potencial para ser usado como uma ferramenta precisa, rápida e relativamente barata para detectar fraudes comerciais. Comparado com outros métodos disponíveis o RADP tem sido sugerido como o mais barato e mais confiável método para identificação inter e intra espécies quando não há conhecimento prévio da sequência genômica (Ramella and others 2005, Liu and others 2004). Como desvantagens deste método podemos considerar a necessidade de manter as condições de reação rigorosamente constantes, para assegurar que as marcas do DNA produzidas reflitam precisamente as espécies correspondentes, e a possibilidade de falsos

positivos, que ocorreriam quando diferentes regiões do DNA, de 2 espécies diferentes produzem fragmentos de PCR de tamanho similar.

3. Conclusão

Atualmente existem diversas técnicas que podem ser utilizadas para de identificar e conseqüentemente combater fraudes na indústria alimentícia, cada qual com sua particularidade de aplicação, vantagens e desvantagens. Não é possível definir uma só técnica que possa ser utilizada em todas as ocasiões, em todos os laboratórios ou com todas as espécies animais, pois ainda não existe técnica perfeita. Por esse motivo é necessário continuar investigando e aperfeiçoando as técnicas atuais, em busca de um método cada vez mais eficaz, confiável, acessível e reproduzível em larga escala. Pode-se assim, atender a demanda cada vez maior do consumidor por produtos de qualidade e origem confiáveis.

Bibliografia

- Akasaki, T.; et al. Species identification and PCR-RFLP analysis of cytochrome b gene in cod fish products. *Journal of Food Science*, n.71, p.190-195, 2006.
- Asensio. L.; González. I.; García. T.; e Martín. R. Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Food Control*, n.19, p.1-8, 2008.
- Barlett, S.E.; Davidson, W.S. FINS (forensically informative nucleotide sequencing): a procedure for identifying the animal origin of biological specimens. *Bio Tech*, n.12. cap.3, p.408-411.
- Barnes, K.W. An introduction to food analysis techniques. *Food Technology*, n.49, p.47-50.
- Bossier, P. Authentication of seafood products by DNA patterns. *Journal of food science*, v.64, n.2, 1999.
- Canclon, P.F. Capillary electrophoresis: a useful technique for food analysis. *Food Technology*, n.49, p.52-58.
- Carrera. E. et al. Immunostick colorimetric ELISA assay for the identification of smoked salmon (*Salmo salar*), trout (*Oncorhynchus mykiss*) and bream (*Brama rau*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, n.74, p.547-550, 1997.
- Carrera. E.; Martín. R.; García. T.; González. I.; Sanz. B. e Hernández. P. E.: Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the identification of smoked salmon (*Salmo salar*), trout

(*Oncorhynchus mykiss*) and bream (*Brama rau*). *Journal of the Science of Food Protection*, n.59, p.521-524, 1996.

Chapela, M. J. et al. Identification of cephalopod species in seafood products by forensically informative nucleotide sequencing (FINS). *Journal of Food Science*, n. 67, cap.5, p.1672-1676, 2002.

Civera, T. Species identification and safety of fish products. *Veterinary Research Communications*, n.27, p.481-491, 2003.

Cota-Rivas, M., Vallejo-Cordoba, B.V. Capillary electrophoresis for meat species differentiation. *Journal of Capillary Electrophoresis* n.4, p.195-199, 1997.

DIAS, Sabrina da Silva; LOBATO, Verônica; VERRUMA-BERNARDI, Marta Regina. Metodologias para identificar adulteração em queijos produzidos com leite de diferentes espécies de animais. *Rev. Inst. Adolfo Lutz (Impr.)*, São Paulo, v. 68, n. 3, 2009.

Espinoza, E.O., Kirms, M.A.; Filipek, M.S. Identification and quantification of source from hemoglobin of blood and blood mixtures by high performance liquid chromatography. *Journal of Forensic Sciences*, n.41, p.804-811, 1996

Gallardo, J. M.; Sotelo, C.G.; Piñero, C.; Pérez-Martin, R. I. Use of capillary zone electrophoresis for fish species identification. Differentiation of flatfish species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, n.43, p.1238-1244, 1995.

Lenstra, J.A. DNA methods for identifying plant and animal species in food. Food authenticity and traceability. 1.ed. Woodhead Publishing, Cambridge, U.K., p.34-53, 2003.

Liu, L. Monoclonal Antibody-Based Sandwich Elisa for the Detection of Ovine Muscle in Cooked Meat. 2006. Tese (Master em Nutrition, Food, and Exercise Science) – Universidade do estado da Florida, Florida.

Liu, Z.J.; Cordes, J.F. DNA maker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*, n.238, p.1-37, 2004.

Lockley, A.K.; Bardsley, R.G. DNA-based methods for food authentication. *Trends in Food Science & Technology*, n.11, p.67-77, 2000.

Macías, J.A.G. et al. Identificación del origen de especia animal en carne fresca utilizando inmunodifusion doble. *Técnica pecuaria en México*, Set-Dez, v.38, n.003, 2000.

Mackie, I. M. et al. Challenges in the identification of species of canned fish. *Trends in Food Science & Technology*, n.10, p.9-14, 1999.

Mafra, I.; Ferreira, I.; Oliveira, M. Food identification by PCR-based methods. *European Food Research and Technology*, v.3, p.649-665, 1999.

Meyer, R.; Höfelein, C.; Lüthy, J.; Candrian U. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis : a simple method for species identification in food. *AOAC. International symposium. Europe sect. N°4, Nyon , Suisse*, vol. 78, n°6, pp. 1542-1551, 1995.

Moretti, V.M. et al. Traceability issues in fishery and aquaculture products. *Veterinary Research Communications*, n.27, p.497-505, 2003.

Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists, 15 ed., Washington D.C., p. 883-889, 1990.

Quinteiro, J. et al. Use of mtDNA direct polymerase chain reaction (PCR) sequencing and PCR-restriction fragment length polymorphism methodologies in species identification of canned tuna. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, n.46, p.1662-1669, 1998.

Quinteiro, J. et al. Use of mtDNA direct polymerase chain reaction (PCR) sequencing PCR-restriction fragment length polymorphism methodologies in species identification of canned tuna. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, n.46, p.1662-1669, 1998.

Ram, J.L.; Ram, M.L.; Raindoun, F.F. Authentication of canned tuna and bonito by sequence and restriction site analysis of polymerase chain reaction products of mitochondrial DNA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, n.44, p. 2460-2467, 1996.

Ramella, M.S.; Kroth, M.A.; Tagliari, C.; Arisi, A.C.M. Optimization of random amplified polymorphic DNA protocol for molecular identification of *Lophius gastrophysus*. *Ciencia e Tecnologia dos Alimentos*, v.25, n.4, p.733-735, 2005.

Rasmussen, R.R.; Morrissey, M.T. DNA-based methods for the identification of commercial fish and seafood species. *Comprehensive reviews*

Rehbein, H.; Kress, G.; Schmidt, T. Application of PCR-SSCP to species identification of fishery products. *Journal of Science of Food and Agriculture*, n.74, p. 35-41.

Sotelo, C.; Piñero, C.; Gallardo, J. M. e Pérez-Martín, R. Fish species identification in seafood products. *Trends in Food Science and Technology*, n.4, p.395-401, 1993.

Teletchea, F.; Maudet, C.; Hanni, C. Food and forensic molecular identification: update and challenges. *Trends in Biotechnology*, n.23, v.7, p. 359-366, 2005.

Toorop, R.M., Murch, S.J.; Ball, R.O. Development of a rapid and accurate method for separation and quantification of myofibrillar proteins in meat. *Food Research International*, n.30, p.619-627, 1997.

Wätzig, H.; Dette, C. Capillary electrophoresis (CE)- a review. Strategies for method development and applications related to pharmaceutical and biological sciences. *Pharmazie*, n.49, p.83-86, 1994.

Woolfe, M.; Primrose, S. Food forensic: using DNA technology to combat misdescription and fraud. *Trends in Biotechnology*, n.22, v.5, p.222-226, 2004. in *food science and food safety*, v.7, p.280-295, 2008.