

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE
DE LISBOA



IDENTIFICAÇÃO DE FRAUDE ALIMENTAR NO BACALHAU FORNECIDO AO EXÉRCITO
PORTUGUÊS

CATARINA MONTEIRO SANTOS

ORIENTADOR:

Tenente-Coronel Pedro Miguel Tomás
Silva

COORIENTADORA:

Doutora Ana Rita Barroso Cunha de Sá
Henriques

2023

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE
DE LISBOA



IDENTIFICAÇÃO DE FRAUDE ALIMENTAR NO BACALHAU FORNECIDO AO EXÉRCITO
PORTUGUÊS

CATARINA MONTEIRO SANTOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

JÚRI

PRESIDENTE:

Doutora Maria João dos Ramos Fraqueza

VOGAIS:

Doutor Miguel José Sardinha de Oliveira
Cardo

Tenente-Coronel Pedro Miguel Tomás
Silva

ORIENTADOR:

Tenente-Coronel Pedro Miguel Tomás
Silva

COORIENTADORA:

Doutora Ana Rita Barroso Cunha de Sá
Henriques

2023

Agradecimentos

Ao Tenente-Coronel Pedro Tomás Silva, pela sua orientação, praticidade e apoio na elaboração desta dissertação.

À Professora Doutora Ana Rita Henriques, pela sua disponibilidade, simpatia e ajuda. Muito obrigada por me ter ajudado a descomplicar, pelos conselhos que me foi dando e pelo empenho que dedicou a esta dissertação.

Ao Major Wilson Antunes, pela partilha de conhecimento, pela ajuda e dicas para o meu trabalho prático e para o desenvolvimento desta dissertação, e pela motivação e boa disposição partilhadas ao longo do tempo que estive no Laboratório de Bromatologia e Defesa Biológica (LBDB).

Ao Tenente-Coronel Coimbra, pela ajuda, motivação e preocupação ao longo destes últimos 6 anos, muito obrigada.

Ao senhor Nuno, ao senhor Sargento-Mor Simões, à Alferes Pinheiro, à Alferes Sá, ao Alferes Dionísio, à Alferes Oliveira, ao Tenente-Coronel Tomás Silva e ao Coronel Ribeiro, pela simpatia e boa disposição com que me acolheram na Equipa de Segurança Alimentar e Vigilâncias Epidemiológica (ESAVE) sul e ilhas e por tudo o que me ensinaram.

Ao senhor Paulo, à Dra. Verónica, à Alferes Santos, à Alferes Pinheiro, à Alferes Alves, à Tenente Pita, ao Tenente Taoufiq, à Major Gomes, ao Major Alonso, ao Major Antunes, ao Tenente-Coronel Freitas, ao Tenente-Coronel Carvalho e ao Coronel João, por toda a preocupação e ajuda, e por me terem acolhido tão bem no LBDB.

À Anabela da Biopremier, pela paciência e disponibilidade para esclarecer as minhas dúvidas, mesmo as mais idiotas, o meu sincero agradecimento.

Aos meus pais, Hélder e Rina, por terem estado sempre lá para mim! Pelo amor e paciência, por todas as vezes que ficaram acordados até tarde para me irem buscar ao autocarro, por todos os abraços reconfortantes, por toda a motivação, apoio e confiança, principalmente nestes últimos 6 anos. Ao meu irmão, Diogo, por aturar as minhas parvoíces e reclamações e por ter tomado conta da Fly na minha ausência. A toda a minha família pelo apoio incondicional, que mesmo longe esteve muito perto.

Às minhas amigas, futuras médicas veterinárias preferidas, sem as quais eu não tinha chegado até aqui, à Bea, à Pipa, à Mariana e à Sara, por toda esta jornada de 6 anos, por todas as palavras de motivação e de força transmitidas, pela ajuda, pela cumplicidade e companhia, pelo apoio, pela preocupação, e acima de tudo, pela amizade. Amigas, do fundo do coração, muito obrigada!

Também à Barbosa, à Rodrigues e à Moreira, por estarem sempre prontas para me ouvir e ajudar e por todos os conselhos que me deram, por serem um bom porto de abrigo.

Por último, mas não menos importante, ao Pedro, por todo o apoio e por me incentivar a ir atrás dos meus sonhos e a fazer cada vez mais, obrigada.

Identificação de Fraude Alimentar no Bacalhau fornecido ao Exército Português

Resumo

Devido ao seu mediatismo, a fraude alimentar apresenta uma tendência crescente de preocupação, quer para a indústria alimentar, quer para o consumidor. O setor do peixe é um dos mais suscetíveis a práticas fraudulentas, e por isso é importante desenvolver metodologias para as identificar, combater e prevenir. O aumento do consumo mundial de bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*) e a sobrepesca consequente desse aumento, levaram à diminuição da sua disponibilidade marinha e comercial e ao subsequente aumento dos preços. Assim, surgiu a comercialização de espécies muito idênticas morfológica e gastronomicamente, mas de menor valor comercial, em substituição intencional de bacalhau, com o intuito de obter vantagens económicas. Por isso, é necessário o desenvolvimento de métodos genéticos rápidos e precisos, através da análise de ácido desoxirribonucleico (DNA), para a confirmação da autenticidade de espécies de bacalhau.

Este trabalho consistiu na identificação e confirmação das espécies de bacalhau presentes nas refeições confeccionadas fornecidas ao Exército Português. Para tal, recorreu-se à Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR) em tempo real. No total foram recolhidas 47 amostras das Unidades/Estabelecimentos/Órgãos (U/E/O) e fornecedores de alimentação do Exército Português com a designação de bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*), bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*) e paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

Numa primeira fase, fez-se a extração do DNA das amostras e posteriormente procedeu-se à identificação das espécies através da qPCR em tempo real. Verificou-se que 76,6% (n=36) das amostras estavam corretamente rotuladas. Contudo, foram detetados três rótulos que mencionavam bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*), mas que foram identificadas como bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*). Também se verificou a provável substituição parcial de espécies em cinco amostras, encontrando-se duas delas rotuladas como bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*), mas que também continham bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*). As outras três continham paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*), apesar de estarem rotuladas como bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).

Assim, este estudo demonstrou que a qPCR em tempo real constitui uma boa ferramenta para deteção de fraude alimentar de forma específica e rápida, seja na forma de troca relativamente ao rótulo, seja na forma de substituição de espécies.

Palavras-chave: bacalhau, fraude alimentar, rotulagem, autenticação, qPCR em tempo real.

Identification of Food Fraud in the Cod supplied to the Portuguese Army

Abstract

Due to its media coverage, food fraud is a growing concern for both the food industry and the consumer. The fish sector is one of the most susceptible to fraudulent practices, which is why it is important to develop methodologies to identify, combat and prevent them. The increase in worldwide consumption of Atlantic cod (*Gadus morhua*) and the resulting overfishing have led to a decrease in its marine and commercial availability and a subsequent increase in prices. This has led to the commercialisation of species that are morphologically and gastronomically identical but of lower commercial value, intentionally replacing cod to gain economic advantages. For this reason, it is necessary to develop fast and accurate genetic methods, by analysing deoxyribonucleic acid (DNA), to confirm the authenticity of cod species.

This work consisted of identifying and confirming the cod species present in the cooked meals supplied to the Portuguese Army. To do this, real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was used. A total of 47 samples were collected from the Unidades/Estabelecimentos/Órgãos (U/E/O) and food suppliers of the Portuguese Army, labelled Atlantic cod (*Gadus morhua*), Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) and Pacific cod (*Gadus chalcogrammus*).

In the first phase, DNA was extracted from the samples and then the species were identified using real-time qPCR. It was verified that 76,6% (n=36) of the samples were correctly labelled. However, three labels were detected mentioning Atlantic cod (*Gadus morhua*) but were identified as Pacific cod (*Gadus macrocephalus*). There was also a probable partial substitution of species in five samples, two of which were labelled as Atlantic cod (*Gadus morhua*) but also contained Pacific cod (*Gadus macrocephalus*). The other three contained Pacific pollock (*Gadus chalcogrammus*) despite being labelled as Pacific cod (*Gadus macrocephalus*).

This study has demonstrated that real-time qPCR is a good tool for detecting food fraud in a specific and rapid manner, either in the form of mislabelling or in the form of species substitution.

Keywords: cod, food fraud, labeling, authentication, real-time qPCR.

Índice

Agradecimentos	iii
Resumo.....	iv
Abstract.....	v
Lista de Figuras.....	viii
Lista de Tabelas	ix
Lista de Abreviaturas.....	x
1. Introdução.....	1
2. Relatório de Estágio	2
3. Revisão Bibliográfica	4
3.1. Fraude alimentar e enquadramento na Proteção Alimentar	4
3.1.1. Vulnerabilidade e tipos de fraude alimentar	6
3.1.2. Práticas fraudulentas mais comuns no setor do pescado	8
3.1.3. Histórico de fraude alimentar nos últimos anos.....	9
3.2. A importância do bacalhau	11
3.3. Taxonomia do Género <i>Gadus</i>	12
3.3.1. Alteração taxonómica do paloco do Pacífico	14
3.4. Identificação e confirmação molecular de espécies de bacalhau	16
3.4.1. Metodologias de identificação e autenticação.....	16
3.4.2. Funcionamento da qPCR em tempo real	18
3.5. Enquadramento do Exército Português.....	21
4. Materiais e Métodos.....	24
4.1. Recolha das amostras	24
4.2. Extração do DNA	26
4.3. Quantificação do DNA extraído	27
4.3.1. Extração fenólica	27
4.3.2. Diluição do DNA	28
4.4. Corrida da qPCR em tempo real	28
5. Resultados.....	30
5.1. Extração e Quantificação do DNA.....	30
5.1.1. Extração fenólica	31
5.1.2. Diluição do DNA	31
5.2. Corrida da qPCR em tempo real	32
6. Discussão de resultados.....	37
6.1. Extração e quantificação do DNA.....	37
6.2. Corrida da qPCR em tempo real	37
6.3. Principais limitações e propostas futuras	39

7. Conclusões	41
8. Referências Bibliográficas	42
9. Anexos	46
9.1. Anexo 1: Resultados iniciais da corrida da qPCR em tempo real.	46
9.2. Anexo 2: Curvas de amplificação das amostras em comparação com os controles positivos de cada espécie.	47

Lista de Figuras

Figura 1 - Componentes da proteção do consumidor (adaptado de Leal 2019).....	4
Figura 2 - Percentagem de consumo de bacalhau nos lares portugueses de 2013 a 2021 (retirada de https://www.marktest.com/wap/a/n/id~2951.aspx).	11
Figura 3 - Bacalhau do Atlântico (<i>Gadus morhua</i>) (retirada de https://fish-commercial-names.ec.europa.eu/fish-names/species_pt?sn=16452).	12
Figura 4 - Distribuição geográfica do bacalhau do Atlântico (<i>Gadus morhua</i>) (retirada de Cohen et al. 1990).	13
Figura 5 - Bacalhau do Pacífico (<i>Gadus macrocephalus</i>) (retirada de http://www.bocanomundo.com/vida/bacalhau-no-mundo-morhua-e-a-familia).	13
Figura 6 - Distribuição geográfica do bacalhau do Pacífico (<i>Gadus macrocephalus</i>) (retirada de Cohen et al. 1990).	14
Figura 7 - Paloco do Pacífico (<i>Gadus chalcogrammus</i>) (retirada de https://polarpedia.eu/en/alaska-pollock/).	15
Figura 8 - Distribuição geográfica do paloco do Pacífico (<i>Gadus chalcogrammus</i>) (retirada de Cohen et al. 1990).	15
Figura 9 - Fases que compõem a curva de amplificação da qPCR em tempo real (adaptada de http://compgen.bio.unipd.it/~stefania/Didattica/AA2018-2019/MMOL_BIOINFO_BE/5_Real%20time%20PCR.pdf).	19
Figura 10 - Funcionamento de uma sonda TaqMan® (adaptada de https://www.researchgate.net/figure/Mechanism-of-the-TaqMan-probe-The-probes-rely-on-the-5-3-nuclease-activity-of-Taq_fig1_257371648).	21
Figura 11 - Protocolo de extração de DNA pelo “DNA Extraction Kit from Food” (Biopremier®, Lisboa, Portugal).	27
Figura 12 - Curva de amplificação da amostra 4 para o bacalhau do Atlântico (<i>Gadus morhua</i>).	34
Figura 13 - Curva de amplificação do controlo positivo para o bacalhau do Atlântico (<i>Gadus morhua</i>).	34
Figura 14 - Curva de amplificação da amostra 4 para o bacalhau do Pacífico (<i>Gadus macrocephalus</i>).	34
Figura 15 - Curva de amplificação do controlo positivo para o bacalhau do Pacífico (<i>Gadus macrocephalus</i>).	34
Figura 16 - Curva de amplificação da amostra 4 para o paloco do Pacífico (<i>Gadus chalcogrammus</i>).	35
Figura 17 - Curva de amplificação do controlo positivo para o paloco do Pacífico (<i>Gadus chalcogrammus</i>).	35

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Tipos de fraude alimentar mais comuns nos alimentos mais suscetíveis (adaptado de Parlamento Europeu 2013; Johnson 2014; Leal 2019).	7
Tabela 2 - Casos reportados de fraude alimentar com mais impacto a nível mundial (adaptado de Leal 2019).	9
Tabela 3 - Últimos cinco casos de fraude alimentar reportados em Portugal.	10
Tabela 4 - Parâmetros importantes para a interpretação de resultados.	20
Tabela 5 - Informação sobre o tipo, formato de apresentação, nome científico no rótulo e local de recolha das amostras.	25
Tabela 6 - Componentes incluídos nos kits comerciais de deteção em qPCR em tempo real da Biopremier® (Lisboa, Portugal).	28
Tabela 7 - Esquema de pipetagem para a preparação de reações de qPCR em tempo real dos kits comerciais da Biopremier® (Lisboa, Portugal).	29
Tabela 8 – Programa da qPCR em tempo real dos kits comerciais da Biopremier® (Lisboa, Portugal).....	29
Tabela 9 – Quantificação de DNA e razão da absorvência a 260/280 das amostras extraídas, por tipo de amostra, formato de apresentação e espécie apresentada no rótulo.	30
Tabela 10 - Quantificação de DNA e razão da absorvência a 260/280 das amostras que foram submetidas à reextração fenólica.	31
Tabela 11 – Diluição final das amostras extraídas.	31
Tabela 12 - Valores de Ct obtidos em amostras que amplificaram mais do que uma das espécies de bacalhau em estudo.	33
Tabela 13 - Avaliação das curvas de amplificação das amostras que amplificaram mais do que uma espécie de bacalhau em estudo.	35
Tabela 14 – Descrição das amostras testadas e dos resultados da qPCR em tempo real considerando as espécies <i>Gadus morhua</i> , <i>Gadus macrocephalus</i> e <i>Gadus chalcogrammus</i>	36

Lista de Abreviaturas

ASAE - Autoridade de Segurança Alimentar e Económica

BA – Bacalhau do Atlântico

BP – Bacalhau do Pacífico

Ct - *Cycle Threshold*

CVMC - Clínica Veterinária Militar de Canídeos

CVME - Clínica Veterinária Militar de Equinos

C3 - Cozinhas de Confeção Centralizada

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

DSAVE - Departamento de Segurança Alimentar e Vigilância Epidemiológica

EMA - Adulteração Motivada Economicamente

ESAVE – Equipa de Segurança Alimentar e Vigilância Epidemiológica

FAO - *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

IUU- *Illegal, Unreported and Unregulated*

LBDB - Laboratório de Bromatologia e Defesa Biológica do Exército Português

PP – Paloco do Pacífico

qPCR – Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa

UMLDBQ - Unidade Militar Laboratorial de Defesa Biológica e Química

UMMV - Unidade Militar de Medicina Veterinária

U/E/O - Unidades/Estabelecimentos/Órgãos

VAT – Visitas de Apoio Técnico

1. Introdução

Realizada no âmbito do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, esta dissertação tem como principais objetivos: verificar se existe fraude alimentar no bacalhau fornecido ao Exército Português, identificar práticas fraudulentas comuns no bacalhau, confirmar se a qPCR em tempo real é uma técnica eficaz em alimentos confeccionados ou com algum grau de processamento passível de ser utilizada de forma rotineira pelo Exército Português no controlo de qualidade e segurança dos alimentos.

Este trabalho é composto por uma primeira parte, de carácter mais teórico, onde a fraude alimentar é contextualizada e inserida no contexto mais amplo da proteção alimentar e saúde pública. Também são apresentados alguns exemplos reais de situações de fraude alimentar, com menção dos alimentos mais suscetíveis e do tipo de fraude a que estão sujeitos. E refere-se ainda a importância do consumo de bacalhau especificamente em Portugal, e abordam-se técnicas de identificação e autenticação de espécies, com foco na técnica da qPCR em tempo real. A segunda parte deste trabalho consiste na descrição das atividades de análise das amostras de bacalhau colhidas das unidades alimentares do Exército Português utilizando a técnica de qPCR em tempo real e os resultados obtidos e sua discussão. Por fim, são apresentadas as conclusões e as principais limitações e recomendações para trabalhos futuros.

2. Relatório de Estágio

No âmbito do plano de estudos do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, o estágio curricular foi realizado na área científica de Higiene e Segurança Alimentar. Este teve uma duração de seis meses, com início a 3 de outubro de 2022 e término a 31 de março de 2023, perfazendo as 500 horas de estágio obrigatórias.

A orientação ficou a cargo do Médico Veterinário Pedro Miguel Tomás Silva, Tenente-Coronel do Exército Português, e da Professora Doutora Ana Rita Barroso Cunha de Sá Henriques, docente na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa. Este estágio curricular encontra-se também inserido no Tirocínio de Promoção a Oficial de Medicina Veterinária da Academia Militar, que compreende duas partes.

Numa primeira fase, a realização do estágio curricular que serve de base a esta dissertação, realizado no período mencionado acima, maioritariamente na Unidade Militar de Medicina Veterinária (UMMV) onde acompanhei as Visitas de Apoio Técnico (VAT) às U/E/O do Exército Português na zona sul e ilhas, com a supervisão, sobretudo, da Alferes Médica Veterinária Rafaela Oliveira, do Alferes Médico Veterinário Luís Dionísio, da Alferes Enfermeira Veterinária Ana Catarina Sá e da Alferes Enfermeira Veterinária Francisca Pinheiro. O acompanhamento das VAT teve como principal objetivo recolher amostras de bacalhau e acompanhar o trabalho realizado por esta vertente da Medicina Veterinária no Exército Português.

As VAT foram realizadas à Unidade de Apoio do Comando da Logística, ao Regimento de Lanceiros nº 2, à Escola de Sargentos do Exército, ao Regimento de Guarnição nº 1, à Unidade de Apoio da Zona Militar dos Açores, ao Instituto dos Pupilos do Exército, à Unidade de Apoio Geral de Material do Exército, à Brigada de Reação Rápida, ao Instituto Universitário Militar, à Academia Militar – Lisboa, à Escola das Armas e à empresa que abastece grande parte as U/E/O.

Durante as últimas duas semanas de outubro, estive na Escola dos Serviços, na Póvoa de Varzim, onde também acompanhei o Major Médico Veterinário Samuel Migueis e a Alferes Enfermeira Veterinária Sêrgia Pimenta nas VAT que se realizaram na zona norte do país, nomeadamente ao Regimento de Engenharia nº3, ao Centro de Saúde Militar de Coimbra e à Brigada de Intervenção.

Ainda no âmbito do estágio curricular, entre os meses de janeiro e março, intercalei as VAT com idas ao LBDB, com a supervisão do Major Médico Veterinário Wilson Antunes e a Tenente Médica Veterinária Joana Pita, onde processei as amostras recolhidas e realizei as extrações de DNA, as reações de qPCR em tempo real para obtenção de resultados e redação desta dissertação.

Numa segunda fase, já no âmbito do Tirocínio de Promoção a Oficial de Medicina Veterinária da Academia Militar, realizei um estágio que se dividiu pelas restantes vertentes da Medicina Veterinária do Exército Português, com o objetivo de acompanhar o trabalho realizado nestas três áreas. Durante o mês de abril, em Mafra, na Clínica Veterinária Militar de Equinos (CVME), pertencente à UMMV. No mês de maio, no LBDB, em Lisboa, da Unidade Militar Laboratorial de Defesa Biológica e Química (UMLDBQ). E durante os meses de junho e julho, na Clínica Veterinária Militar de Canídeos (CVMC), em Lisboa, também pertencente à UMMV.

Por fim, ao longo do Estágio Curricular efetuei a redação da presente dissertação.

3. Revisão Bibliográfica

3.1. Fraude alimentar e enquadramento na Proteção Alimentar

O termo fraude alimentar é um termo genérico que, apesar de existir quase desde sempre, não tem ainda uma definição consensual (Correia 2018). A prática de fraude alimentar já existe desde a idade média, com alteração de pesos e medidas dos alimentos (Oliveira 2016).

Uma das definições mais aceites de fraude alimentar engloba atitudes deliberadas e intencionais de “*substituição, adição, adulteração, ou representação enganosa de alimentos, ingredientes alimentares ou embalagens; ou alegações falsas e enganosas feitas acerca de um produto para a obtenção de ganhos económicos podendo ter impacto na saúde dos consumidores*” (Spink and Moyer 2011; Carvalho 2020).

O principal objetivo da proteção do consumidor passa por proibir a disponibilidade de produtos fraudulentos não seguros ou que não cumpram os requisitos de qualidade e segurança, incluindo a prevenção, intervenção e resposta a incidentes de qualidade alimentar, segurança alimentar, fraude alimentar e defesa alimentar (Correia 2018). Então, para além da fraude alimentar, existem mais três componentes a ter em conta e que podem ser categorizadas de acordo com a motivação que as desencadearam e tipo de ação realizada, como apresentado na Figura 1 (Carvalho 2020).



Figura 1 - Componentes da proteção do consumidor (adaptado de Leal 2019).

A adulteração pode ser não intencional ou intencional. Na adulteração não intencional ou acidental incluem-se as componentes de segurança alimentar (*food safety*) e de qualidade alimentar (*food quality*), já na adulteração intencional estão contempladas a fraude alimentar (*food fraud*) e a defesa alimentar (*food defense*) (Correia 2018).

Os conceitos de segurança dos alimentos e qualidade dos alimentos podem suscitar algumas dúvidas. Segundo o *Codex Alimentarius*, segurança dos alimentos é definida como “a garantia de que o alimento não causará danos ao consumidor quando preparado e/ou consumido de acordo com a utilização prevista” (Codex Alimentarius Commission 2011). Já a qualidade de um alimento, segundo a Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE), está relacionada com “o conjunto de propriedades e características de um produto alimentar ou alimento, relativas a matérias-primas ou ingredientes utilizados na sua elaboração (*natureza, composição, pureza, identificação, origem e rastreabilidade*), assim como os processos de elaboração, armazenamento e embalagem, utilizados na apresentação do produto final ao consumidor” (ASAE 2022).

A distinção entre estas duas componentes não intencionais assenta na premissa que a segurança dos alimentos está focada em contaminações que podem surtir efeitos negativos e graves na saúde pública e provocar receio no consumidor, enquanto que a qualidade alimentar está focada nas consequências ao nível de perdas económicas, quebra de vendas e perda da confiança do consumidor por o alimento não estar em conformidade com os seus requisitos e especificações, sem colocar em risco a saúde pública (Spink and Moyer 2011; Correia 2018; Leal 2019).

A componente de defesa alimentar, à semelhança da fraude alimentar, tem também motivações intencionais e é definida como o conjunto de “procedimentos adotados para garantir a segurança dos alimentos e bebidas e das suas redes de abastecimento, contra ataques maliciosos e ideologicamente motivados, levando à contaminação ou quebra no abastecimento” (British Standards Institution 2017). Assim a defesa alimentar, traduz ações que intencionalmente alteram os produtos alimentares capazes de causar consequências nefastas à saúde pública.

A fraude alimentar está associada à obtenção de lucro económico, pelo que, o seu foco não é causar dano à saúde do consumidor, pelo menos, não diretamente. Assim, detetar práticas fraudulentas torna-se mais difícil, permitindo que ocorram com maior frequência, do que práticas que tenham um impacto negativo na saúde pública (Johnson 2014). A predisposição para a ocorrência de fraude alimentar é maior quando existe, pelo menos, uma motivação e oportunidade e/ou a falta de um controlo rigoroso que seja eficaz na deteção e combate da fraude (Correia 2018).

Existe também um termo com alguma importância relacionado com a fraude alimentar, a chamada Adulteração Motivada Economicamente (EMA), que é considerada uma

subcategoria da fraude alimentar específica, sendo descrita como a alteração de um produto alimentar de forma a aumentar o seu lucro, reduzindo os custos de produção (Manning and Soon 2016).

Assim, a fraude alimentar constitui um risco para a proteção alimentar, pelo facto de não resultar em danos diretos e intencionais para a saúde pública, um aspeto que originaria motivos de alarme, mas por passar mais despercebida aos mecanismos de deteção. Até que se criem as primeiras suspeitas pode demorar algum tempo, porque as consequências não são imediatamente perceptíveis e na maior parte dos casos não nos causa dano direto (Johnson 2014). Por isso, existe cada vez mais a necessidade de comunicar os riscos e os incidentes, como forma de difundir e resolver as diferenças de conhecimento entre os especialistas e o público-alvo (Oliveira 2017).

Como forma de manter a proteção do consumidor contra a fraude alimentar, o Regulamento (UE) nº 1169/2011 de 25 de outubro de 2011, estabelece regras específicas para garantir a precisão da informação nos rótulos dos alimentos, com o intuito de garantir a transparência das informações que são fornecidas aos consumidores. Este regulamento exige que os rótulos dos alimentos forneçam informações sobre o conteúdo do produto, sendo algumas: a lista de ingredientes, a quantidade líquida, a data de validade e as informações nutricionais, assim como qual a origem de determinados ingredientes utilizados. Também proíbe informações enganosas nos rótulos, incluindo a apresentação falsa das informações e características do produto (Regulamento (UE) nº 1169/2011).

3.1.1. Vulnerabilidade e tipos de fraude alimentar

Atualmente, existem variadas formas de fraude alimentar. A evolução do comércio internacional, a globalização do mercado, as cadeias de produção com muitos intermediários, a existência atual de vários formatos em que os produtos são apresentados no mercado, o aparecimento de novas experiências alimentares e iguarias e os próprios métodos de controlo não serem os mais eficazes, vieram permitir camuflar práticas fraudulentas nos alimentos (Mohanty et al. 2013; Amaral 2021).

Assim, os tipos de fraude mais comuns são: 1) a substituição de um produto por um outro que lhe seja similar; 2) a adulteração da qualidade do produto, através da alteração das suas características específicas; 3) a adição de componentes alimentares não autorizados; 4) a alteração da data de validade do produto; 5) a falsificação da origem ou das matérias primas utilizadas; 6) a diluição dos produtos para diminuir a quantidade do produto em causa; 7) a rotulagem incompleta ou até mesmo incorreta (Oliveira 2016; Moyer et al. 2017; Tibola et al. 2018; Leal 2019).

De acordo o Decreto-Lei nº 28/84 de 20 de janeiro 1984, nomeadamente nos artigos 23º e 82º, as práticas de fraude alimentar de contrafeição, falsificação, depreciação ou a utilização de produtos alimentares de natureza diferente ou qualidade inferior que alterem a genuinidade, as condições para que sejam alimentos aptos para o seu consumo ou as características analíticas que lhes são impostas por lei, são práticas puníveis por lei. Este Decreto-Lei estabelece normas para a qualidade, rotulagem e segurança dos produtos alimentares e prevê sanções, incluindo coimas, para o não cumprimento das disposições legais relacionadas com a autenticidade e qualidade dos alimentos.

Segundo o relatório sobre crise alimentar, fraude na cadeia alimentar e respetivo controlo do Parlamento Europeu, os dez alimentos mais expostos ao risco de fraude alimentar são: o azeite, o peixe, alimentos de origem biológica, o leite, os cereais, o mel e o xarope de açúcar, o café e o chá, as especiarias, o vinho e certos sumos de fruta. Na Tabela 1 estão apresentados os tipos de fraude alimentar que são mais comuns encontrar nos alimentos mais suscetíveis.

Tabela 1 - Tipos de fraude alimentar mais comuns nos alimentos mais suscetíveis (adaptado de Parlamento Europeu 2013; Johnson 2014; Leal 2019).

Alimentos	Práticas fraudulentas
Azeite	Substituição por outras gorduras vegetais refinadas, de menor valor comercial e menor qualidade.
Peixe	Substituição de espécies de maior valor económico por outras de menor, adição de gelo ou de expansores que retêm a água para aumentar o peso final, utilização de espécies não declaradas e rotulagem incorreta.
Alimentos de origem biológica	Rotulagem fraudulenta em alimentos que não têm origem biológica e adição de produtos proibidos na produção biológica não declarados nos rótulos.
Leite e produtos lácteos	Diluição do leite e suplementação com melanina para aumentar de forma artificial o teor proteico do leite, e adição de leite de vaca ou de ovelha em queijo de cabra.
Mel e xarope de açúcar	Adulteração do mel com outros açúcares e adoçantes sem a sua declaração no rótulo e a falsificação da origem geográfica autêntica.
Café	Falsificação da origem, denominação incorreta de produto orgânico ou sustentável e adição de folhas ou palha de milho para aumentar o peso final.

Chá	Mistura com folhas de outras plantas que não as que estão indicadas nos rótulos e adição de corantes.
Especiarias	Adição de corantes e substâncias de menor valor para minimizar os custos.
Vinho	Diluição com água e adição de açúcar, adulteração da origem do produto e adição de destilados de fruta em aguardentes vínicas.
Determinados sumos de fruta	Adulteração do sumo com água e açúcar e adição de corantes e aromatizantes sintéticos sem estarem incluídos no rótulo.

3.1.2. Práticas fraudulentas mais comuns no setor do pescado

Segundo a *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO), o setor do pescado foi considerado a terceira categoria de alimentos de maior risco de fraude alimentar (Reilly 2018). Os tipos de fraude que mais se observam são a substituição de espécies; a rotulagem incorreta para ocultar a origem geográfica de espécies cuja pesca é ilegal, ou para ocultar a adição de ingredientes; a falsificação de produtos autênticos; o uso não declarado de aditivos alimentares, como aglutinantes de água, ou de água de vidragem em excessos em produtos congelados para aumentar o peso final; e o uso ilegal de aditivos alimentares para melhorar a aparência visual do pescado (Reilly 2018). Destas, as que mais se destacam são a substituição de espécies e a rotulagem incorreta.

A substituição de espécies é um problema generalizado, que teve como grande impulsionador a sobrepesca para corresponder às exigências do consumidor levando à diminuição da disponibilidade de certas espécies marinhas, e aliado à grande variedade de formatos que o pescado tem atualmente (Helyar et al. 2014). Este tipo de fraude acontece, quando espécies de elevado valor e mais desejáveis são trocadas por espécies mais baratas e de menor qualidade. É ainda comum a sua ocorrência quando há intenção de omitir a origem do pescado, em situações de pesca ilegal, não declarada e não regulamentada (IUU) (Reilly 2018).

A rotulagem incorreta surge muito associada também à prática IUU. Este tipo de fraude pode ocorrer por diversos motivos com o intuito de omitir: a origem de determinadas espécies cuja pesca é ilegal; a origem de espécies consideradas espécies de risco; e calibres não permitidos para pesca. Por isso, desde 2002, tornou-se obrigatório mencionar tanto o nome comercial como o nome científico do pescado, a origem geográfica da captura e o método de produção dos produtos da pesca (Mohanty et al. 2013).

3.2. A importância do bacalhau

A introdução do peixe na nossa alimentação permitiu aumentar a diversidade da nossa dieta, tornando-se um elemento fundamental para uma alimentação saudável.

O consumo de peixe proporciona múltiplos benefícios para a saúde humana. Estes benefícios incluem a redução do risco de doenças cardiovasculares em adultos, a prevenção de demência e a deterioração muscular associada ao envelhecimento em idosos, além de prevenir perturbações hiperativas de défice de atenção e asma em crianças (Mohanty et al. 2013; Thilsted et al. 2014).

O peixe, em geral, é um alimento que constitui uma excelente fonte de aminoácidos essenciais e ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa, como o ômega-3. Também é fonte de vitaminas, como vitamina A e D e algumas vitaminas do complexo B. E fornece ainda sais minerais, nomeadamente, iodo, selénio, zinco, ferro, cálcio, fósforo e potássio (Hall et al. 2013; Thilsted et al. 2014; Almeida et al. 2015).

O bacalhau ganha importância no consumo e comércio nacional desde o século XV, com a pesca portuguesa de bacalhau no nordeste do Oceano Atlântico. E está enraizado na gastronomia portuguesa nos hábitos alimentares atuais e continua a ser o prato principal do Natal na maioria dos lares portugueses (Sobral and Rodrigues 2013; Almeida et al. 2015).

Segundo um estudo realizado pelo Grupo Marktest (2022) cerca de 86% dos lares portugueses consumiram bacalhau no ano de 2021 e cerca de um terço desses lares consome bacalhau, pelo menos, uma vez por semana. De acordo com o mesmo estudo, desde 2013, que o consumo anual de bacalhau nos lares portugueses foi superior a 78,1%, isto é, 78,1% da população consumiu pelo menos uma vez bacalhau no ano, como está apresentado na Figura 2.

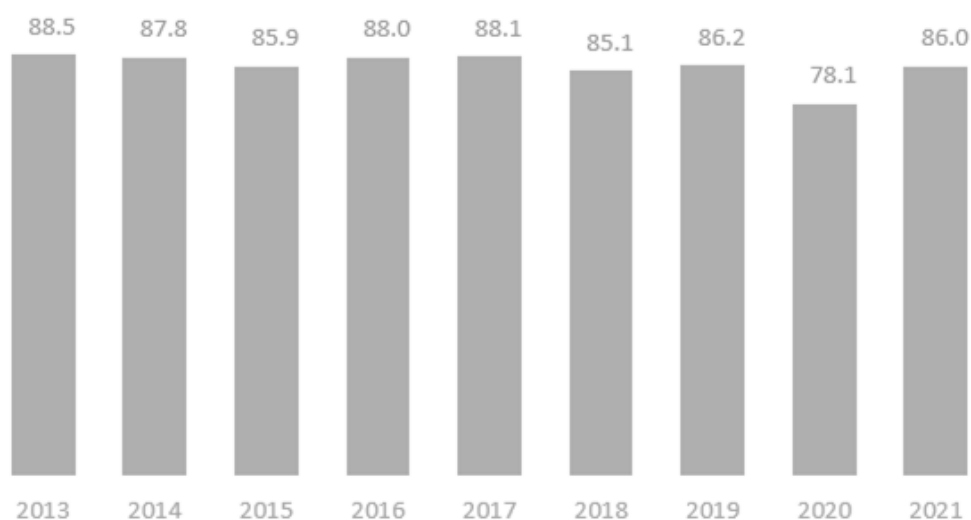


Figura 2 - Percentagem de consumo de bacalhau nos lares portugueses de 2013 a 2021

(retirada de <https://www.marktest.com/wap/a/n/id~2951.aspx>).

3.3. Taxonomia do Género *Gadus*

O Bacalhau do Atlântico e o Bacalhau do Pacífico são duas espécies de peixes que pertencem à mesma classificação taxonómica. Ambos estão inseridos no Reino Animalia, no Filo Chordata, na Classe Actinopterygii, na Ordem Gadiformes, na Família Gadidae e no Género *Gadus*. No entanto, diferem na espécie, sendo o bacalhau do Atlântico conhecido como *Gadus morhua*, enquanto o bacalhau do Pacífico é denominado *Gadus macrocephalus* (Cohen et al. 1990).

De acordo com o Decreto-Lei nº 25/2005 de 28 de janeiro 2005, a classificação de bacalhau é restrita a apenas três espécies pertencentes ao género *Gadus*. Essas espécies são o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*), o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*) e o bacalhau da Gronelândia (*Gadus ogac*). Todas as outras espécies relacionadas são consideradas como espécies afins, ou seja, não são classificadas especificamente como bacalhau de acordo com a referida legislação.

Estudos posteriores utilizando a metodologia de sequenciação de DNA mitocondrial revelaram que o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*) e o bacalhau da Gronelândia (*Gadus ogac*) são geneticamente indistinguíveis, pelo que, estas espécies poderiam ser sinonimizadas (Coulson et al. 2006; Evseenko et al. 2006).

A nível morfológico, o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*) tem a cabeça estreita, cor castanha-esverdeada na parte dorsal superior e parte ventral mais pálida (Figura 3) (Cohen et al. 1990).



Figura 3 - Bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*) (retirada de https://fish-commercial-names.ec.europa.eu/fish-names/species_pt?sn=16452).

Está distribuído geograficamente no Oceano Atlântico, desde o Cabo Hatteras na Carolina do Norte, até ao Oceano Glacial Ártico no Mar Barents no norte da Noruega (Figura 4). E habita no fundo no mar, podendo ter comportamentos pelágicos, de acordo com as condições atmosféricas, e tem um comprimento médio de cerca de 130 cm (Cohen et al. 1990; Araújo 2021).

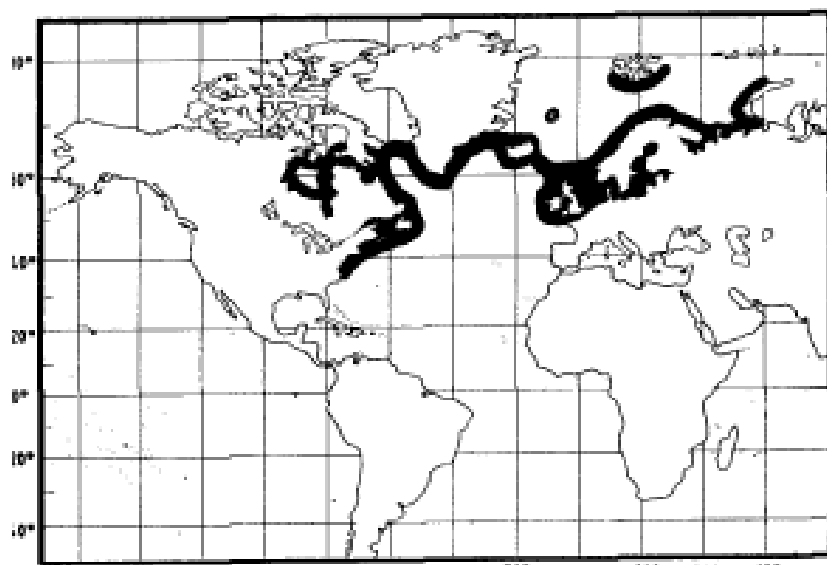


Figura 4 - Distribuição geográfica do bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*) (retirada de Cohen et al. 1990).

O bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*) tem uma cabeça relativamente larga, coloração dorsal castanha acinzentada com algumas vermiculações e mais pálida ventralmente (Figura 5) (Cohen et al. 1990).

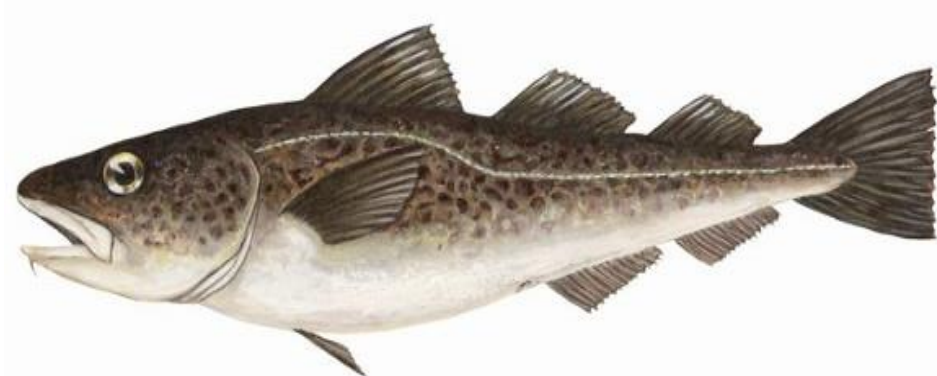


Figura 5 - Bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*) (retirada de <http://www.bocanomundo.com/vida/bacalhau-no-mundo-morhua-e-a-familia>).

Esta espécie pode ser encontrada na orla no Pacífico Norte, desde o Mar Amarelo (que banha a zona leste da República Popular da China) até Los Angeles nos Estados Unidos da América (Figura 6). É um peixe pelágico e habita sobretudo nas colunas de água, podendo teoricamente atingir um comprimento máximo de 94 cm, sendo variável consoante a sua distribuição batimétrica (Cohen et al. 1990; Araújo 2021).

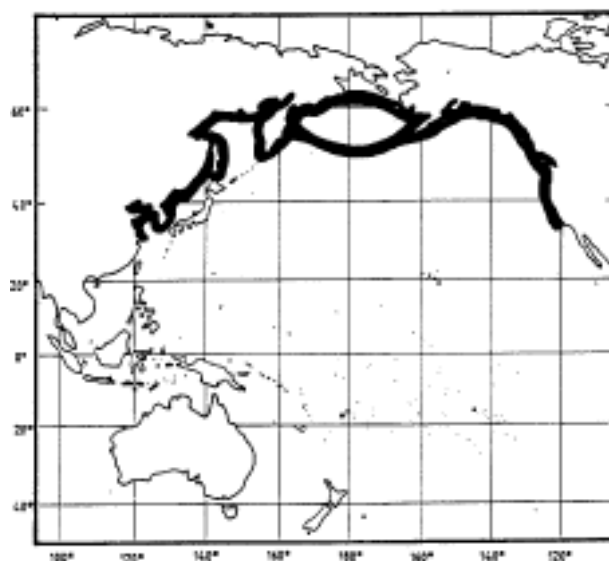


Figura 6 - Distribuição geográfica do bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*) (retirada de Cohen et al. 1990).

A nível alimentar, o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*) é um peixe de menor qualidade que o bacalhau do Atlântico, não tendo uma textura tão tenra, não se desfaz em lascas, é mais fibroso e tem um sabor menos característico. No entanto, apesar de ser vendido a preços mais baixos comparativamente ao bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*), há também um elevado consumo desta espécie (Tomás 2015).

3.3.1. Alteração taxonómica do paloco do Pacífico

De acordo com Direção-Geral dos Recursos Naturais, Segurança e Serviços Marítimos (DGRM), apesar da sua denominação comercial ser escamudo do Alasca, pode também ter como denominação comercial de paloco do Pacífico, sendo que ambas as denominações podem ser utilizadas e consideradas corretas (NOAA 2013).

Contudo, o seu nome científico sofreu alterações. Anteriormente, e de acordo com o Decreto-Lei nº 25/2005 de janeiro de 2005, o paloco do Pacífico apresentava como espécie *Theragra chalcogramma*, mas passou a ter a nomenclatura de *Gadus chalcogrammus* (NOAA 2013). Esta alteração foi baseada em estudos genéticos, através sequenciamento de DNA, que mostraram que o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*) está intimamente relacionado com o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*) (Teletchea et al. 2006; NOAA 2013).

Devido a esta relação genética, o paloco do Pacífico, passou a fazer parte da linhagem do género *Gadus*, adquirindo assim, a nova nomenclatura de *Gadus chalcogrammus* (Coulson et al. 2006; Teletchea et al. 2006).

O paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*) distingue-se por ter uma ligeira projeção do maxilar inferior, uma coloração dorsal verde-azeitona acastanhada, lateralmente com tons prateados, mais pálido ventralmente e tem as barbatanas escuras (Figura 7) (Cohen et al. 1990).



Figura 7 - Paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*) (retirada de <https://polarpedia.eu/en/alaska-pollock/>).

A sua distribuição geográfica é no norte do Oceano Pacífico, desde o Mar do Japão até ao Centro da Califórnia (Figura 8). E habita em profundidades de 30 a 400 metros e tem um tamanho médio de 80 cm (Cohen et al. 1990; Araújo 2021).

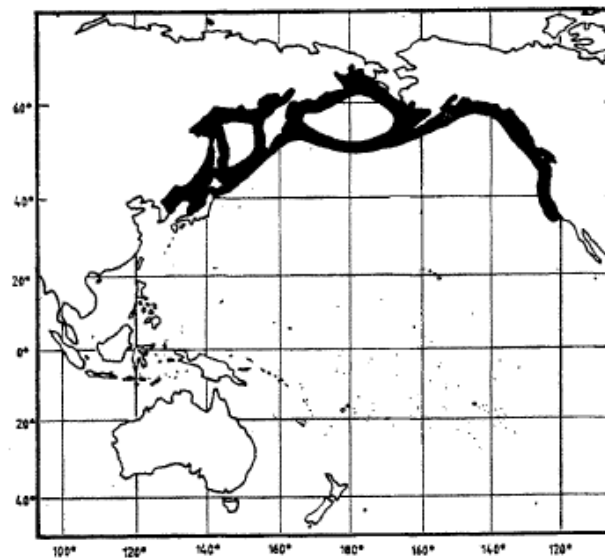


Figura 8 - Distribuição geográfica do paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*) (retirada de Cohen et al. 1990).

O paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*) é um peixe de tamanho inferior quando comparado com o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*) e com o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*) e normalmente é comercializado em formato de migas, o que facilita

as práticas fraudulentas de substituição e rotulagem incorreta, principalmente do bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*) (Tomás 2015).

3.4. Identificação e confirmação molecular de espécies de bacalhau

O bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*) tem um enorme valor comercial, tanto a nível nacional como internacional, sendo uma das espécies de peixe mais consumidas na Europa e em Portugal. O elevado consumo e o aumento do interesse e procura pelos consumidores, levaram à sua sobre-exploração e a limitações da sua captura que culminaram numa diminuição acentuada da sua disponibilidade marinha. Para corresponder à procura do consumidor e aumentar a disponibilidade comercial, começou a procura por outras espécies próximas do bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*) (Calo-Mata et al. 2003; Herrero et al. 2010; Lago et al. 2013).

No caso do bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*), é comum que essa substituição seja por espécies com características morfológicas, organolépticas e gastronómicas semelhantes, nomeadamente, o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*) e o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*) (Lago et al. 2013).

O bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*) é um peixe muito versátil, pode ser comercializado com diversas apresentações: fresco, congelado, cru, cozido, em conserva, em posta, em migas, em filetes ou em refeições já prontas. Durante os processos da cadeia de produção para estas apresentações, as características morfológicas originais são removidas, o que, inadvertidamente, facilita práticas fraudulentas (Lago et al. 2013).

A autenticação e a rastreabilidade do bacalhau são fundamentais para garantir a segurança dos alimentos, a qualidade dos produtos e a proteção dos consumidores. Atualmente, existem diversas metodologias desenvolvidas para identificar e autenticar bacalhau e produtos derivados do bacalhau. Estas técnicas permitem identificar vários tipos de fraude, entre os quais, falsificação, rotulagem incorreta e substituição de espécies (Mohanty et al. 2013).

Ao implementar estas metodologias, é possível assegurar a origem do bacalhau, garantindo que o produto é genuíno, seguro para consumo e que esteja em conformidade com os regulamentos e padrões de qualidade estabelecidos, contribuindo para a confiança do consumidor e para a integridade do mercado de géneros alimentícios.

3.4.1. Metodologias de identificação e autenticação

Atualmente, existem diversas técnicas de identificação de bacalhau. O método tradicional de identificação é baseado nas características morfológicas da espécie, como por

exemplo: a forma corporal, o padrão e a distribuição de cores, o tamanho e número de escamas, o número e posição das barbatanas, o número e o tipo de raios da barbatana, incluindo as medidas corporais (Bréchon et al. 2013; Scarano and Rao 2014; Soares 2015).

Nem sempre é possível fazer a identificação correta com base no aspeto morfológico, porque as espécies podem apresentar variações intraespecíficas mínimas, que passam despercebidas a esta metodologia (Soares 2015). E quando o bacalhau é submetido a processos específicos de produção, como, filetagem, corte ou desfia, torna-se difícil, e por vezes impossível, fazer a sua identificação. Na maioria das situações, o bacalhau perde as suas características morfológicas que permitem fazer a sua distinção (Scarano and Rao 2014).

Assim, para ultrapassar estas limitações, foi necessário desenvolver novas técnicas de identificação, como métodos de biologia molecular que se baseiam na análise do polimorfismo das proteínas e do DNA (Rasmussen and Morrissey 2008; Herrero et al. 2010; Soares 2015). Para além de permitirem verificar a autenticidade dos alimentos com maior precisão em comparação com a avaliação das características morfológicas, estas técnicas oferecem também a possibilidade de: estabelecer relações filogenéticas entre espécies, géneros, famílias ou populações; estimar tamanho de populações; e identificar híbridos (Tomás 2015).

Em comparação com a análise morfológica, estas novas técnicas têm como desvantagem serem mais dispendiosas e necessitarem de equipamentos específicos e processos mais complexos (Tomás 2015).

Em relação à análise de proteínas, são utilizadas maioritariamente em alimentos crus, frescos ou pouco processados. Uma das desvantagens deste método é que, quando sujeitas a tratamentos por ação do calor, as proteínas sofrem desnaturação, inviabilizando este método. Estudos realizados, mostraram que mesmo um processo de tratamento térmico ligeiro torna a análise proteica ineficaz (Rasmussen and Morrissey 2008). Também tem como desvantagem, uma eficiência diminuída quando se comparam produtos que utilizam espécies muito próximas filogeneticamente e requer que sejam feitas análises específicas para cada proteína de interesse (Pepe et al. 2005; Rasmussen and Morrissey 2008; Soares 2015).

Os avanços na tecnologia genética permitiram um rápido desenvolvimento de técnicas baseadas em DNA para a identificação de espécies de peixes. Uma das vantagens desta técnica é resultado do DNA estar presente em todas as células e tecidos animais, ser específico de cada animal, ser estável a elevadas temperaturas, e poder ser facilmente isolado e analisado (Asensio Gil 2007; Fontanesi 2009). Estas técnicas, mais sensíveis e específicas, demonstram ter melhor performance em alimentos com maior grau de processamento, quando comparadas com as técnicas de análise de proteínas (Rasmussen and Morrissey 2008).

Atualmente, os métodos genéticos mais utilizados são os que estão relacionados com a técnica da qPCR, que se baseia na hibridação de oligonucleótidos específicos (primers) com sequências características nos genomas, permitindo sintetizar milhões de cópias do DNA-alvo pretendido (Pepe et al. 2005; Soares 2015). A maioria das metodologias que se baseiam neste princípio, requerem a aplicação de eletroforese em gel como etapa final da análise, o que traz algumas desvantagens. Essas desvantagens incluem um aumento de tempo de execução do procedimento, uma baixa sensibilidade quando se utilizam pequenas quantidades de DNA e são técnicas mais demorosas, pois requerem processamento pós-PCR (Bréchon et al. 2013).

A qPCR é uma técnica amplamente utilizada em diversas áreas da biologia molecular. Para além da sua aplicação na identificação e autenticação de espécies, a qPCR é ainda utilizada em técnicas de sequenciamento de genomas, na investigação em genética molecular e no estudo da expressão de genes. Adicionalmente, pode ser empregue na determinação da paternidade e possui ainda uma grande relevância no diagnóstico de doenças infecciosas (Novais et al. 2004).

3.4.2. Funcionamento da qPCR em tempo real

A utilização da técnica da qPCR em tempo real tem vindo a aumentar de forma exponencial, principalmente devido à sua característica da amplificação poder ser monitorizada em tempo real, através de técnicas de fluorescência (Carvalho 2007; Rasmussen and Morrissey 2008).

A amplificação de DNA que ocorre durante a reação da qPCR em tempo real é um processo que se divide em três fases distintas (Oliveira 2010; Martins 2016):

1. Fase de iniciação: ocorrem os preparativos para a amplificação do DNA-alvo, a temperatura da reação é elevada até cerca de 95°C, levando à separação das duas cadeias complementares de DNA. Este processo é realizado por uma DNA polimerase termoestável e são adicionadas pequenas sequências de DNA (primers) que se ligam a regiões específicas do DNA-alvo servindo como ponto de partida para a síntese do novo DNA.

2. Fase de crescimento exponencial: com a redução da temperatura para cerca de 60-72°C, ocorre a amplificação propriamente dita do DNA-alvo, permitindo que os primers se liguem às regiões complementares do DNA-alvo. Assim, a DNA-polimerase, juntamente com os nucleótidos, sintetizam novas cadeias de DNA a partir dos primers que, como é resistente a altas temperaturas, permite que a reação ocorra em ciclos sucessivos sem a necessidade de adicionar mais DNA-polimerase.

3. Fase de *plateau*: a quantidade de DNA amplificado chega a um ponto de saturação, porque à medida que o número de cópias de DNA-alvo aumenta, os reagentes essenciais (primers e nucleótidos) vão começar a esgotar-se, para além de a DNA polimerase

poder ser desativada. Assim, a taxa de amplificação do DNA-alvo diminui e a quantidade de produtos de reação estabiliza (Figura 9).

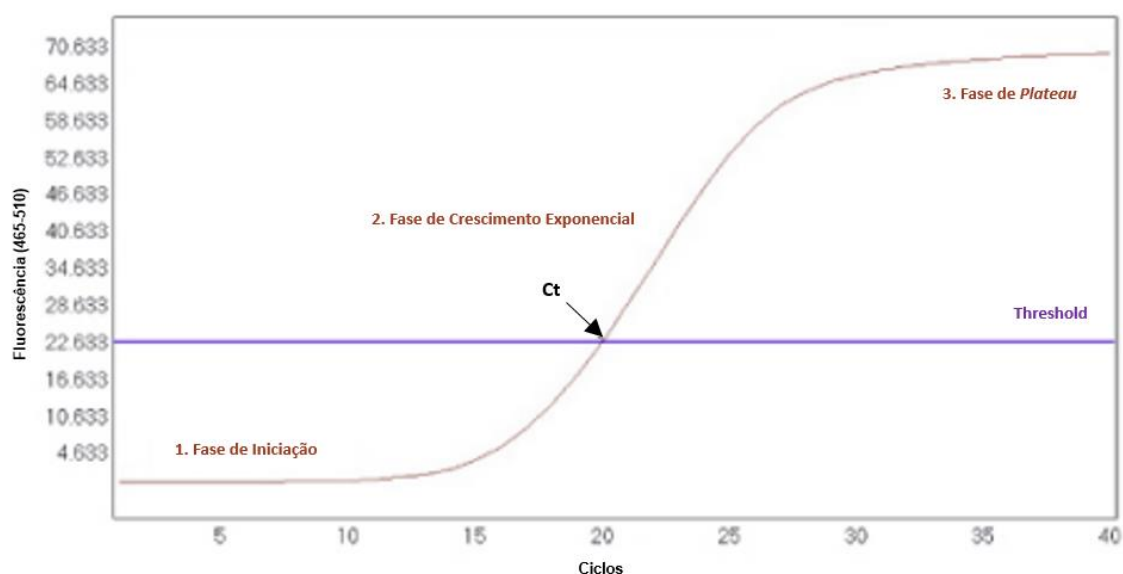


Figura 9 - Fases que compõem a curva de amplificação da qPCR em tempo real (adaptada de http://compgen.bio.unipd.it/~stefania/Didattica/AA2018-2019/MMOL_BIOINFO_BE/5_Real%20time%20PCR.pdf).

A técnica da qPCR em tempo real desempenha um papel fundamental na indústria alimentar, permitindo economizar tempo e reduzir custos. Esta técnica destaca-se também por possibilitar a identificação rápida e simples de fragmentos amplificados durante a reação e permite fazer uma avaliação quantitativa, já que permite medir a quantidade de DNA presente no início da reação. Em comparação com outras técnicas, a qPCR em tempo real permite também analisar quantidades extremamente mínimas de DNA, não requer processamentos pós-PCR permitindo economizar recursos, tornando-se uma técnica bem mais sensível e específica que as restantes técnicas de análise de DNA (Herrero et al. 2010).

A aplicabilidade desta técnica estende-se tanto ao controlo de alimentos crus como a alimentos que tenham sido submetidos a processos de produção complexos. E contribui também para a rastreabilidade dos alimentos ao longo das várias etapas de produção, garantindo manter transparência ao consumidor e promovendo uma competição justa na indústria alimentar (Herrero et al. 2011). Contudo, apresenta algumas desvantagens, nomeadamente: custo elevado dos equipamentos e da sua manutenção, e requer conhecimento técnico e científico diferenciado para o seu manuseamento (Rasmussen and Morrissey 2008).

No decorrer da qPCR em tempo real, há parâmetros relevantes para fazer a interpretação de resultados que se apresentam de forma sucinta na Tabela 4.

Tabela 4 - Parâmetros importantes para a interpretação de resultados.

Conceito	Definição	Referência
<i>Threshold</i>	Corresponde ao ponto em que a reação passa da fase de crescimento exponencial para a de crescimento linear, em que passa a haver degradação dos produtos de reação.	(Oliveira 2010)
<i>Cycle Threshold</i> (Ct)	Indica o número de ciclos necessários para que o sinal de fluorescência ultrapasse o limiar, é obtido pela interseção entre o <i>threshold</i> e a curva de amplificação. É indiretamente proporcional à concentração de DNA inicial, ou seja, quanto maior for a concentração inicial de DNA, menor será o número de ciclos necessários para que se comece a detetar a fluorescência.	(Herrero et al. 2010)

A sonda TaqMan® é um tipo de método químico baseado em fluorescência que permite a monitorização em tempo real da reação da qPCR. É composta por uma sequência específica de DNA, por um fluoróforo na extremidade 5' (designado de *reporter*) e um inibidor de fluorescência (designado de *quencher*) na extremidade 3' e uma molécula que retém a energia do fluoróforo (Oliveira 2010; Martins 2016). A utilização das sondas TaqMan® permite aumentar a especificidade e sensibilidade da qPCR em tempo real, tornando esta técnica ainda mais precisa para determinar a presença ou ausência de sequências específicas de DNA. E podem ser utilizadas tanto em amostras simples como em amostras mais complexas, compostas por várias espécies, ou em amostras com algum grau de degradação do DNA (Novais et al. 2004; Rasmussen and Morrissey 2008; Bréchon et al. 2013).

Na fase de hibridação da qPCR, a sonda liga-se à cadeia de DNA complementar. Quando chega a fase da extensão, a Taq DNA polimerase vai hidrolisar a sonda, fazendo com que o fluoróforo da extremidade 5' se separe da extremidade 3' e, uma vez livre em solução, emita a sua fluorescência característica (Figura 10) (Oliveira 2010; Martins 2016). À medida que os ciclos da qPCR se repetem, a intensidade da fluorescência emitida vai aumentando, sendo que, é tanto maior quanto maior for a quantidade de DNA que é amplificado (Carvalho 2007).

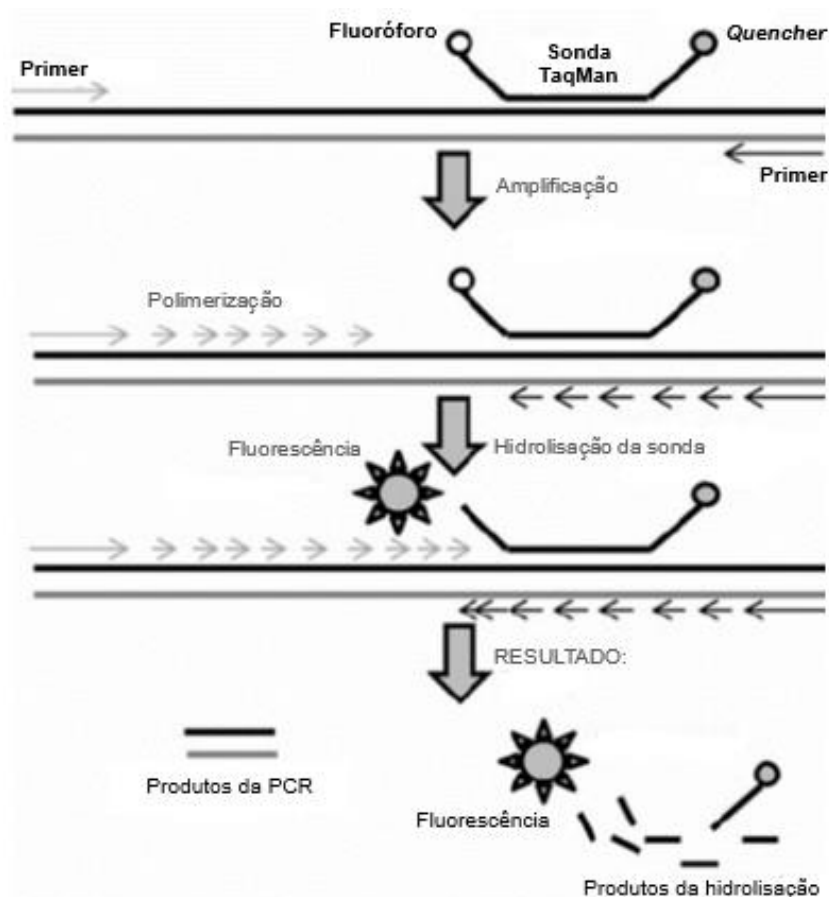


Figura 10 - Funcionamento de uma sonda TaqMan® (adaptada de

https://www.researchgate.net/figure/Mechanism-of-the-TaqMan-probe-The-probes-rely-on-the-5-3-nuclease-activity-of-Taq_fig1_257371648).

Atualmente, já estão disponíveis no mercado kits comerciais que utilizam a tecnologia TaqMan® para a identificação de espécies de peixes. Estes kits já incluem todos os reagentes necessários, controles positivos e negativos, sondas complementares às sequências específicas das espécies-alvo para as quais foram desenhadas, incluindo outros componentes necessários para a reação qPCR em tempo real. Assim, executar a técnica qPCR em tempo real de uma forma ainda mais rápida e, pode ser especialmente útil em situações de triagem, por exemplo (Asensio Gil 2007).

3.5. Enquadramento do Exército Português

No Exército Português, é da responsabilidade da Unidade Militar de Medicina Veterinária (UMMV) através do Departamento de Segurança Alimentar e Vigilância Epidemiológica (DSAVE), desenvolver e promover a Higiene e Segurança Alimentar, prestando apoio às Unidades/Estabelecimentos/Órgãos (U/E/O) do Exército Português.

Este departamento é composto por três Equipas de Segurança Alimentar e Vigilância Epidemiológica (ESAVE), distribuídas entre o norte (ESAVE-norte), centro (ESAVE-centro), sul e ilhas (ESAVE-sul e ilhas) do país, que realizam VAT de Segurança e Defesa Alimentar semestralmente às U/E/O e anualmente aos fornecedores.

Para além destas visitas, o DSAVE detém capacidades técnicas e humanas para apoiar a implementação e a manutenção de sistemas de autocontrolo, através da colheita de amostras alimentares para análises microbiológicas e da avaliação local das condições de higiene das instalações, equipamentos e manipulação dos géneros alimentícios.

Anteriormente, o Exército Português procedia à aquisição centralizada e entrega descentralizada dos géneros alimentícios para posterior confeção nas U/E/O de acordo com a ementa. Nos locais sem capacidade de confeção, o Exército Português assegurava a distribuição da alimentação já confeccionada. Contudo, houve necessidade de melhorar este modelo, devido: à falta de recursos humanos.

Assim, o novo modelo de fornecimento de alimentação propõe um processo de externalização, pela contratação de empresas, e alterações que permitem reduzir o número de Cozinhas de Confeção Centralizada (C3) para um total de três em todo o território nacional, que confeccionam e fornecem refeições para todas as U/E/O sem encargo operacional.

Relativamente ao processo de externalização, o serviço de alimentação ou a entrega de géneros alimentícios é garantido por empresas selecionadas através de concurso público e compreende três modalidades de ação distintas:

- Receção de géneros que são fornecidos pelas empresas e confeção nas U/E/O por elementos militares, permitindo manter em funcionamento as cozinhas com encargo operacional;
- Fornecimento de géneros alimentícios e confeção das refeições nas U/E/O do Exército Português, mas com a total responsabilidade da empresa, isto é, a empresa fornece os géneros e o pessoal;
- Géneros e confeção das ementas em instalações próprias da empresa e distribuição das refeições prontas nas U/E/O do Exército Português que não têm encargo operacional.

Para complementar e assegurar o controlo da receção das refeições e géneros alimentícios, serviços de preparação e confeção simples, preparação da área de distribuição e copa e manutenção dos equipamentos de confeção, foi criada também uma equipa de apoio à alimentação.

O que se tem verificado é que os rótulos de bacalhau das U/E/O nem sempre correspondem ao bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*). Por vezes também se encontram rótulos de bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*) e de paloco do Pacífico (*Gadus*

chalcogrammus), o que suscita desconfianças acerca da autenticidade do bacalhau que é servido aos militares do Exército Português.

O desenvolvimento deste trabalho pretende perceber se existe fraude alimentar no bacalhau que é fornecido, verificar o cumprimento da contratualização das espécies de bacalhau e, implementar no Exército Português ferramentas de rotina, que permitam o controle adequado dos produtos contratualizados nas ementas das U/E/O.

4. Materiais e Métodos

4.1. Recolha das amostras

As amostras de bacalhau (n=47) foram recolhidas nas U/E/O do Exército Português e nos fornecedores de géneros e refeições confeccionadas, durante a realização das VAT entre os meses de outubro de 2022 a março de 2023, pela ESAVE-Sul e Ilhas da UMMV. Nomeadamente, na Unidade de Apoio do Comando da Logística (em Paço de Arcos), na Brigada de Reação Rápida (em Tancos), no Instituto Universitário Militar (no Restelo), na Academia Militar – Sede (em Lisboa), no Regimento de Lanceiros nº2 (na Amadora), na Escola de Sargentos do Exército (nas Caldas da Rainha), no Regimento de Guarnição nº1 (na Ilha Terceira), na Unidade de Apoio da Zona Militar dos Açores (em Ponta Delgada), no Instituto dos Pupilos do Exército (em São Domingos de Benfica), na Escola das Armas (em Mafra) e na Unidade de Apoio Geral de Material do Exército (em Samora Correia). E também na empresa responsável pelo fornecimento de alimentação e ou géneros alimentícios a U/E/O que não se encontram a produzir refeições, designada neste estudo como empresa E.

A amostras recolhidas foram, maioritariamente, amostras confeccionadas (n=35), tais como: bacalhau espiritual, bacalhau com natas, bacalhau à Brás, bacalhau cozido, bacalhau à Gomes de Sá, bacalhau com broa, bacalhau assado, bacalhau gratinado, bacalhau à Zé do Pipo, bacalhau à minhota, meia desfeita de bacalhau e bacalhau à lagareiro. E também foram recolhidas amostras de bacalhau cru (n=12), quer em posta, quer em migas. As amostras confeccionadas foram numeradas de 1 a 35 e as amostras cruas numeradas de C1 a C12, conforme apresentado na Tabela 5.

Relativamente às espécies descritas nos rótulos, cerca de 61,7% (n=29) das amostras indicavam a espécie *Gadus morhua* (bacalhau do Atlântico), 31,9% (n=15) das amostras a espécie *Gadus macrocephalus* (bacalhau do Pacífico) e 6,4% (n=3) das amostras a espécie *Gadus chalcogrammus* (paloco do Pacífico).

Todas as amostras foram conservadas a uma temperatura de -20°C desde a sua recolha até ao momento da extração de DNA.

4.2. Extração do DNA

O processo de extração de DNA foi feito com o kit comercial “DNA Extraction Kit from Food” (Biopremier®, Lisboa, Portugal) adequado para a extração de DNA de alimentos, inclusive de alimentos já confeccionados, e encontra-se esquematizado na Figura 11. Este kit é constituído pelos seguintes reagentes: *Lysis* e *Proteinase K* (para a fase de lise celular), *Binding* (para a fase de ligação do DNA), *Wash 1* e *Wash 2* (para a fase de lavagem do DNA) e *Elution* (para a fase de eluição do DNA).

Em primeiro lugar, pré aqueceram-se os reagentes *Lysis* e *Elution* a uma temperatura de 65°C e descongelou-se a *Proteinase K*, enquanto se procedia à pesagem das amostras. Para a pesagem, pesou-se 300 mg de cada amostra, previamente descongelada, em microtubos de 1,5 mL.

Para a lise celular, adicionaram-se 1000 µL do reagente *Lysis* a 25 µL de *Proteinase K* no microtubo de 1,5 mL que continha a amostra anteriormente pesada. Homogeneizou-se o conteúdo do microtubo no vórtex durante cerca de 10 segundos e incubou-se no banho seco a 65°C durante 30 minutos. Após os 30 minutos, retiraram-se os microtubos do banho seco e centrifugaram-se a 10000×g durante 5 minutos.

Seguidamente, para fazer a ligação do DNA, transferiram-se 500 µL de sobrenadante para um novo microtubo de 1,5 mL, adicionaram-se 250 µL do reagente *Binding* e levou-se o microtubo ao vórtex durante 10 segundos. Colocaram-se as membranas de sílica em microtubos sem tampa, para onde se transferiram 600 µL da mistura anteriormente preparada e centrifugaram-se a 10000×g durante 1 minuto. Após a centrifugação, descartou-se o líquido filtrado e repetiu-se este procedimento com o restante volume da mistura anterior. Transferiram-se as membranas de sílica para um novo microtubo sem tampa.

Para fazer a lavagem do DNA, adicionaram-se 500 µL do reagente de *Wash 1* a cada microtubo, centrifugou-se a 10000×g durante 1 minuto e descartou-se o filtrado. Em seguida, adicionaram-se 700 µL do reagente *Wash 2* a cada microtubo, centrifugou-se a 10000×g durante 1 minuto e descartou-se o filtrado. Depois, centrifugaram-se novamente os tubos a 10000×g durante 3 minutos.

Posteriormente, seguiu-se a eluição do DNA e transferiram-se as membranas de sílica para novos microtubos de 1,5 mL. Adicionaram-se 100 µL de solução *Elution* pré aquecida a 65°C, incubou-se à temperatura ambiente durante 2 minutos e centrifugou-se a 10000×g durante 1 minuto.

Por fim, descartaram-se as membranas de sílica e guardaram-se os tubos microtubo com a extração a 4°C para posteriormente fazer a medição de concentração de DNA.

Um volume de 100 µL por amostra de DNA foi misturado com 200 µL de água ultrapura (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham e Estados Unidos da América) e adicionado 300 µL de fenol-clorofórmio. A mistura foi agitada vigorosamente num vórtex durante 10 segundos e centrifugada a 10000×g durante 30 segundos. A fase menos densa foi cuidadosamente transferida para um novo microtubo de 1,5 mL.

Em seguida, adicionaram-se 300 µL de clorofórmio, agitou-se novamente no vórtex durante 10 segundos e centrifugou-se a 10000×g durante 30 segundos. E colheram-se 100 µL da fase menos densa e que foram cuidadosamente transferidos para um novo microtubo 1,5 mL, para nova medição da concentração de DNA e da razão de absorvência 260/280.

4.3.2. Diluição do DNA

Para as amostras com uma concentração de DNA superior a 15,0 ng/µL, fizeram-se diluições com água ultrapura de modo a obter concentrações de DNA todas uniformizadas num intervalo de valores de 11,0 – 15,0 ng/µL.

No caso das amostras em que a concentração de DNA foi inferior a 11,0 ng/µL, foi necessário repetir a extração de DNA, como está explicado no subcapítulo 4.2.

4.4. Corrida da qPCR em tempo real

Para a corrida da qPCR em tempo real utilizaram-se kits comerciais Biopremier® (Lisboa, Portugal) para cada uma das três espécies do estudo: “SUPREME REAL TIME DETECTION KIT Atlantic cod (*Gadus morhua*)”, “SUPREME REAL TIME DETECTION KIT Pacific cod (*Gadus macrocephalus*)” e “SUPREME REAL TIME DETECTION KIT Alaska Pollack (*Gadus chalcogrammus*)”, cujos componentes se encontram descritos na Tabela 6.

Tabela 6 - Componentes incluídos nos kits comerciais de deteção em qPCR em tempo real da Biopremier® (Lisboa, Portugal).

Tubos	Composição
Mix	dNTPs, primers e sondas
Controlo positivo	DNA-alvo correspondente a cada kit
Enzimas	DNA polimerase e UDG
Controlo negativo	Água ultrapura

Para a preparação das reações de qPCR em tempo real, descongelaram-se as extrações de DNA diluídas, os controlos positivo e negativo, os mix e as enzimas (incluídos no kit comercial). De seguida, conforme o número de amostras e de acordo com a Tabela 7, fizeram-se as pipetagens com o reagente mix e as enzimas, para se obter um mix final.

Tabela 7 - Esquema de pipetagem para a preparação de reações de qPCR em tempo real dos kits comerciais da Biopremier® (Lisboa, Portugal).

Reagentes	Volume para 1 amostra
Mix	13 µL
Enzimas	2 µL
TOTAL	15 µL

Em cada poço da placa de qPCR em tempo real adicionaram-se 15 µL do mix final. Depois, adicionaram-se 5 µL das extrações de DNA nos respetivos poços da placa da qPCR em tempo real. E efetuou-se o mesmo utilizando 5 µL do controlo negativo (constituído por água ultrapura) fornecido no respetivo kit e 5 µL do controlo positivo (constituído pelo DNA-alvo de cada espécie de bacalhau em estudo) também fornecido no respetivo kit, cuja preparação ocorreu sempre em último lugar, para evitar contaminações dos restantes poços.

Para cada amostra prepararam-se três reações, considerando a pesquisa de bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*), bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*) e paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*), bem como os respetivos controlos positivos e negativos.

Por poço, utilizou-se um volume de 20 µL, com uma velocidade de reação padrão e juntaram-se os reagentes FAM e ROX, sendo que o canal FAM corresponde ao DNA alvo e o canal ROX ao controlo interno.

A placa da qPCR em tempo real foi selada com película e, por fim, colocou-se no termociclador (Bio-Rad Laboratories, Lisboa, Portugal), utilizando o programa indicado na Tabela 8.

Tabela 8 – Programa da qPCR em tempo real dos kits comerciais da Biopremier® (Lisboa, Portugal).

Fase	Temperatura	Tempo	Recolha de dados	Ciclos
Incubação	37 °C	15 min.	Não	1×
Inativação UDG	95 °C	5 min.	Não	1×
	94 °C	15 seg.	Não	
Amplificação de DNA	60 °C	30 seg.	Recolha de dados	40×
	72 °C	15 seg.	Não	

C9	-	posta	<i>Gadus morhua</i>	845,47	1,70
C10	-	posta	<i>Gadus morhua</i>	1319,99	2,06
C11	-	migas	<i>Gadus morhua</i>	124,36	2,06
C12	-	migas	<i>Gadus morhua</i>	503,00	2,09

5.1.1. Extração fenólica

As amostras que apresentaram valores inferiores a 1,8, amostras 5, 6, 7, 15 e 23 (identificadas a cinzento na Tabela 9 e compiladas na Tabela 10), foram submetidas a uma extração fenólica, seguindo o protocolo descrito no subcapítulo 4.3.1., para purificação do DNA extraído e os resultados obtidos encontram-se apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Quantificação de DNA e razão da absorvência a 260/280 das amostras que foram submetidas à reextração fenólica.

Amostra	Tipo de amostra	Espécie	Concentração (ng/μL)	260/280
5	bacalhau à Brás	<i>Gadus chalcogrammus</i>	3398,31	1,70
6	bacalhau com natas	<i>Gadus chalcogrammus</i>	3599,75	1,65
7	bacalhau cozido	<i>Gadus morhua</i>	4045,25	1,78
15	bacalhau assado	<i>Gadus morhua</i>	3382,81	1,68
23	bacalhau cozido	<i>Gadus morhua</i>	4401,54	1,78

Apesar de, após a reextração fenólica, as amostras não apresentarem uma razão de absorvência igual ou superior a 1,8, como se verificou um aumento da razão de absorvência 260/280, o que evidencia uma melhora na qualidade do DNA destas 5 amostras, foram consideradas para o restante estudo.

5.1.2. Diluição do DNA

As diluições foram feitas com o intuito de uniformizar as concentrações de DNA das amostras, para tornar mais viável a corrida da qPCR em tempo real e a interpretação das curvas de amplificação. Como se trata de valores de concentrações muito baixos, foi difícil estabelecer um valor fixo de concentração. Por isso, estabeleceu-se o intervalo de concentrações de 11,0 – 15,0 ng/μL e os resultados podem ser consultados na Tabela 11.

Tabela 11 – Diluição final das amostras extraídas.

Amostra	Tipo de amostra	Espécie	Concentração inicial (ng/μL)	Concentração final (ng/μL)
1	bacalhau espiritual	<i>Gadus morhua</i>	39,33	12,56
2	bacalhau espiritual	<i>Gadus morhua</i>	12,98	12,45
3	bacalhau com natas	<i>Gadus macrocephalus</i>	55,56	13,36
4	bacalhau com natas	<i>Gadus chalcogrammus</i>	41,28	11,00
5	bacalhau à Brás	<i>Gadus chalcogrammus</i>	3398,31	12,31
6	bacalhau com natas	<i>Gadus chalcogrammus</i>	3599,75	10,93
7	bacalhau cozido	<i>Gadus morhua</i>	4045,25	13,22
8	bacalhau Gomes de Sá	<i>Gadus macrocephalus</i>	309,83	12,32
9	bacalhau Gomes de Sá	<i>Gadus morhua</i>	320,73	12,77

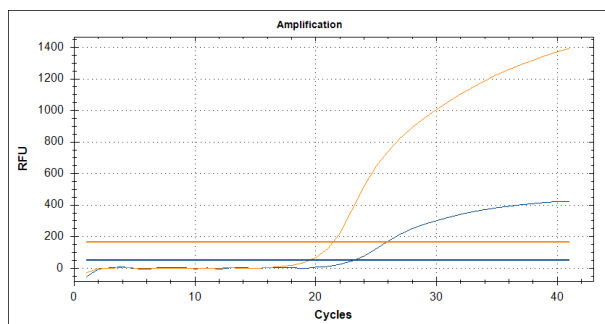


Figura 16 - Curva de amplificação da amostra 4 para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

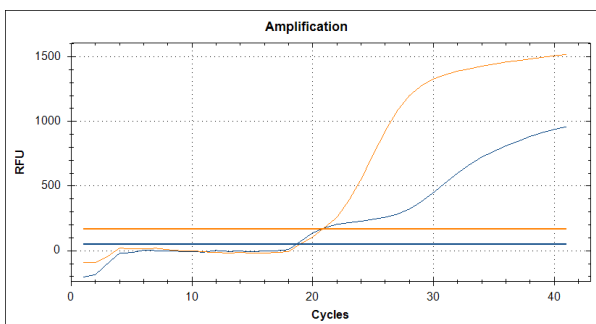


Figura 17 - Curva de amplificação do controle positivo para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

Legenda das Figuras 12 a 17: curva laranja – controle interno; curva azul – amplificação da amostra nas Figuras 12, 14 e 16 e amplificação do controle positivo nas Figuras 13, 15 e 17.

Assim, e relativamente às amostras 2, 3, 4, 27, 30, C1, C6 e C7 (compiladas na Tabela 13) as curvas de cada espécie foram classificadas como “existe amplificação” para as curvas que seguiram o mesmo padrão dos respetivos controlos positivos, como “sem amplificação” para as curvas que não seguiram o mesmo padrão dos respetivos controlos positivos e “amplificação inconclusiva” para as amostras cujas curvas seguiram os padrões em mais que uma espécie em estudo, quando comparadas com os respetivos controlos positivos. As curvas de amplificação das 47 amostras podem ser consultadas no Anexo 2 (9.2).

Tabela 13 - Avaliação das curvas de amplificação das amostras que amplificaram mais do que uma espécie de bacalhau em estudo.

Amostra	Espécies		
	<i>Gadus morhua</i> (bacalhau do Atlântico)	<i>Gadus macrocephalus</i> (bacalhau do Pacífico)	<i>Gadus chalcogrammus</i> (paloco do Pacífico)
2	existe amplificação	amplificação inconclusiva	sem amplificação
3	-	existe amplificação	amplificação inconclusiva
4	Ct superior a 38	amplificação inconclusiva	existe amplificação
27	existe amplificação	sem amplificação	-
30	-	existe amplificação	amplificação inconclusiva
C1	existe amplificação	amplificação inconclusiva	-
C6	existe amplificação	sem amplificação	-
C7	sem amplificação	existe amplificação	Ct superior a 38

Esta seriação foi feita com o intuito de facilitar a análise de resultados, permitindo então, compilar todos os resultados obtidos na Tabela 14.

6. Discussão de resultados

6.1. Extração e quantificação do DNA

Como o DNA absorve radiação no comprimento de onda de 260 nm e as proteínas absorvem no comprimento de onda de 280 nm, a razão da absorvência 260/280 permite avaliar a pureza do DNA da amostra. Por isso, o DNA para ser considerado puro deverá apresentar uma razão de absorvência com valores entre 1,8 e 2,0 (Silva 2014). Assim, o kit usado para a extração de DNA foi uma mais-valia, porque permitiu poupar tempo e tornar esta etapa muito mais simples, tendo funcionado com sucesso em cerca de 89,36% (n=42) das amostras analisadas, que apresentaram concentrações de DNA superiores a 30 ng/μL e valores da razão de absorvência 260/280 quando submetidas à leitura por espectrofotometria.

Apenas 10,6% (n=5) das amostras apresentaram valores de razão de absorvência 260/280 inferiores a 1,8. Estas amostras eram confeccionadas, nomeadamente uma de bacalhau à Brás (amostra 5), uma de bacalhau com natas (amostra 6), uma de bacalhau assado (amostra 15) e duas de bacalhau cozido (amostra 7 e 23), pelo que, não se encontrou nenhuma relação entre o tipo de ementa e valores inferiores a 1,8 que apresentaram. Fatores como a presença de níveis elevados de proteínas agregadas ao DNA, compostos fenólicos ou outros contaminantes, tratamentos com temperaturas extremamente elevadas que promovam um elevado grau de degradação do DNA, podem ter influenciado os resultados relativos aos valores da razão de absorvência 260/280 (Tomás 2015).

Então, foi necessário passarem por um processo de extração fenólica, que teve como objetivo aumentar o valor da razão de absorvência 260/280, havendo também um aumento da concentração de DNA. A extração fenólica realizada às 5 amostras (5, 6, 7, 15 e 23) foi bem-sucedida, e foi possível obter o aumento dos valores da razão de absorvência 260/280 e também da concentração de DNA para estas amostras. Estas amostras apresentaram amplificações na qPCR em tempo real, pelo que, a extração fenólica não mostrou influenciar o sucesso da qPCR em tempo real nestas amostras.

6.2. Corrida da qPCR em tempo real

As amostras consideradas inconclusivas, que correspondem às de suspeita de substituição parcial de espécies, passaram por uma análise mais detalhada. Inicialmente, 40,4% (n=19) das amostras apresentaram amplificação em duas ou mais espécies. O primeiro passo foi analisar os valores de Ct e rejeitar amplificações com valores de Ct superiores a 38, porque um valor elevado de Ct está associado a quantidades residuais de DNA que são considerados falsos positivos (Martins 2016). As amostras que foram consideradas foram as

amostras que apresentaram valores de Ct inferiores a 38. Assim, em cerca de 17,0% (n=8) das amostras, fez-se a comparação do padrão das suas curvas de amplificação das amostras com as curvas dos respetivos controlos positivos.

Das 29 amostras que estavam rotuladas com a espécie de bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*), observaram-se alterações relativamente à rotulagem em 5 amostras. Em 3 dessas amostras (amostras 12, 13 e 18), a espécie amplificada na qPCR em tempo real não coincidiu com a espécie presente no rótulo, tendo sido amplificada o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*), sendo estas amostras sugestivas de fraude alimentar por rotulagem incorreta, uma vez que, apesar do bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*) ser classificado como bacalhau, tem um menor valor económico, refletindo-se em vantagens económicas quando é vendido como bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*). Também rotuladas como bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*), 2 amostras (amostra 2 e C1), apesar de terem amplificado essa espécie, amplificaram também no bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*), sendo sugestivas de fraude alimentar por substituição parcial de espécies.

Relativamente às 15 amostras com rotulagem de bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*), 5 amostras apresentaram resultados diferentes que os dos respetivos rótulos. Dessas, 2 amostras (amostra 3 e 30), são sugestivas de fraude alimentar por substituição parcial de espécies, uma vez que, para além de terem amplificado o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*), apresentaram também amplificação para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*). As outras 3 amostras (amostra 8, 14 e C3), amplificaram uma única espécie, mas em vez de bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*), a amplificação foi no bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*), não sugerindo haver fraude alimentar nestas 3 amostras, mas sim, consequência de alguma negligência que possa ter ocorrido ao longo da cadeia de produção, já que a espécie amplificada, bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*), é uma espécie de maior valor económico que a referida no rótulo, traduzindo-se em prejuízo e não em vantagem económica, como aconteceria num caso de fraude alimentar.

Em relação às 3 amostras rotuladas como paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*), apenas em 1 amostra (amostra 4) se obteve resultados de qPCR em tempo real que não correspondiam ao rótulo, uma vez que, se verificou também amplificação para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*), sugerindo fraude alimentar por substituição parcial de espécies.

Assim, cerca de 17,0% (n=8) das amostras apresentaram resultados de qPCR em tempo real que podem sugerir evidência de fraude alimentar, mais especificamente, em 6,4% (n=3) das amostras por rotulagem incorreta da espécie e em 10,6% (n=5) das amostras por suspeita de substituição parcial de espécies. A rotulagem incorreta é um dos tipos de fraude mais comum no setor do pescado e, por isso, o desenvolvimento e aplicação de técnicas

genéticas como a qPCR em tempo real, ao permitir a identificação das espécies, permite também garantir que os requisitos de rotulagem são cumpridos e que não há substituição das espécies (Mafra et al. 2008).

Nas 5 amostras (amostra 2, 3, 4, 30 e C1) suspeitas de fraude alimentar por substituição parcial de espécies, em 4 amostras (amostra 2, 3, 4 e 30) o bacalhau estava no formato de migas, o que permitiu estabelecer uma relação entre a apresentação comercial e a maior ocorrência de substituição parcial de espécies. Esta apresentação comercial, com o bacalhau desfiado ou em lascas, constitui uma oportunidade para a fraude alimentar, que na presença da motivação certa, visto ser relativamente fácil de substituir e/ou misturar com outras espécies, como forma de redução de custos, ou também devido a contaminação, quer em linhas de produção (van Ruth et al. 2017) quer em contexto de atividades laboratoriais na realização deste estudo.

6.3. Principais limitações e propostas futuras

As principais limitações no processo de extração de DNA estiveram relacionadas com a preparação de amostras de receitas confeccionadas (bacalhau à Brás, bacalhau espiritual ou bacalhau com natas) e com múltiplos ingredientes (queijo, natas, refogado com azeite), nas quais o bacalhau é desfiado, o que dificultava a sua individualização dos restantes ingredientes. Também o facto destas amostras serem congeladas antes de se fazer a pesagem do bacalhau, pelo que, futuramente, para facilitar a preparação da amostra, seria preferível fazer a pesagem do bacalhau diretamente em microtubos individuais antes de congelar a amostra; isso permitiria que a amostra ficasse individualizada e pronta para, após descongelação, ser usada para a extração de DNA.

Em estudos futuros, seria interessante, fazer a quantificação absoluta, sobretudo das 5 amostras consideradas inconclusivas, isto é, nas amostras suspeitas de substituição parcial de espécies, para confirmar a presença de mais do que uma espécie e determinar as respetivas concentrações de DNA, para se perceber se efetivamente se possa tratar de uma substituição parcial intencional ou então de uma contaminação acidental que tenha ocorrido, por exemplo, em alguma etapa da cadeia de produção ou a nível do processamento laboratorial durante a realização deste estudo.

Um outro estudo interessante a fazer, principalmente nas 5 amostras de suspeita de substituição parcial de espécies, seria analisar as migas de bacalhau antes e depois da confeção, para também perceber se a adição da espécie teria ocorrido durante a confeção ou ao longo da cadeia de produção.

Para o Exército Português seria vantajoso conseguir um maior número de amostras durante todo o ano com testagem regular para perceber se há influências sazonais na fraude

alimentar, poder alargar este tipo de testagem a outras espécies animais e vegetais que estão contratualizados para fornecer o Exército Português.

7. Conclusões

A fraude alimentar é um problema antigo com contínua relevância na atualidade e, apesar de não ser o seu objetivo, pode constituir um risco para a proteção do consumidor, sobretudo quando compromete a saúde pública. O setor do pescado é bastante suscetível à fraude alimentar, pela substituição de espécies de elevado valor económico por outras menos valiosas, especialmente em apresentações comerciais com outros ingredientes ou nas quais os produtos da pesca não se apresentam inteiros, além da rotulagem incorreta ou incompleta.

Como forma de combater e prevenir a fraude alimentar, para além da análise das características morfológicas, têm-se vindo a desenvolver e aplicar técnicas, como as que se baseiam na análise do material genético, que permitem a identificação e confirmação de espécies em amostras alimentares. A qPCR em tempo real traz vantagens por ser uma técnica mais sensível e específica, mais rápida, e com menor risco de contaminação.

Este estudo mostrou que 17,0% (n=8) das amostras recolhidas da alimentação fornecida nas U/E/O do Exército Português, foram alvo de incorreção na rotulagem 6,4% (n=3), como tal não conformidade legal, e sugerem a existência de uma provável fraude alimentar, 10,6% (n=5) suspeitas de substituição parcial de espécies de bacalhau.

Em suma, a qPCR em tempo real mostrou ser uma técnica eficaz na identificação e autenticação de espécies de bacalhau, podendo ser uma metodologia a aplicar na deteção de fraude alimentar em refeições com bacalhau confeccionado. Este estudo permite dotar o Exército Português de ferramentas para a identificação e combate de fraude alimentar, no bacalhau, mas também noutras espécies de pescado e categorias de alimentos.

8. Referências Bibliográficas

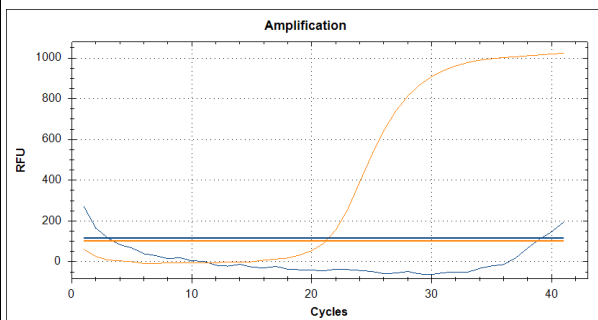
- Almeida C, Karadzic V, Vaz S. 2015. The seafood market in Portugal: Driving forces and consequences. *Mar Policy*. 61:87–94. doi:10.1016/j.marpol.2015.07.012.
- Amaral JS. 2021. Target and Non-Target Approaches for Food Authenticity and Traceability. *Foods*. 10(1):172. doi:10.3390/foods10010172.
- Araújo FB. 2021. Prevalência de nematodes anisakidae no bacalhau [Dissertação de Mestrado]. [Coimbra]: Escola Universitária Vasco da Gama. [accessed 2023 May 28]. <http://hdl.handle.net/10400.26/38134>.
- ASAE. 2022 Mar. O Laboratório de Segurança Alimentar da ASAE na Defesa do Consumidor. ASAEnews nº 125. [accessed 2023 Sep 13]. <https://www.asae.gov.pt/newsletter2/asaenews-n-125-marco-2022/qualidade-e-seguranca-dos-alimentos-o-lsa-na-defesa-do-consumidor.aspx>.
- Asensio Gil L. 2007. PCR-based methods for fish and fishery products authentication. *Trends Food Sci Technol*. 18(11):558–566. doi:10.1016/j.tifs.2007.04.016.
- Bréchon AL, Coombs SH, Sims DW, Griffiths AM. 2013. Development of a rapid genetic technique for the identification of clupeid larvae in the Western English Channel and investigation of mislabelling in processed fish products. *ICES Journal of Marine Science*. 70(2):399–407. doi:10.1093/icesjms/fss178.
- British Standards Institution. 2017. Guide to protecting and defending food and drink from deliberate attack. 4º. BSI Standards Limited 2017. [accessed 2023 May 30]. https://www.food.gov.uk/sites/default/files/media/document/pas962017_0.pdf.
- Calo-Mata P, Sotelo CG, Pérez-Martín RI, Rehbein H, Hold GL, Russell VJ, Pryde S, Quinteiro J, Rey-Méndez M, Rosa C, et al. 2003. Identification of gadoid fish species using DNA-based techniques. *European Food Research and Technology*. 217(3):259–264. doi:10.1007/s00217-003-0735-y.
- Carvalho CAM de. 2007. Aplicação médico-legal da PCR em tempo real na caracterização de SNPs [Dissertação de Mestrado]. [Porto]: Faculdade de Medicina da Universidade do Porto. [accessed 2023 May 27]. <http://hdl.handle.net/10216/22122>.
- Carvalho DFV de O. 2020. Defesa alimentar e fraude alimentar no âmbito dos sistemas de gestão da segurança alimentar: linhas de orientação [Dissertação de Mestrado]. [Porto]: Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa. [accessed 2023 Jun 2]. <http://hdl.handle.net/10400.14/31490>.
- Codex Alimentarius Commission. 2011. GENERAL PRINCIPLES OF FOOD HYGIENE. [accessed 2023 Jun 2]. https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXC%2B1-1969%252FCXC_001e.pdf.
- Cohen DM, Inada T, Iwamoto T, Scialabba N. 1990. Gadiform fishes of the world (order Gadiformes): an annotated and illustrated catalogue of cods, hakes, grenadiers and other gadiform fishes known to date. Roma. [accessed 2023 May 28]. <https://www.fao.org/3/T0243E/t0243e.pdf>.
- Correia AMN. 2018. Fraude Alimentar: fatores de risco e medidas de controlo e prevenção [Dissertação de Mestrado]. [Lisboa]: Faculdade de Ciências e Tecnologia da

- Universidade Nova de Lisboa. [accessed 2023 May 27]. <http://hdl.handle.net/10362/58098>.
- Coulson MW, Marshall HD, Pepin P, Carr SM. 2006. Mitochondrial genomics of gadine fishes: implications for taxonomy and biogeographic origins from whole-genome data sets. *Genome*. 49(9):1115–1130. doi:10.1139/g06-083.
- Decreto-Lei n.º 20/2005 de 28 de Janeiro. 2005. Diário da República n.º 25/2005, Série I-A. Lisboa, Portugal Lisboa: Ministério da Agricultura, Peixes e Alimentação. [accessed 2023 Jun 2]. <https://files.dre.pt/1s/2005/01/020a00/06960703.pdf>.
- Decreto-Lei n.º 28/84 de 20 de janeiro 1984. 1984. Diário da República n.º 17/1984, Série I de 1984-01-20. Lisboa. [accessed 2023 Sep 13]. <https://files.diariodarepublica.pt/1s/1984/01/01700/02400258.pdf>.
- Evseenko SA, Laurel B, Brown JA, Malikova DYU. 2006. On the *Gadus* taxonomy: Ontogenetic evidence. *J Ichthyol*. 46(5):351–358. doi:10.1134/S0032945206050018.
- Fontanesi L. 2009. Genetic authentication and traceability of food products of animal origin: new developments and perspectives. *Ital J Anim Sci*. 8(sup2):9–18. doi:10.4081/ijas.2009.s2.9.
- Grupo Marktest. 2022 Dec 27. Consumo de bacalhau recupera. [accessed 2023 Jun 2]. <https://www.marktest.com/wap/a/n/id~2951.aspx>.
- Hall SJ, Hilborn R, Andrew NL, Allison EH. 2013. Innovations in capture fisheries are an imperative for nutrition security in the developing world. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 110(21):8393–8398. doi:10.1073/pnas.1208067110.
- Helyar SJ, Lloyd H ap D, de Bruyn M, Leake J, Bennett N, Carvalho GR. 2014. Fish Product Mislabelling: Failings of Traceability in the Production Chain and Implications for Illegal, Unreported and Unregulated (IUU) Fishing. *PLoS One*. 9(6):e98691. doi:10.1371/journal.pone.0098691.
- Herrero B, Madriñán M, Vieites JM, Espiñeira M. 2010. Authentication of Atlantic Cod (*Gadus morhua*) Using Real Time PCR. *J Agric Food Chem*. 58(8):4794–4799. doi:10.1021/jf904018h.
- Herrero B, Vieites JM, Espiñeira M. 2011. Authentication of Atlantic salmon (*Salmo salar*) using real-time PCR. *Food Chem*. 127(3):1268–1272. doi:10.1016/j.foodchem.2011.01.070.
- Johnson R. 2014. Food Fraud and “Economically Motivated Adulteration” of Food and Food Ingredients. www.crs.gov/R43358.
- Lago FC, Vieites JM, Espiñeira M. 2013. Authentication of gadoids from highly processed products susceptible to include species mixtures by means of DNA sequencing methods. *European Food Research and Technology*. 236(1):171–180. doi:10.1007/s00217-012-1875-8.
- Leal FMS dos S. 2019. Plano de Mitigação da Fraude Alimentar IFS Logistics Versão 2.2 [Dissertação de Mestrado]. [Coimbra]: Escola Superior Agrária do Politécnico de Coimbra. [accessed 2023 May 27]. <http://hdl.handle.net/10400.26/34864>.

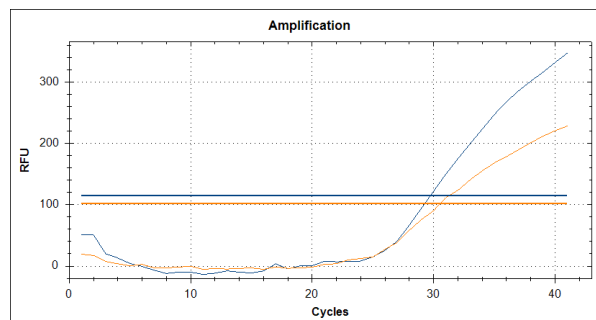
- Mafrá I, Ferreira IMPLVO, Oliveira MBPP. 2008. Food authentication by PCR-based methods. *European Food Research and Technology*. 227(3):649–665. doi:10.1007/s00217-007-0782-x.
- Manning L, Soon JM. 2016. Food Safety, Food Fraud, and Food Defense: A Fast Evolving Literature. *J Food Sci*. 81(4):R823–R834. doi:10.1111/1750-3841.13256.
- Martins CAP. 2016. Quantificação de DNA por PCR em Tempo Real em diferentes Amostras Forenses [Dissertação de Mestrado]. [Porto]: Faculdade de Medicina da Faculdade do Porto. [accessed 2023 May 27]. <https://hdl.handle.net/10216/105261>.
- Mohanty BP, Barik S, Mahanty A, Mohanty S. 2013. Food Safety, Labeling Regulations and Fish Food Authentication. *National Academy Science Letters*. 36(3):253–258. doi:10.1007/s40009-013-0139-x.
- Moyer DC, DeVries JW, Spink J. 2017. The economics of a food fraud incident – Case studies and examples including Melamine in Wheat Gluten. *Food Control*. 71:358–364. doi:10.1016/j.foodcont.2016.07.015.
- NOAA. 2013 Dec. Yes, Virginia, Walleye Pollock is *Gadus chalcogrammus*. [accessed 2023 May 28]. <https://apps-afsc.fisheries.noaa.gov/Quarterly/ond2013/tocRACE.htm>.
- Novais CM, Pires-Alves M, Silva FF. 2004. PCR em tempo real: Uma Inovação tecnológica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). *Bioteecnolog Cienc Desenvolv*.:10–13. [accessed 2023 May 31]. https://www.academia.edu/7723061/0_Revista_Bioteecnologia_Ci%C3%A2ncia_e_Developmento_Ed%C3%A7%C3%A3o_no_33_julho_dezembro_2004_Uma_inova%C3%A7%C3%A3o_tecnol%C3%B3gica_da_Rea%C3%A7%C3%A3o_em_Cadeia_da_Polimerase_PCR.
- Oliveira DBFR. 2017. Amplificação da fraude alimentar por média impressos nacionais: Estudo de caso [Dissertação de Mestrado]. [Porto]: Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. [accessed 2023 May 27]. https://sigarra.up.pt/faup/pt/pub_geral.pub_view?pi_pub_base_id=273067.
- Oliveira MAM de. 2016. Segurança na Cadeia alimentar: estudo de fraudes [Dissertação de Mestrado]. [Porto]: Escola Superior de Tecnologia e Gestão do Instituto Politécnico do Porto. [accessed 2023 May 29]. <http://hdl.handle.net/10400.22/10062>.
- Oliveira TM dos S. 2010. PCR em tempo real: métodos e aplicações [Dissertação de Mestrado]. [Aveiro]: Universidade de Aveiro. [accessed 2023 May 27]. <http://hdl.handle.net/10773/7230>.
- Parlamento Europeu. 2013. Relatório sobre crise alimentar, fraudes na cadeia alimentar e respetivo controlo. [accessed 2023 Jun 2]. https://www.europarl.europa.eu/doceo/document/A-7-2013-0434_PT.html.
- Pepe T, Trotta M, Di Marco I, Cennamo P, Anastasio A, Cortesi ML. 2005. Mitochondrial Cytochrome b DNA Sequence Variations: An Approach to Fish Species Identification in Processed Fish Products. *J Food Prot*. 68(2):421–425. doi:10.4315/0362-028X-68.2.421.
- Rasmussen RS, Morrissey MT. 2008. DNA-Based Methods for the Identification of Commercial Fish and Seafood Species. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 7(3):280–295. doi:10.1111/j.1541-4337.2008.00046.x.

9.2. Anexo 2: Curvas de amplificação das amostras em comparação com os controlos positivos de cada espécie.

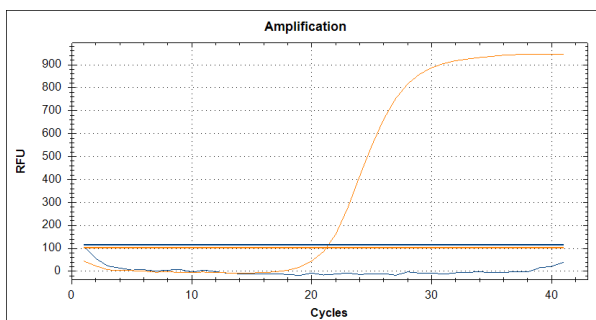
Amostra 1



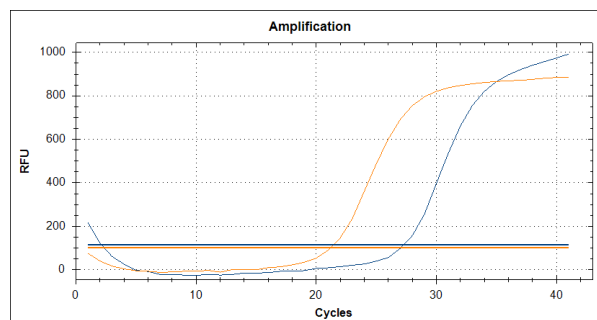
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



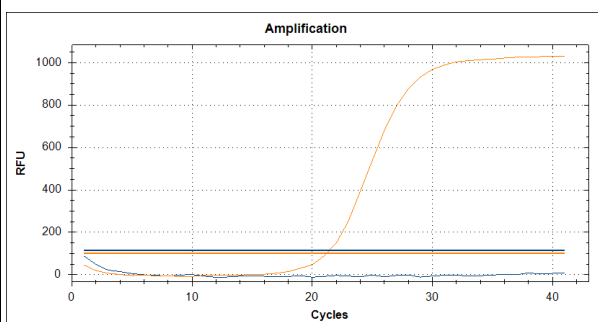
Controlo positivo para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



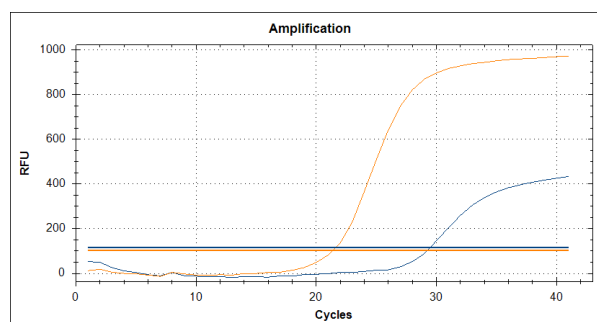
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).



Controlo positivo para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).

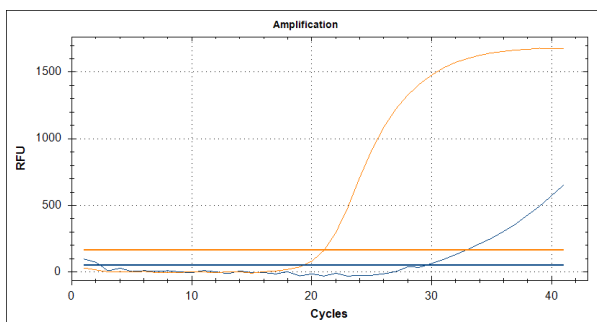


Curva de amplificação da amostra para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

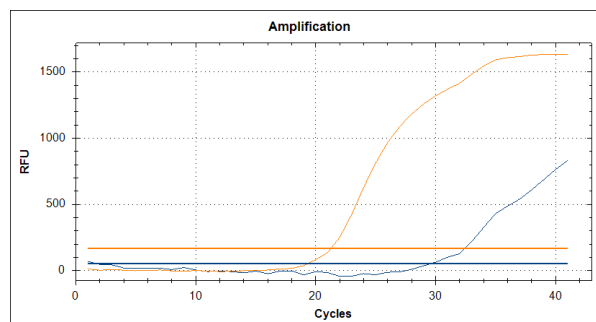


Controlo positivo para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

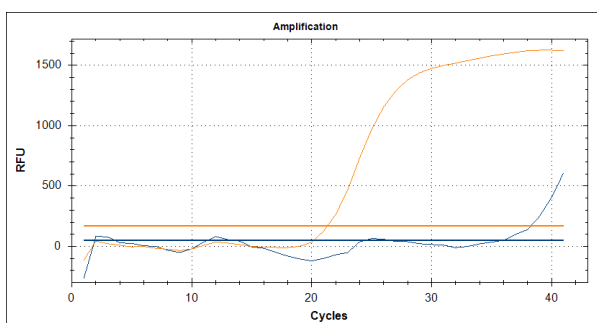
Amostra 2



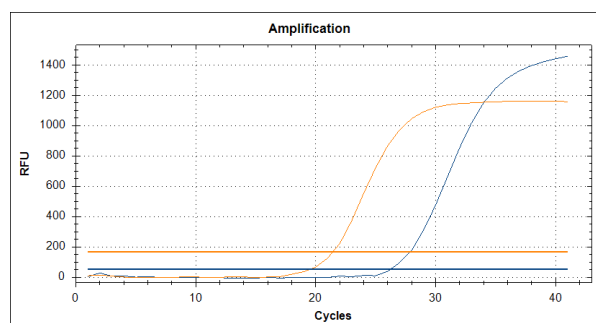
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



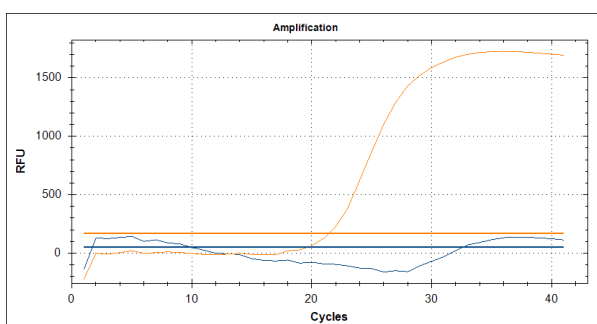
Controlo positivo para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



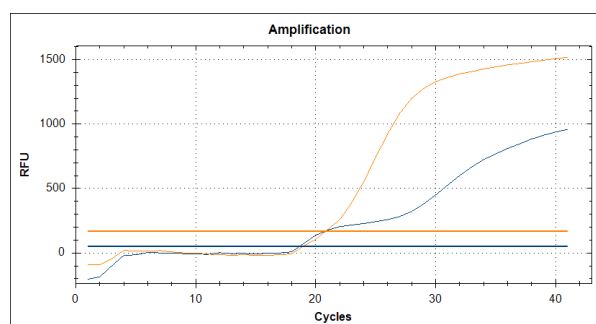
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).



Controlo positivo para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).

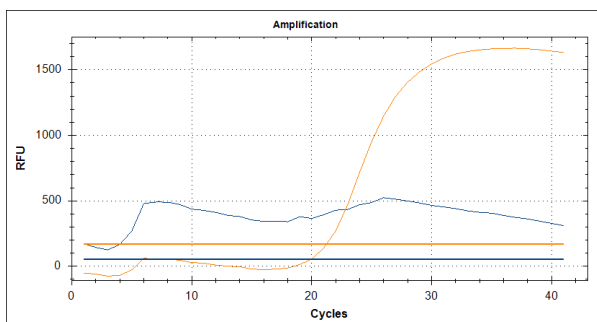


Curva de amplificação da amostra para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

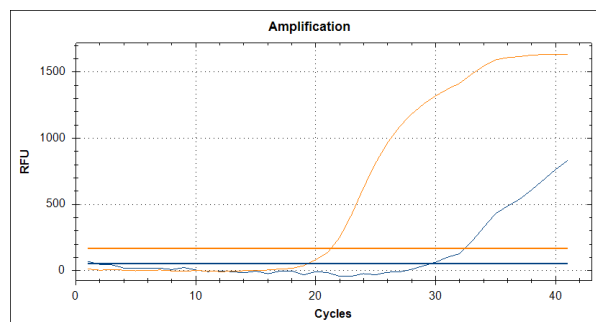


Controlo positivo para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

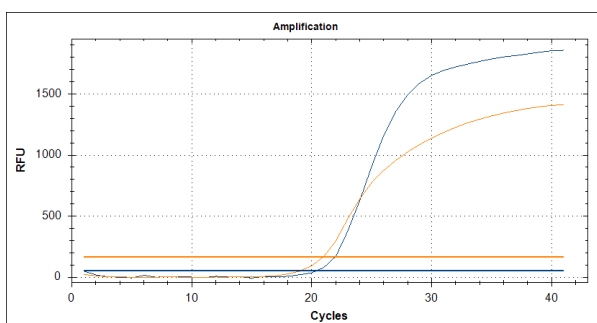
Amostra 3



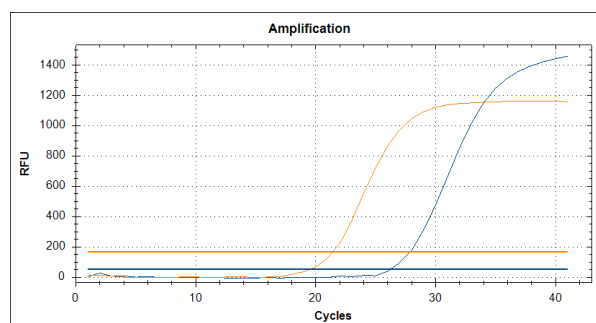
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



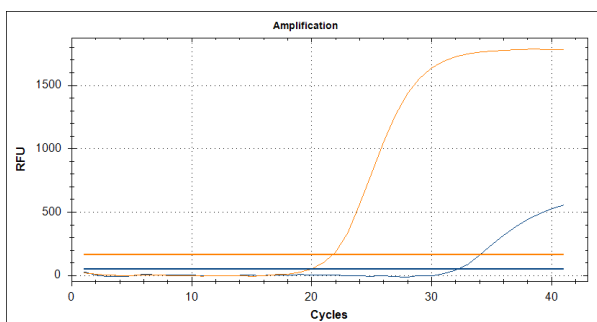
Controlo positivo para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



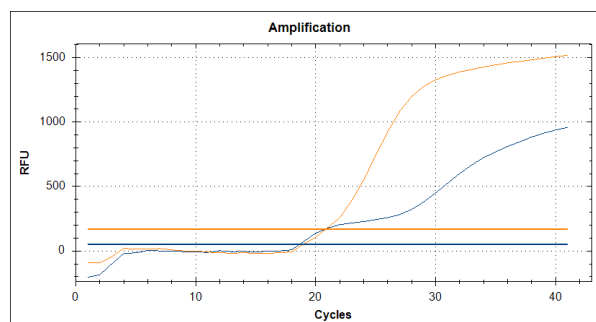
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).



Controlo positivo para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).

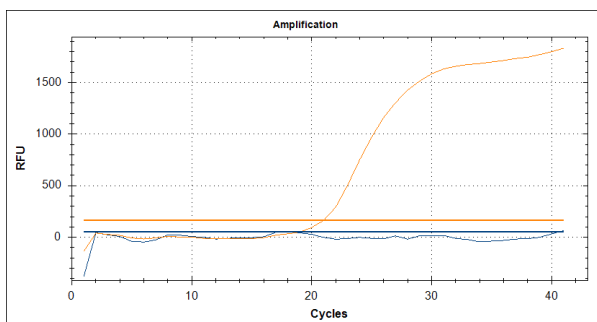


Curva de amplificação da amostra para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

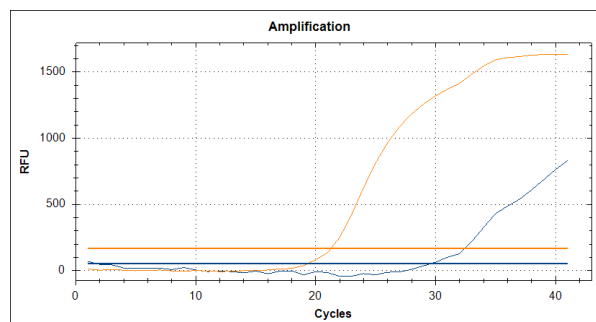


Controlo positivo para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

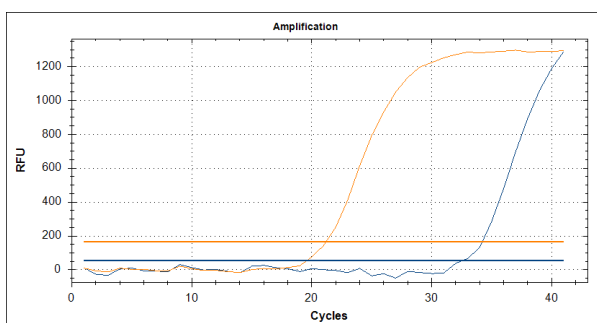
Amostra 4



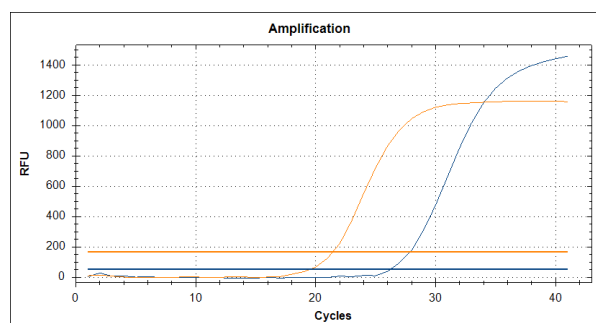
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



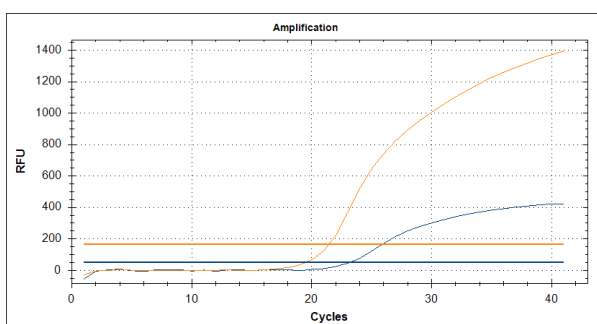
Controlo positivo para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



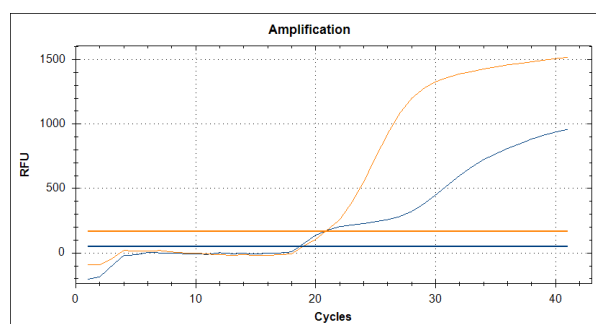
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).



Controlo positivo para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).

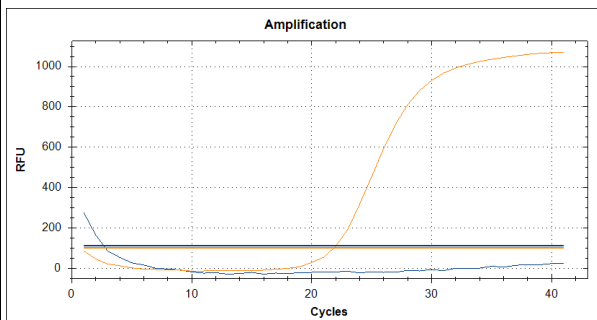


Curva de amplificação da amostra para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

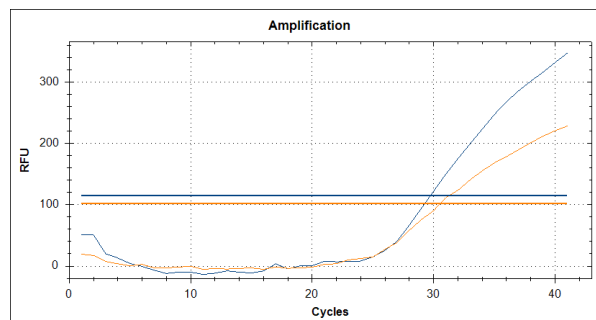


Controlo positivo para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

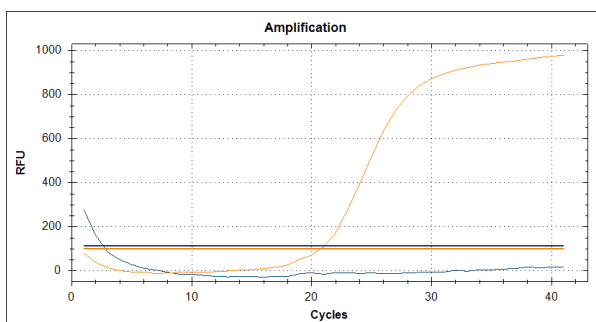
Amostra 5



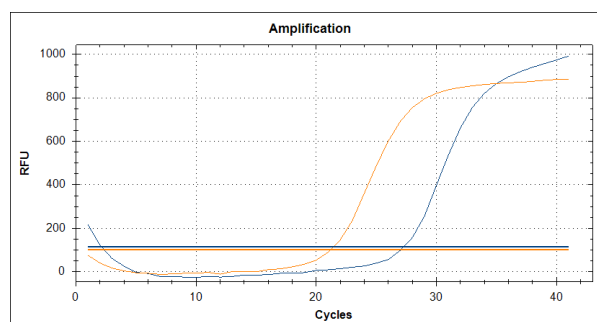
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



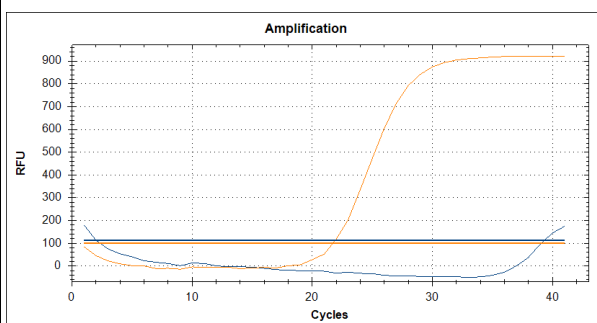
Controlo positivo para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



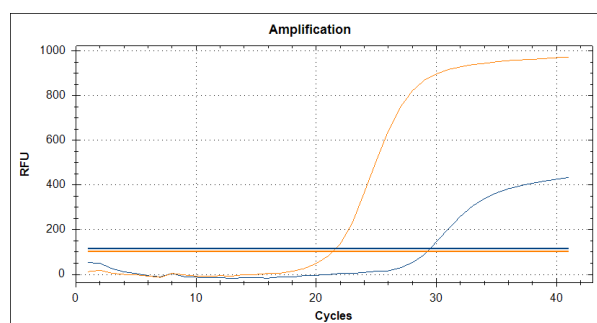
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).



Controlo positivo para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).

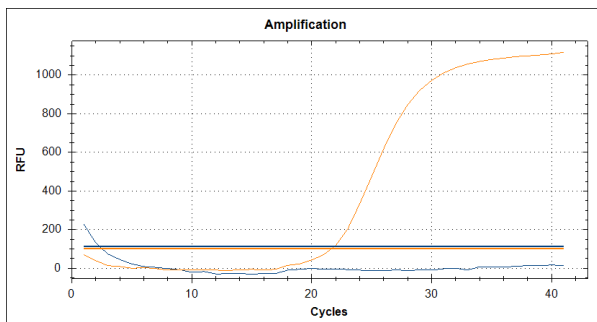


Curva de amplificação da amostra para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

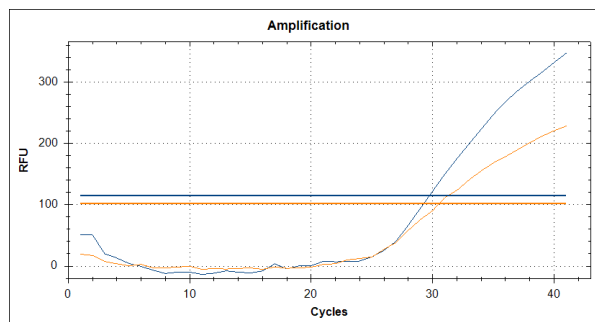


Controlo positivo para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

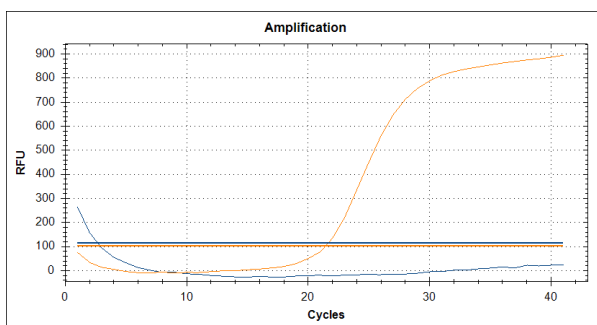
Amostra 6



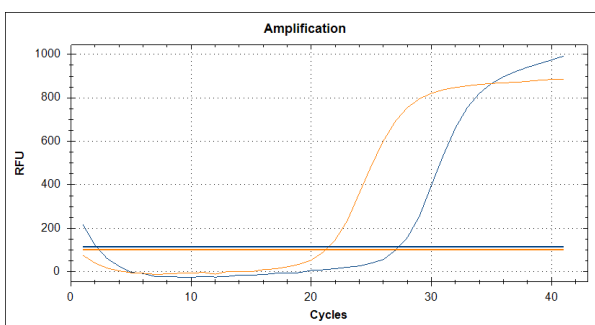
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



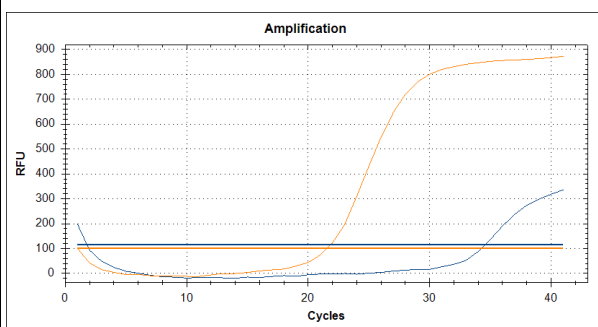
Controlo positivo para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



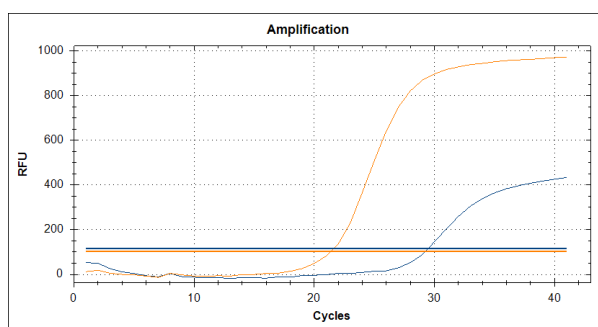
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).



Controlo positivo para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).

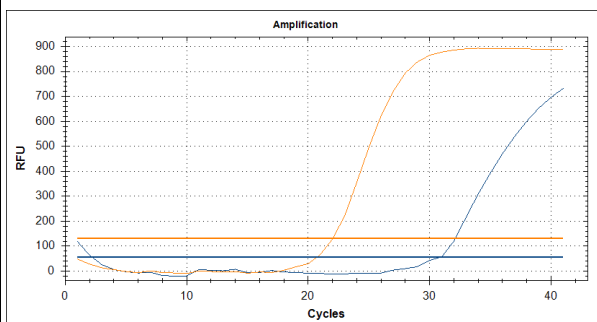


Curva de amplificação da amostra para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

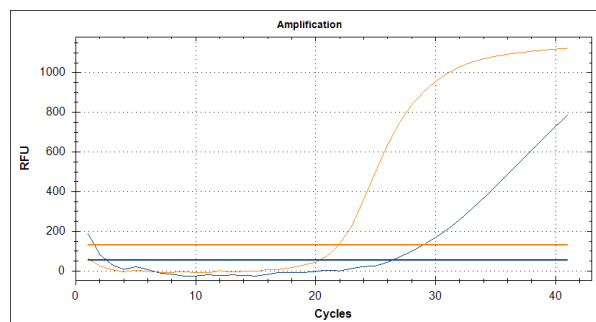


Controlo positivo para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

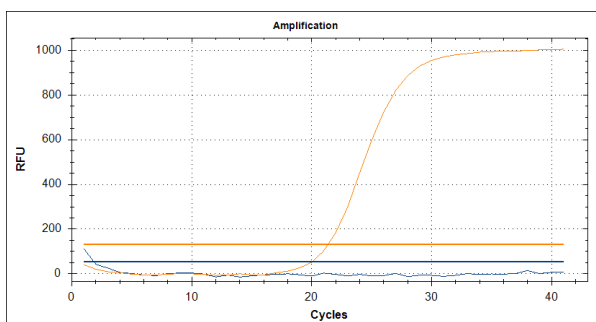
Amostra 7



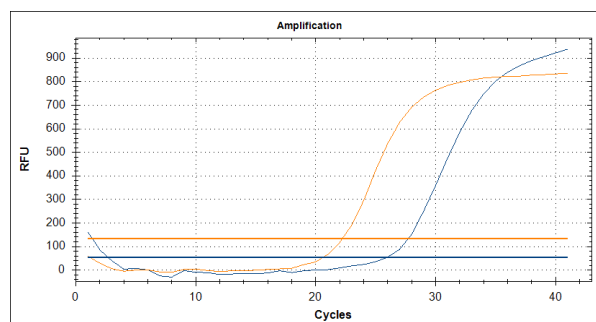
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



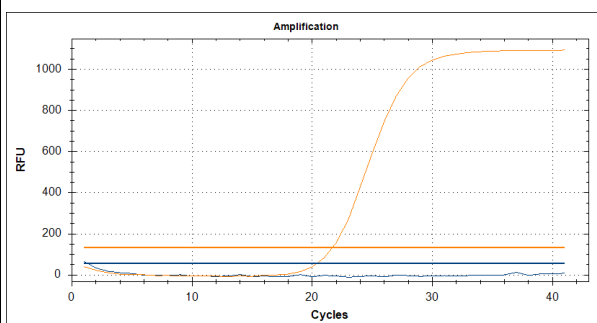
Controlo positivo para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



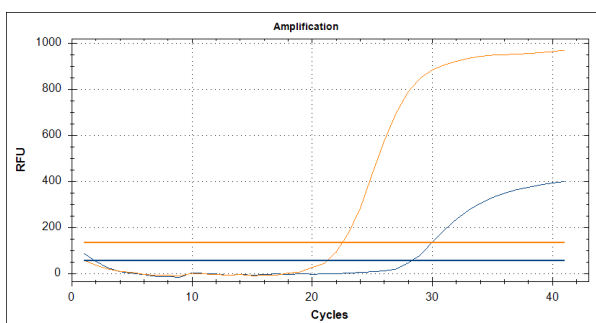
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).



Controlo positivo para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).

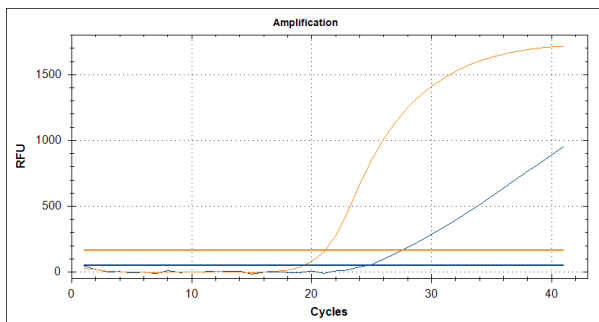


Curva de amplificação da amostra para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

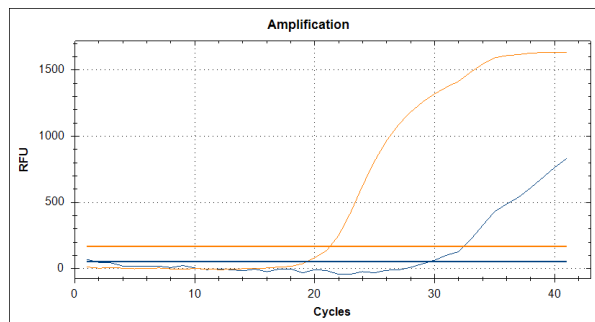


Controlo positivo para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

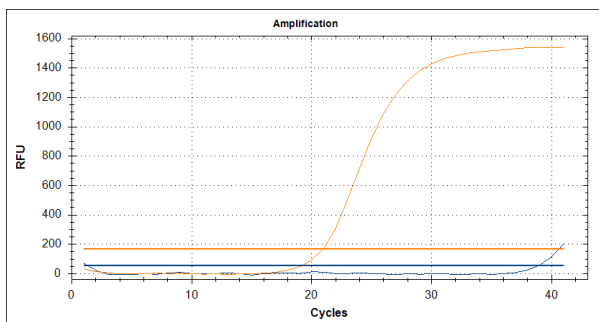
Amostra 8



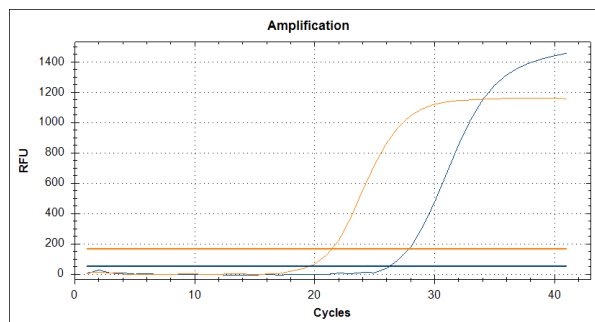
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



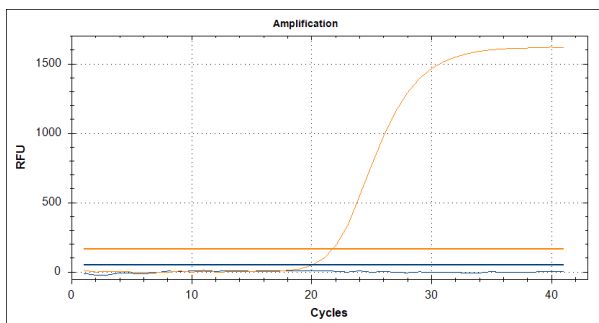
Controlo positivo para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



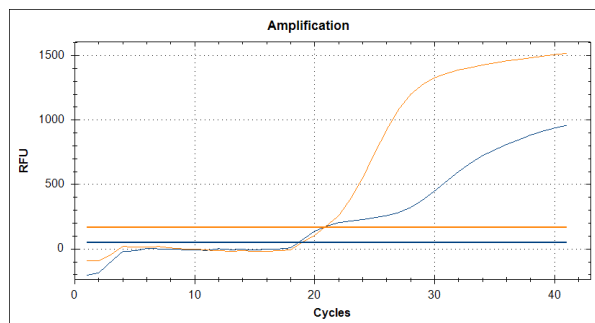
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).



Controlo positivo para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).

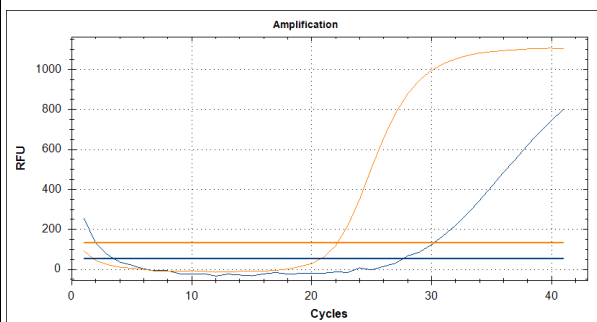


Curva de amplificação da amostra para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

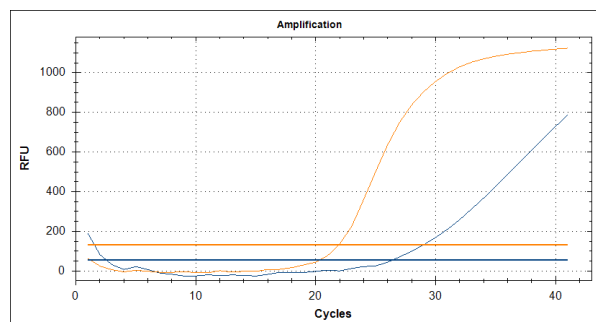


Controlo positivo para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

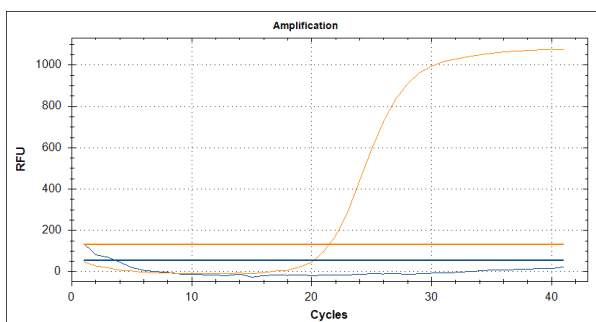
Amostra 9



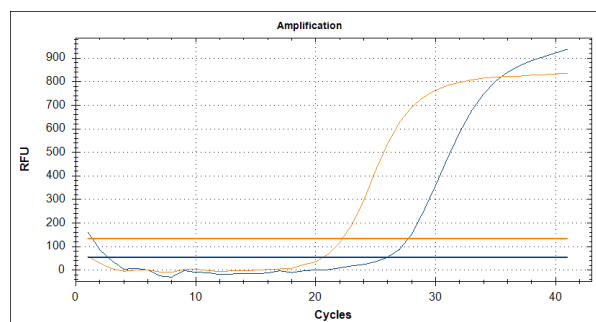
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



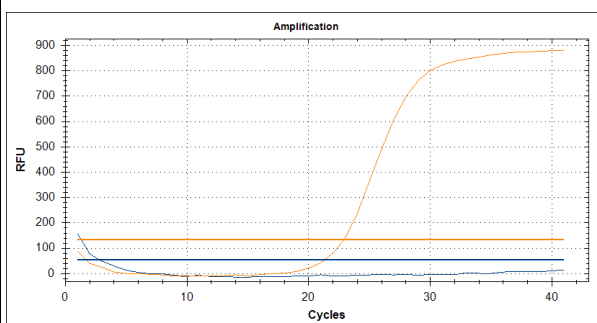
Controlo positivo para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



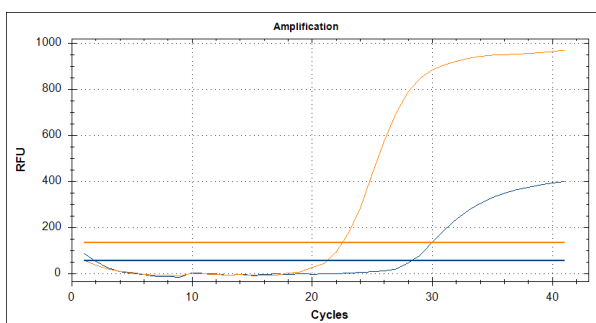
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).



Controlo positivo para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).

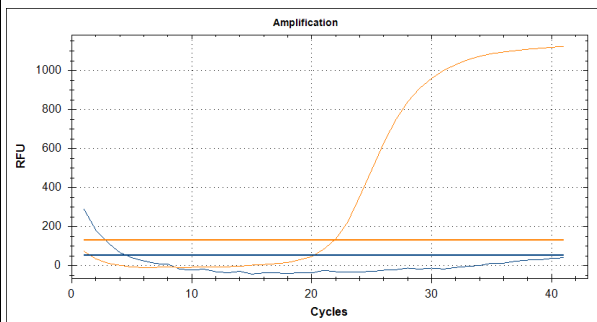


Curva de amplificação da amostra para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

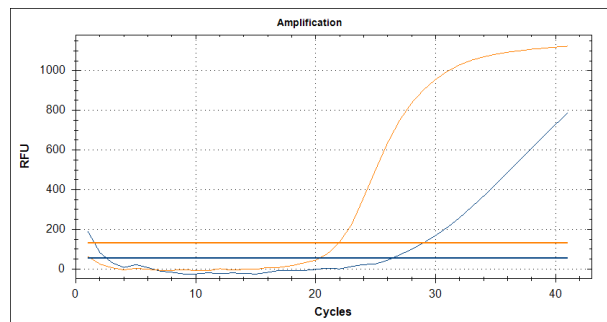


Controlo positivo para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

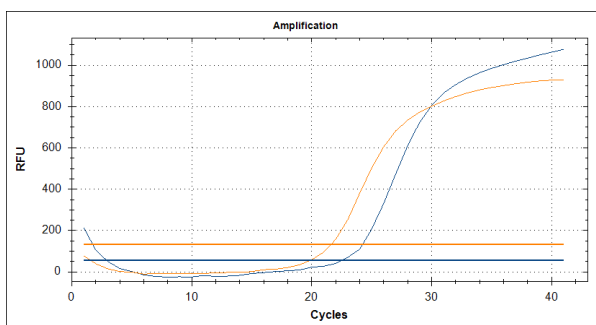
Amostra 10



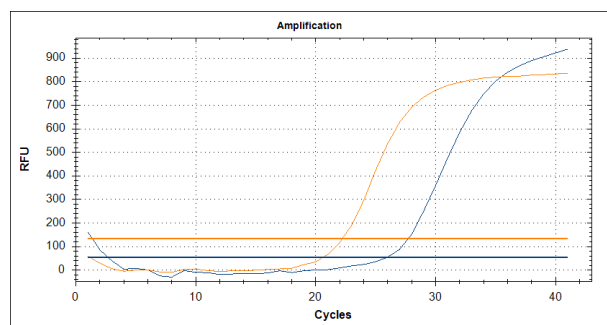
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



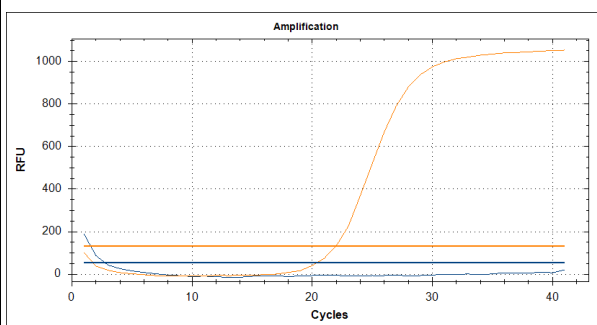
Controlo positivo para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



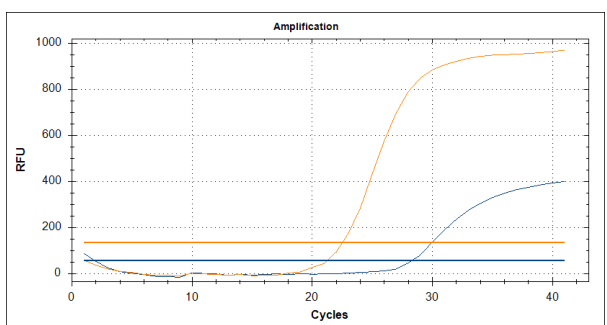
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).



Controlo positivo para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).

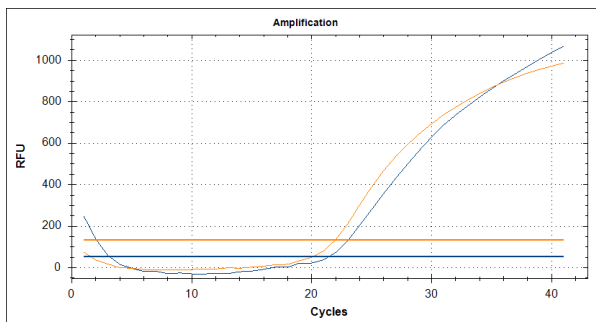


Curva de amplificação da amostra para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

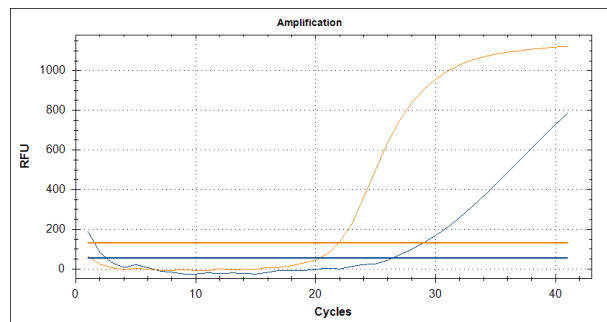


Controlo positivo para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

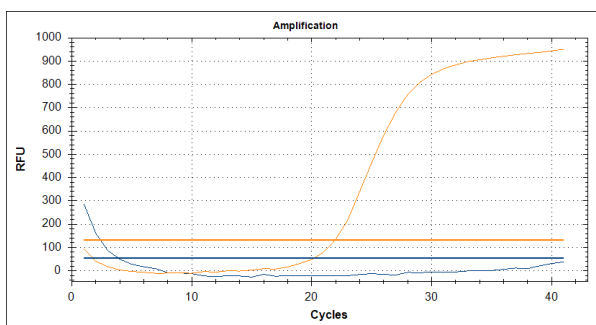
Amostra 11



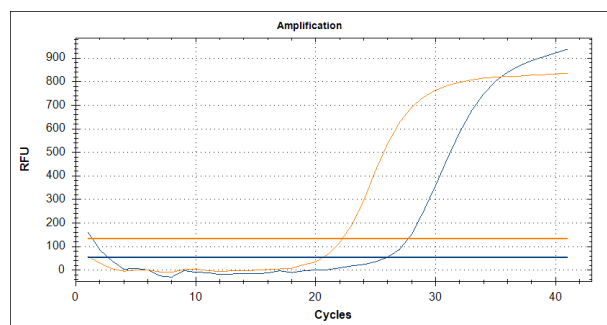
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



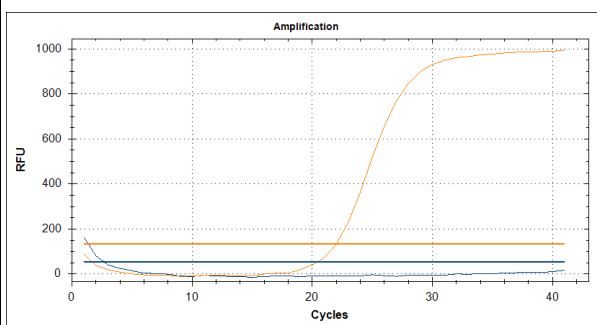
Controlo positivo para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



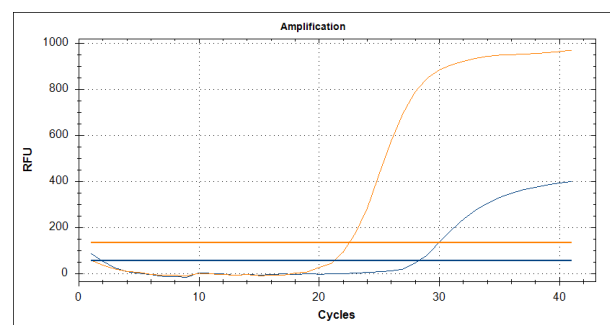
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).



Controlo positivo para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).

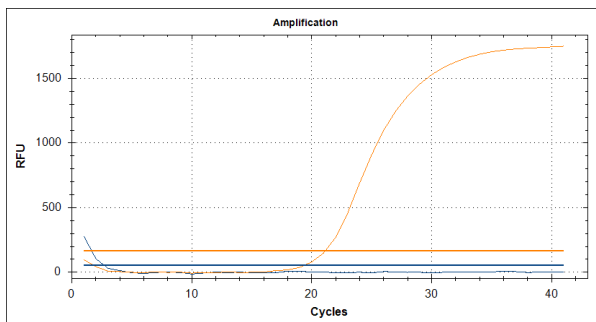


Curva de amplificação da amostra para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

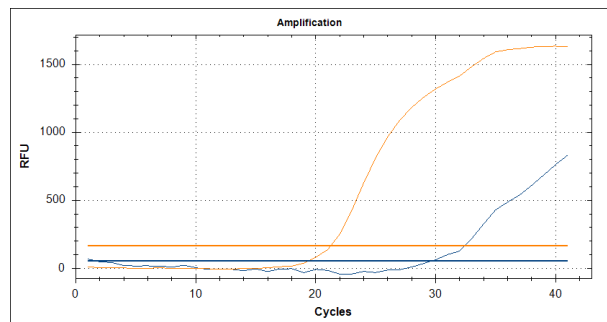


Controlo positivo para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

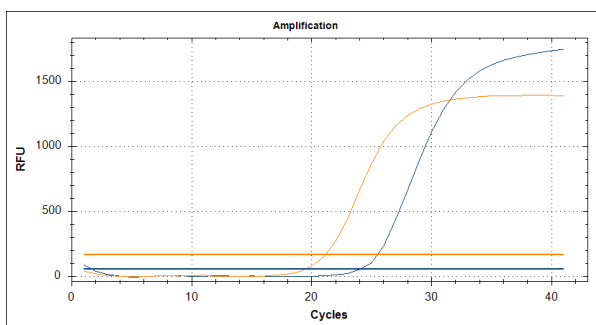
Amostra 12



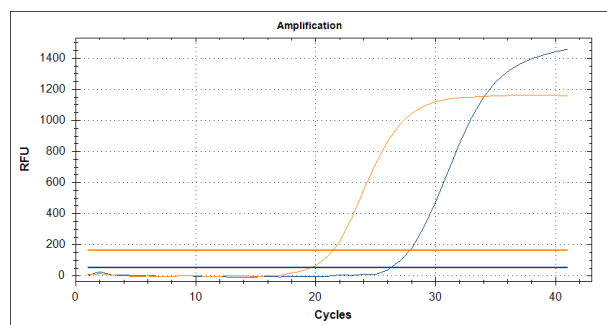
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



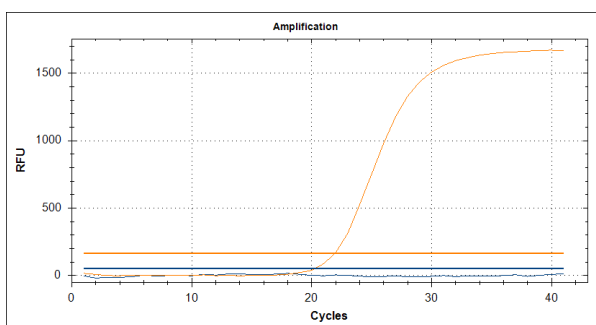
Controlo positivo para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



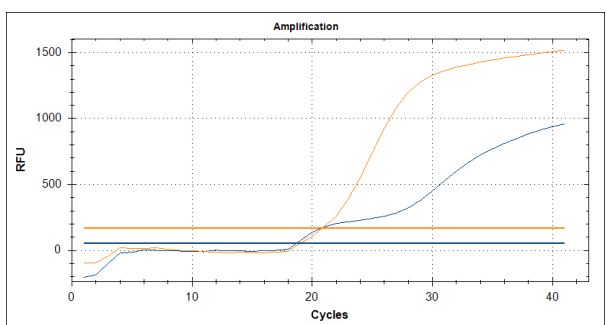
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).



Controlo positivo para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).

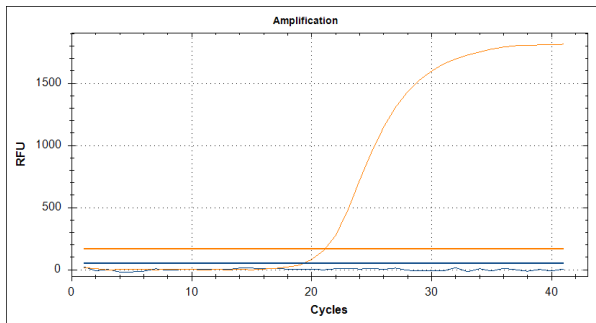


Curva de amplificação da amostra para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

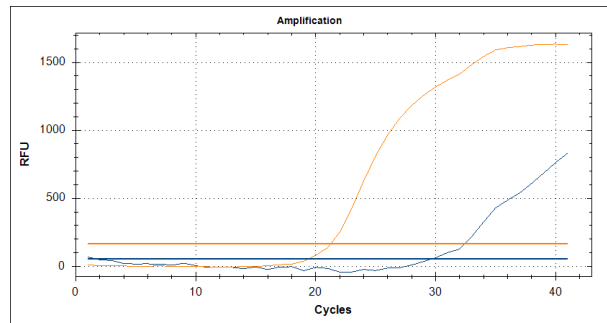


Controlo positivo para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

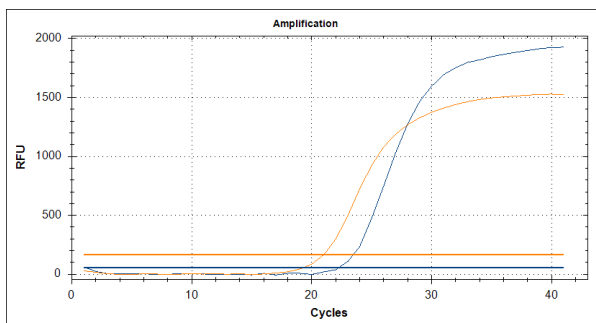
Amostra 13



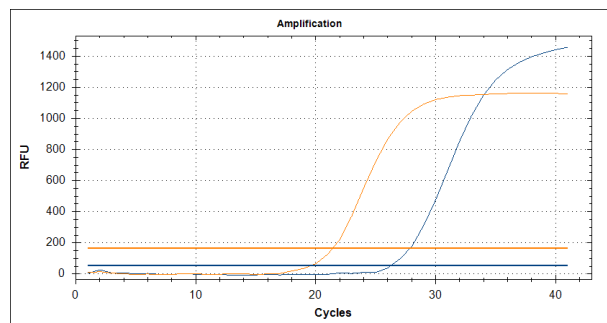
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



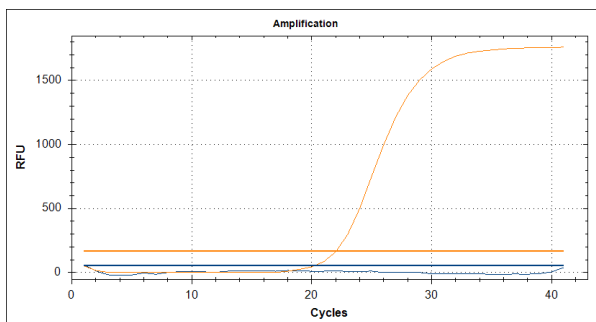
Controlo positivo para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



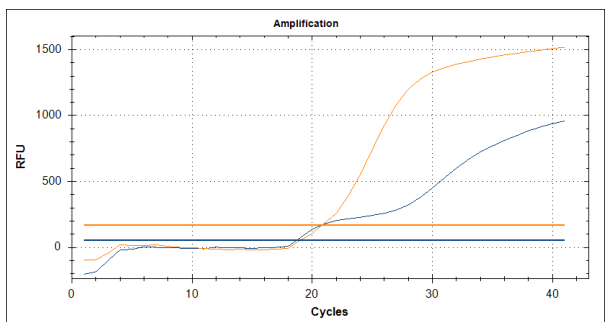
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).



Controlo positivo para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).

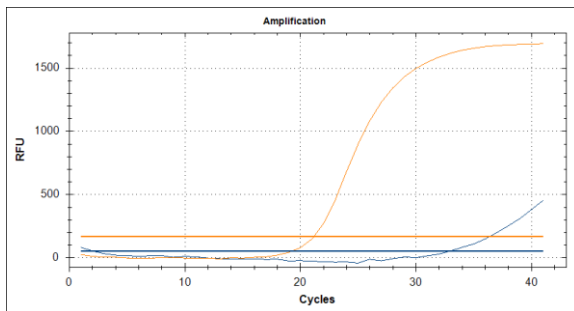


Curva de amplificação da amostra para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

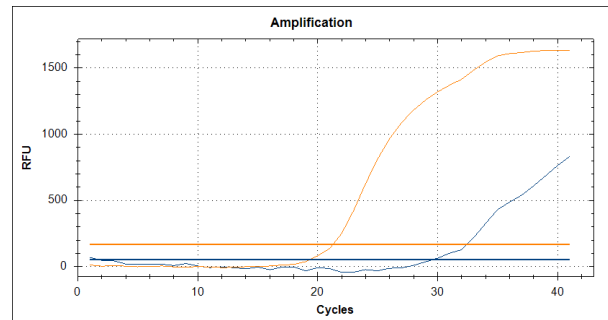


Controlo positivo para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

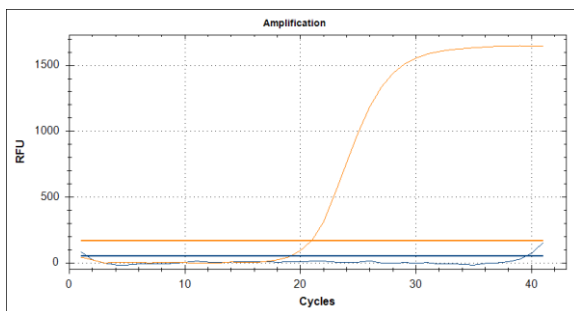
Amostra 14



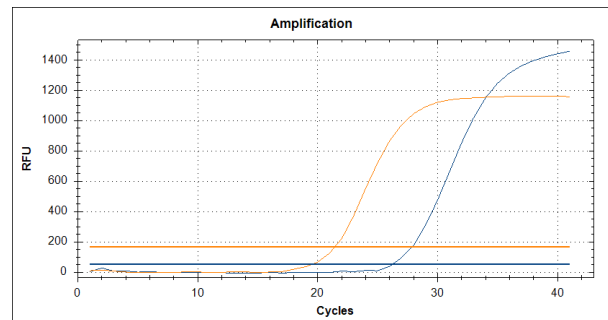
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



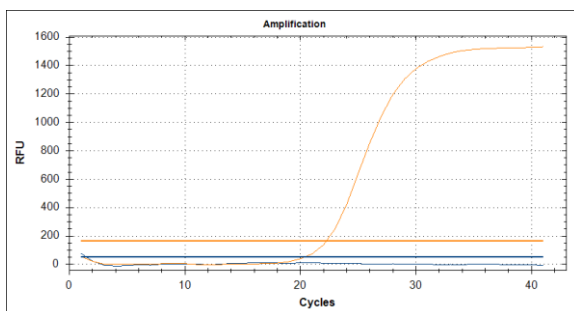
Controlo positivo para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



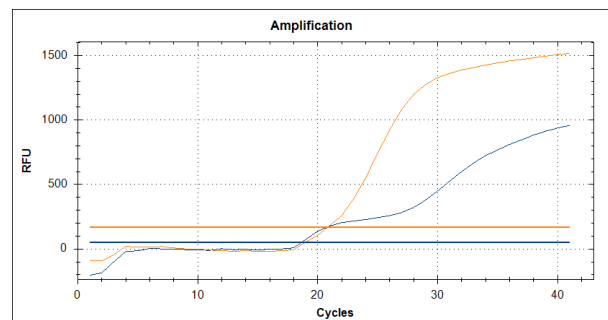
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).



Controlo positivo para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).

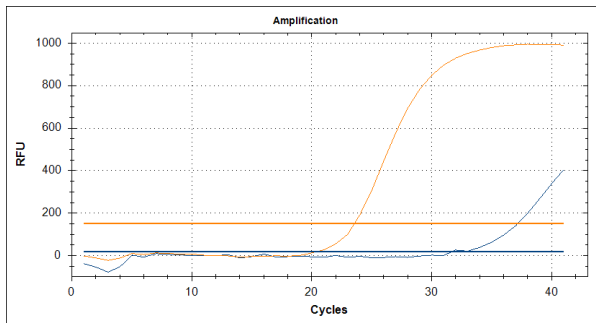


Curva de amplificação da amostra para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

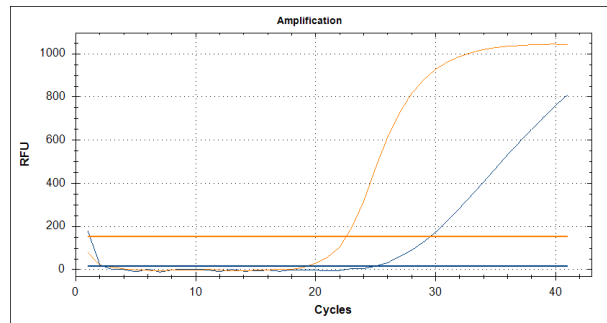


Controlo positivo para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

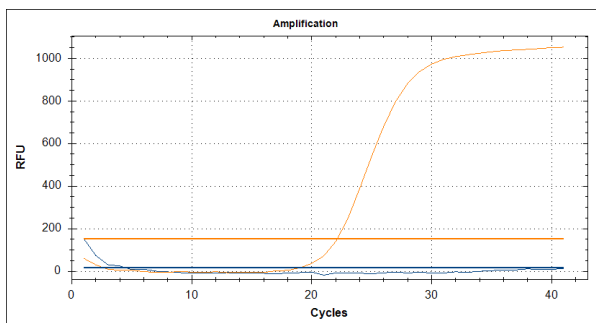
Amostra 15



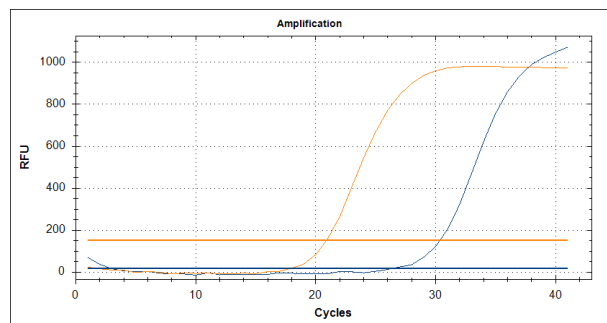
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



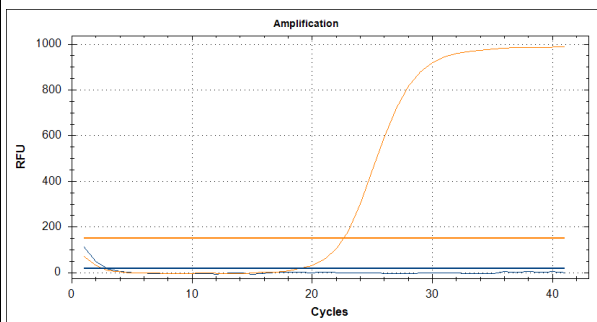
Controlo positivo para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



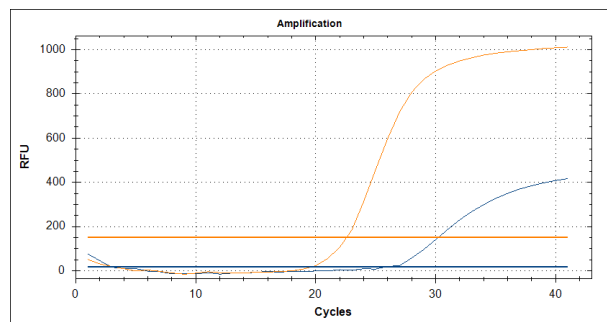
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).



Controlo positivo para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).

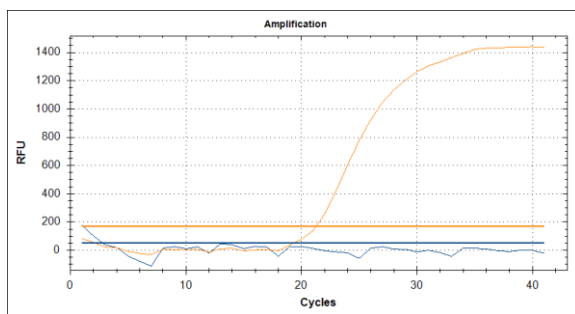


Curva de amplificação da amostra para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

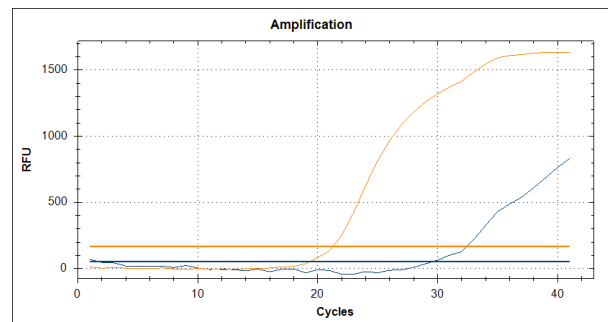


Controlo positivo para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

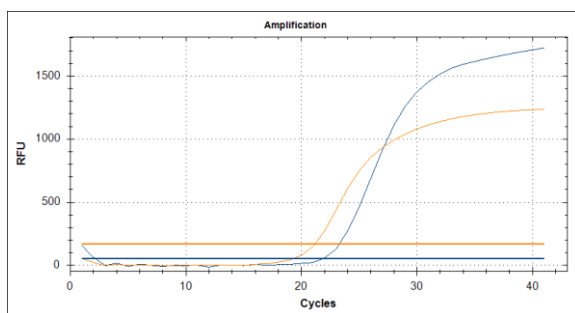
Amostra 16



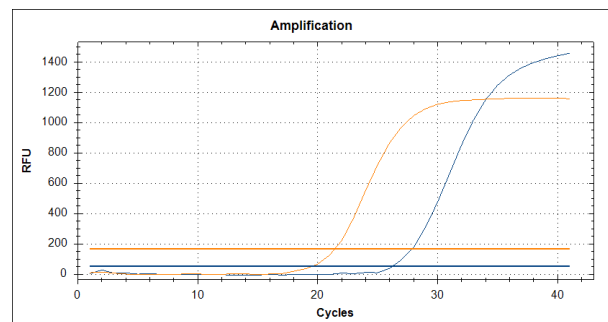
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



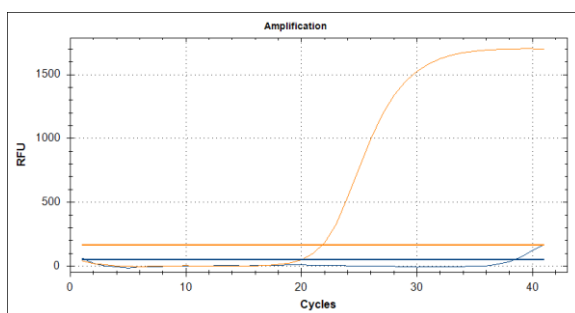
Controlo positivo para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



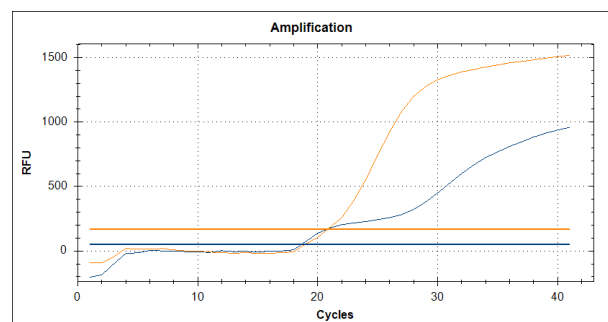
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).



Controlo positivo para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).

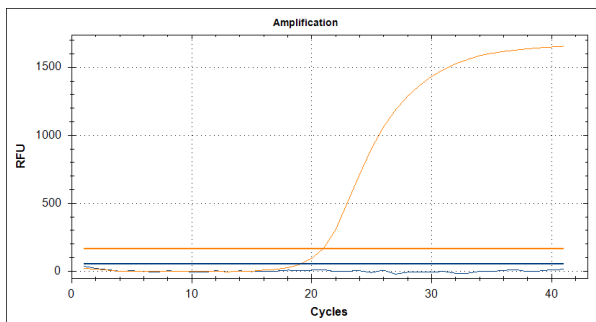


Curva de amplificação da amostra para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

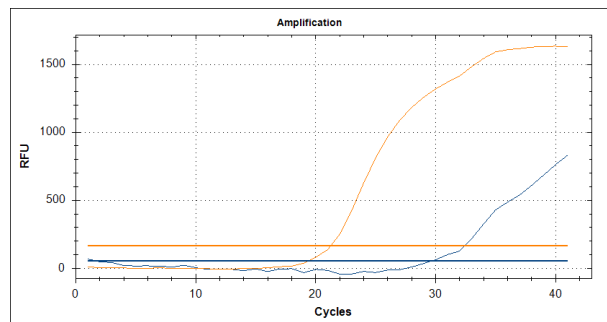


Controlo positivo para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

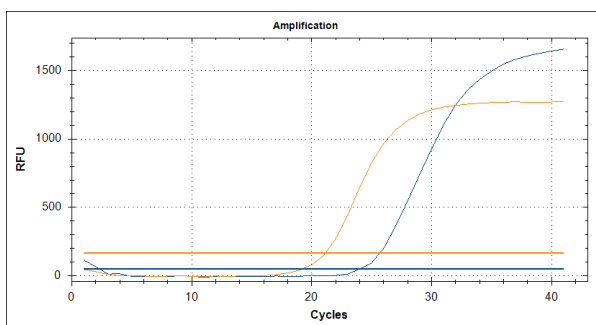
Amostra 17



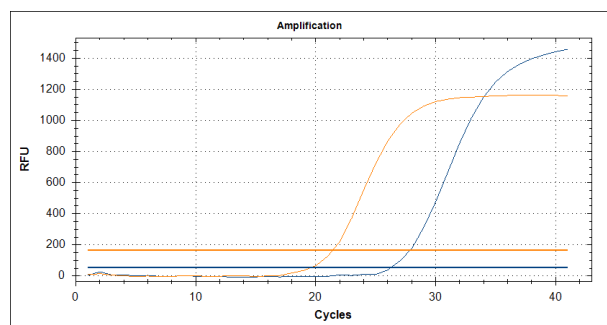
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



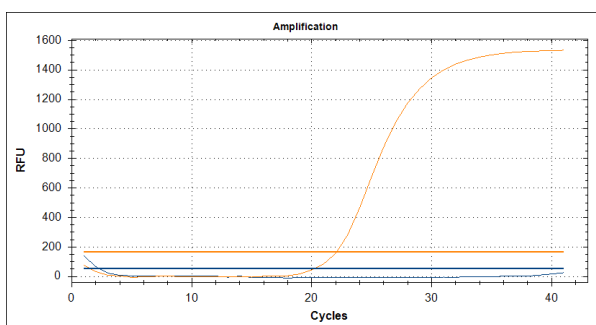
Controlo positivo para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



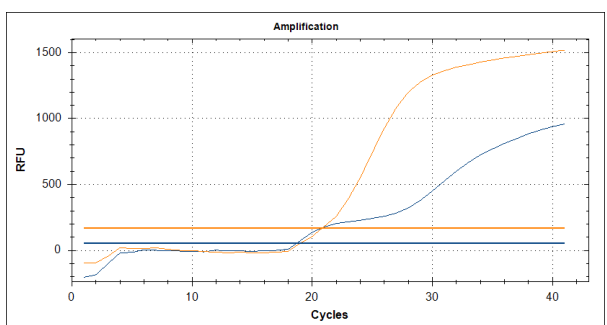
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).



Controlo positivo para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).

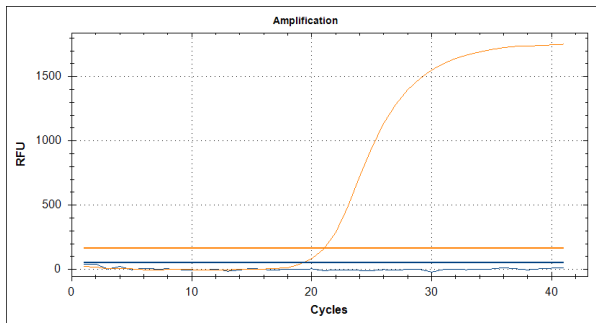


Curva de amplificação da amostra para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

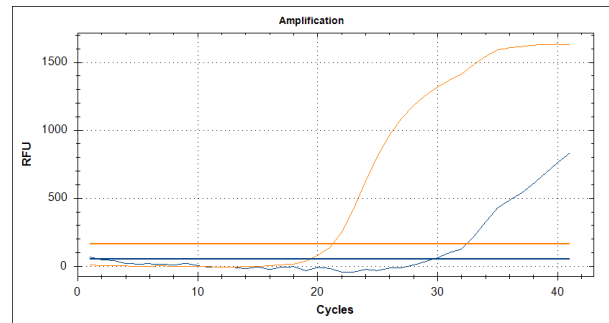


Controlo positivo para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

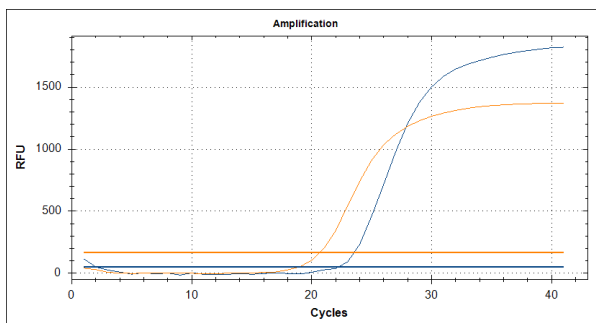
Amostra 18



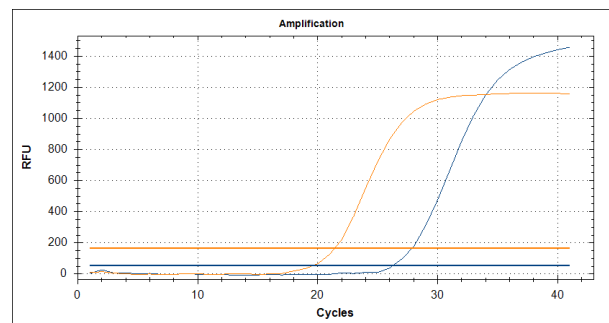
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



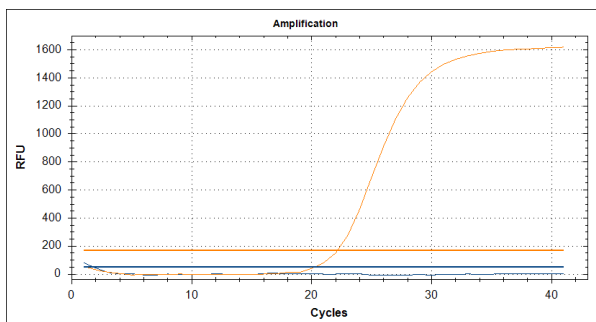
Controlo positivo para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



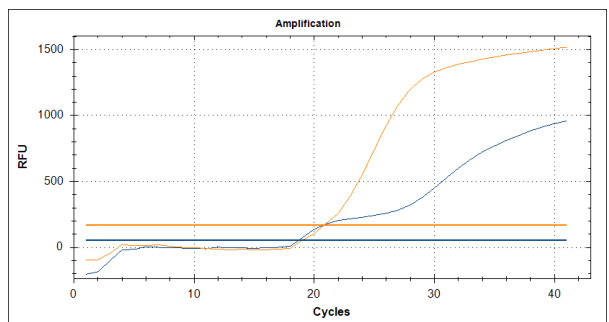
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).



Controlo positivo para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).

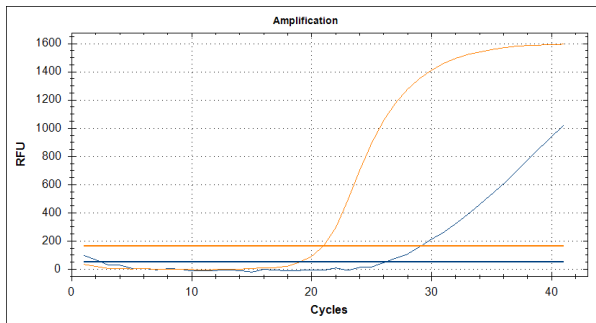


Curva de amplificação da amostra para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

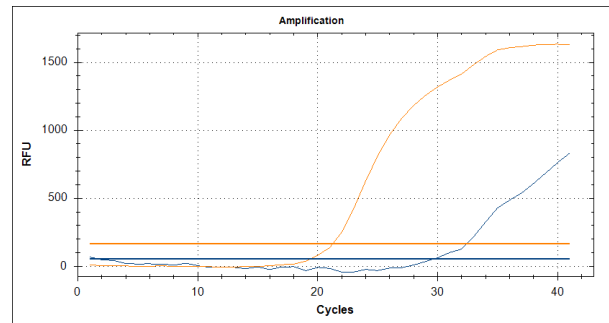


Controlo positivo para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

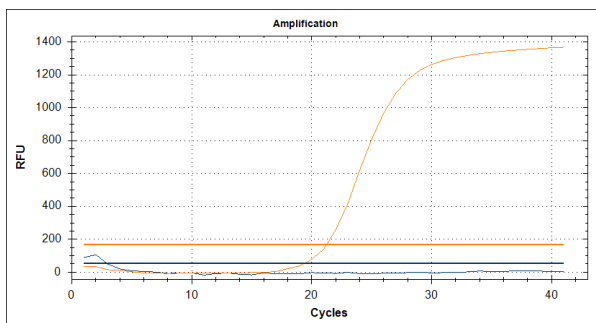
Amostra 19



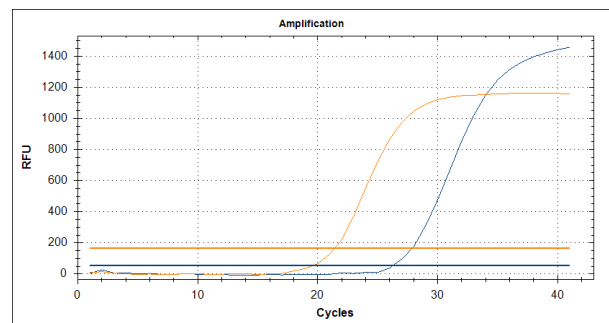
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



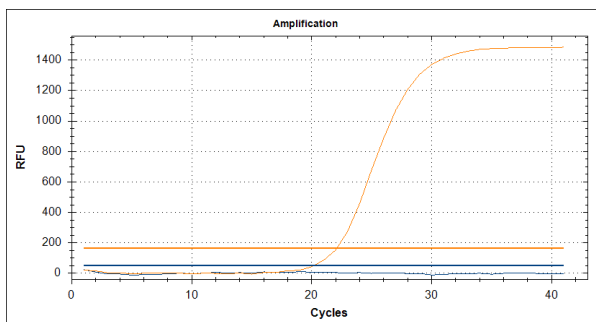
Controlo positivo para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



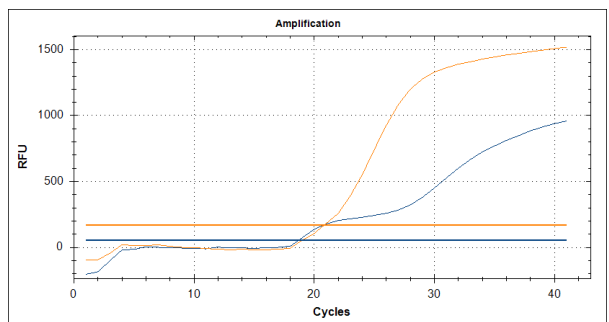
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).



Controlo positivo para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).

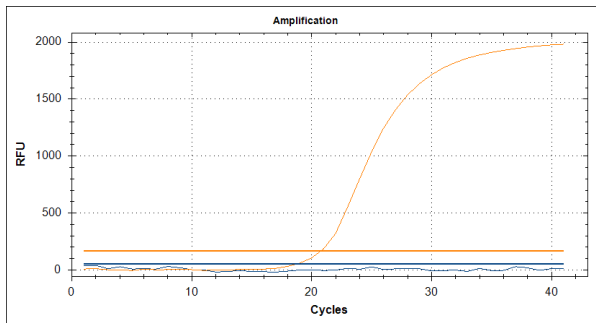


Curva de amplificação da amostra para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

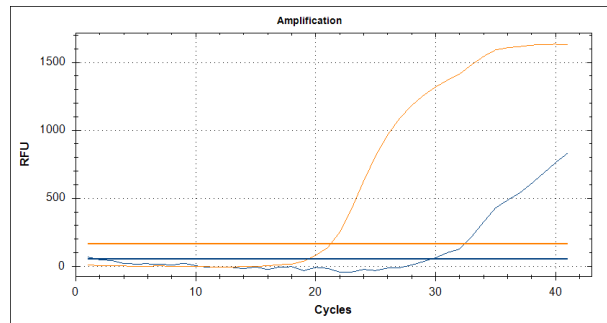


Controlo positivo para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

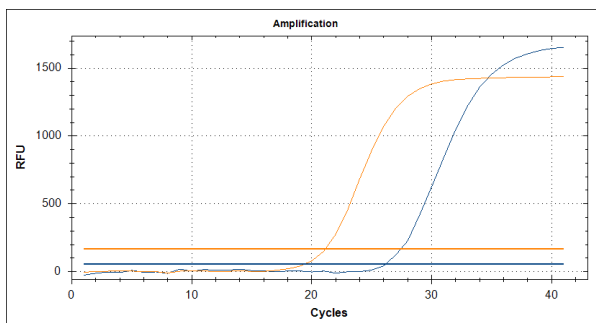
Amostra 20



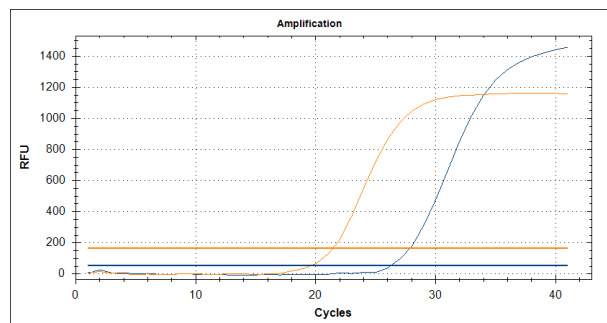
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



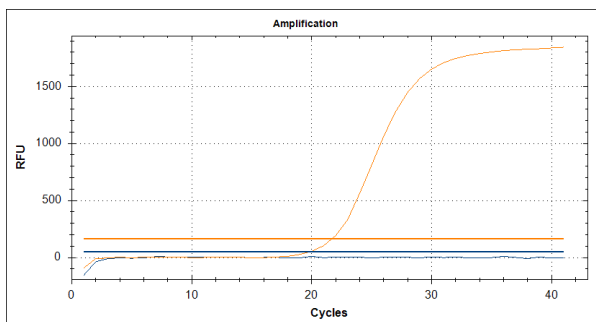
Controlo positivo para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



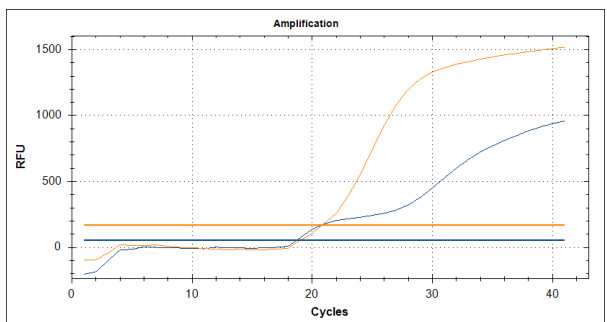
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).



Controlo positivo para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).

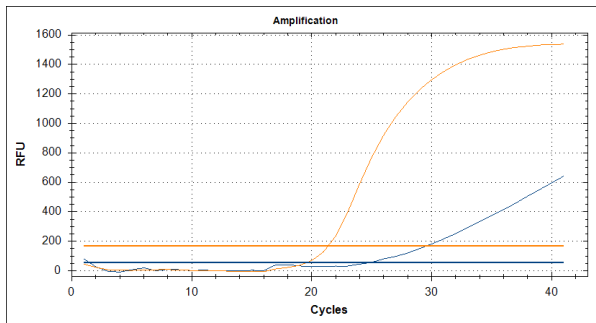


Curva de amplificação da amostra para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

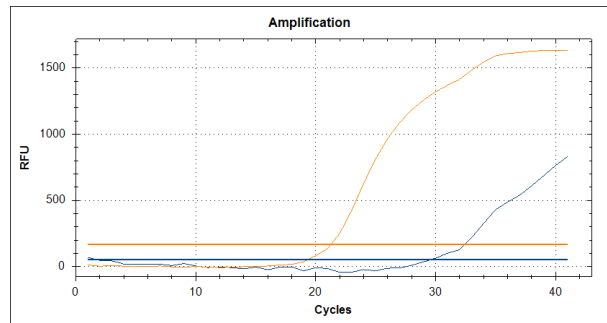


Controlo positivo para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

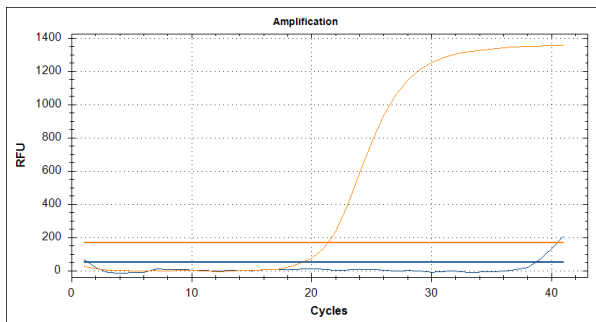
Amostra 21



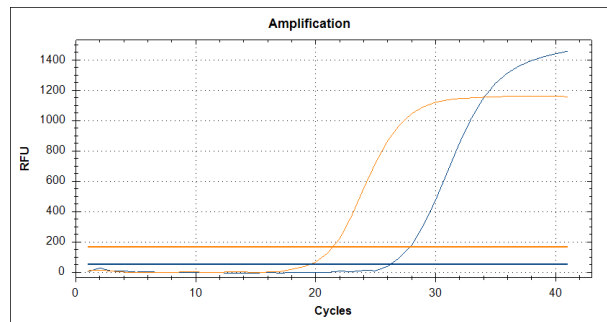
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



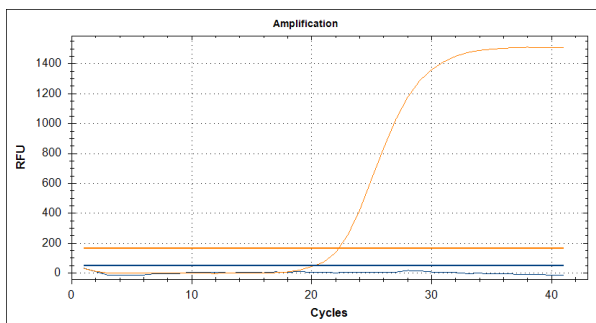
Controlo positivo para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



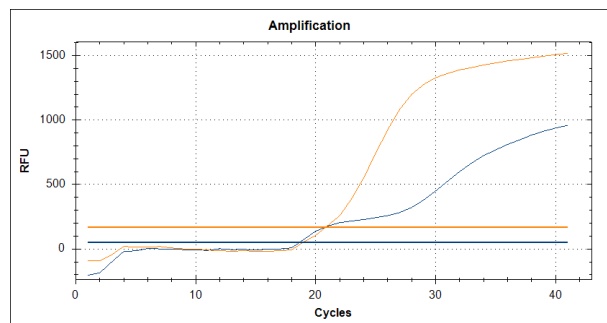
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).



Controlo positivo para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).

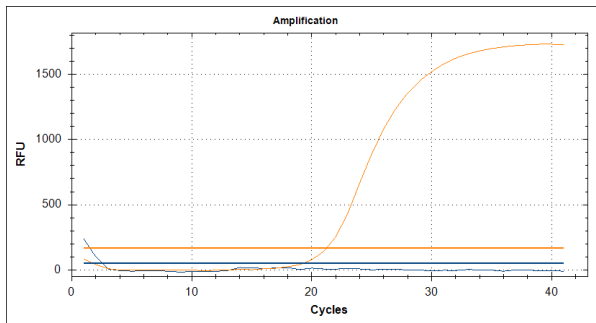


Curva de amplificação da amostra para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

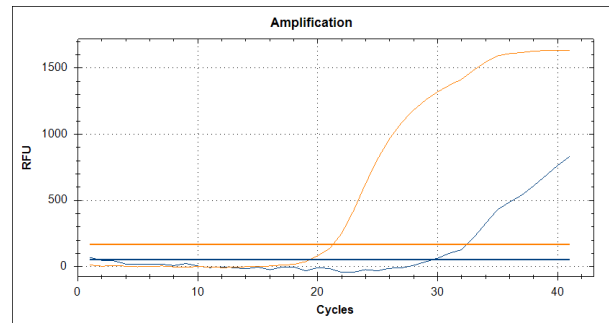


Controlo positivo para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

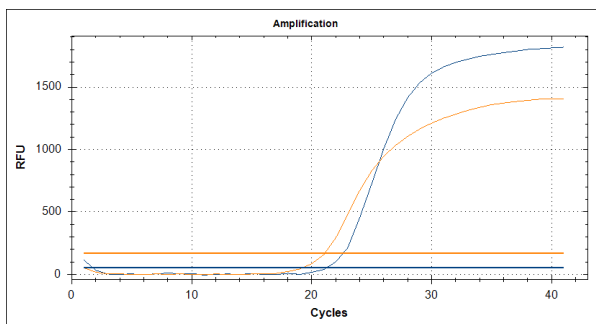
Amostra 22



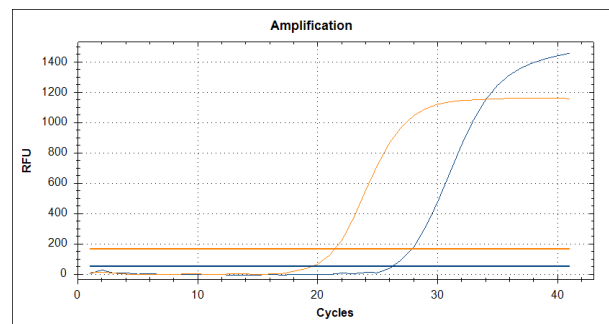
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



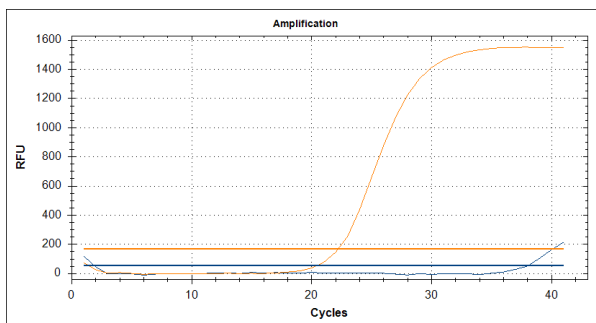
Controlo positivo para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



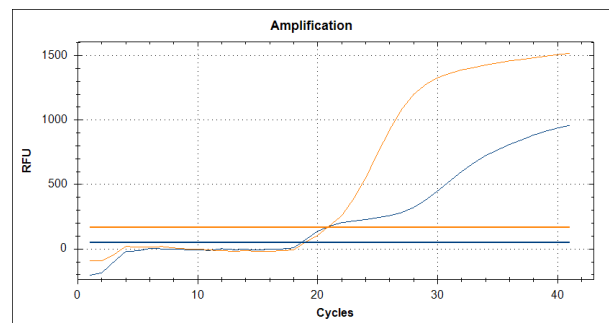
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).



Controlo positivo para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).

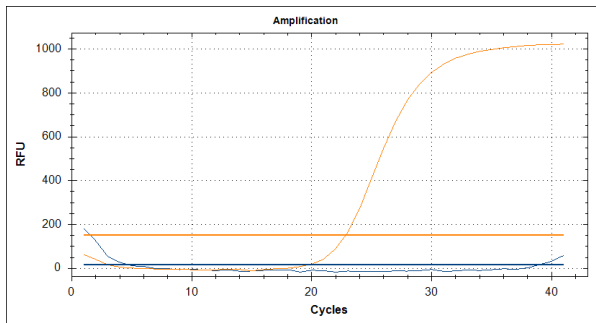


Curva de amplificação da amostra para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

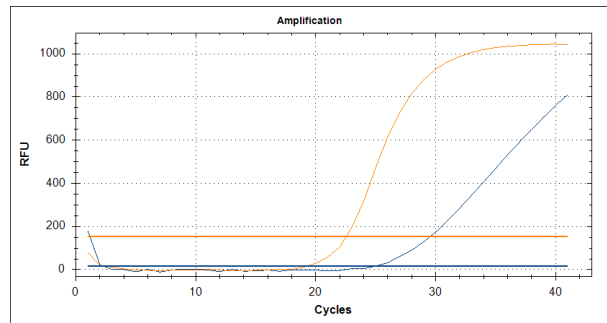


Controlo positivo para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

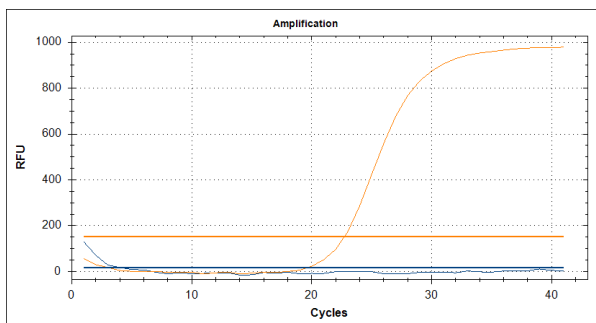
Amostra 23



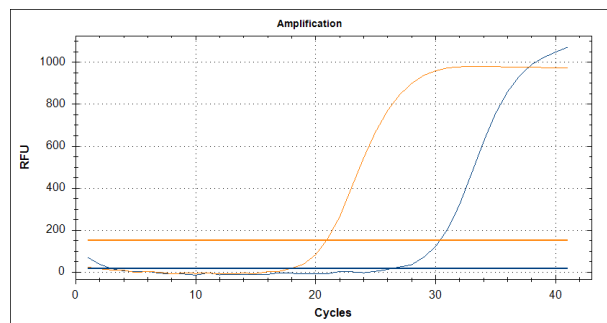
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



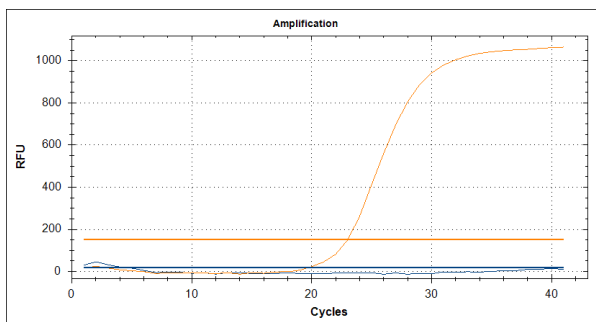
Controlo positivo para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



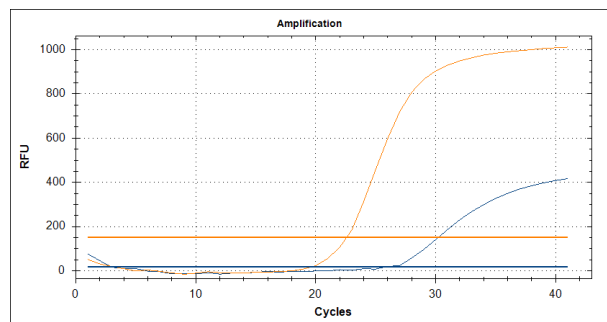
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).



Controlo positivo para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).

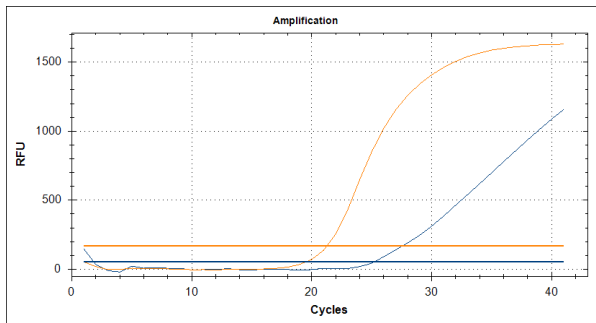


Curva de amplificação da amostra para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

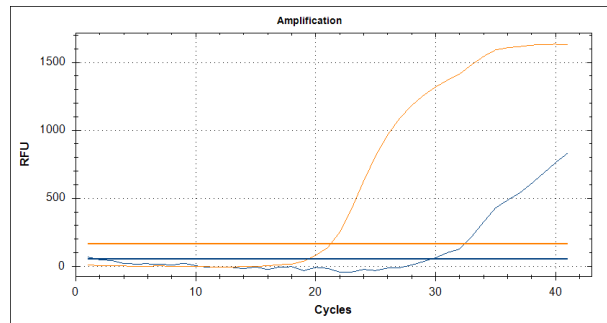


Controlo positivo para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

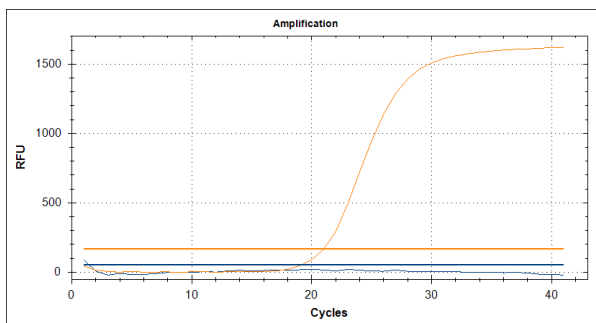
Amostra 24



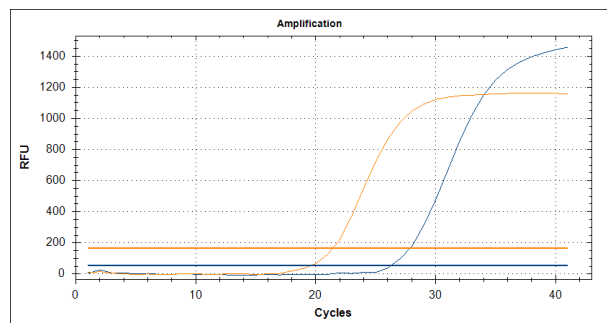
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



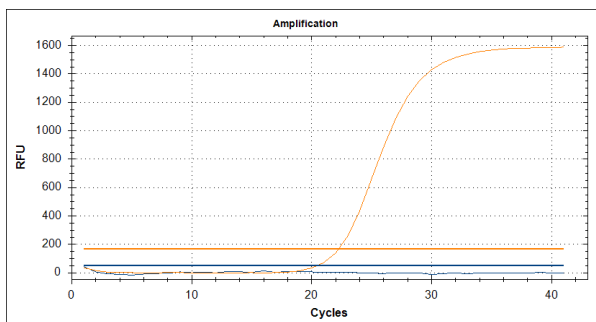
Controlo positivo para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



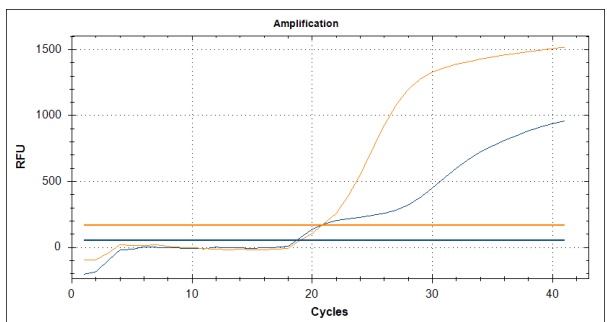
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).



Controlo positivo para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).

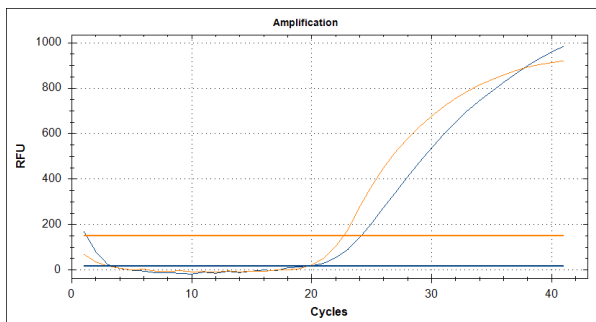


Curva de amplificação da amostra para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

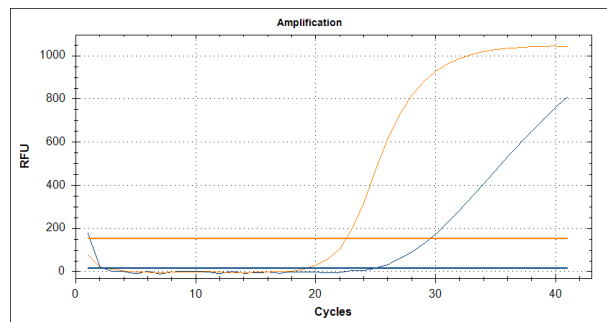


Controlo positivo para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

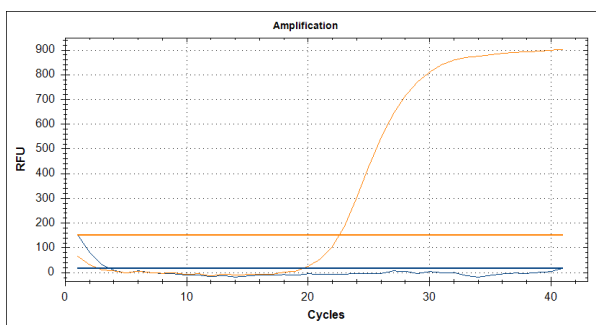
Amostra 26



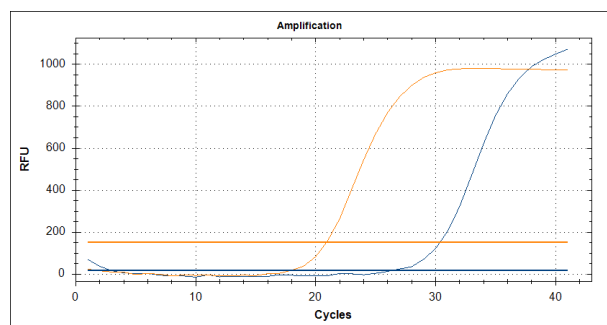
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



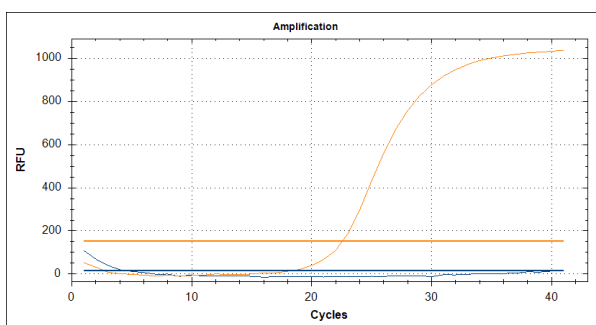
Controlo positivo para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



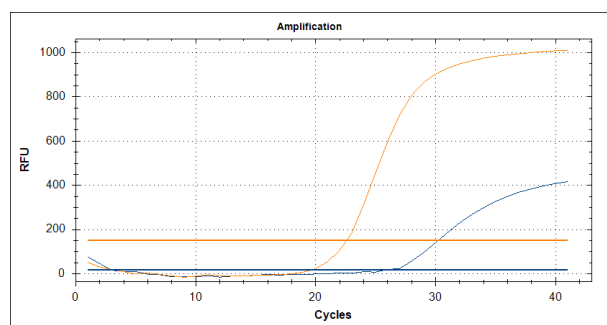
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).



Controlo positivo para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).

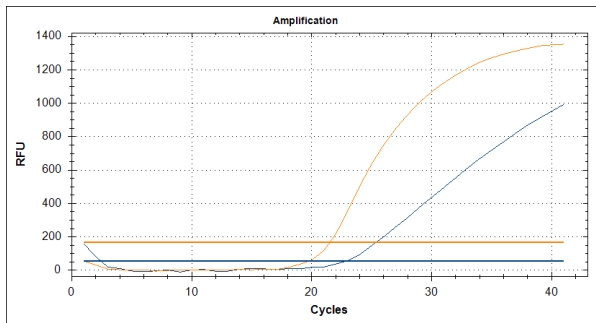


Curva de amplificação da amostra para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

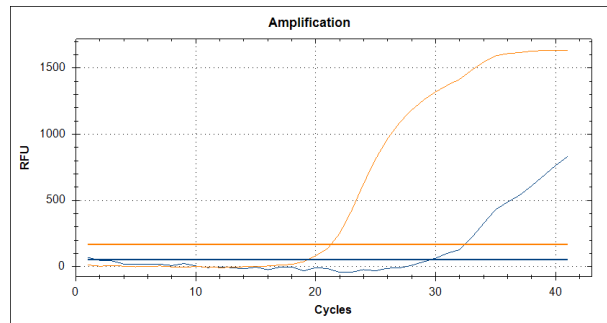


Controlo positivo para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

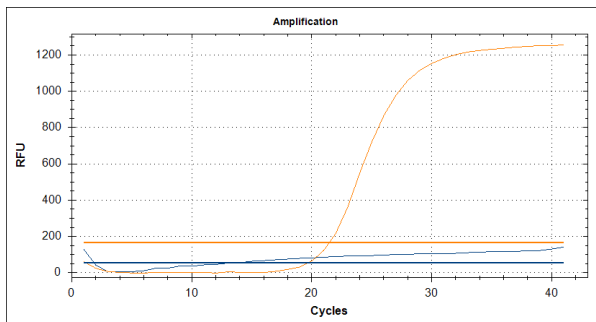
Amostra 27



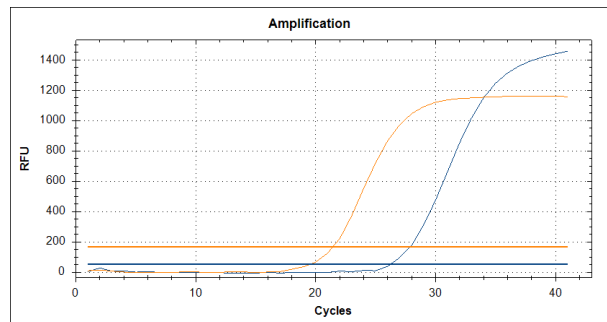
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



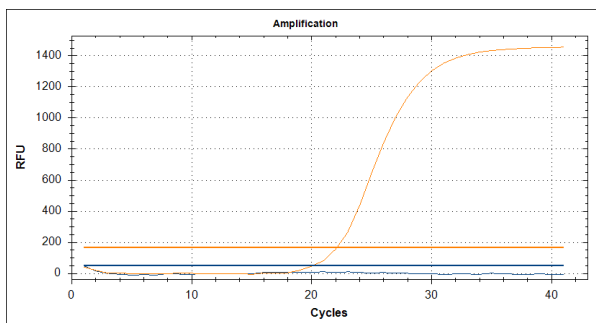
Controlo positivo para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



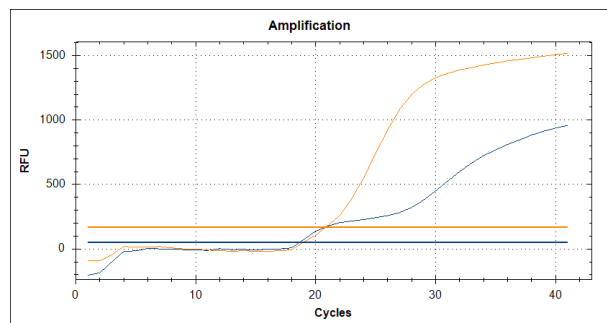
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).



Controlo positivo para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).

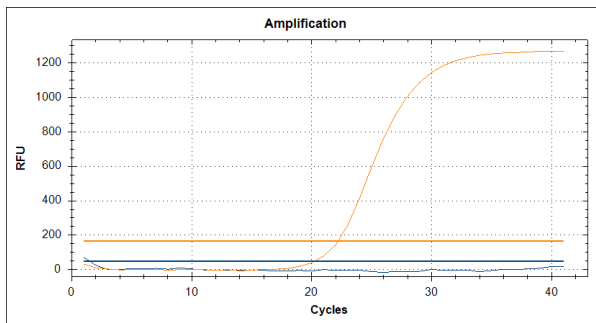


Curva de amplificação da amostra para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

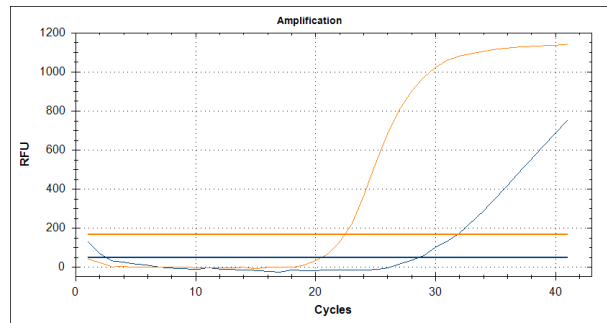


Controlo positivo para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

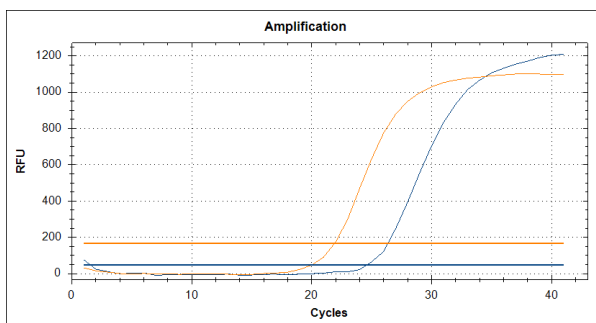
Amostra 28



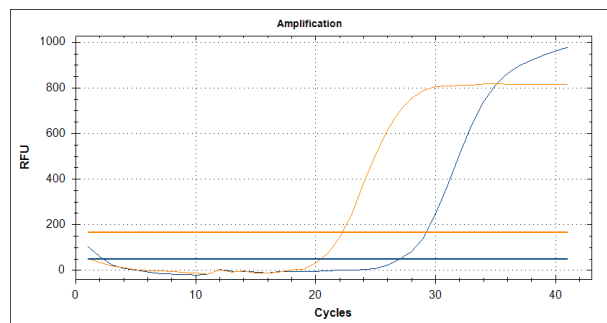
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



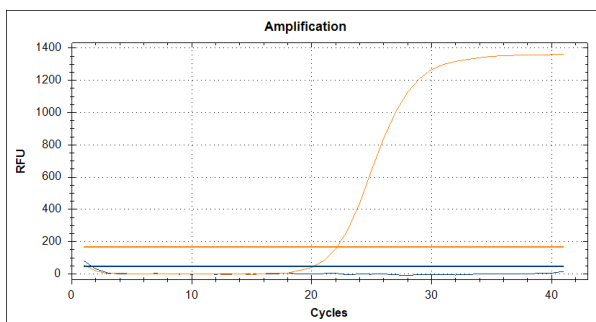
Controlo positivo para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



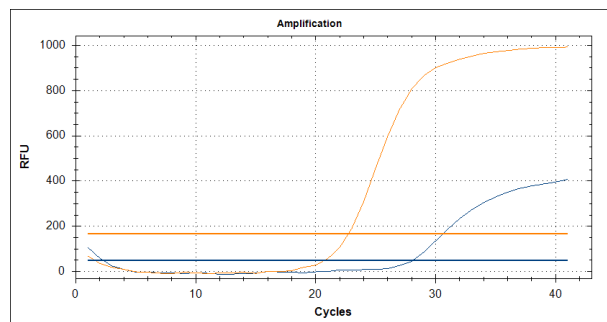
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).



Controlo positivo para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).

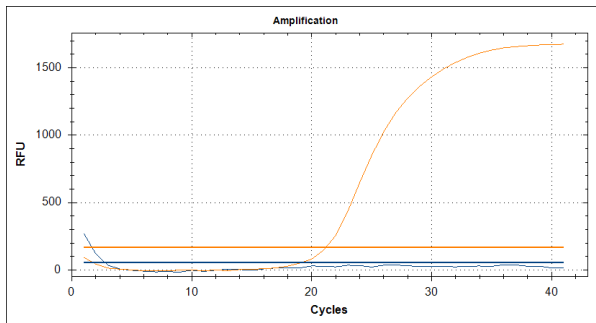


Curva de amplificação da amostra para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

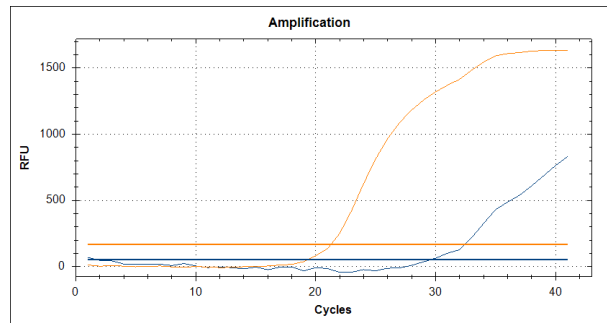


Controlo positivo para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

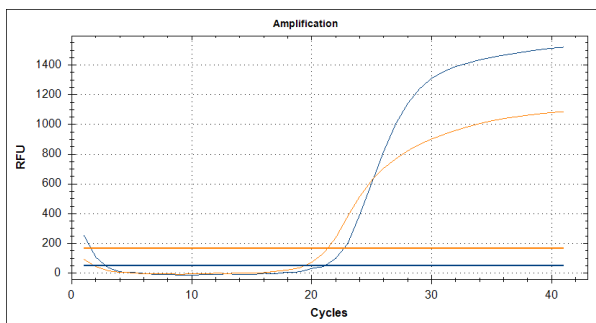
Amostra 29



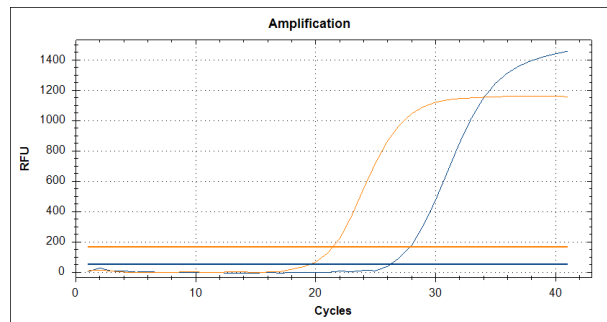
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



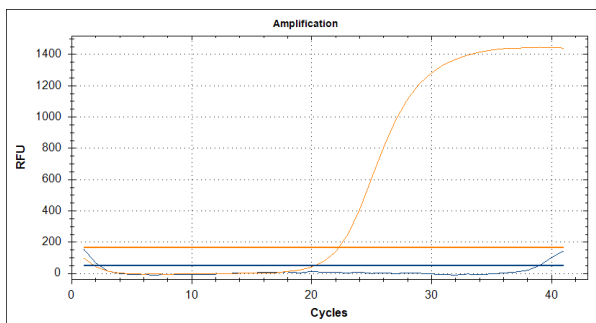
Controlo positivo para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



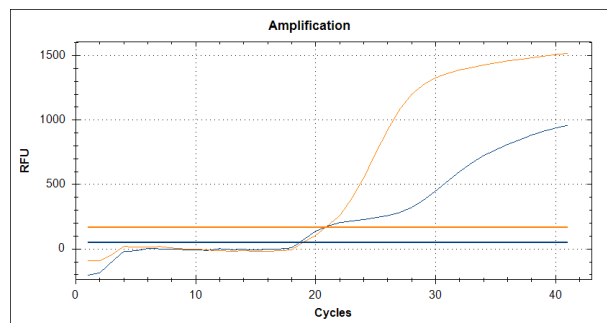
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).



Controlo positivo para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).

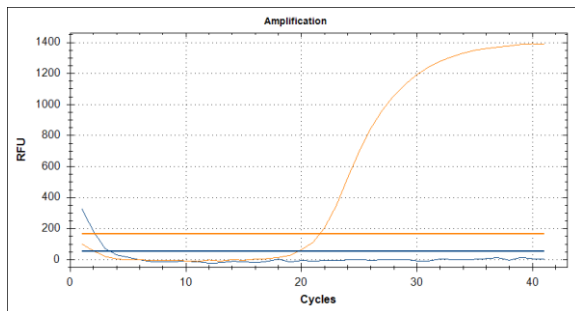


Curva de amplificação da amostra para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

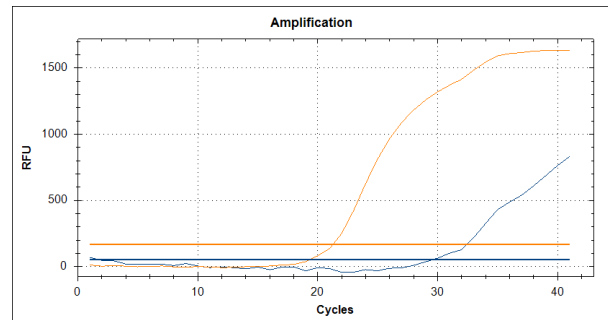


Controlo positivo para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

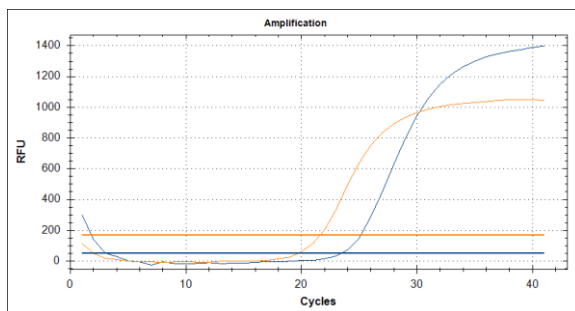
Amostra 30



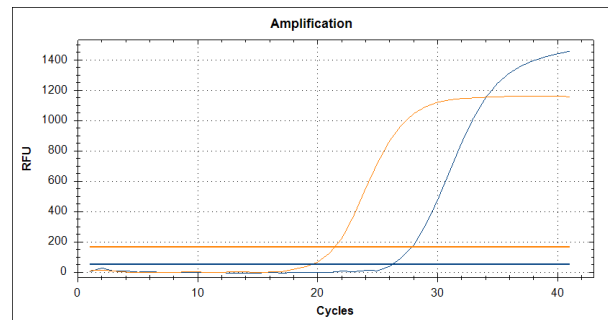
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



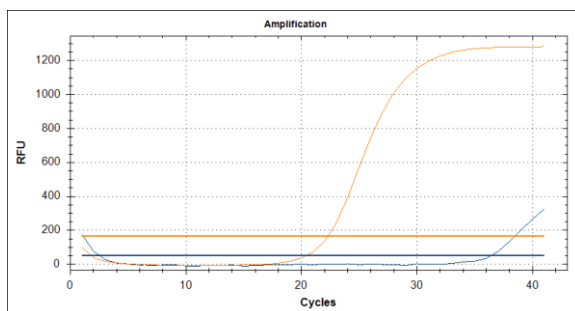
Controlo positivo para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



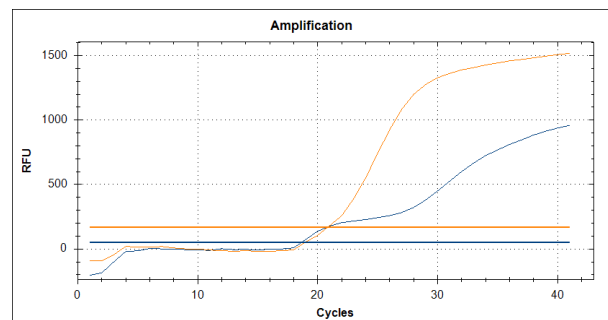
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).



Controlo positivo para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).

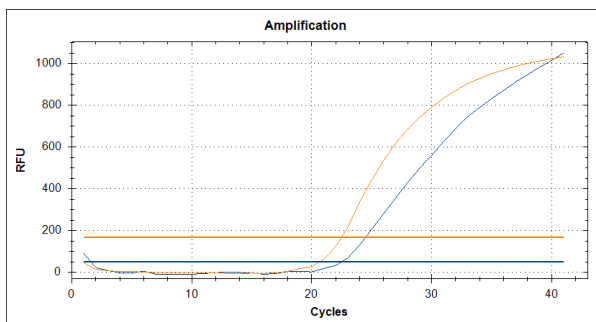


Curva de amplificação da amostra para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

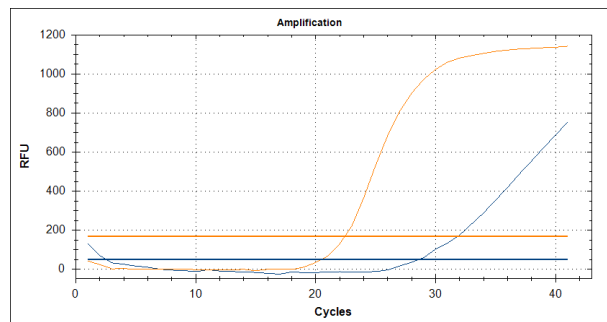


Controlo positivo para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

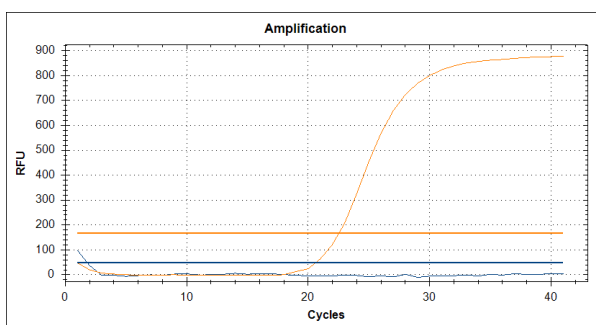
Amostra 31



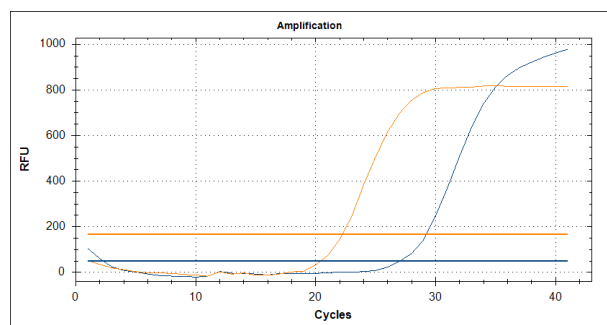
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



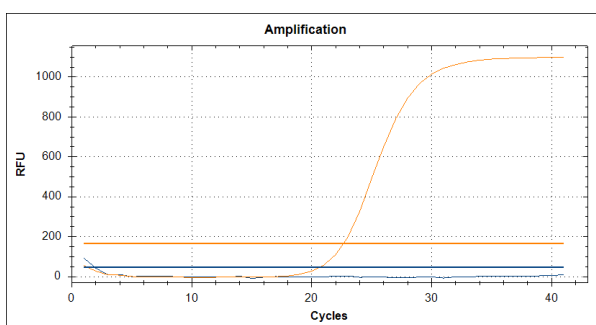
Controlo positivo para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



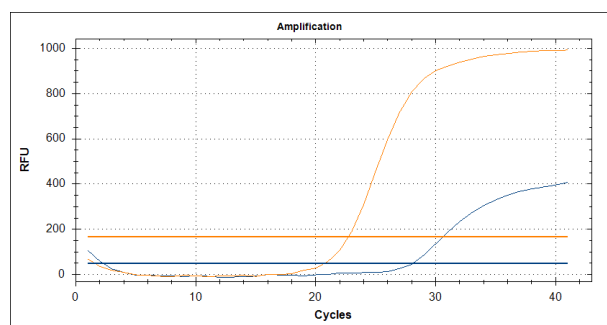
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).



Controlo positivo para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).

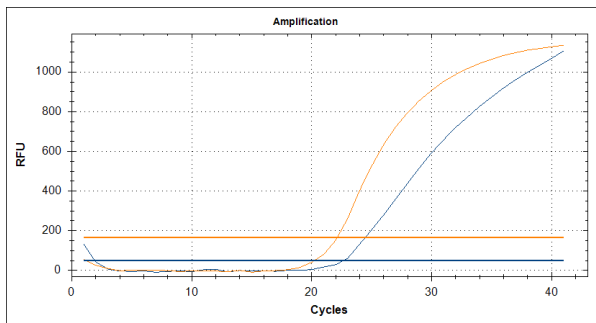


Curva de amplificação da amostra para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

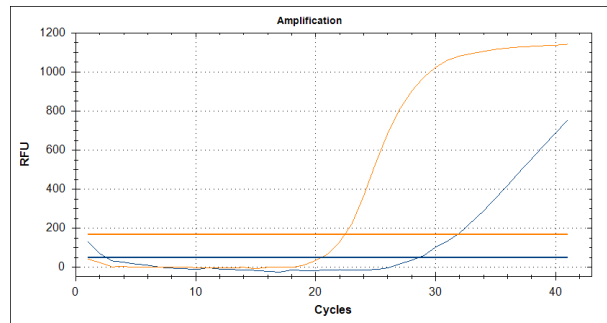


Controlo positivo para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

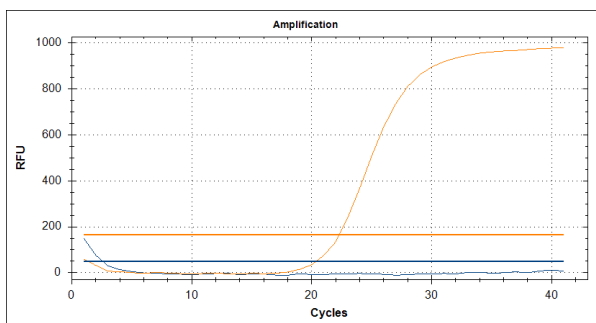
Amostra 32



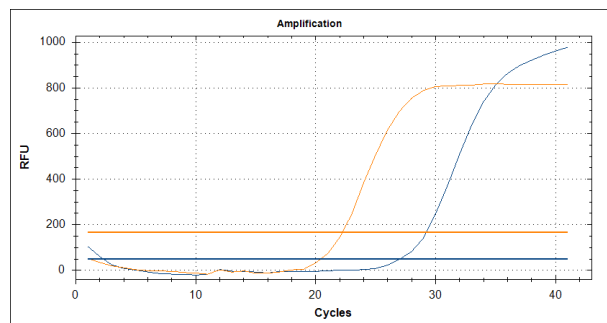
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



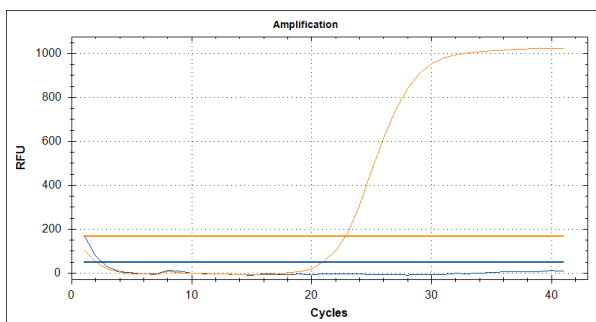
Controlo positivo para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



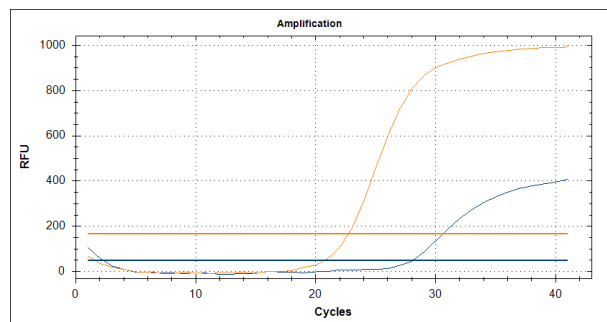
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).



Controlo positivo para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).

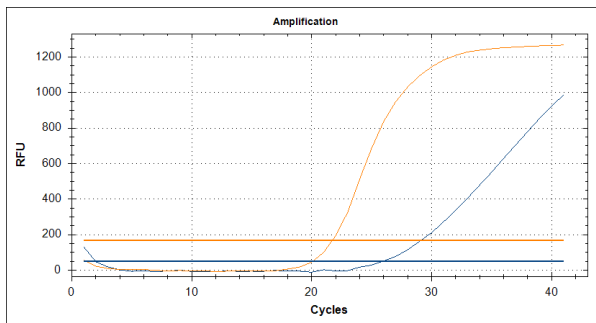


Curva de amplificação da amostra para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

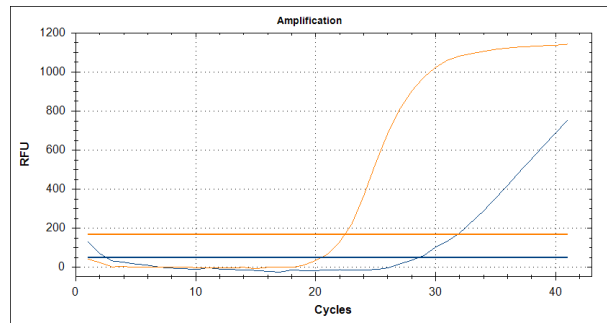


Controlo positivo para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

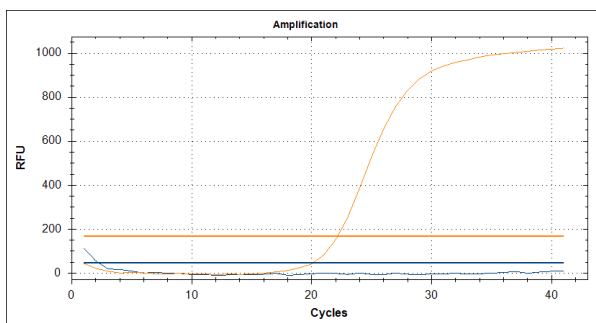
Amostra 33



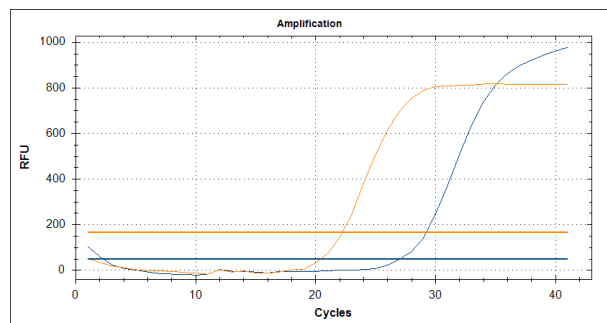
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



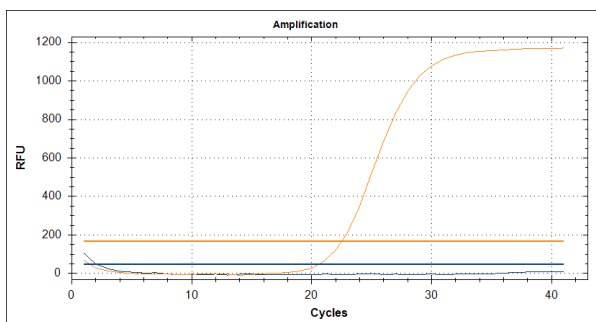
Controlo positivo para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



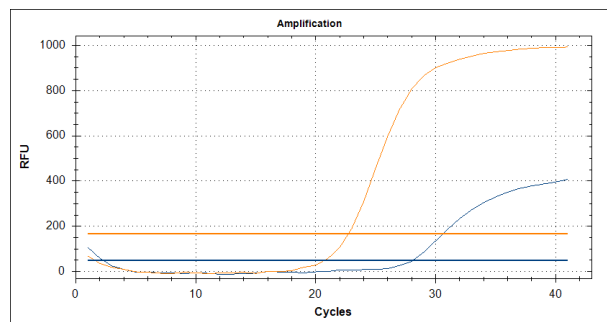
curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).



Controlo positivo para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).

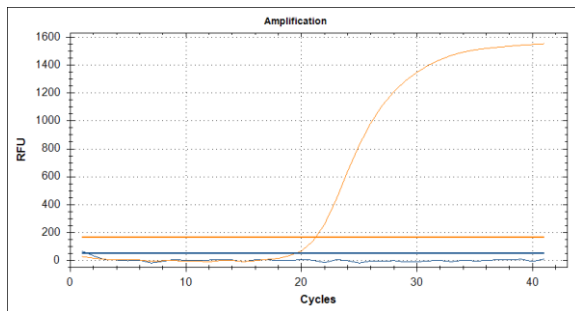


Curva de amplificação da amostra para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

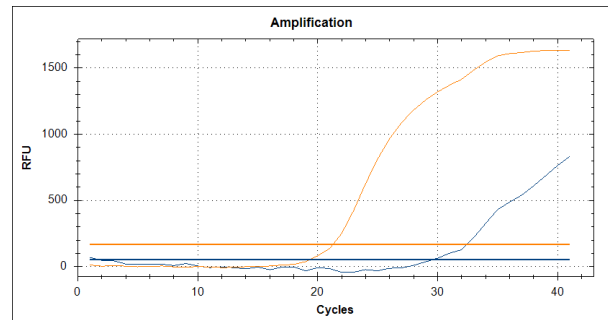


Controlo positivo para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

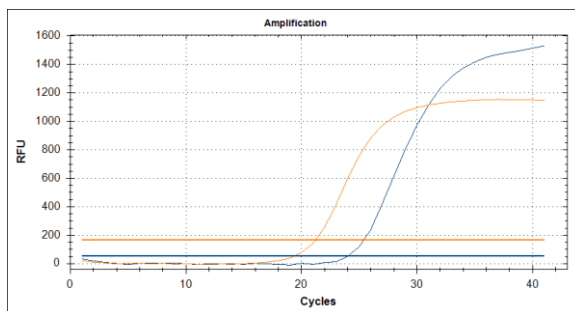
Amostra 34



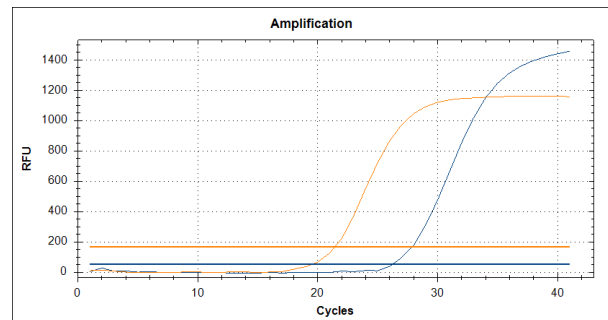
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



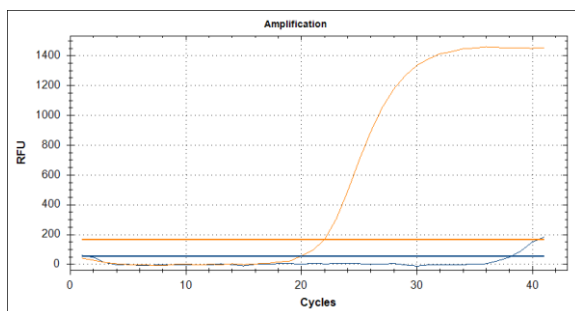
Controlo positivo para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



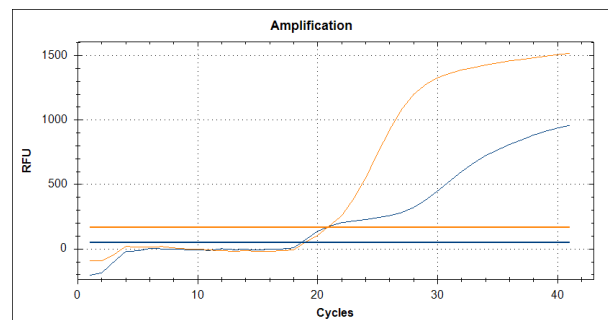
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).



Controlo positivo para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).

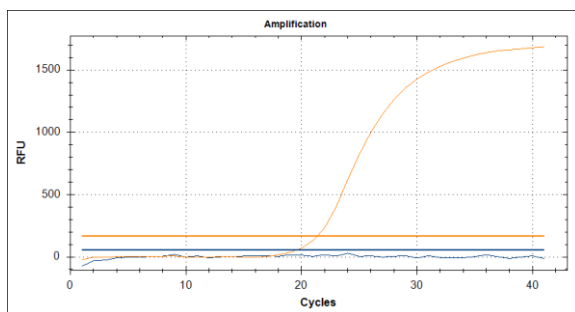


Curva de amplificação da amostra para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

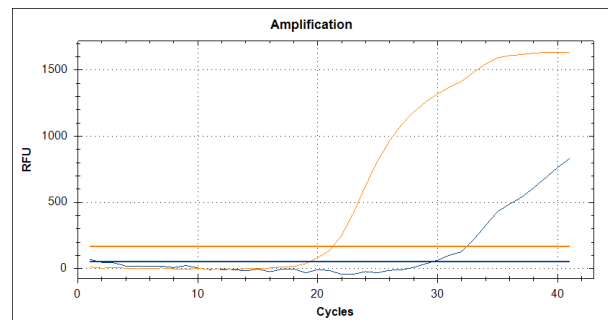


Controlo positivo para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

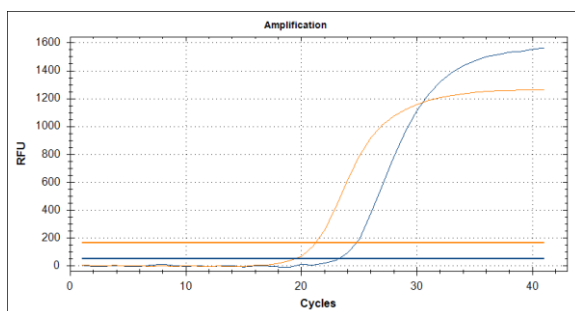
Amostra 35



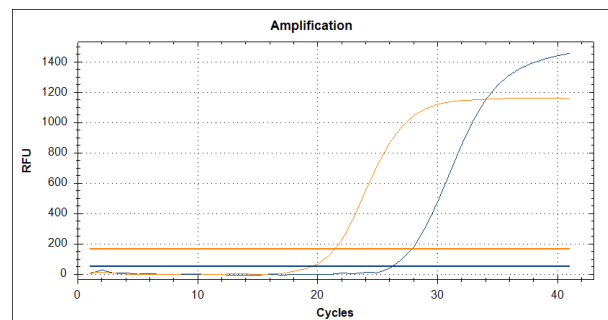
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



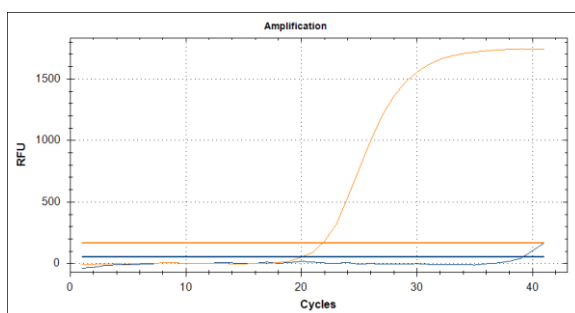
Controlo positivo para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



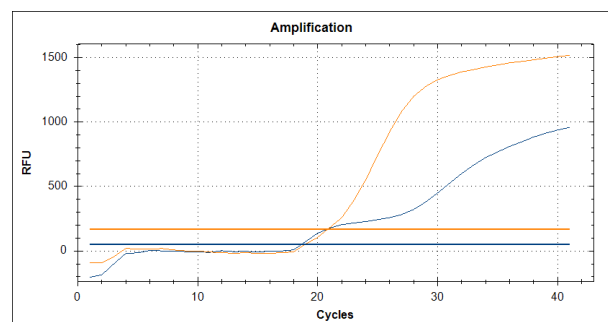
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).



Controlo positivo para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).

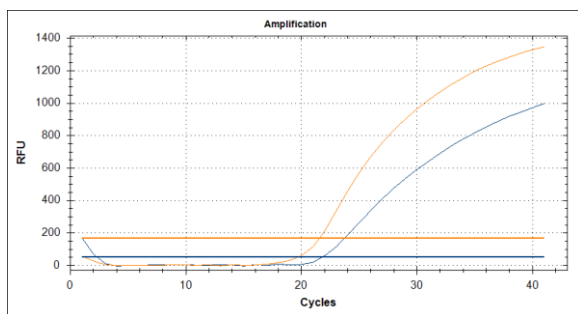


Curva de amplificação da amostra para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

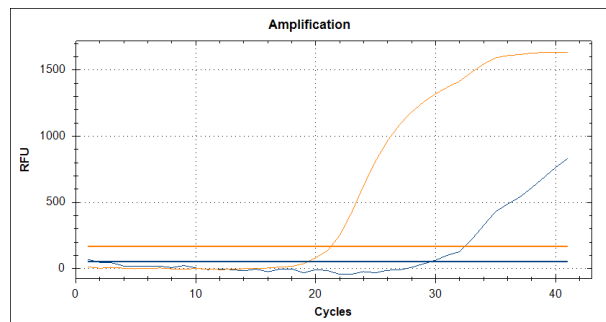


Controlo positivo para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

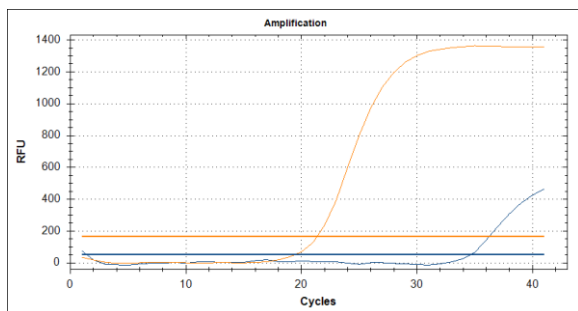
Amostra C1



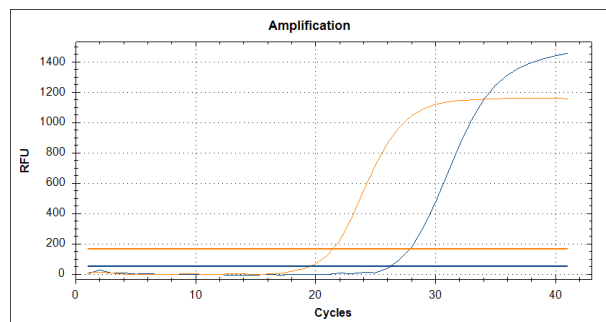
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



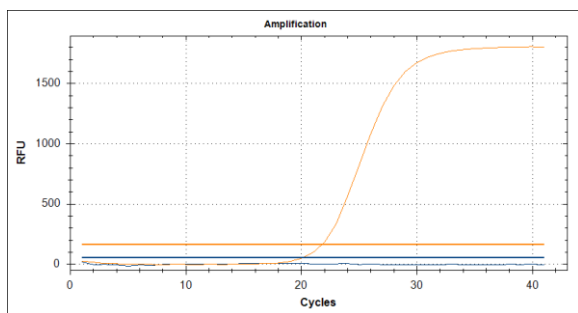
Controlo positivo para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



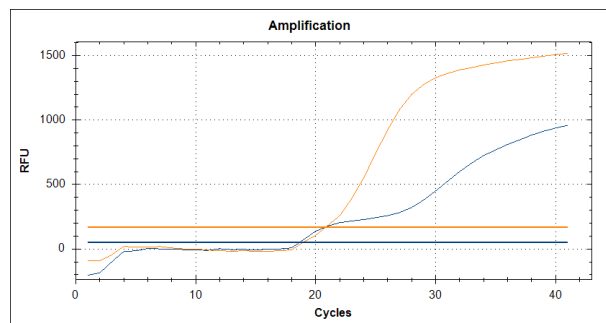
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).



Controlo positivo para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).

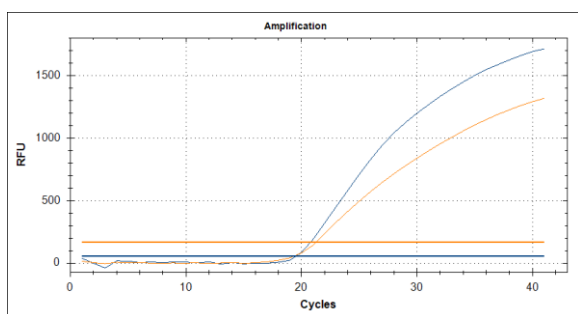


Curva de amplificação da amostra para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

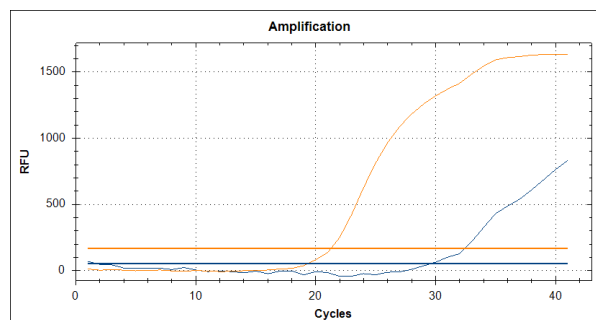


Controlo positivo para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

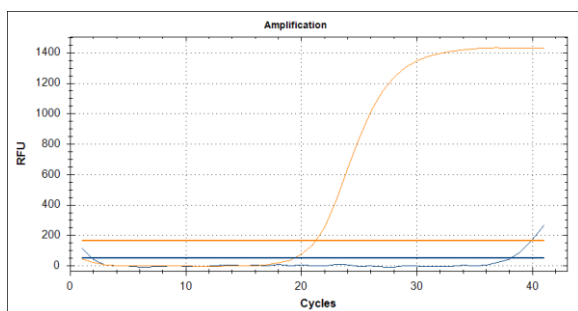
Amostra C2



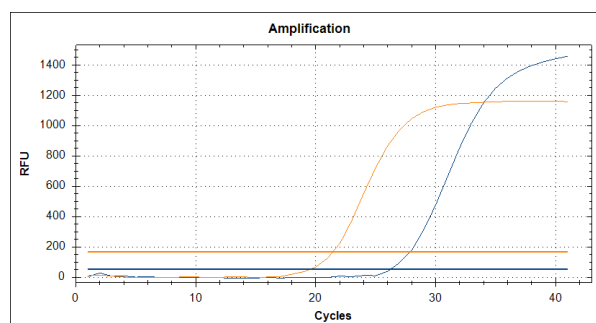
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



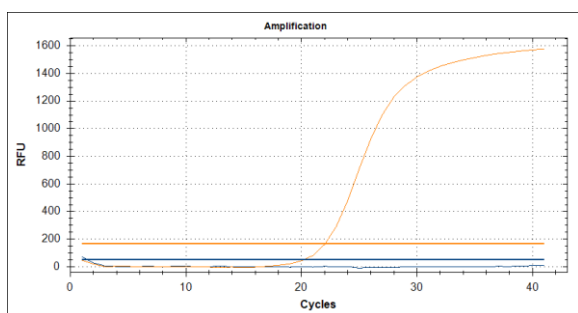
Controlo positivo para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



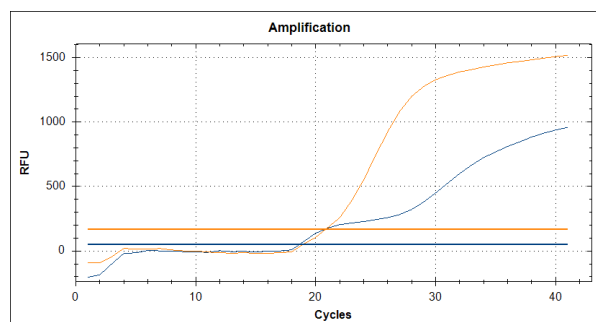
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).



Controlo positivo para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).

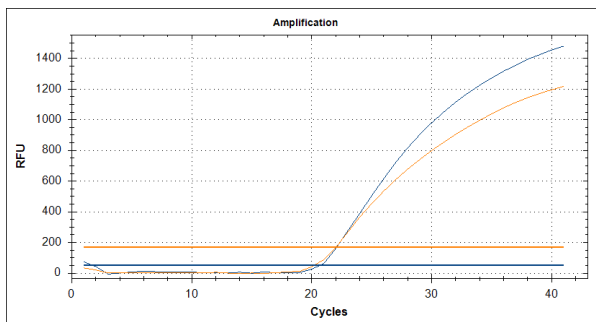


Curva de amplificação da amostra para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

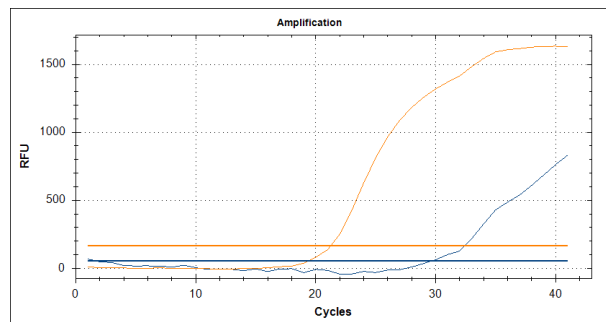


Controlo positivo para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

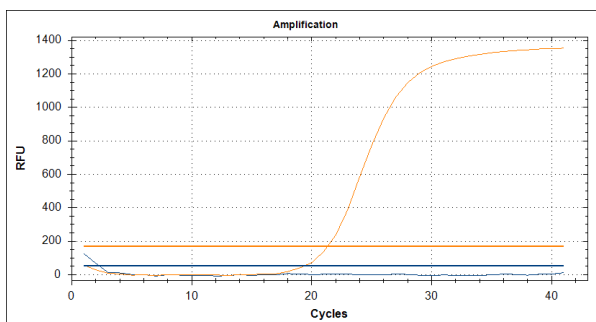
Amostra C3



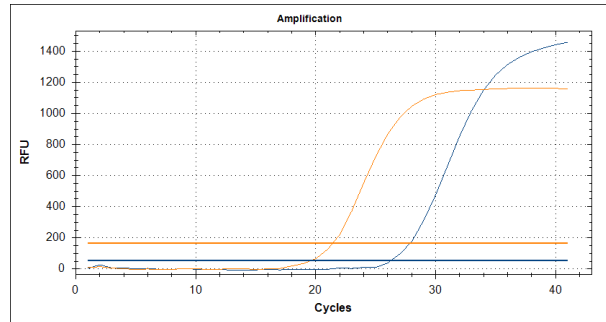
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



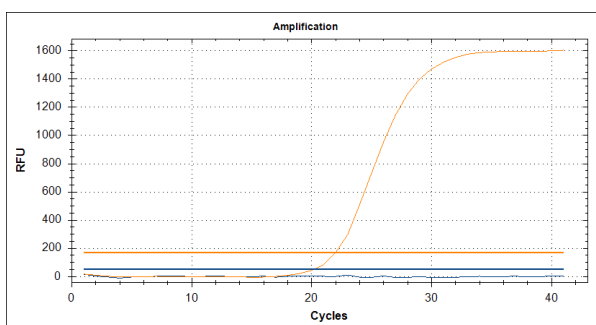
Controlo positivo para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



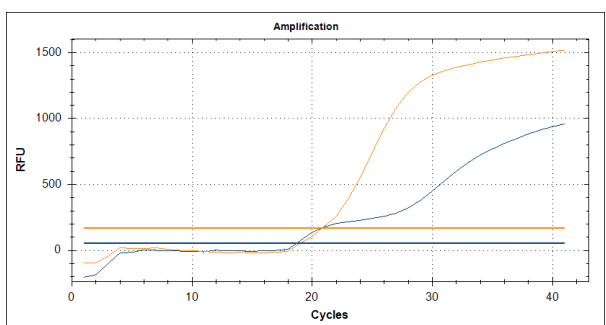
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).



Controlo positivo para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).

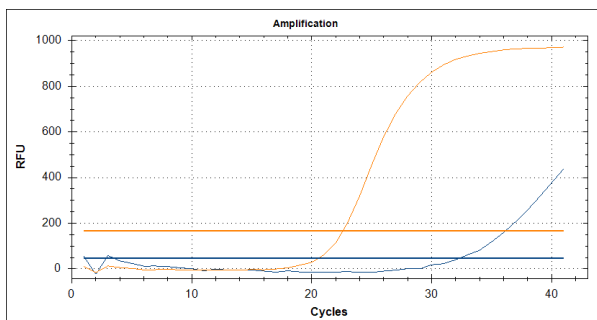


Curva de amplificação da amostra para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

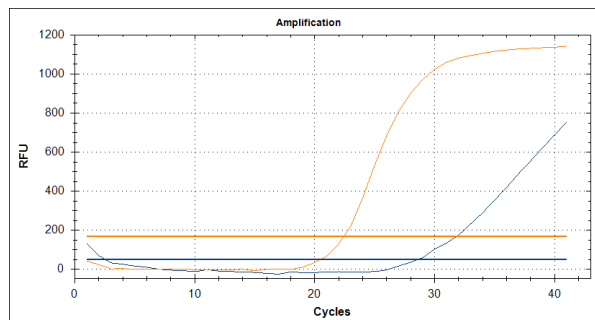


Controlo positivo para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

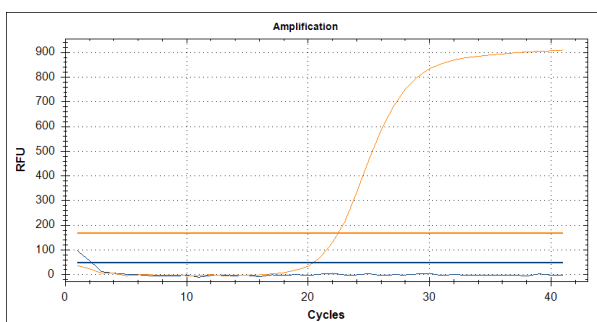
Amostra C4



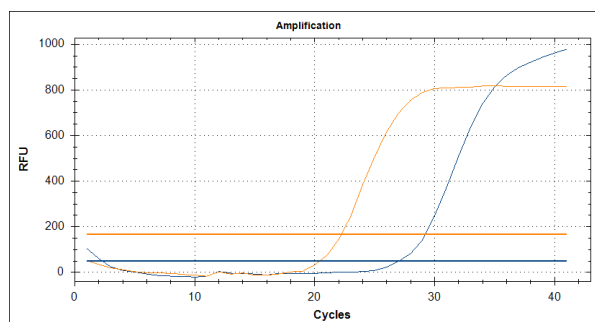
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



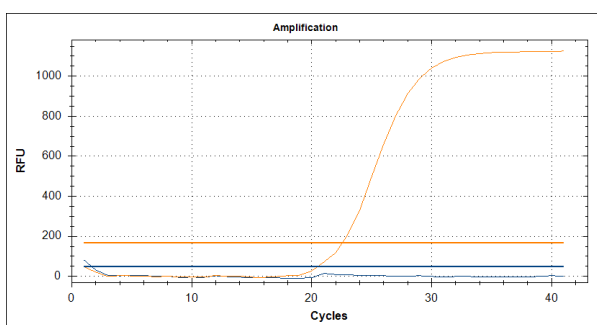
Controlo positivo para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



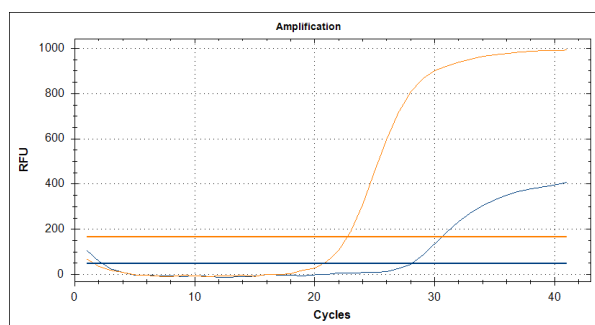
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).



Controlo positivo para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).

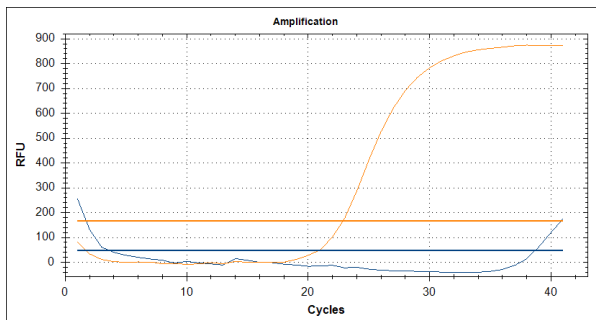


Curva de amplificação da amostra para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

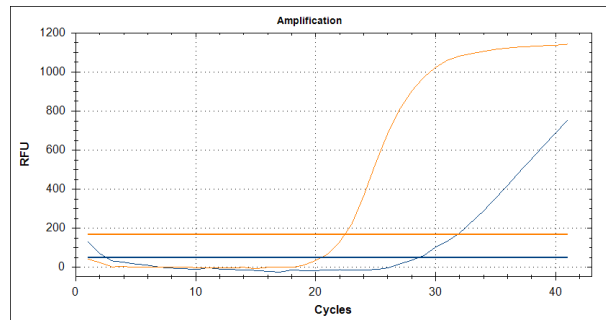


Controlo positivo para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

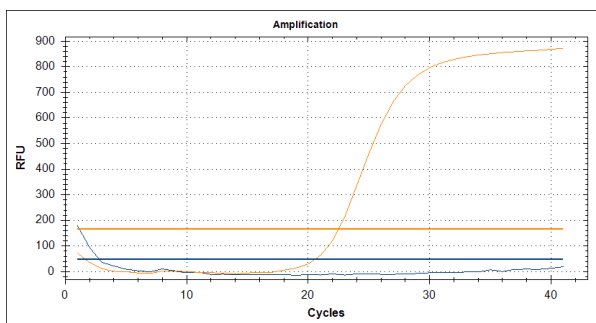
Amostra C5



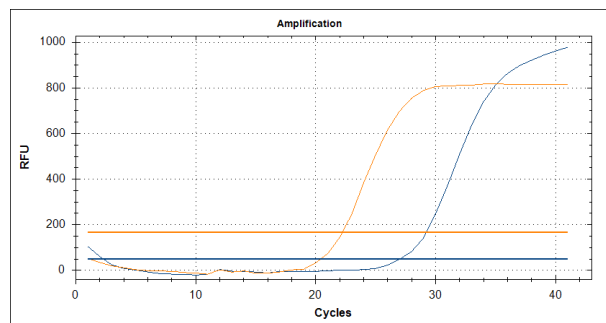
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



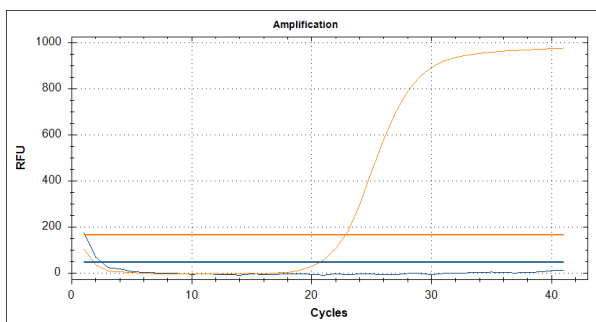
Controlo positivo para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



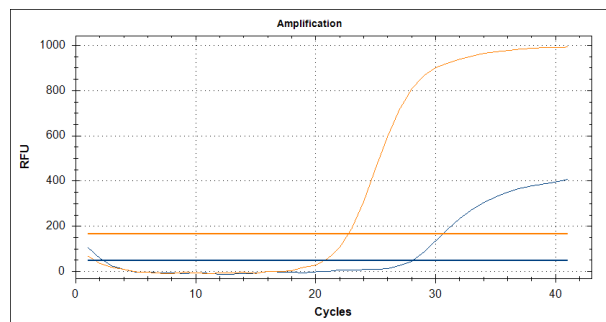
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).



Controlo positivo para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).

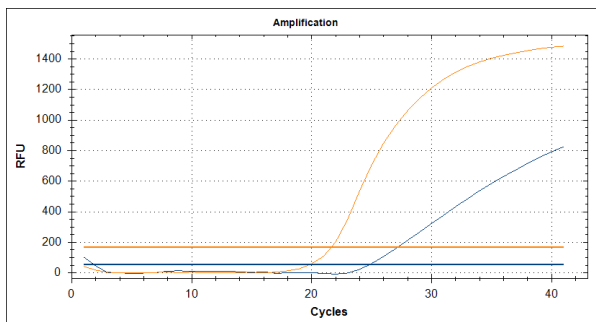


Curva de amplificação da amostra para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

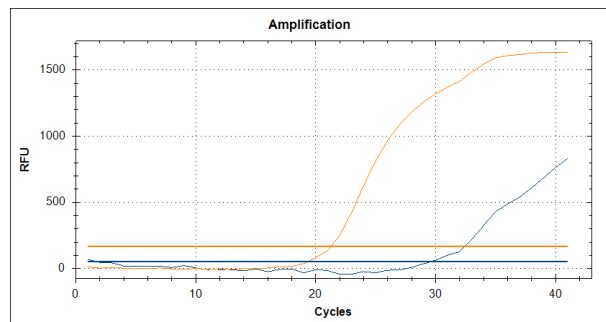


Controlo positivo para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

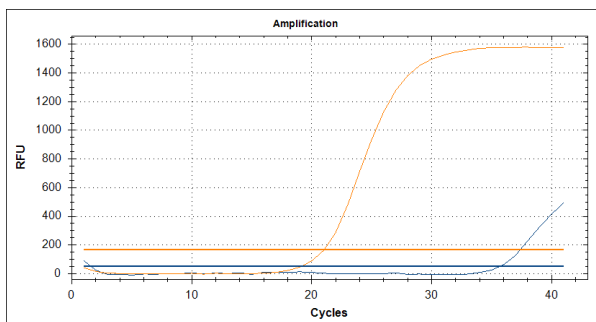
Amostra C6



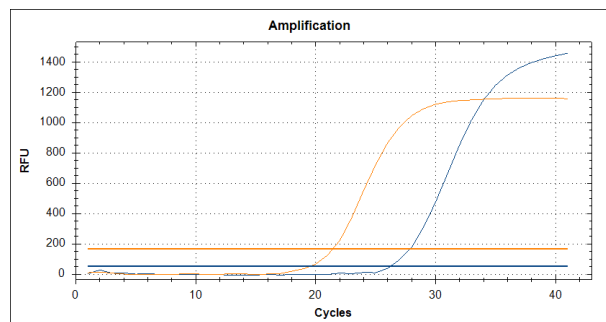
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



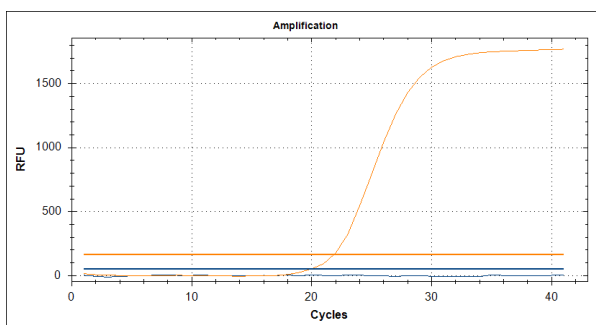
Controlo positivo para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



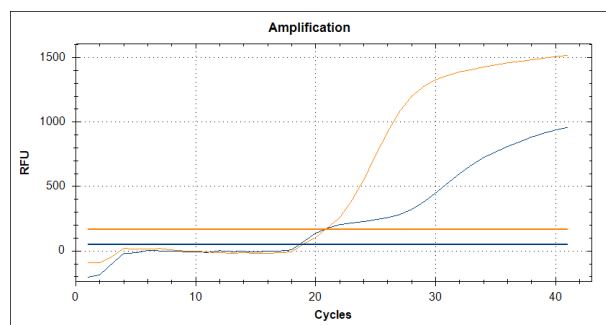
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).



Controlo positivo para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).

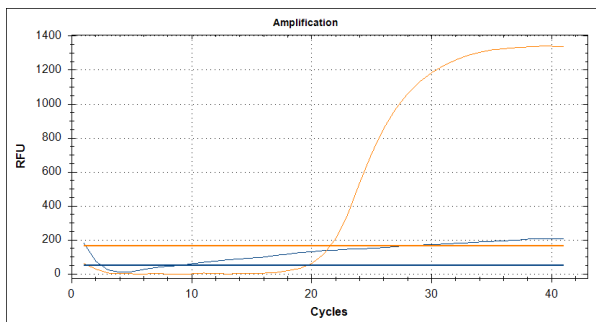


Curva de amplificação da amostra para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

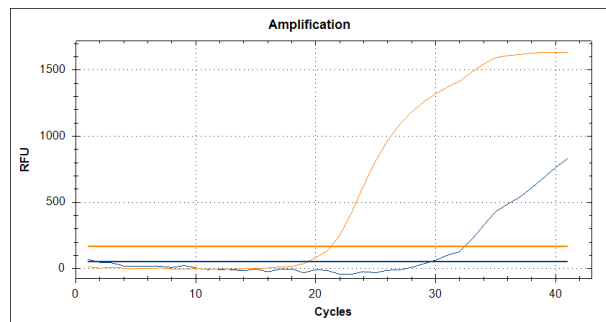


Controlo positivo para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

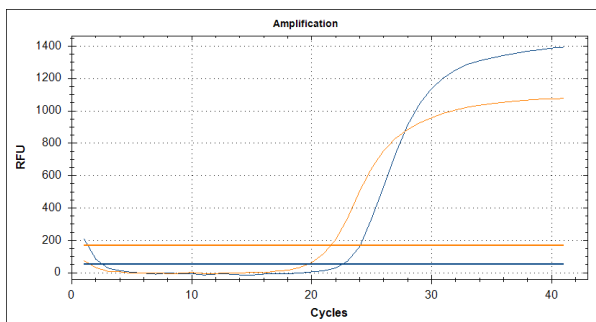
Amostra C7



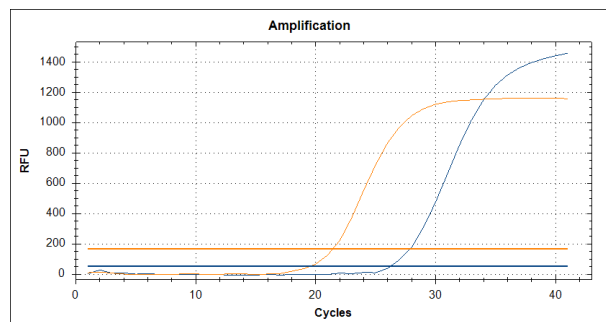
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



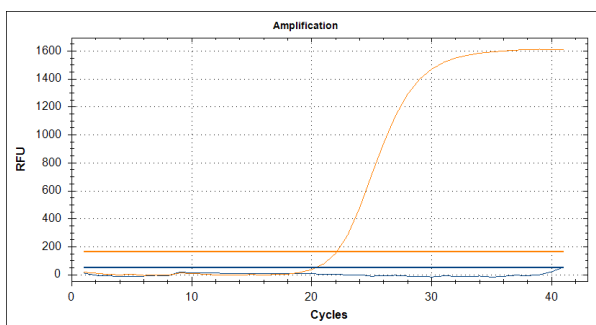
Controlo positivo para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



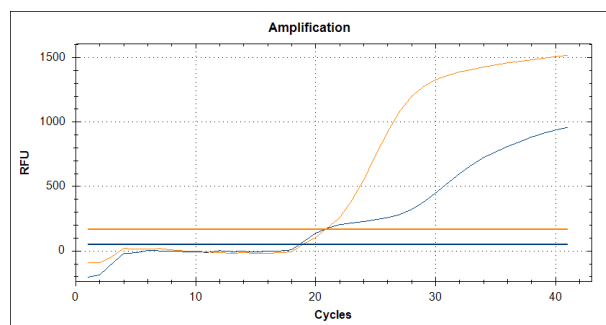
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).



Controlo positivo para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).

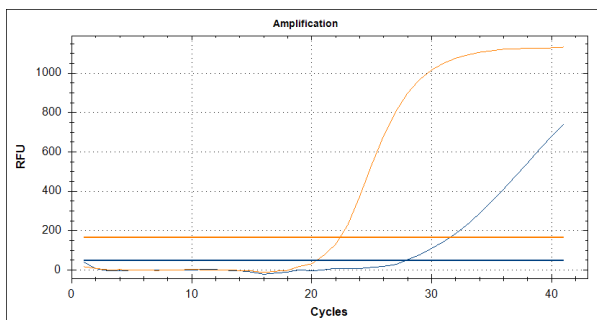


Curva de amplificação da amostra para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

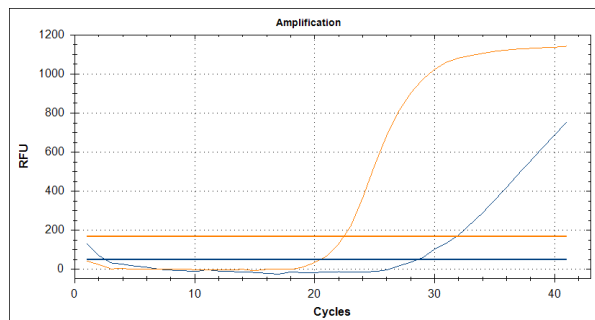


Controlo positivo para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

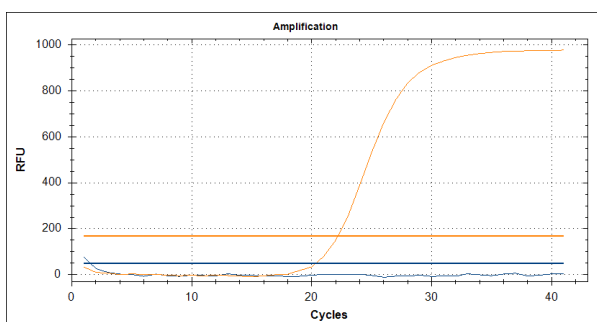
Amostra C8



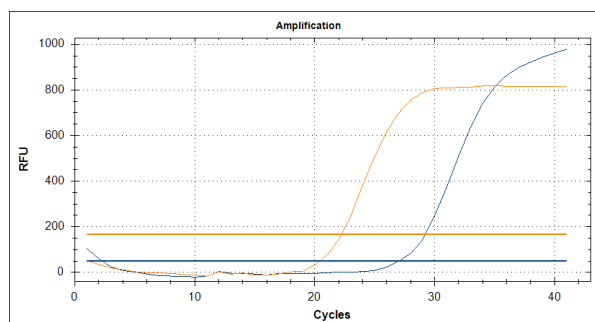
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



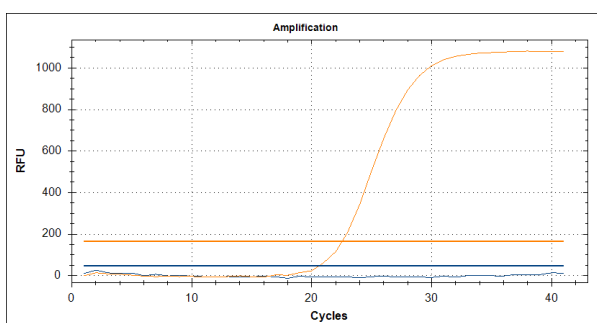
Controlo positivo para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



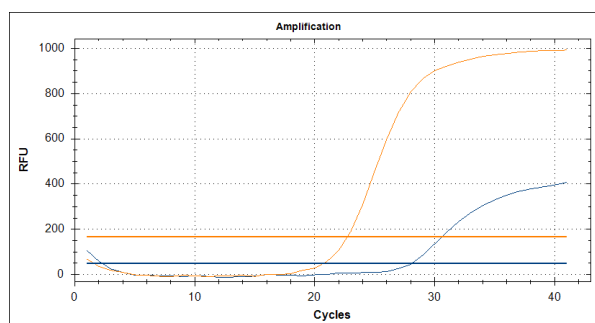
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).



Controlo positivo para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).

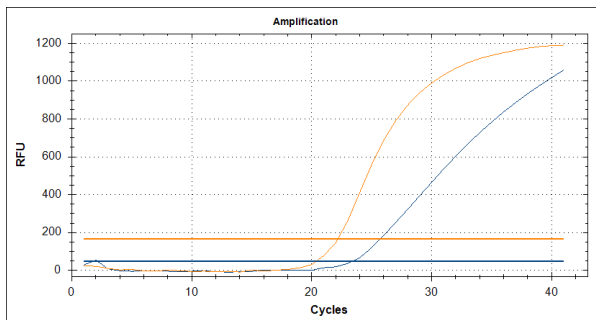


Curva de amplificação da amostra para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

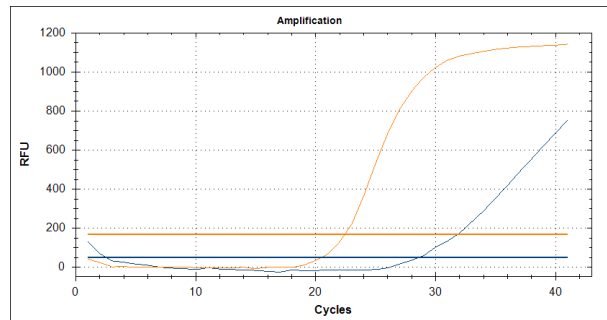


Controlo positivo para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

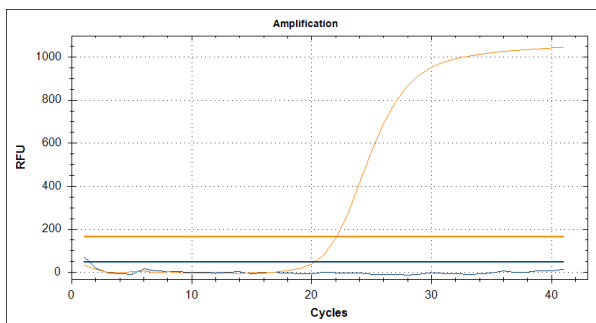
Amostra C9



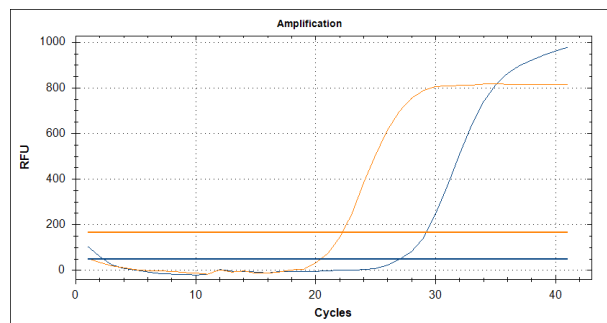
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



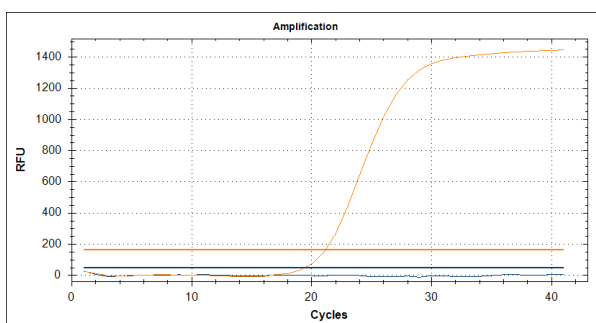
Controlo positivo para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



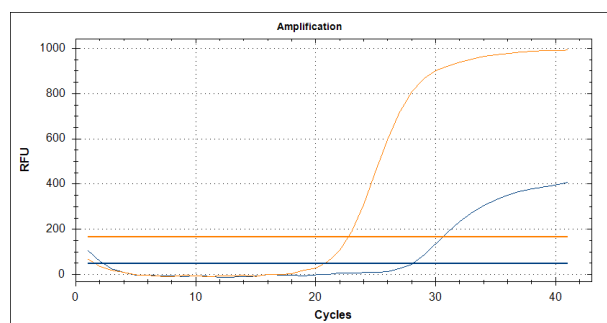
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).



Controlo positivo para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).

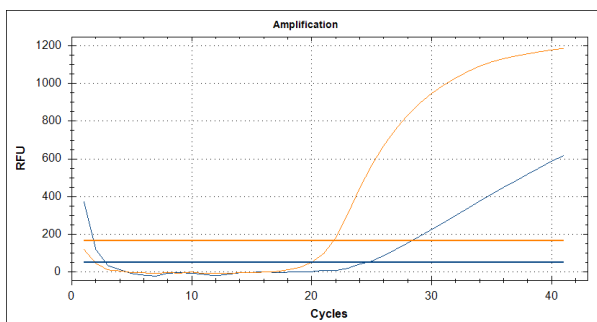


Curva de amplificação da amostra para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

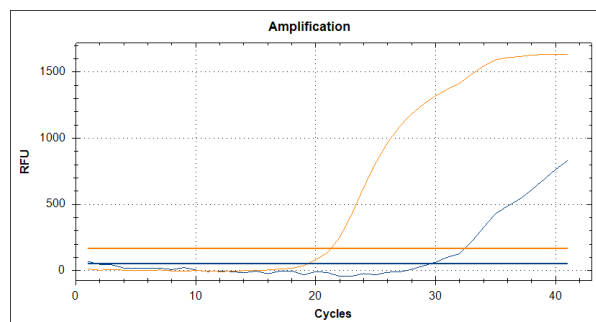


Controlo positivo para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

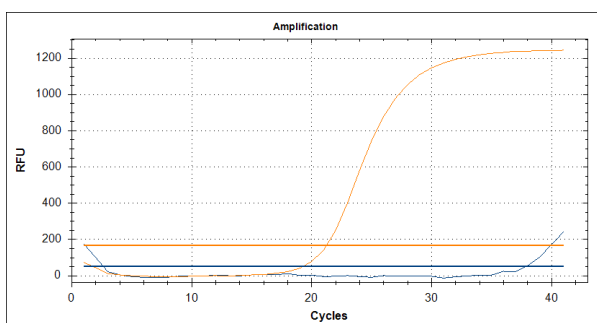
Amostra C10



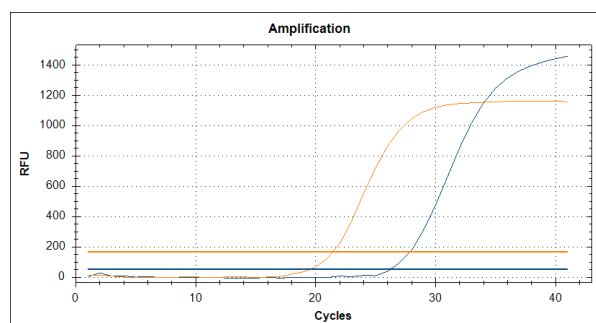
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



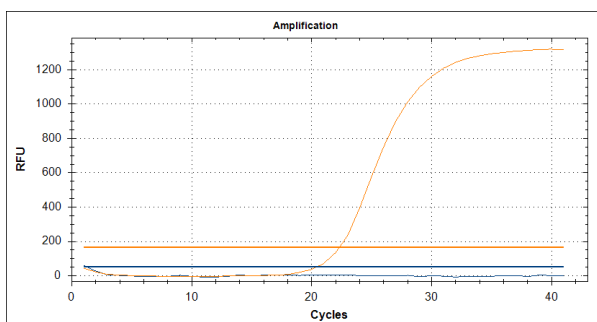
Controlo positivo para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



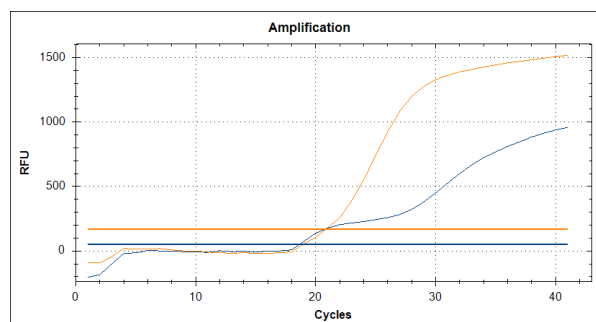
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).



Controlo positivo para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).

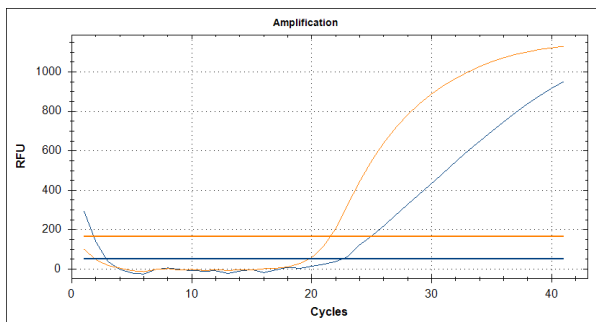


Curva de amplificação da amostra para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

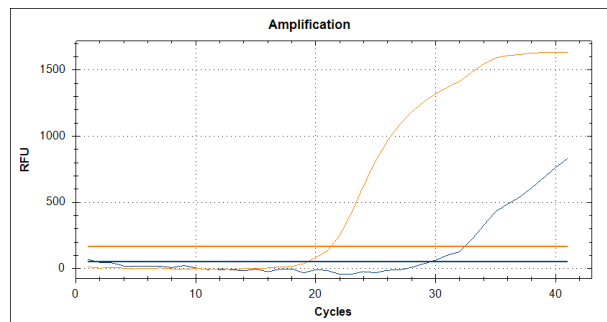


Controlo positivo para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

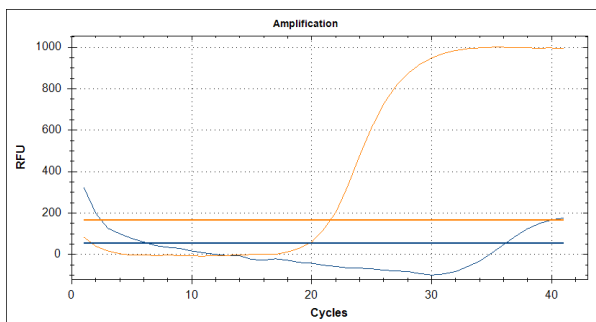
Amostra C11



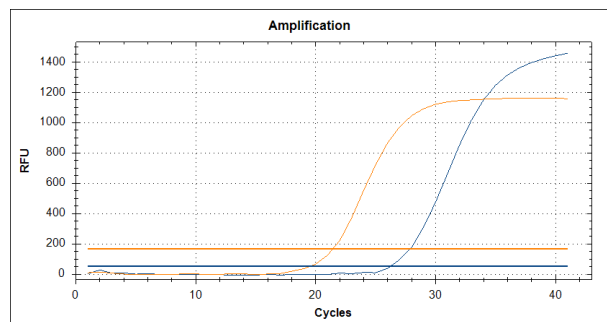
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



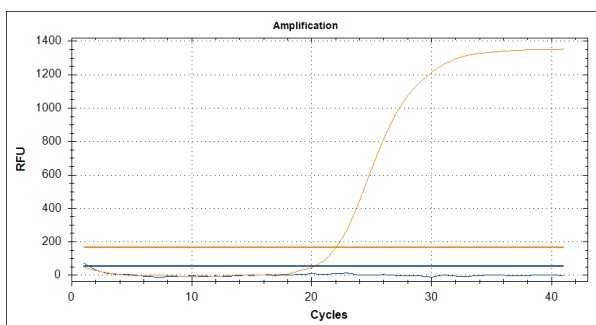
Controlo positivo para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



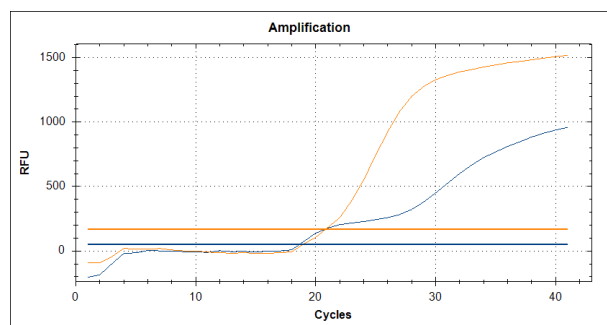
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).



Controlo positivo para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).

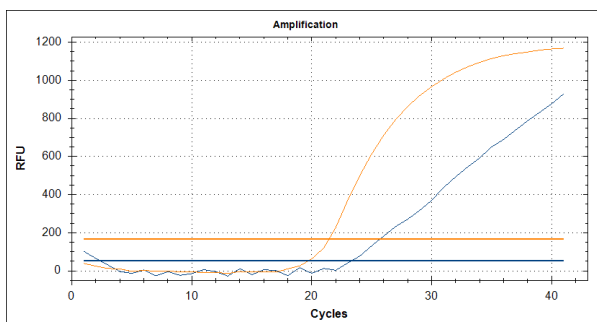


Curva de amplificação da amostra para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

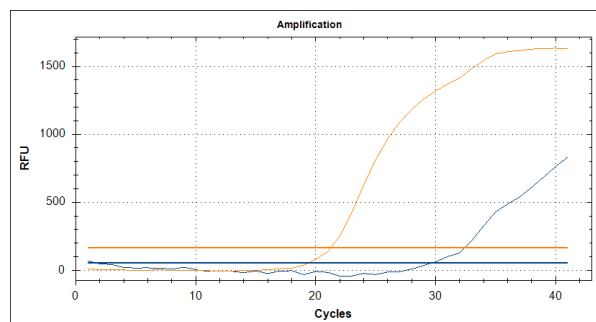


Controlo positivo para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).

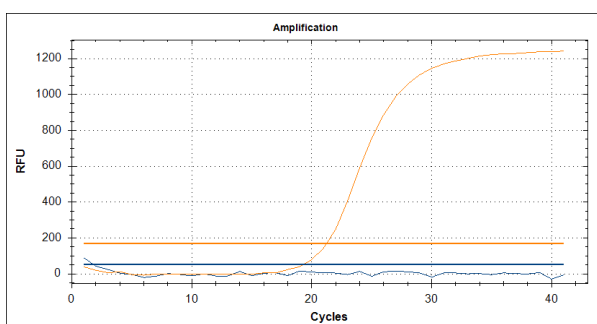
Amostra C12



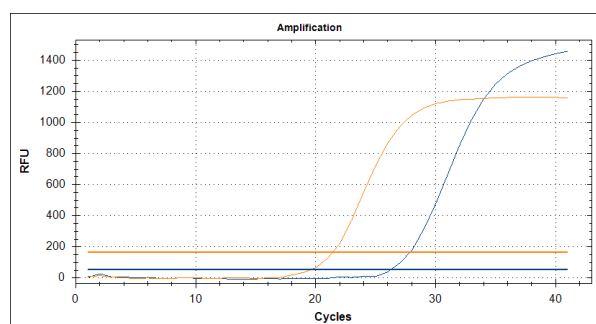
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



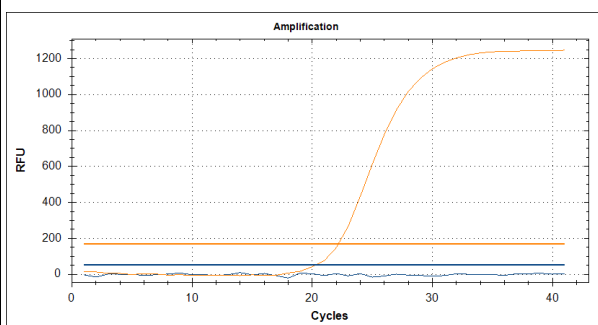
Controlo positivo para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*).



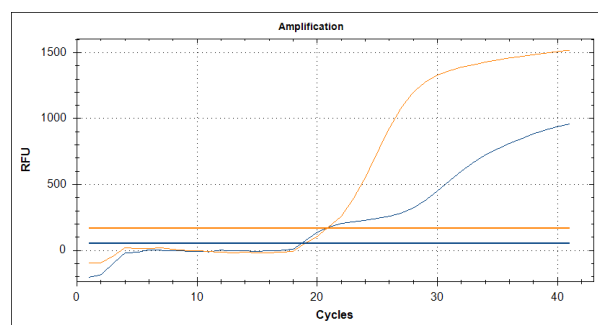
Curva de amplificação da amostra para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).



Controlo positivo para o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*).



Curva de amplificação da amostra para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).



Controlo positivo para o paloco do Pacífico (*Gadus chalcogrammus*).