

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**Validação do ensaio genético de determinação de espécies de pescado por  
DNA Barcode segundo ABNT NBR ISO/IEC 17025 e  
desenvolvimento de método para identificação molecular de espécies de  
Salmão e Trutas por minissequenciamento**

**Danilo Alves Pimenta Neto**

Belo Horizonte

2017

**Danilo Alves Pimenta Neto**

**Validação do ensaio genético de identificação de espécies de pescado por  
DNA Barcode segundo ABNT NBR ISO/IEC 17025 e  
desenvolvimento de método para identificação molecular de espécies de  
Salmão e Trutas por minissequenciamento**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Zootecnia.

Área de concentração: Genética e Melhoramento Animal

Prof<sup>a</sup>. Orientadora: Denise Aparecida Andrade de Oliveira

Belo Horizonte

2017

TESE defendida e aprovada em 20/02/2017 pela Comissão Examinadora composta pelos seguintes membros:

---

Dra. Denise Aparecida Andrade de Oliveira (Orientadora)

---

Dr. Eduardo Geraldo Alves Coelho

---

Dra. Livia Loiola dos Santos

---

Dra. Daniela Chemim de Melo

---

Dra. Ângela Maria Quintão Lana

*"É muito melhor arriscar coisas grandiosas, alcançar triunfos e glórias, mesmo expondo-se a derrota, do que formar fila com os pobres de espírito que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem nessa penumbra cinzenta que não conhece vitória nem derrota."*

*Theodore Roosevelt*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por guiar todos os meus passos nessa caminhada que acaba de ser concluída. Agradeço a minha mãe Maria de Lourdes, ao meu pai Agêo (*in memoriam*) e a minha irmã Edelweiss pela dedicação, carinho, atenção e exemplo sempre. Cada um de vocês tem uma parte muito importante em tudo o que faço! À minha noiva e futura esposa Lara, que me ajudou durante todo esse tempo com discussão de resultados, problemas e me ajudando a encontrar soluções para até quando a PCR não funciona de maneira nenhuma! Por estar sempre presente comigo em toda essa caminhada. A minha orientadora, Denise, pela oportunidade, confiança e todo o aprendizado recebido durante estes anos no Laboratório. À todos do Laboratório de Genética Animal da UFMG, Cláudia, Eduardo, Ângelo, Ronaldo, Sandra, Lívia, Glauber, Danielle, Bruna, Diana, Emellyn e Marcelo, pelo incentivo, ensinamentos e boas risadas. Ao INCT Pecuária, CAPES, Fapemig, Cnpq e FEP pelos auxílios financeiros. À todos os professores com quem tive aulas ou que me ajudaram com conselhos e dicas. Aos amigos pela ajuda, companheirismo e por me aguentarem falando sobre peixes por esse tempo todo. Muito obrigado a cada um de vocês!

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	13
2.1 Mercado do pescado .....	13
2.2 Genoma mitocondrial .....	14
2.3 Identificação de espécie .....	16
2.4 Adulteração por substituição de espécie .....	20
2.5 Validação de métodos analíticos .....	21
2.5.1 Processo de Validação.....	22
2.6 Parâmetros de Validação .....	23
2.6.1 Seletividade .....	24
2.6.2 Limite de Detecção .....	25
OBJETIVOS .....	34
<b>I. CAPÍTULO 1 - DNA barcoding reveals a high level of mislabeling in seafood products marketed in southeastern Brazil</b>	
Abstract .....	35
1. Introduction .....	36
2. Materials and methods .....	36
3. Results and discussion .....	38
References .....	39
	46
<b>II. CAPÍTULO 2 - Otimização e Validação do ensaio genético qualitativo de identificação de espécies de pescado por DNA Barcode para fins de acreditação segundo os requisitos ABNT NBR ISO/IEC 17025</b>	
1. INTRODUÇÃO .....	50
2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	53
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	55
4. CONCLUSÃO .....	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	63

### **III. CAPÍTULO 3 - Desenvolvimento e demonstração de eficácia de método para identificação molecular de espécies de Salmão e Trutas**

1. INTRODUÇÃO .....	67
2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	69
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	72
4. CONCLUSÃO .....	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	82
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	86

#### **LISTA DE TABELAS**

##### **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

Tabela 1: Produção aquícola brasileira 2013 - 2015 .....	14
--	----

##### **CAPÍTULO 2**

Tabela 1: Relação das concentrações do DNA com a qualidade (QV) do sequenciamento (n=35) .....	56
--	----

Tabela 2: Teste preliminar para identificação do Limite de Detecção do ensaio com as concentrações de 25, 50 e 100 ng/ $\mu$ L de DNA.....	57
--	----

Tabela 3: Teste final para identificação do Limite de Detecção do ensaio com as concentrações de 30 e 40 ng/ $\mu$ L de DNA.....	58
--	----

Tabela 4: Teste para avaliação da Seletividade do ensaio com misturas de DNA de outra espécie em quatro proporções.....	59
---	----

Tabela 5: Análise de 12 amostras para a identificação da Precisão do ensaio.....	61
--	----

##### **CAPÍTULO 3**

Tabela 1: Padronização das quantidades dos reagentes para o método de identificação molecular de Salmão e Truta por minissequenciamento.....	74
--	----

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1: Representação do DNA mitocondrial com os 13 genes codificantes de proteínas da cadeia respiratória, 22 tRNAs, 2 rRNAs e a região controle....	15
Figura 2: Exemplificação do dNTP com o grupo hidroxila (OH) e o ddNTP com ausência do grupo OH .....	17
Figura 3: Exemplificação da ligação fosfodiéster.....	18
Figura 4: Desenho esquemático do <i>workflow</i> do minissequenciamento utilizando o Kit SNaPshot® (adaptado de <a href="https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_042107.pdf">https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_042107.pdf</a> ) .....	19
Figura 5: Parâmetros de validação conforme o tipo de ensaio segundo o DOQ-CGCRE-008 do INMETRO. (*) Parâmetro facultativo. ....	24

### CAPÍTULO 2

Figura 1: A validação e a inter-relação entre acreditação e qualidade. Adaptado de VALENTINI et al. (2013).....	51
---	----

### CAPÍTULO 3

Figura 1: Minissequenciamento utilizando o <i>Primer</i> SnapS_5 das amostras de <i>S. salar</i> , <i>O. gorbuscha</i> , <i>O. keta</i> e <i>O. mykiss</i> , demonstrando diferencia os gêneros <i>Salmo</i> e <i>Oncorhynchus</i> l .....	75
Figura 2: Minissequenciamento utilizando o <i>Primer</i> SnapS_4 das amostras de <i>O. gorbuscha</i> , <i>O. keta</i> e <i>O. mykiss</i> , demonstrando diferencia entre <i>O. keta</i> e <i>O. mykiss</i> / <i>O. gorbuscha</i> .....	76
Figura 3: Minissequenciamento utilizando o <i>Primer</i> SnapS_3 das amostras de <i>S. salar</i> e <i>O. mykiss</i> , demonstrando diferencia entre essas espécies .....	78
Figura 4: Minissequenciamento utilizando em conjunto os <i>Primers</i> SnapS_4 e SnapS_3 para a diferenciação das espécies <i>O. mykiss</i> e <i>O. gorbuscha</i> .....	79



## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>Sigla</b>	<b>Nome</b>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
ATP	Adenosina trifosfato
CGCRE	Coordenação Geral de Acreditação do Inmetro
COI	Citocromo Oxidase I
CYTB	Citocromo b
D-LOOP	Região Controle
ddNTP	Dideoxynucleotídeo trifostato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleotídeo trifosfato
EC	<i>European Commission</i>
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ILAC	International Laboratory Accreditation Cooperation
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
ISO	<i>International Standards Organization</i>
IT	Instrução de Trabalho
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LD	Limite de detecção
MAPA	Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento
ng	Nanograma
OMC	Organização Mundial do Comércio
OMS	Organização Mundial da Saúde
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
QV	<i>Quality value</i>
RCF	Força Centrífuga Relativa
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	RNA ribossomal
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>
tRNA	RNA transportador
µL	Microlitro

## RESUMO

O presente estudo descreve a otimização e padronização do método de identificação de espécies de peixes por DNA Barcode bem como a sua validação segundo os requisitos da ABNT NBR ISO/IEC 1705 para acreditação junto ao INMETRO e posteriormente credenciamento junto ao MAPA com o objetivo de prestar o serviço de identificação, podendo auxiliar os empresários na escolha de seus fornecedores e controle de qualidade de seus produtos, bem como os consumidores a terem maior confiança no que estão consumindo. Pode ainda, auxiliar o governo nos testes de fiscalização de produtos para evitar a fraude, além de regular com maior eficácia produtos exportados e importados. Propõe também um novo método para identificação molecular de trutas e salmão em nível de gênero e/ou de espécies. Esse método é baseado na amplificação seguida de minissequenciamento de parte da região D-loop (Região controle) do DNA mitocondrial dos peixes. Por meio desse método, é possível identificar os dois gêneros e as quatro espécies de salmão e truta mais prevalentes, *Salmo salar*, *Oncorhynchus keta*, *O. gorbuscha* e *O. mykiss*.

## ABSTRACT

The present study describes the optimization and standardization of the method of identification of fish species by DNA Barcode as well as its validation according to the requirements of ABNT NBR ISO / IEC 1705 for accreditation with INMETRO and later accreditation with the MAPA with the objective of providing the identification service, which can help entrepreneurs choose their suppliers and quality control of their products, as well as consumers to have greater confidence in what they are consuming. It can also assist the government in testing products to prevent fraud, as well as regulate products exported and imported more effectively. It also proposes a new method for molecular identification of trout and salmon at the level of genus and / or species. This method is based on amplification followed by minisequencing of part of the D-loop region of the mitochondrial DNA of the fish. By means of this method, it is possible to identify the two genera and the four most prevalent salmon and trout species, *Salmo salar*, *Oncorhynchus keta*, *O. gorbuscha* and *O. mykiss*.

## 1. INTRODUÇÃO

A ocorrência de substituições em pescado foi relatada em diversos países e é importante ressaltar que a autenticação de pescado é dificultada pela ausência de caracteres morfológicos identificadores em alimentos processados e/ou filetados. Além disso, técnicas de identificação baseadas em proteínas ou lipídeos são laboriosas, exigem mão-de-obra especializada e não podem ser aplicadas sobre produtos processados termicamente ou quimicamente.

O sistema moderno de taxonomia molecular foi apresentado por Tautz *et al.* (2003), baseado no uso do DNA como ferramenta para a identificação taxonômica nos diversos grupos de organismos, sendo hoje aceita mundialmente. Neste contexto, as análises moleculares por DNA, vêm ganhando destaque entre as metodologias utilizadas, devido à necessidade de pequenas quantidades amostrais (fragmentos de tecido animal) e por permitirem a identificação do produto em circunstâncias diversas, como: produtos congelados, salgados ou processados por de aquecimento ou cozimento.

Para proteger seus mercados, os países criam as barreiras não tarifárias, especialmente as chamadas barreiras técnicas. Tais barreiras surgem da aplicação de normas técnicas, regulamentos, procedimentos de avaliação da conformidade e pela não aceitação ou não existência de acordos de reconhecimento.

Uma das formas mais efetivas da remoção de barreiras de comércio internacional são os acordos de reconhecimento mútuo, firmados entre órgãos de credenciamento de laboratórios. Esses acordos eliminam a necessidade de se fazer novamente o ensaio do materiais e produto nos países importadores, problema identificado pela Organização Mundial do Comércio (OMC) como umas das maiores barreiras técnicas ao comércio.

Um acordo de reconhecimento mútuo foi assinado pelos órgãos de acreditação ao redor do mundo que fazem parte da *International Laboratory Accreditation Cooperation* (ILAC). O objetivo deste acordo é criar uma estrutura internacional para apoiar o comércio internacional por meio da remoção de barreiras técnicas. O acordo entrou em vigor em 31 de janeiro de 2001, passando seus signatários a reconhecer a equivalência dos seus sistemas de acreditação de laboratórios e se comprometendo a promover o acordo e a aceitação dos certificados de

calibração e relatórios de ensaio emitidos pelos laboratórios acreditados por seus parceiros internacionais (INMETRO, 2010).

A acreditação possui caráter voluntário e representa o reconhecimento formal da competência de um laboratório ou organização para desenvolver tarefas específicas, segundo requisitos pré-estabelecidos. A atestação é realizada por terceira parte, relativa a um órgão de avaliação da conformidade, demonstrando formalmente sua competência para realizar tarefas específicas de avaliação da conformidade. Para laboratórios, a acreditação é concedida com base na norma ABNT NBR ISO/IEC 17025 – Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração – de acordo com diretrizes estabelecidas pela *International Laboratory Accreditation Cooperation* (ILAC).

De acordo com a ABNT NBR ISO/IEC 17025, o laboratório deve utilizar métodos e procedimentos apropriados para os ensaios de seu escopo e, quando necessário, aplicar uma estimativa da incerteza de medição, bem como técnicas estatísticas para análise dos dados. A introdução de métodos de ensaio desenvolvidos pelos laboratórios para uso próprio deve ser uma atividade planejada, com pessoal qualificado e equipado com os recursos adequados. Quando necessário o emprego de métodos não abrangidos por métodos normalizados, estes devem ser devidamente validados antes de serem utilizados (ABNT, 2005b).

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Mercado do pescado**

Com a captura de peixes em situação relativamente estável desde o final dos anos 80, a aquicultura vem mostrando cada vez mais sua importância no mercado do pescado. Em 2015, ela compreendeu 44% de toda a produção de peixes, com 77,3 milhões de toneladas em todo o mundo (FAO, 2016).

Na América do Sul, considerando-se o total de peixes consumidos, 57% se refere à produção interna, sendo o restante importado, com a maior parcela proveniente da Ásia (26%), seguida pela Europa (11%) (FAO, 2016).

A aquicultura brasileira continua em crescimento, com todos os 27 Estados apresentando dados sobre essa atividade e sua produção gerando, em 2015, mais de R\$ 4,39 bilhões, sendo

quase 70% (R\$ 3,64 bilhões) proveniente da criação de peixes (IBGE 2015). Em 2013, o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) começou a computar os dados da aquicultura em suas estatísticas, incluindo a produção de peixes, bem como de camarões, alevinos, larvas e pós-larvas de camarões, ostras, vieiras e mexilhões. Segundo dados do IBGE (2013; 2014; 2015) de 2013 para 2015 a produção de peixes teve um crescimento de 18,8% (Tabela 1). Em 2013 eram 392 mil toneladas e em 2015 passou para 483 mil toneladas sendo que o peixe mais produzido no Brasil é a tilápia, com 219,33 mil toneladas.

Tabela 1: Produção aquícola brasileira 2013-2015 (IBGE2013; 2014; 2015)

<b>Ano</b>	<b>Quantidade produzida (Ton)</b>	<b>Valor da produção (R\$ 1.000)</b>
<b>2013</b>	392.492.531	2.020.922
<b>2014</b>	474.329.095	2.714.556
<b>2015</b>	483.241.273	3.064.693

Dados da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), (FAO, 2013; 2014; 2016) mostram que, com o crescimento da população, o consumo de proteína animal, principalmente do pescado, vem aumentando também. No Brasil, o pescado é em sua maioria comercializado inteiro, fresco ou refrigerado/congelado, e uma pequena parcela é processada ou filetada.

Na América do Sul, o consumo de quilos de pescado por habitante ao ano é menor do que o recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), que é de 12 quilos. No Brasil, o consumo chega a 14,5 quilos por habitante/ano, de acordo com o levantamento realizado em 2013 (FAO, 2014; 2016).

## **2.2 Genoma mitocondrial**

As mitocôndrias são organelas citoplasmáticas cuja função primária é a conversão de substâncias orgânicas em energia, além da respiração celular. Ambos os processos acoplam a transferência de elétrons à produção de ATP (Adenosina trifosfato), utilizando a força próton-motora que ocorre através de suas membranas (Allen, 2003).

As mitocôndrias possuem seu próprio DNA e RNA, bem como seus componentes para



As sequências do genoma mitocondrial é muito parecida entre indivíduos da mesma espécie, mas difere em grupos de espécies distintas (Boore, 1999). O DNA mitocondrial é utilizado em análises intraespecíficas de estruturação populacional, distribuição demográfica, e estudos evolutivos mais profundos (Avise, 1994).

Atualmente, na era do sequenciamento de nova geração, as análises de genomas mitocondriais têm sido utilizadas também para estudos de relações filogenéticas entre as espécies (Fabre et al., 2013; Wang et al., 2013). Algumas espécies são tão parecidas que somente análises mais robustas, conseguem diferenciá-las. Tal abordagem foi utilizada para esclarecer a filogenia de alguns artrópodes e equinodermos, em que foi necessário relacionar tamanho, estruturas e arranjos de genes (Boore, 1999, 2006).

Ausência de recombinação, herança materna, taxas de substituição nucleotídica aceleradas em relação ao DNA nuclear, tamanho compacto e organização conservada em vertebrados são alguns dos motivos que fizeram o DNA mitocondrial ser amplamente utilizado para identificação de espécies. (Avise, 1994, Curole & Kocher, 1999).

### **2.3 Identificação de espécies**

A crescente utilização de marcadores genéticos tem possibilitado melhores estudos e compreensão da diversidade genética, fazendo com que sua aplicação na identificação de espécies seja acessível e fundamental. Existem diversos tipos de técnicas e marcadores genéticos, e deve-se fazer a escolha de acordo com os objetivos estabelecidos previamente.

A identificação genética de espécies baseia-se no isolamento e análise de marcadores de DNA que mostram variações entre as espécies.

Em animais, os marcadores mais utilizados para identificação de espécies são regiões de genes dentro do DNA mitocondrial. O genoma mitocondrial, em comparação com o genoma nuclear, é relativamente pequeno. Além disso, têm-se diferentes números de cópias entre esses genomas. Em uma célula há apenas um núcleo, e de 100 a 1000 mitocôndrias, tendo assim mais cópias do DNA mitocondrial, o que facilita sua obtenção (Karlsson e Holmlund, 2007).



### 2.3.1 DNA Barcode

A técnica de sequenciamento de DNA passou por modificações para ser automatizada, método de Sanger (Sanger et al., 1977). O princípio do sequenciamento consiste na incorporação de ddNTPs (dideoxynucleotídeo trifostato) marcados com fluorescência durante uma reação de amplificação, de forma que o sequenciador automático consiga captá-las com uma câmera.

O ddNTP não apresenta o grupo hidroxila na posição 3 da pentose, diferente do dNTP (desoxynucleotídeo trifostato) (Figura 2).

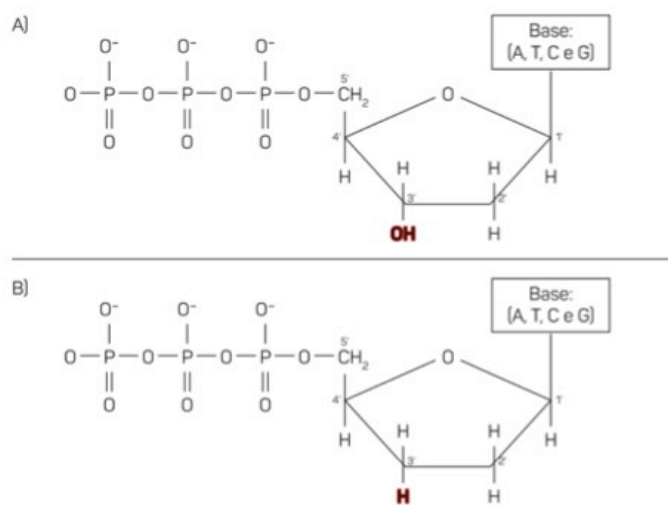


Figura 2: Exemplificação do dNTP com o grupo hidroxila (OH) e o ddNTP com ausência do grupo OH

Com a adição do ddNTP, o processo de extensão do DNA é interrompido, pois a incorporação de outros nucleotídeos depende do grupo hidroxila (Figura 3). O grupo hidroxila do carbono-3 da pentose do primeiro nucleotídeo se une ao grupo fosfato ligado à hidroxila do carbono-5 da pentose do segundo nucleotídeo através da ligação fosfodiéster. Desta forma, os nucleotídeos se unem, constituindo uma fita de ácido desoxirribonucleico. Em contra partida quando o grupo OH está ausente essa ligação não acontece.

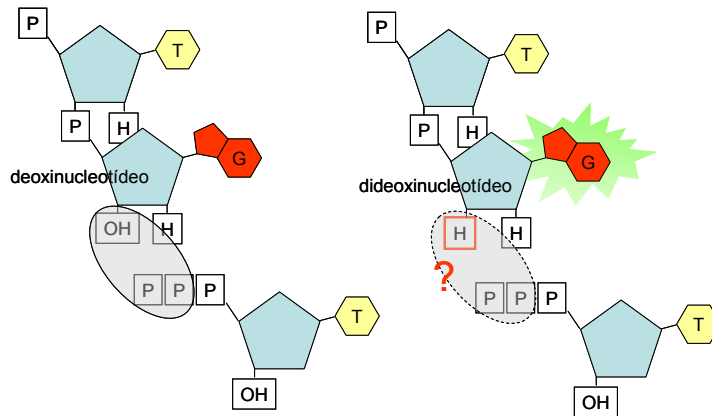


Figura 3: Exemplificação da ligação fosfodiéster

Ao final de todos os ciclos da PCR (Reação em cadeia da polimerase), vários fragmentos de tamanhos distintos são gerados e, então, é realizada a eletroforese capilar, onde os fragmentos de menor tamanho migram mais rapidamente em relação aos maiores, permitindo, assim, uma leitura da sequência deste DNA.

Aplicações desta técnica incluem o rastreamento de populações de espécies invasoras (Corin et al., 2007), investigações forenses de animais selvagens (Dawnay et al., 2007; Nelson et al., 2007), estudos de ecologia de comunidades crípticas (Corin et al., 2007; Pfenninger et al., 2007) e identificação de conteúdo estomacal de animais (Pons 2006), entre outros. Os marcadores mais utilizados para animais são o Citocromo b (Cytb) (Dooley et al., 2004; Bottero e Dalmaso, 2010; Barakat et al., 2014; Orji et al., 2015; Munira et al., 2016;), a Região Controle (D-loop) (Yang e Speller, 2006; Prioli et al., 2012; Karabasanavar et al., 2014; Yang et al., 2014; Nikolic et al., 2016) e o Citocromo Oxidase I (COI) (Hebert et al., 2003, Carvalho et al., 2011; Carvalho et al., 2015).

Visando padronizar um marcador universal para identificação de espécies, foi desenvolvido, no ano de 2003, o chamado *DNA Barcode*. Para isso, foi utilizado um fragmento de aproximadamente 650 pares de bases (pb) do gene citocromo oxidase I (Hebert et al., 2003). Como discutido por Hogg e Hebert (2004) e Ward et al. (2005), para o gene COI, a taxa de evolução molecular permite distinguir tanto espécies relacionadas como grupos filogeográficos dentro da mesma espécie.

### 2.3.2 Minisequenciamento

No DNA, existem muitos marcadores repetitivos, microssatélites e minissatélites, e também mutações em base única, os chamados SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*), que representam ferramentas úteis para estudos de evolução e identificação de espécies (Onofri et al., 2006).

Uma técnica recentemente apresentada na literatura para se realizar a caracterização de SNPs é o minisequenciamento, que consiste no uso do kit comercial *SNaPshot*<sup>®</sup> (Thermo Fisher, CA, EUA) (La Neve et al., 2008; Bottero & Dalmaso, 2010), que permite a realização de uma (*singleplex*) ou várias reações (*multiplex*) utilizando diferentes *primers* e ddNTPs marcados com fluorescência, que se ligam ao DNA em uma região imediatamente adjacente ao local da existência do SNP (Applied Biosystems, 2010).

Um *primer* não marcado emparelha na extremidade 3' do alvo, na base imediatamente adjacente ao local do SNP que, por sua vez, se liga a um único ddNTP complementar a ele (Figura 4). Cada tipo de ddNTP (ddATP, ddCTP, ddTTP e ddGTP) fluorescente emite um comprimento de onda diferente que se traduz em uma cor específica para cada base do DNA. Os produtos desta extensão são corridos por eletroforese capilar em um sequenciador automático de DNA e, após a corrida, os picos gerados, representados pelo respectivo nucleotídeo (A, C, T ou G), são analisados no software *GeneMapper*<sup>®</sup> (Applied Biosystems, 2010).

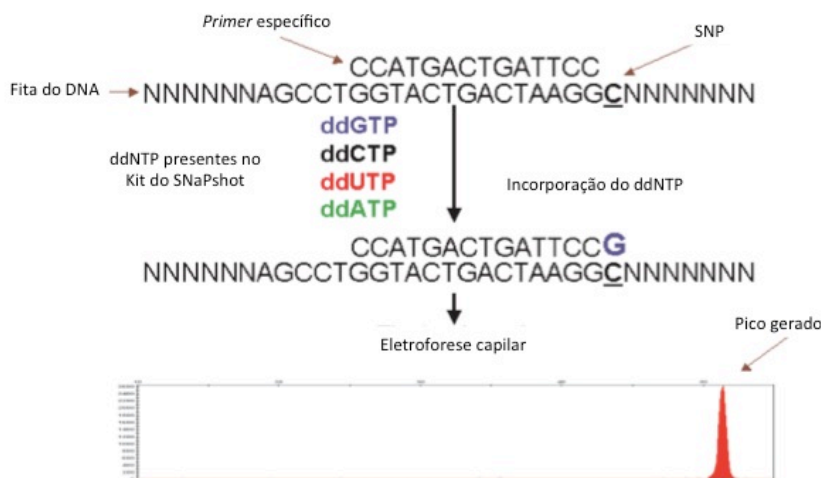


Figura 04: Desenho do *workflow* do minissequenciamento utilizando o Kit SNaPshot® (adaptado de: [www.tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms\\_042107.pdf](http://www.tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_042107.pdf))

A grande vantagem desta tecnologia é a sensibilidade da técnica, o menor custo e por dispende menor tempo para ser feita do que as outras técnicas de detecção de SNP.

#### **2.4 Adulteração por substituição de espécie**

A palavra fraude, segundo o dicionário *Michaelis*, “é o ato ou efeito de fraudar, modificar ou alterar um produto ou esconder a qualidade viciada deste, com objetivo de lucro ilícito”. As pessoas que cometem este ato estão sujeitas à sanções penais e o Código Brasileiro de Defesa do Consumidor discursa sobre isto. O capítulo IV, artigo 18, afirma que “são impróprios ao uso e consumo produtos fraudados”. Já o artigo 66 deixa claro que “fazer afirmação falsa ou enganosa, ou omitir informação relevante sobre a natureza, característica ou qualidade de produtos pode ter uma pena de detenção de três meses a um ano mais multa” (BRASIL, 2009).

As fraudes por adulteração de alimentos podem ser realizadas intencionalmente com o intuito de mascarar más condições do produto, ludibriar o consumidor com mercadorias de menor valor comercial ou, até mesmo, esconder condições que impliquem na sanidade destes

Segundo a literatura, existem dois tipos de erro de rotulagem em pescado: a substituição acidental e a intencional. A substituição acidental pode ocorrer devido à semelhança morfológica de espécies (Buck, 2010; Cawthorn et al., 2012), mas também porque algumas espécies podem receber diferentes nomes comerciais dentro ou fora do país, como a tilápia que na União Europeia pode ser a espécie *O. niloticus*, nas Filipinas, *O. mossambicus* e no México, *O. urolepis* (Barbuto et al., 2010; Triantafyllidis et al., 2010), o que faz da correta identificação uma tarefa mais passível de erro. Já a substituição intencional pode ser utilizada com espécies que normalmente seriam descartadas por não serem atrativas (Huxley-Jones et al., 2012) ou mesmo para vender espécies ameaçadas de extinção (Marko et al., 2004; Ogden, 2008; Rasmussen e Morrissey, 2008). Há ainda casos de espécies de alto valor comercial sendo substituídas por outras de menor valor comercial (Carvalho et al., 2011; Cawthorn et al., 2012; Cline, 2012).

Como os rótulos dos produtos não oferecem ao consumidor garantias suficientes sobre seu real conteúdo, é necessário certificar esses alimentos, de modo a proteger os consumidores de substituições ilegais ou possíveis erros de identificação (Teletchea et al., 2008, Rastogi et al., 2007).

O comércio de peixes filetados tem, cada vez mais, tomado o lugar do comércio de peixes inteiros (MDIC, 2016), fazendo com que a certificação de peixes seja mais necessária. Nos filés, as características morfológicas geralmente utilizadas na identificação das espécies (cabeça, pele e outros), são removidas. A eletroforese de proteínas, metodologia oficial de identificação tradicionalmente utilizada, pode até ser utilizada para peixes filetados, mas não é recomendada para produtos enlatados ou que passaram por processo de cozimento ou defumação, pois as proteínas são desnaturadas pelo calor (Smith et al., 2008).

A substituição de pescado é um problema mundial, podendo gerar danos econômicos e à saúde (Jacquet e Pauly, 2008). Como exemplo de países que identificaram a substituição, destacam-se: Canadá e EUA (Wong e Hanner, 2008), Japão e Coreia (Baker, 2008), Itália (Barbutto et al., 2010; Filonzi et al., 2010), Grécia (Triantafyllidis et al., 2010), África do Sul (Cawthorn et al., 2012) e Egito (Galal-Khallaf et al., 2014), entre outros. Da mesma forma, o Brasil não fica fora desta estatística e já apresenta alguns trabalhos demonstrando isso. Carvalho et al. (2011) relataram uma grande taxa de substituição de espécie em filés de surubim (*Pseudoplatystoma corruscans*), sendo encontrados vários outros gêneros. Outro exemplo é estudo de Carvalho et al., (2015), no qual diversos peixes foram substituídos por outras espécies, muitas vezes sendo estas espécies de menor valor comercial.

## **2.5 Validação de métodos analíticos**

A necessidade progressiva de dados analíticos comparáveis e confiáveis é um fator importante para a eliminação de barreiras técnicas entre os países. Uma vez efetuada a medição, para que ela seja aceita em qualquer país, devem ser observados requisitos legais e de acreditação. As normas nacionais e internacionais de sistemas de gestão da qualidade destacam a importância da validação de métodos analíticos para a obtenção de resultados confiáveis e adequados ao propósito de uso (ABNT, 2005a).

Vários organismos internacionais como EURACHEM (2014); *European Commission* (EC) (2002); *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC International), *International Standards Organization* (ISO) (2001) e *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) (2010) tem documentos com orientações para validação de métodos analíticos.

Atualmente, no Brasil, dois órgãos têm autorização para avaliar a competência de laboratórios de ensaios e disponibilizam guias para a validação de métodos analíticos. São estas: a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), ligada ao Ministério da Saúde, com a Resolução ANVISA RE nº 899, de 29/05/2003 (ANVISA, 2003), e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO), ligado ao Ministério da Indústria e do Comércio, com o DOQ-CGCRE-008 (INMETRO, 2010) .

A validação de métodos é um dos requisitos técnicos importantes na qualificação assegurada aos laboratórios de ensaio, assim como a documentação do trabalho de validação (ABNT, 2005b). Desta forma, órgãos como IUPAC, ISO, ANVISA, INMETRO exigem a validação de métodos analíticos como um requisito fundamental no credenciamento para qualidade assegurada e demonstração de competência técnica (ANVISA, 2003; FDA, 2013).

### 2.5.1 Processo de Validação

A falta de padronização sobre os parâmetros e demais procedimentos de validação, certificação e qualificação de instalações, equipamentos, processos e metodologia analítica gera uma barreira sobre o entendimento dos termos (Athaide, 2000).

O tema “validação de métodos” tem sido abordado por literaturas científicas, segmentos industriais e agências reguladoras. A harmonização dos processos de validação e seus termos, indicadores e cálculos, tem sido dificultada pela diversidade de áreas de aplicação, de parâmetros de desempenho a serem avaliados e definições. (Antignac et al., 2003).

Conforme publicado pelo INMETRO (2001), são considerados métodos normalizados, aqueles desenvolvidos por um órgão de normalização ou por alguma outra organização no qual o setor técnico do seu país o aceite,. Aqueles que são adaptados a partir de métodos

normalizados ou desenvolvidos pelo próprio laboratório são considerados métodos não normalizados.

Segundo o EURACHEM (1998), a validação de um método deve ser adequado ao seu propósito de uso (*fitness for purpose*), não sendo limitado em nenhum documento. Logo, estes somente guiam a maneira de proceder quanto aos parâmetros. A validação é considerada um critério essencial que os laboratórios devem implementar no âmbito de seus sistemas de gestão da qualidade, com o intuito de garantir a qualidade do resultado, a rastreabilidade e a comparabilidade dos resultados emitidos. (ABNT, 2005b)

Embora o guia publicado pela EURACHEM (1998) considere a validação vinculada ao desenvolvimento do método, em alguns casos não é possível determinar o ponto no qual o desenvolvimento de uma metodologia termina para dar início à validação. Isto porque muitos dos parâmetros de desempenho associados à validação do método são normalmente avaliados como parte do desenvolvimento. O processo de validação tem sido dividido, então, em dois estágios: uma “pré-validação”, conduzida durante o desenvolvimento do método, e uma validação “formal”, realizada após o desenvolvimento ter sido finalizado (Jenke, 1996).

Há duas formas para realizar o processo de validação de um método e ambas devem ser desenvolvidas em conjunto - intra e interlaboratorial. A validação interlaboratorial deve ser feita após o término da validação intralaboratorial para que os parâmetros de desempenho sejam avaliados de forma precisa, já que o método estará sendo feito de maneira idêntica em outro laboratório (Wood, 1999; Taverniers, et al., 2004).

Existem duas classificações para os métodos de ensaio: os qualitativos e os quantitativos. No primeiro, tem-se respostas binomial (sim ou não), pois avaliam a presença ou ausência do analito em uma amostra, levando em consideração questões biológicas, físicas ou químicas. Já nos métodos quantitativos, a quantificação numérica de um, ou mais analitos em uma amostra são avaliados (EC, 2002; Pulido et al., 2003; Cárdenas & Valcárcel, 2005).

## **2.6 Parâmetros de Validação**

Os parâmetros determinados na validação de métodos analíticos têm como objetivo demonstrar se o método em questão, nas condições em que é praticado, apresenta as

características necessárias para a obtenção de resultados com a qualidade exigida. Os parâmetros frequentemente determinados são: linearidade, efeito de matriz, seletividade, faixa linear, faixa de trabalho, limite de detecção (LD), limite de quantificação, precisão e veracidade.

De acordo com o INMETRO (2016), os parâmetros que necessitam ser calculados durante o processo de validação podem variar de acordo com o tipo de ensaio (Figura 5).

Parâmetros	Tipo de ensaio	
	Qualitativo	Quantitativo
Seletividade	√	√
Linearidade / faixa de trabalho / Faixa linear de trabalho / Sensibilidade		√
Limite de detecção	√	√
Limite de quantificação		√
Tendência / recuperação		√
Precisão		√
Robustez	( * )	( * )

Quadro 1: Parâmetros de validação conforme o tipo de ensaio Fonte: DOQ-CGCRE-008

(\*) Parâmetro facultativo

### Seletividade

De acordo com o EURACHEM (2014) a seletividade é a capacidade de detectar inequivocamente o analito quando na presença de outros constituintes da matriz que também produzem sinal de resposta no instrumento de medição. Em outras palavras, é a habilidade do método de determinar corretamente e especificamente o analito de interesse na presença de outros componentes na matriz da amostra sob as condições de ensaio estabelecidas.

De maneira geral, uma amostra consiste dos analitos de interesse em uma matriz, que pode possuir interferentes. A seletividade está relacionada ao evento da detecção de tal analito. Um método que produz respostas para apenas um analito é chamado específico. Um método que produz respostas para vários analitos, mas que consegue distinguir a resposta entre eles, é chamado seletivo (INMETRO, 2016).



Alguns componentes da matriz da amostra podem interferir no desempenho da medição, resultando no aumento ou redução do sinal analítico. Desse modo, a seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do analito de interesse. Além disso, se a seletividade não for verificada, outros parâmetros como a linearidade, a exatidão e a precisão, podem ser comprometidos (Ribani et al., 2004; INMETRO, 2016).

### 2.6.2 Limite de Detecção

O limite de detecção (LD) de um procedimento analítico individual representa a menor quantidade de analito na amostra que pode ser detectada sob as condições estabelecidas para o ensaio (ICH, 2005).

Através da análise de amostras com concentrações conhecidas de analito ou por valores de propriedades conhecidos, o limite de detecção pode ser determinado, permitindo a definição de um nível mínimo em que o analito/propriedade pode ser detectado com confiança.

Para isso, normalmente são realizadas sucessivas diluições até se encontrar a menor concentração que pode ser diferenciada do branco. Uma vez estabelecido o LD, este deve ser confirmado por meio da análise de amostras independentes no mesmo nível de concentração do LD. Nesta avaliação, adota-se um número de sete replicatas (INMETRO, 2010).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT. *ABNT NBR ISO/IEC17000 Avaliação de conformidade — Vocabulário e princípios gerais*. Rio de Janeiro: 2005a. 18p.

ABNT. *ABNT NBR ISO/IEC17025 Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração*. Rio de Janeiro: 2005b. 31p.

ADAMS, K.L.; PALMER, J.D. Evolution of mitochondrial gene content: gene loss and transfer to the nucleus. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v.29,p.380-395, 2003.

ALLEN, J.F. The function of genomes in bioenergetic organelles. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. n.358, p.19-38, 2003.

ANTIGNAC, J.P.; LE BIZEC, B.; MONTEAU, F.; ANDRE, F. Validation of analytical methods based on mass spectrometric detection according to the “2002/657/EC” european

decision: guideline and application. *Analytica Chimica Acta*, v.483, p.325-334, 2003.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária Resolução, R. E. N 899, de 29 de mai. *Diário Oficial*, Brasília, 2003.

Applied Biosystems. *ABI PRISM® SNaPshot™ Multiplex Kit*. 42p. 2010.

ATHAIDE A. Validação comprova e documenta qualidade dos produtos e equipamentos. *Controle de Contaminação*.v.3,p.16-22, 2000.

AVISE, J.C., *Molecular Markers, Natural History and Evolution*, Chapman & Hall, New York, 1994.

BARAKAT, H.; EL-GARHY, H.A.S.; MOUSTAFA, M.M.A. Detection of pork adulteration in processed meat by species-specific PCR-QIAxcel procedure based on D-loop and cytb genes *Applied Microbiology Biotechnology*, 2014.

BARBUTO, M., GALIMBERTI, A.; FERRI, E.; et al. DNA barcoding reveals fraudulent substitutions in shark seafood products: The Italian case of “palombo” (*Mustelus spp.*). *Food Research International*, v.43,p.376–381, 2010.

BAKER; C.S. A truer measure of the market: the molecular ecology offisheries and wildlife trade. *Molecular Ecology*. 2008

BOORE, J.L. The complete sequence of the mitochondrial genome of *Nautilus macromphalus* (Mollusca: Cephalopoda). *BMC genomics*, n.7,v.1,p.182, 2006.

BOORE, J.L. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research*, v.27,p.1767-1780, 1999.

BOTTERO, M.T.; DALMASSO, A. Animal species identification in food products: Evolution of biomolecular methods. *The Veterinary Journal*. v.190, p. 34–38, 2010.

BRASIL. Lei n. 8.078 – 11 set. 2009. Código de defesa do consumidor. Brasília, *Diário Oficial da União*, 2009.

BUCK, E.H. 2010. *Seafood marketing: Combating fraud and deception*. Congressional Research Service. Disponível em: <<http://www.gbcbiotech.com/genomicaypesca/documentos/identidad%20y%20trazabilidad/S>

eafood%20marketing%20combating%20fraud%20and%20deception.pdf/>. Acesso em 2 mar. 2016.

CARVALHO, D.C., PALHARES, R.M., DRUMMOND, M.G.; et al. DNA Barcoding identification of commercialized seafood in South Brazil: A governmental regulatory forensic program. *Food Control*, v.50, p.784–788, 2015.

CARVALHO, D.C.; PIMENTA NETO, D.A.; BRASIL, B.S.A.F.; et al. DNA barcoding unveils a high rate of mislabeling in a commercial freshwater catfish from Brazil. *Mitochondrial DNA*, v. 22, p. 97–105 2011.

CAWTHORN, D.M.; STEINMAN, H.A.; WITTHUHN, R.C. DNA barcoding reveals a high incidence of fish species misrepresentation and substitution on the South African market. *Food Research International*, v. 46, p. 30–40, 2012.

CLINE, E. Marketplace substitution of Atlantic salmon for Pacific salmon in Washington State detected by DNA barcoding. *Food Research International* v.45, p.388–393, 2012.

CORIN, S.E.; LESTER, P.J.; ABBOTT, K.L.; RITCHIE, P.A Inferring historical introduction pathways with mitochondrial DNA: The case of introduced Argentine ants (*Linepithema humile*) into New Zealand. *Diversity Distrib* v.13, p.510–518, 2007.

CUROLE, J.P.; KOCHER, T.D. Mitogenomics: digging deeper with complete mitochondrial genomes. *Trends in Ecology & Evolution*, n.14, v.10, p.394-398, 1999.

DAWNAY, N.; OGDEN, R.; MCEWING, R.; et al. Validation of the barcoding gene COI for use in forensic genetic species identification. *Forensic Science International*, v.173 p.1–6, 2007.

DOOLEY, J.J.; PAINE K.E.; GARRETT, S.D.; et al. Detection of meat species using TaqMan real-time PCR assays. *Meat Science*, v.68, p.431–438, 2004.

EC - European Commission. Commission decision 2002/657/EC of 12 August 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Official Journal of the European Communities*, 2002.

EURACHEM. - *The fitness for purpose of analytical methods*. Teddington: LGC; 2014. 61p.

EURACHEM. *The fitness for purpose of analytical methods, a laboratory guide to method validation and related topics*. Teddington: LGC; 1998. 61p.

FABRE, P. H.; JONSSON, K. A.; DOUZERY, E. J. Jumping and gliding rodents: Mitogenomic affinities of Pedetidae and Anomaluridae deduced from an RNA-Seq approach. *Gene*. v.531, n.2 p.388-397, 2013.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all*. Rome. 2016. 200 p.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. *The state of world fisheries and aquaculture*. Rome. 2014. 243p.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. *Fishery and Aquaculture Country Profiles*. 2013. Disponível em: <[http://www.fao.org/fishery/countrysector/FI-CP\\_BR/en/](http://www.fao.org/fishery/countrysector/FI-CP_BR/en/)>. Acesso em 3 mar. 2016.

FDA, UNITED STATES FOOD and DRUG ADMINISTRATION. *Guidance for Industry, Analytical Procedures and Methods Validation*, 2013.

FILONZI, L.; CHIESA, S.; VAGHI, M.; NONNIS MARZANO, F. Molecular barcoding reveals mislabelling of commercial fish products in Italy. *Food Research International*, v.43, p.1383–1388, 2010.

GALAL-KHALLAF, A.; ARDURA, A.; MOHAMMED-GEBA, K.; et al. DNA barcoding reveals a high level of mislabeling in Egyptian fish fillets. *Food Control*, v.46, p.441–445, 2014.

GROENENBERG, D.S.J.; PIROVANO, J.; GITTENBERGER, E.; SCHILTHUIZEN, M. The complete mitogenome of *Cylindrus obtusus* (Helicidae, Ariantinae) using Illumina next generation sequencing. *BMC Genomics*, v.13, p.114, 2012.

HEBERT, P.D.N.; CYWINSKA, A.; BALL, S.L.; et al. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B*. v.270, p.313-322, 2003.

HOGG, I.D.; HEBERT, P.D.N. Biological identification of springtails (Collembola: Hexapoda) from the Canadian Arctic, using mitochondrial DNA barcodes. *Canadian Journal of Zoology*. v.82, p.749-754, 2004.

HUXLEY-JONES, E.; SHAW, J.L.A.; FLETCHER, C.; et al. Use of DNA Barcoding to Reveal Species Composition of Convenience Seafood. *Conservation Biology*, v. 26, p. 367–371, 2012.

IBGE, Produção da pecuária municipal Rio de Janeiro, v. 43, p.1-49, 2015

IBGE, Produção da pecuária municipal Rio de Janeiro, v. 42, p.1-39, 2014

IBGE, Produção da pecuária municipal Rio de Janeiro, v. 41, p.1-108, 2013

ICH - International Conference on Harmonisation Guideline, ICH Harmonized Tripartite. "Validation of analytical procedures: text and methodology.", v.1, 2005.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. DOQ-CGCRE-008 2016. Disponível em: <[http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/organismos/doc\\_organismos.asp?tOrganismo=BPL&iacao=imprimir](http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/organismos/doc_organismos.asp?tOrganismo=BPL&iacao=imprimir)>. Acesso em 13 Ago. 2016.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. *DOQ-CGCRE-008. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos*. Rio de Janeiro: INMETRO, 2010. 35p.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. *DOQ-DQUAL-006 - Orientações para adoção da NBR ISO/IEC 17025 pelos laboratórios e credenciados e postulantes ao credenciamento*. Rio de Janeiro: INMETRO, 2001. 32p.

ISO - International Organization for Standardization. *ISO 5725-3:1994. Accuracy (trueness and precision) of Measurement Methods and Results - Part 3: Intermediate Measures of Precision of a Standard Measurement Method*. 2001.

JACQUET, J.L.; PAULY, D. Trade secrets: Renaming and mislabeling of seafood. *Marine Policy*. n. 32, p. 309–318, 2008.

KARABASANAVAR, N.S.; SINGH, S.P.; KUMAR, D.; SHEBANNAVAR, S.N. Detection of pork adulteration by highly-specific PCR assay of mitochondrial D-loop *Food Chemistry*. n.145, p.530–534, 2014.

KARLSSON, A.; HOLMLUND, G. Identification of mammal species using species-specific DNA pyrosequencing. *Forensic Science International* v.173, p.16– 20, 2007.

- LA NEVE, F.; CIVERA, T.; MUCCI, N.; BOTTERO, M.T. Authentication of meat from game and domestic species by SNaPshot minisequencing analysis. *Meat Science*, v.80, p.216–224, 2008.
- MARKO, P.B.; LEE, S.C.; RICE, A.M.; et al. Fisheries: mislabelling of a depleted reef fish. *Nature*. n.430, p.309–310, 2004.
- MDIC - Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. 2016. *Aliceweb* Disponível em: < <http://aliceweb.mdic.gov.br//index/home>> Acesso em: 14 out. 2016-
- MUNIRA, S., JAHURA, F.T.; HOSSAIN, M.M.; BHUIYAN, M.S.A. Molecular detection of cattle and buffalo species meat origin using mitochondrial cytochrome b (Cyt b) gene *Asian Journal of Medical and Biological Research.*, n.2, p.177-182, 2016.
- NELSON, L.A.; WALLMAN, J.F.; DOWTON, M. Using COI Barcodes to identify forensically and medically important blowflies. *Medical and Veterinary Entomology*, n.21, p.44–52, 2007.
- NIKOLIC, N.; JÉRÔME. M.; FONTENEAU, A.; et al. Identification of skipjack tuna juveniles based on DNA control region sequences and potential spawning area around reunion island.. *Environmental Biology of Fishes*. v.99, p.171–178, 2016.
- OGDEN, R. Fisheries forensics: The use of DNA tools for improving compliance, traceability and enforcement in the fishing industry. *Fish and Fisheries*, v.9, p.462–472, 2008.
- ONOFRI, V.; ALESSANDRINI, F.; TURCHI, C.; et al. Development of multiplex PCRs for evolutionary and forensic applications of 37 human Y chromosome SNPs. *Forensic Science International*, n.157, p.23-35, 2006.
- ORJI, C.U.; ONYEOCHA, I.O; SHAIDA, S.S; et al. Molecular identification of tsetse fly (Diptera: Glossinidae) species based on mitochondrial DNA (COII and CytB) sequences *African Journal of Biotechnology*. v. 14(19), p.1605-1613, 2015.
- PERINI, V.R.; CARVALHO, D.C.; BEHEREGARAY, L.B.; PROSDOCIMI, F.; The complete mitochondrial genome of the southern purple-spotted gudgeon *Mogurnda adspersa* (Perciformes: Eleotridae) through pyrosequencing. *Mitochondrial DNA*. p.1940-1744, 2014.

PFENNINGER, M.; NOWAK, C.; KLEY, C.; et al. Utility of DNA taxonomy and barcoding for the inference of larval community structure in morphologically cryptic *Chironomus* (Diptera) species. *Molecular Ecology*, n.16, p.1957–1968, 2007.

PONS J. DNA-based identification of preys from non- destructive, total DNA extractions of predators using arthropod universal primers. *Molecular Ecology Notes*, n.6, p.623–626, 2006.

PRIOLI, A.J.; CARLO, V.A.; SORIA, T.V. et al. Mitochondrial D-loop nucleotide diversity in *Astyanax* (Osteichthyes, Characidae) from the upper Paraná and upper Paraguay River basins. *Genetics and Molecular Research*. v.11(2), p.1064-1074, 2012.

PULIDO, A.; RUISÁNCHEZ, I.; BOQUÉ, R.; et al. Uncertainty of results in routine qualitative analysis. *Trends in Analytical Chemistry*. v. 22, n.10, p. 647-654, 2003.

RASMUSSEN, R.S.; MORRISSEY, M.T. DNA-based methods for the identification of commercial fish and seafood species. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v.7, p.280-295, 2008.

RASTOGI, G.; DHARNE, M.; WALUJKAR, S.; et al. Species identification and authentication of tissues of animal origin using mitochondrial and nuclear markers. *Meat Science*. v.76, p.666–674, 2007.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v.27, n.5, p.771-780, 2004.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.74, p.5463–5467, 1977.

SMITH, P.J.; MCVEAGH, S.M.; STEINKE, D. DNA barcoding for the identification of smoked fish products. *Journal of Fish Biology*, v.72, p.464-471, 2008.

SUN, H.; DONG, J.; SHI, H.; et al. The complete mitochondrial genome of a Chinese rufous horseshoe bat subspecies, *Rhinolophus sinicus sinicus* (Chiroptera: Rhinolophidae) *Mitochondrial DNA* p.1940-1744, 2015.

TANG, Y.X., LIU, F.; TANG, H.X; et al. The complete mitochondrial genome of Yunnan

black goat (*Capra hircus*). *Mitochondrial DNA*. 2015.

TAVERNIERS, I.; DE LOOSE, M.; VAN BOCKSTAELE, E. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *Trends in Analytical Chemistry*, v.23, p.535-552, 2004.

TAY, W.T.; ELFEKIH, S.; COURT, L.; et al. Complete mitochondrial DNA genome of *Bemisia tabaci* cryptic pest species complex Asia I (Hemiptera: Aleyrodidae). *Mitochondrial DNA*. 2014.

TELETCHEA, F.; BERNILLON, J.; DUFFRAISSE, M.; et al. Molecular identification of vertebrate species by oligonucleotide microarray in food and forensic samples. *Journal of Applied Ecology*, n.45, p.967–975, 2008.

TISTHAMMER, K.H.; FORSMAN, Z.H.; SINDORF, V.L.; et al. The complete mitochondrial genome of the lobe coral *Porites lobata* (Anthozoa: Scleractinia) sequenced using ezRAD *Mitochondrial DNA Part B: Resources*, v.1, n. 1, p.247–249, 2016.

TRIANAFYLLIDIS, A.; KARAISSKOU, N.; PEREZ, J.; et al. Fish allergy risk derived from ambiguous vernacular fish names: Forensic DNA-based detection in Greek markets. *Food Research International*, v.43, n.8, p.2214–2216, 2010.

WANG, H.L.; YANG, J.; BOYKIN, L.M.; et al. The characteristics and expression profiles of the mitochondrial genome for the Mediterranean species of the *Bemisia tabaci* complex. *BMC genomics*, v.14, v.1, p.4, 2013.

WARD, R.D.; ZEMLAK, T.S.; INNES, B.H.; et al. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*, v.360, p.1847-1857, 2005.

WONG, E.H.; HANNER, H.R. DNA barcoding detects market substitution in North American seafood. *Food Research International*, v.41, p.828–837, 2008.

WOOD, R. How to validate analytical methods. *Trends in Analytical Chemistry*, v.18, p.624-632, 1999.

WU, H.Y.; JI, X.Y.; YU, W.W.; DU, Y.Z. Complete mitochondrial genome of the stonefly *Cryptoperla stilifera* Sivec (Plecoptera: Peltoperlidae) and the phylogeny of Polyneopteran insects. *Gene*. n.537, p.177–183, 2014.



YANG, L., TAN, Z.; WANG, D.; et al. Species identification through mitochondrial rRNA genetic analysis *Scientific Reports*. n.4, 4089, p.1-11, 2014.

YANG, D.Y.; SPELLER, C.F. Co-amplification of cytochrome *b* and D-loop mtDNA fragments for the identification of degraded DNA samples. *Molecular Ecology Notes*. v.6, p.605–608, 2006.

ZHANG, B., MA, C.; EDWARDS, O.; et al. The mitochondrial genome of the Russian wheat aphid *Diuraphis noxia*: Large repetitive sequences between trnE and trnF in aphids. *Gene*. n.533, p.253–260, 2014.

## **OBJETIVOS**

### **A) OBJETIVOS GERAIS**

- Otimizar e validar método molecular para identificação de espécies de peixes segundo os requisitos da ABNT NBR ISO/IEC 17025 para fins de acreditação
- Desenvolver método molecular para identificação gênero e espécie de salmão e trutas

### **B) OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Otimizar o método de DNA Barcode para identificação molecular de peixes.
- Validar segundo os requisitos da ABNT NBR ISO/IEC 17025 o método otimizado para fins de acreditação no Laboratório de Genética da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).
- Desenvolver e padronizar o minissequenciamento por SNaPshot para identificação das espécies *Salmo salar*, *Oncorhynchus keta*, *O. gorbuscha* e *O. mykiss*.

## I. CAPÍTULO 1

DNA barcoding reveals a high level of mislabeling in seafood products marketed in southeastern Brazil

Danilo Alves Pimenta Neto<sup>a,\*</sup>, Lilian Viana Teixeirab, Daniel Cardoso de Carvalhoc, Denise Aparecida Andrede de Oliveiraa

a Laboratório de Genética Animal, Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais

b Departamento de Tecnologia e Inspeção em Produtos de Origem Animal, Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais

c Laboratório de Genética da Conservação, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

\* Corresponding author. Tel.: +55 31 3409-2206; Fax: +55 31 3491-3963. E-mail address: danilo\_apn@hotmail.com (D.A.Pimenta Neto).

### Abstract

Here we highlights the importance of monitoring the fish and products marketed at a local and national scale, their proper labeling and the adoption of molecular techniques such as an inspection tool. Using the DNA Barcode methodology we identify 315 samples of seafood purchased from several supermarkets, restaurants and diners in southeastern Brazil. In 32% of samples mislabeled were found. The greatest replacement was observed in Hake (72%), and the most traded specie with this popular name was *Gadus chalcogrammus* (Alaska pollack), it has a smaller commercial value compared to the *Merluccius hubbsi*. Considering the high mislabeling rate reported here, we suggest the implementation of labeling policies together with a constant monitoring and development of effective awareness campaigns for consumers.

### Keywords

DNA barcoding; Processed fish ; Species substitution; Commercial fraud; Market substitution; COI ; Brazilian food control; Mislabeling

## 1. Introduction

The growth in world population has increased animal protein intake, and fishery products are important to meet this growing demand. In Brazil, only a small part of the production is exported, while about 97% is used in the internal market (FAO, 2014). The seafood products are most marketed as whole, fresh or chilled fish, and only a small portion is sold as processed products or as fillets (FAO, 2013).

Aquaculture, in Brazil, is expanding sustainably and is the most important focus in the global fishing industry. With the decrease of the fishing extractive sector in recent decades, the rapid growth of aquaculture has been the only way to keep up with this high demand of fish consumption (Chammas & Nakanishi, 2008).

In an attempt to standardize a marker for the molecular identification of animal species, in 2003, researchers at the University of Guelph (Ontario, Canada) proposed the creation of a universal diagnostic system, based on a fragment of 650 base pairs (bp) from base 58 of the 5' end of the gene cytochrome oxidase subunit I. This process has been termed DNA barcoding, because this gene sequence represents a real barcode (Hebert et al., 2003).

The removal of morphological characteristics induced by preparation (gutting, beheading and filleting) together with the continuous entrance of new exotic species, innovations in processing, transportation, and technology have facilitated trade with a wide variety of seafood species and represent the main challenges in seafood identification by consumers and official controllers (Ercsey-Ravasz et al., 2012).

There are two types of fish mislabeling, the accidental and the intentional substitution. Accidental substitution can occur due to morphological similarity of species (Buck, 2010; Cawthorn et al., 2012) but also because some species can receive different trade names within or outside the country (Triantafyllidis et al., 2010, Barbuto et al, 2010), making the correct species identification difficult. Intentional replacement can be used for species that would normally be discarded for not being attractive (Huxley-Jones et al., 2012) or even to sell vulnerable or overexploited species (Marko et al., 2004; Ogden, 2008; Rasmussen & Morrissey, 2008). Most of the cases have the species of high commercial value has been replaced by those of low commercial value, so that they have an economic gain. (Cawthorn et al., 2012; Cline, 2012; Carvalho et al., 2011).

Fish substitutions have been reported in several countries such as Canada and the United States of America (Wong and Hanner, 2008), Japan and Korea (Baker, 2008) Italy (Filonzi et al., 2010; Barbuto et al., 2010), Greece (Triantafyllidis et al., 2010), South Africa (Cawthorn et al., 2012), Egypt (Galal-Khallaf et al., 2014), and others. In Brazil, one example of the application of DNA barcoding technique in fish fraud identification is the replacement when selling fish as catfish (*Pseudoplatystoma corruscans*) (Carvalho et al., 2011) and other species (Carvalho et al., 2015) by others of lower commercial value.

As already shown by Jacquet and Pauly (2008), the wrong label can bring several complications such as economic losses to consumers and the government, loss of natural resources and of existing eco-campaigns in many countries.

This study highlights the importance of monitoring the fish and products marketed at a local and national scale, their proper labeling and the adoption of molecular techniques such as an inspection tool. Thus, this study aims to use DNA barcoding to identify the fish species products labeled in southeastern Brazil. It is also the aim of the study to assess the accuracy of the mitochondrial gene sequencing method cytochrome c oxidase subunit I (COI).

## **2. Materials and methods**

### **2.1 Sample collection**

A total of 315 samples of seafood (Table 1) were purchased from several supermarkets, restaurants and diners in 11 cities in four states belonging to southeastern Brazil (Belo Horizonte, Betim, Contagem and Divinópolis in Minas Gerais; Arraial do Cabo, Búzios and Cabo Frio in Rio de Janeiro; Santos and São Paulo in São Paulo; and Vitória and Guarapari in Espírito Santo).

### **2.2 DNA extraction and PCR**

DNA was extracted using a “*Salting Out*” protocol (Aljanabi & Martinez 1997). A 655bp fragment of the mitochondrial COI gene was amplified using primers FishF1 and FishR1 (Ward et al., 2005).

PCR reaction consisted of 1.0 ml of 5 Go Taq DNA polymerase reaction buffer (Promega, Madison USA), 0.2 ml of mixed dNTP (40 mM, Promega, Madison USA), 0.3 ml of MgCl<sub>2</sub>

(Promega, Madison USA), 0.2 ml of each primer (10 mM, Integrated DNA Technologies - IDT), 0.1 ml of Go Taq polymerase (Promega, Madison USA), 1.0 ml of DNA template (100 ng/ul) and 7.0 ml of ultrapure water.

Thermal cycling conditions consisted of an initial denaturation step at 94 C for 2 min, 35 cycles at 94 C for 30 s, 54 C for 30 s, and 72 C for 1 min, and a final extension at 72 C for 10 min.

### 2.3 Sequencing and data analysis

Sequences were determined bi-directionally using the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Inc., Foster City, California, USA), following the manufacturer's protocol on an ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California). Electropherograms were analyzed using SeqScape V2.7 software (Applied Biosystems, Foster City, California).

The identification of samples was conducted comparing the sequences deposited on BOLD Identification System (<http://www.boldsystems.org>) (Ratnasingham & Hebert 2007) and considering only matches up to 98% of specimen similarity (Ferri et al. 2009) (Table 2). To determine the percentage of species substitution, we compared the result with what has been labeled.

All the data generated were added to a table for the final analysis of the samples. A summarized table (Table 2) is presented here with the mean percentage of similarity with the sequence deposited in BOLD.

Brazil does not have an official regulatory list of species and common/market names. To determine cases of mislabeling, we used FishBase derivatives vernacular names (Froese & Pauly, 2015), and Ordinance 52, from December 29, 2000, by the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply, which dictates guidelines for the regulation of Cod.

## 3. Results and discussion

In the present study we carried out genetic identification of some Brazilian commercial fish species sold in restaurants and supermarkets, focused on economically important species.

We identified commercial samples in southeast Brazil, sold in markets and restaurants through the comparisons of COI mtDNA sequences using the BOLD database. Strikingly, analysis of commercial seafood and fish products revealed a 32% rate of substitution by fish from the other species and 68% of reliable information (Table 2).

We were able to identify all species in the analyzed samples. Of the 315 samples of fish that underwent species identification, 268 samples had labels that contained the fish used, and these were analyzed for replacement (Table 2). Forty-seven did not have the names of the fish on the product labels (e.g. burger, nuggets, etc.), therefore only species identifications were done (Table 3).

In samples of fishery products from Tuna, Tilapia, Cação, Caviar, and Sardines, no substitutions were observed. Even in Tuna and Tilapia, where we observed several distinct species (Table 2), all are considered valid, corresponding to fish belonging to the same genus, different species and commercially accepted by its popular name.

Various species of tuna are sold under one common name, whether canned, fresh or already processed into ready meals in restaurants, and this can hinder the consumer from knowing if he is actually consuming the species that is on the label (when labeled). Many restaurants are still unable to explain which species is being sold (Lowenstein et al., 2009, Viñas & Tudela, 2009).

However, the DNA barcode technique is not effective in differentiating the samples to the species level (Viñas & Tudela, 2009) and BOLD four species share the same haplotype: *Thunnus albacares*, *Thunnus maccoyii*, *Thunnus obesus*, and *Thunnus atlanticus* (Carvalho et. al., 2015).

The greatest replacement was observed in Hake, 72% of the samples sold are a replacement. In this group we found 4 species (Table 2) and the most traded specie with this popular name was *Gadus chalcogrammus* (Alaska pollack) (n = 21). Most importantly, the *Gadus chalcogrammus* has a smaller commercial value compared to the *Merluccius hubbsi* (Froese & Pauly, 2015).

Second in the number of replacements is Cod. According to a regulation by the Ministry of Fisheries and Aquaculture, only the species *Gadus morhua* and *Gadus macrocephalus* can be marketed as cod. Thus, the species *Molva molva* (Ling) and *Pollachius virens* (Saithe) are not considered cod, and thus 58% of the samples were considered a replacement.

A clear case of seafood substitution found within supermarkets was observed with a sample of cod, labeled by an establishment such as Atlantic cod (*Gadus morhua*), and was molecularly identified as Pacific cod (*Gadus macrocephalus*).

Cod replacement has been reported in Ireland and the UK, where 131 Atlantic cod samples (*G. morhua*) were examined, 7.4% and 28% of the samples were replacements, respectively (Miller & Mariani, 2010).

The Panga was the fish with the highest number of species being marketed with this common name (Table 2) and 55% of sample replacements were found.

A curious situation that is happening is the substitution of Panga for Tilapia (*Oreochromis* spp). Tilapia is a fish with a high commercial value, a more appreciated flesh already incorporated into the eating habits of the Brazilian consumer, with clear meat without thorns, and mild taste (Nogueira & Rodrigues, 2007). Instead, Panga is being introduced in the country with a lower value, with meat that is less tasty and with a higher fat content (Deco, 2009). The Red List of the International Union for Conservation of Nature (IUCN) classifies the panga (*Pangasius*) as "Endangered" and many specimens are not found in the natural environment, as reported by Roberts (1993), Hogan (2007), Vidthayanon & Hogan (2012). This species are cultivated in a large scale throughout the region (Baird et al., 2004) and its imports by Brazil rose from a negligible 225 tons in 2007 to 29,500 in 2011 (FAO, 2013).

The salmon (*Salmo salar*) is a fish with high commercial value and their trade should be constantly monitored, as fraud on the part of traders can be easily accomplished by substituting it with other species such as trout salmon, which has morphological and sensory characteristics similar to the real salmon (Vallandro, 2010).



With increased consumption of Japanese cuisine, we expected a greater number of replacements in restaurants, and even with the higher sampling (n = 52) only two samples (4%) were considered substitutes being acquired in the markets.

Only four samples were collected from Traira, all samples replacements were considered. The species found were Argentine hake (*Merluccius hubbsi*), Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and Alaska pollock (*Gadus chalcogrammus*).

We only have identifications of the species of 47 samples for burger, nuggets, whitefish and kani, because the fish used in these products was not specified on the label (Table 3). By analyzing the sequences of burger (n = 4) and nuggets (n = 2) the DNA barcode showed that they were made with fish belonging to the genus *Merluccius* (Table 3): *Merluccius gayi* (for hamburgers) and *Merluccius hubbsi* (for both products).

In the case of white fish (n = 30) marketed by the Japanese, 24 samples were identified as mahi-mahi, 5 as *Oreochromis niloticus* and one as *Oreochromis aureus*. Regarding the analysis of 11 samples of Kani, *Merluccius hubbsi* (n = 2), *Oreochromis niloticus* (n = 2), and *Micromesistius australis* (n = 7) were identified.

Another example of this can be seen in the work of Pepe et al. (2007), who used the Cytochrome b gene (cyt b) to identify 19 products marketed as surimi. Eight species were identified, of which 84% were different species than the declared on the label. This shows how a law to regulate what fish can be marketed with such popular names is important, such as exists in the US (FDA, 2016) and Canada (CFIA, 2016).

It is recommended that a valid list of trade and scientific names for fish sold in Brazil be adopted. The Brazilian Regulation number 52, from December 29, 2000 established by the Ministry of Agriculture, Live- stock and Food Supply, which regulates that only the species *Gadus morhua*, *Gadus macrocephalus*, and *Gadus ogac* will be termed as cod is a first step.

In addition, customs would have the ability to regulate and to inspect the imported/exported items, for tax purposes and for consumer protection, reducing the risks to human health, as in the case of some food allergies.

Other important items to consider are: identification of the scientific name of the species on the label of the products, as well as information stating if the fish is caught in the wild or is farmed. For instance, the Republic Act No. 7394 in the Philippines (FDA-PH, 2002), as well as the Commission Regulation (EC) No 2065/2001 (Commission Regulation, 2001) mandate that all products be properly labeled as to their accurate nature, quality, and quantity.

These measures taken by the government and regulatory agency could reduce the replacements and possible fraud with the fish marketed in Brazil, punishing those responsible. With this we would have more reliable and safe products for consumption.

A total of 155 samples were analyzed in Group 1, 81 samples in Group 2, and 32 samples in Group 3 (Table 2). Regarding the replacements, we can confirm that Group 2 (samples obtained in the trade) has a higher percentage (44%) of replacements in comparison to the other groups, with 19% in group 3, and 18% in group 2 (Figure 1). We expected a higher percentage of substitutions in samples collected from restaurants and snack bars since there is fish manipulation to make the products.

Our results indicated that 32% of the fish sold in the surveyed markets and restaurants in southeast in Brazil are mislabeled. This is higher than what is reported for USA (77%; Marko et al., 2004), North American seafood (25%; Wong & Hanner, 2008), the same as Italian fish products (32%; Filonzi et al., 2010), but below fish analyzed in 21 US states with 33% substitution (Warner et al., 2013) and 33% in Egyptian seafood (Galal-Khallaf et al., 2014).

In Brazil, Carvalho et al. (2011) found substitutions in surubins. In steaks, 42% were of the *Pseudoplatystoma* gene, but none of them were *P. corruscans* (true Surubim), and 58% were from completely different genes; marine fish being marketed as catfish have also been identified.

As the global demand for seafood continues to rise, there is an increasing need for effective and sustainable seafood industry management. Several research reports have shown a wide range of seafood replacements worldwide, an economic and potential health problem for consumers. Thus, considering the high mislabeling rate reported here, we suggest the implementation of labeling policies together with a constant monitoring and development of effective awareness campaigns for consumers.

### Acknowledgment

The authors are grateful to all personnel of the Laboratory of Animal Genetics at UFMG Veterinary College for their assistance. This study was supported by CNPq (INCT 573899/2008-8) and FAPEMIG (APQ-0084/08). D. A. Pimenta Neto also give special thanks to Eduardo Coelho for all the teachings and help in the lab.

### Tables

<b>Fish (as identified on the purchase)</b>	<b>N of samples</b>
Salmon	52
Hake	46
Cod	45
Panga	42
Tuna	30
White Fish	30
Tilapia	30
Kani	11
Sardine	8
Cação	7
Caviar	4
Burguer	4
Traira	4
Nuggets	2

**Table1** Description of fish samples collected

<b>Seafood (as identified at purchase)</b>	<b>Identified species (mean of % similarity with the sequence deposited in BOLD)</b>	<b>N</b>	<b>FAO Name (FishBase)</b>	<b>Mislabeled</b>
Tuna	<i>Thunnus albacares</i> - 99,69 %	24	Yellowfin tuna	No

Tuna	<i>Thunnus obesus</i> - 99,56 %	3	Bigeye tuna	No
Tuna	<i>Thunnus alalunga</i> - 100 %	2	Albacore	No
Tuna	<i>Thunnus orientalis</i> - 100 %	1	Pacific bluefin tuna	No
Caviar	<i>Mugil liza</i> - 99,45 %	2	Lebranche mullet	No
Caviar	<i>Mallotus villosus</i> - 99,59 %	2	Capelin	No
Cação	<i>Prionace glauca</i> - 99,95 %	7	Blue shark	No
Sardine	<i>Sardinella aurita</i> - 99,91 %	8	Round sardinella	No
Tilapia	<i>Oreochromis mossambicus</i> - 99,73 %	9	Mozambique tilapia	No
Tilapia	<i>Oreochromis niloticus</i> - 99,78 %	20	Nile tilapia	No
Tilapia	<i>Oreochromis aureus</i> - 99,61 %	1	Blue tilapia	No
Cod	<i>Gadus macrocephalus</i> - 100 %	9	Pacific cod	No
Cod	<i>Gadus morhua</i> - 99,42 %	10	Atlantic cod	No
<b>Cod</b>	<b><i>Molva molva</i> 99,93 %</b>	<b>7</b>	<b>Blue ling</b>	<b>Yes</b>
<b>Cod</b>	<b><i>Pollachius virens</i> - 97,50 %</b>	<b>19</b>	<b>Saithe</b>	<b>Yes</b>
<b>Hake</b>	<b><i>Gadus chalcogrammus</i> 99,92 %</b>	<b>21</b>	<b>Alaska pollock</b>	<b>Yes</b>
<b>Hake</b>	<b><i>Pangasius hypophthalmus</i> - 99,89 %</b>	<b>6</b>	<b>Striped catfish</b>	<b>Yes</b>
Hake	<i>Merluccius hubbsi</i> - 100 %	13	Argentine hake	No
<b>Hake</b>	<b><i>Trichiurus lepturus</i> - 98,18 %</b>	<b>6</b>	<b>Largehead hairtail</b>	<b>Yes</b>
<b>Panga</b>	<b><i>Brachyplatystoma rousseauxii</i> - 100 %</b>	<b>4</b>	<b>---</b>	<b>Yes</b>
Panga	<i>Pangasius hypophthalmus</i> 99,75	19	Striped catfish	No
<b>Panga</b>	<b><i>Gadus chalcogrammus</i> - 99,70 %</b>	<b>5</b>	<b>Alaska pollock</b>	<b>Yes</b>
<b>Panga</b>	<b><i>Merluccius hubbsi</i> - 97,63 %</b>	<b>5</b>	<b>Argentine hake</b>	<b>Yes</b>
<b>Panga</b>	<b><i>Oreochromis niloticus</i> - 100 %</b>	<b>6</b>	<b>Nile tilapia</b>	<b>Yes</b>
<b>Panga</b>	<b><i>Oreochromis mossambicus</i> 100 %</b>	<b>3</b>	<b>Mozambique tilapia</b>	<b>Yes</b>
Salmon	<i>Salmo salar</i> - 99,87 %	45	Atlantic salmon	No
Salmon	<i>Oncorhynchus keta</i> - 100 %	3	Chum salmon	No

Salmon	<i>Oncorhynchus mykiss</i> - 99,91 %	2	Rainbow trout	Yes
Salmon	<i>Oncorhynchus gorbusha</i> - 100 %	1	Pink salmon	No
Salmon	<i>Oncorhynchus kisutch</i> - 99,83 %	1	Coho salmon	No
Traíra	<i>Gadus chalcogrammus</i> - 99,83 %	1	Alaska pollock	Yes
Traíra	<i>Oreochromis niloticus</i> - 99,67 %	1	Nile tilapia	Yes
Traíra	<i>Merluccius hubbsi</i> - 100 %	2	Argentine hake	Yes

**Table 2** Commercial food products analyzed for mislabeled by COI sequencing

Seafood (as identified at purchase)	Identified species (mean of % similarity with the sequence deposited in BOLD)	N	FAO Name (FishBase)	Mislabeled
Burguer	<i>Merluccius hubbsi</i> - 100 %	2	Argentine hake	Not tested
Burguer	<i>Merluccius gayi</i> - 100 %	2	South Pacific hake	Not tested
Nuggets	<i>Merluccius hubbsi</i> - 100 %	2	Argentine hake	Not tested
Kani	<i>Trachurus murphyi</i> - 99,91 %	2	Chilean jack mackerel	Not tested
Kani	<i>Micromesistius australi</i> - 100 %	7	Southern blue whiting	Not tested
Kani	<i>Oreochromis niloticus</i> 97,18 %	2	Nile tilapia	Not tested
White Fish	<i>Coryphaena hippurus</i> - 99,32 %	4	Common dolphinfish	Not tested
White Fish	<i>Oreochromis niloticus</i> - 99,72 %	5	Nile tilapia	Not tested
White Fish	<i>Oreochromis aureus</i> - 99,03 %	1	Blue tilapia	Not tested

**Table 3** Species identification of commercial products without information on the label

## References

ALJANABI, S. M.; MARTINEZ, I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res.*, v. 25, n. 22, p. 4692-4693, 1997.

- Baird, I. G., Flaherty, M. S. E., & Phylavanh, B. (2004). Mekong River Pangasiidae catfish migrations and the Khone Falls wing trap fishery in southern Laos. *Natural History Bulletin of the Siam Society*, 52, 81-109.
- Baker, C. S. (2008). A truer measure of the market: The molecular ecology of fisheries and wildlife trade. *Molecular Ecology*, 17(18), 3985–3998. <http://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03867.x>
- Barbuto, M., Galimberti, A., Ferri, E., Labra, M., Malandra, R., Galli, P., & Casiraghi, M. (2010). DNA barcoding reveals fraudulent substitutions in shark seafood products: The Italian case of “palombo” (*Mustelus* spp.). *Food Research International*, 43(1), 376–381. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.10.009>
- Buck, E. H. Seafood marketing: Combating fraud and deception. (2010). [http://www.gbcbiotech.com/genomicaypesca/documentos/identidad%20y%20trazabilidad/Sea food%20marketing%20combating%20fraud%20and%20deception.pdf/](http://www.gbcbiotech.com/genomicaypesca/documentos/identidad%20y%20trazabilidad/Sea%20food%20marketing%20combating%20fraud%20and%20deception.pdf/) Accessed 12.11.15.
- Carvalho, D. C., Neto, D. a. P., Brasil, B. S. a. F., & Oliveira, D. a. a. (2011). DNA barcoding unveils a high rate of mislabeling in a commercial freshwater catfish from Brazil. *Mitochondrial DNA*, 22(S1), 97–105. <http://doi.org/10.3109/19401736.2011.588219>
- Carvalho, D. C., Palhares, R. M., Drummond, M. G., & Frigo, T. B. (2015). DNA Barcoding identification of commercialized seafood in South Brazil: A governmental regulatory forensic program. *Food Control*, 50, 784–788. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.10.025>
- Cawthorn, D. M., Steinman, H. A., & Witthuhn, R. C. (2012). DNA barcoding reveals a high incidence of fish species misrepresentation and substitution on the South African market. *Food Research International*, 46(1), 30–40. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.11.011>
- CFIA. Fish List. (2016). <http://www.inspection.gc.ca/food/fish-and-seafood/product-inspection/fish-list/eng/1352923480852/1352923563904/> Accessed 20.01.15.
- Cline, E. (2012). Marketplace substitution of Atlantic salmon for Pacific salmon in Washington State detected by DNA barcoding. *Food Research International*, 45(1), 388–393. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.10.043>
- Commission Regulation (EC) No 2065/2001 of 22 October 2001 laying down detailed rules for the application of Council Regulation (EC) No 104/2000 as regards informing consumers about fishery and aquaculture products.
- Chammas, M. A. & Nakanishi, L. I. T. Status da aquicultura no mundo, no Brasil e em Sergipe. (2008). <http://bis.sebrae.com.br/bis/conteudoPublicacao.zhtml?id=2214/> Accessed 08.11.2015.

- Deco, P. Peixe panga sem químicos. (2009). <http://www.deco.proteste.pt/alimentacao/seguranca-alimentar/testes-primeira-impressao/peixe-panga-sem-quimicos/> Accessed 25.11.15.
- Ercsey-Ravasz, M., Toroczkai, Z., Lakner, Z., & Baranyi, J. (2012). Complexity of the international agro-food trade network and its impact on food safety. *PLoS ONE*, 7(5), 1–7. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0037810>
- EUR-Lex. EC No. 2065/2001. (2001). <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX%3A32001R2065/> Accessed 24.01.15.
- FAO. Fishery and Aquaculture Country Profiles. (2013). [http://www.fao.org/fishery/countrysector/FI-CP\\_BR/en/](http://www.fao.org/fishery/countrysector/FI-CP_BR/en/) Accessed 10.09.15.
- Food and Agriculture Organization (FAO) (2014). *The state of world fisheries and aquaculture 2014*. Rome FAO.
- FDA. The Seafood List. (2016). <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/?set=seafoodlist/> Accessed 20.01.16.
- FDA-PH. Republic Act No. 7394 of Philippines. (1992). <http://www.fda.gov.ph/issuances/305-others/others-republic-act/29036-republic-act-no-7394/> Accessed 24.01.15.
- Filonzi, L., Chiesa, S., Vaghi, M., & Nonnis Marzano, F. (2010). Molecular barcoding reveals mislabelling of commercial fish products in Italy. *Food Research International*, 43(5), 1383–1388. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.04.016>
- Froese, R., & Pauly, D. FishBase. (2015) <http://www.fishbase.org/> Accessed 10.12.15.
- Galal-Khallaf, A., Ardura, A., Mohammed-Geba, K., Borrell, Y. J., & Garcia-Vazquez, E. (2014). DNA barcoding reveals a high level of mislabeling in Egyptian fish fillets. *Food Control*, 46, 441–445. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.06.016>
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & deWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, 270(1512), 313–21. <http://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
- Hogan, Z., Baird, I. G., Radtke, R. M. J., & Zanden, V. (2007) Long distance migration and marine habitation in the Asian catfish *Pangasius krempfi*. *Journal of Fish Biology*. 71, 818-832.
- Huxley-Jones, E., Shaw, J. L. A., Fletcher, C., Parnell, J., & Watts, P. C. (2012). Use of DNA Barcoding to Reveal Species Composition of Convenience Seafood. *Conservation Biology*, 26(2), 367–371. <http://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2011.01813.x>

- Jacquet, J. L., & Pauly, D. (2008). Trade secrets: Renaming and mislabeling of seafood. *Marine Policy*, 32(3), 309–318. <http://doi.org/10.1016/j.marpol.2007.06.007>
- Lowenstein, J. H., Amato, G., & Kolokotronis, S. O. (2009). The real maccoyii: Identifying tuna sushi with DNA barcodes - Contrasting characteristic attributes and genetic distances. *PLoS ONE*, 4(11). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0007866>
- Marko, P. B., Lee, S. C., Rice, A. M., Gramling, J. M., Fitzhenry, T. M., McAlister, J. S., Harper, G. R., & Moran, A. L. (2004). Mislabeling of a depleted reef fish. *Nature*, 430, 309–310.
- Miller, D. D., & Mariani, S. (2010). Smoke, mirrors, and mislabeled cod: Poor transparency in the European seafood industry. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 8(10), 517–521. <http://doi.org/10.1890/090212>
- Nogueira, A. C., Rodrigues, T. (2007). *Criação de tilápias em tanques-rede*. Salvador: SEBRAE.
- Ogden, R. (2008). Fisheries forensics: The use of DNA tools for improving compliance, traceability and enforcement in the fishing industry. *Fish and Fisheries*, 9(4), 462–472. <http://doi.org/10.1111/j.1467-2979.2008.00305.x>
- Pepe, T., Trotta, M., Marco, I. Di, Bautista, J. M., & Cortesi, M. L. (2007). Fish Species Identification in Surimi-Based Products Fish Species Identification in Surimi-Based Products, 3681–3685. <http://doi.org/10.1021/jf063321o>
- Rasmussen, R. S., & Morrissey, M. T. (2008). DNA-based methods for the identification of commercial fish and seafood species. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 7(3), 280–295. <http://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2008.00046.x>
- Ratnasingham, S., & Hebert, P. D. N. (2007) BOLD: The barcode of life data system [www.barcodinglife.org](http://www.barcodinglife.org). *Molecular Ecology Notes*, 7, 355–364.
- Roberts, T.R. (1993). Artisanal fisheries and fish ecology below the great waterfalls of the Mekong River in southern Laos. *The Natural History Bulletin of the Siam Society*, 41, 31- 62.
- Triantafyllidis, A., Karaiskou, N., Perez, J., Martinez, J. L., Roca, A., Lopez, B., & Garcia-Vazquez, E. (2010). Fish allergy risk derived from ambiguous vernacular fish names: Forensic DNA-based detection in Greek markets. *Food Research International*, 43(8), 2214–2216. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.07.035>
- Vallandro, M. J. Avaliação da qualidade microbiológica de sashimis a base de salmão, preparados em restaurantes especializados em culinária japonesa na cidade de Porto Alegre-RS. (2010).



<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/28854/000773619.pdf?sequence=1/>  
Accessed 17.11.15

Vidthayanon, C. & Hogan, Z. *Pangasianodon hypophthalmus*. (2011).  
<http://www.iucnredlist.org/details/180689/0/> Accessed 28.12.15.

Viñas, J., & Tudela, S. A. (2009) Validated Methodology for Genetic Identification of Tuna Species (genus *Thunnus*). *PLoS ONE*, 4, 7606.

Ward, R. D., Zemlak, T. S., Innes, B. H., Last, P. R., & Hebert, P. D. N. (2005). DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 360(1462), 1847–1857.  
<http://doi.org/10.1098/rstb.2005.1716>

Warner, K., Timme, W., Lowell, B., Hirshfield, M. (2013) Oceana Study Reveals Seafood Fraud Nationwide. *Oceana*. Retrieved, 16.

Wong, E. H. K., & Hanner, R. H. (2008). DNA barcoding detects market substitution in North American seafood. *Food Research International*, 41(8), 828–837.  
<http://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.07.005>

## II. CAPÍTULO 2

### **Otimização e Validação do ensaio genético qualitativo de identificação de espécies de pescado por DNA Barcode para fins de acreditação segundo os requisitos ABNT NBR ISO/IEC 17025**

#### **1. INTRODUÇÃO**

Segundo Wood (1999), os parâmetros de desempenho dos métodos analíticos, de vários artigos publicados, contêm poucas informações. Por este motivo deve-se fazer a validação dos métodos, já que estes podem não ser confiáveis para o uso direto no laboratório. Em 1946, foi criada na Suíça a Organização Internacional de Normalização (ISO), com a junção de duas organizações: a *United Nations Standards Coordinating Committee* e a *International Federation of the National Standardizing Associations*. Atualmente, a ISO é uma das maiores organizações que desenvolvem normas, com órgãos de normalização em mais de 160 países. Seu objetivo é padronizar procedimentos, visando facilitar o comércio e promover boas práticas de gestão, além do avanço tecnológico e disseminação de conhecimentos (INMETRO, 2016a).

O Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) é a entidade responsável pela operacionalização do sistema brasileiro de acreditação. O INMETRO iniciou suas atividades com o objetivo de implementar uma rede de laboratórios acreditados em conformidade ao documento ABNT ISO/IEC, Guia 58 (INMETRO 2016b).

Segundo a ABNT NBR ISO/IEC 17000 (ABNT, 2005a), a acreditação é voluntária e representa o reconhecimento formal da competência de um laboratório ou organização para desenvolver tarefas específicas, segundo requisitos estabelecidos. A atestação realizada por terceira parte, relativa a um órgão de avaliação da conformidade, exprime a demonstração formal de sua competência para realizar tarefas específicas. Para laboratórios, a acreditação é concedida com base na ABNT NBR ISO/IEC 17025 (ABNT, 2005b). A Norma ISO/IEC

17025:2005 é a norma internacional que trata dos requisitos para a implementação de sistemas de gestão da qualidade em laboratórios de ensaio e calibração (ABNT, 2005b).

A validação deve ser abrangente o suficiente para atender às necessidades de uma determinada aplicação ou área de aplicação (INMETRO, 2010). Os laboratórios devem registrar os resultados obtidos e os procedimentos utilizados para a validação, bem como fazer uma declaração de que os métodos são adequados para o uso pretendido. A Figura 1 ilustra a inter-relação entre a validação e outras ferramentas de garantia da qualidade na acreditação de sistemas de gestão de laboratórios (Taverniers et al., 2004).

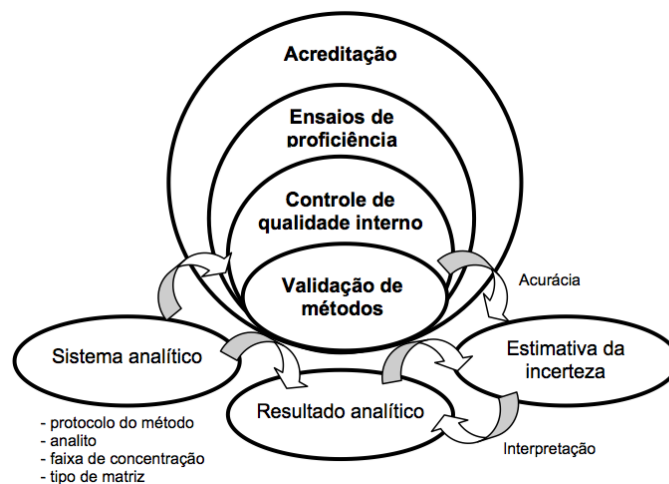


Figura 1: A validação e a inter-relação entre acreditação e qualidade. Adaptado de VALENTINI et al., (2013)

Segundo Valentini et al. (2013), validar um processo, equipamento, sistema ou metodologia é tornar legítimo, por meio do estabelecimento de documentações, tudo que envolve o processo de produção e controle de qualidade, desde as condições do ambiente até os insumos e matérias-primas que entram em sua composição. Validar significa garantir que o produto seja sempre fabricado da mesma forma, com a mesma qualidade e dentro dos limites de tolerância pré-estabelecidos.

O trabalho de revisão de Gondim et al., (2011), apresenta duas classificações para métodos de ensaio: os quantitativos e os qualitativos. Os métodos quantitativos são os que conseguem determinar a quantidade de um analito em uma amostra com valores numéricos (União Europeia, 2002; Cádenas e Valcárcel, 2005). Já os métodos qualitativos permitem apenas a

identificação do analito com base em suas propriedades físicas, químicas ou biológicas (União Europeia, 2002). A resposta é binomial (presença/ausência) e pode ser obtida por intermédio de *kits* de testes e instrumentos de medidas (Pulido et al., 2003).

Para fazer a validação de métodos qualitativos, não existe atualmente um guia que contenha os parâmetros que devam ser considerados. No entanto, de acordo com o guia harmonizado pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC International), *International Standards Organization* (ISO) e *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) (Thompson et al., 2002), não há diferenças entre os dois tipos de métodos (quantitativos e qualitativos) no que diz respeito aos parâmetros.

Vários parâmetros são relacionados em diversos documentos, sendo alguns deles: limite de detecção (LD), precisão, que engloba a repetitividade e a reprodutibilidade. Como dito anteriormente, há dificuldade em saber quais parâmetros devem ser utilizados em validações qualitativas por não haver um guia harmonizado. De qualquer forma, a robustez é mencionada no documento da União Europeia (2002) e do INMETRO (2010). Por outro lado, no guia da EURACHEM (1998), apesar de não ser considerada a robustez, são mencionados estudos de falso-positivos e falso-negativos, que não são relatados em outros documentos.

Inúmeros ensaios, exames e medições são feitos todos os dias em vários laboratórios em todo o mundo. Existem diversas razões que os sustentam, por exemplo: valorização de mercadorias para fins comerciais; verificação da qualidade da alimentação humana e animal; análise forense de fluidos corporais em investigações criminais.

A acreditação, conforme o INMETRO (2016c), é uma maneira segura de identificar aqueles que oferecem alto grau de confiança em seus serviços e agregam valores tanto mercadológicos como econômicos. Como vantagens lista-se a conquista de novos mercados, o aumento da confiança dos clientes, a evidência da competência técnica, o reconhecimento e aceitação nacional e internacional de suas atividades, além do aprimoramento das práticas laboratoriais.

Segundo a ABNT NBR ISO/IEC 17025 (ABNT, 2005b), visando confirmar se os métodos são apropriados para o uso pretendido, os laboratórios devem validar os procedimentos não normalizados, procedimentos desenvolvidos pelo próprio laboratório, procedimentos

normalizados usados fora dos escopos para os quais foram concebidos, e ampliações e modificações de métodos normalizados.

A Instrução Normativa Nº 34, de 14 de julho de 2011, publicada pelo Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) (MAPA, 2011), determina que os laboratórios, para obterem o credenciamento pelo MAPA, têm como obrigação apresentar comprovante de acreditação na Norma ABNT NBR ISO/IEC 17025 (ABNT, 2005b), emitido pelo INMETRO, válido e atualizado, para todos os ensaios para os quais o credenciamento for solicitado.

Neste estudo, o ensaio de identificação de espécies utilizando o *DNA Barcode* foi otimizado para o uso no laboratório, visando um resultado confiável, preciso e com menor custo. Após realizada a validação do ensaio genético qualitativo de identificação de espécies de pescado, será possível pedir a acreditação deste ensaio no escopo do Laboratório de Genética da Escola de Veterinária da UFMG.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram feitos testes para identificar a seletividade, incidências de resultados falso-positivos e negativos, limite de detecção e precisão do ensaio para fins de acreditação, segundo os requisitos ABNT NBR ISO/IEC 17025 e EURACHEM 1998.

As espécies de peixes utilizadas foram: Tilápia (*Oreochromis niloticus*), Merluza (*Merluccius hubbsi*), Polaca do Alasca (*Gadus chalcogrammus*), Salmão (*Salmo salar*) e Truta (*Oncorhynchus mykiss*), as amostras foram armazenadas em microtubos de 1,5mL com álcool 95% à 4°C, no Laboratório de Genética Animal da Escola de Veterinária da UFMG.

### 2.1 Extração do DNA

O DNA foi extraído pelo método de *Salting Out*, descrito por Aljanabi e Martinez (1997). Após a extração, foi feita a quantificação do DNA utilizando-se o espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific®), considerando-se a proporção de 1,8 no parâmetro A260/A280 como sendo um DNA puro (Thermo Scientific, 2011). Posteriormente, a amostra foi dividida em alíquotas que foram armazenadas em microtubos de 200µl a 4°C até o uso.

## 2.2 PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

A PCR consistiu nas seguintes condições de volume e concentração dos reagentes: Tampão 1x, MgCl<sub>2</sub> (50mM), primer (0,01mM), dNTP (0,05mM) e Taq DNA polimerase (0,5u), em um volume final de 10µl. As amplificações foram realizadas com um passo inicial de desnaturação a 94°C por 1 min, 35 ciclos de 94°C por 60s, 54°C por 90s e 72°C por 60s, seguido por um passo de extensão final a 72°C por 5 min, em termociclador Veriti<sup>®</sup> 60-Well Thermal Cycler (Thermo Scientific<sup>®</sup>). Fragmentos de aproximadamente 650 pares de base do gene COI foram amplificados utilizando os pares de iniciadores apresentados em Ward et al. (2005).

## 2.3 Sequenciamento e Análise dos dados

As sequências foram determinadas bi-direcionalmente pelo método *ABI Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit* de acordo com instruções do fabricante (Thermo Fisher, EUA) e analisadas no aparelho ABI 3130 (Thermo Scientific<sup>®</sup>) no Laboratório de Genética Animal da Escola de Veterinária da UFMG. Os cromatogramas foram analisados manualmente e as sequências de DNA manipuladas no software *SeqScape V2.7* (Thermo Scientific<sup>®</sup>). Após as análises, as sequências foram comparadas no banco de sequencias nucleotídicas online *BOLD System* (<http://www.boldsystems.org>) para a identificação das espécies.

## 2.4 Limite de detecção (LD)

O ensaio utilizou uma concentração de 100 ng de DNA/µL. Foram testadas amostras em menores concentrações (50, 40, 30 e 25 ng de DNA/µL) até que se atingisse concentração insuficiente para análise. Uma tabela contendo os números de resultados detectados e não detectados em função do nível de concentração de analito foi elaborada. Em seguida, a tabela foi analisada para determinação do ponto em que o método passa a apresentar resultados não detectáveis para as amostras adicionadas. O menor nível de concentração estudado no qual o analito foi detectado para todas as sete replicatas foi considerado como limite de detecção do método, conforme orientações do INMETRO (2010).

## 2.5 Seletividade

Misturas aleatórias contendo DNA das várias espécies foram preparadas segundo as proporções 90/10, 80/20, 70/30 e 60/40, incluindo as seguintes espécies: Salmão/Truta,

Truta/Salmão, Tilápia/Merluza, Merluza/Tilápia, Tilápia/Polaca, Polaca/Tilápia, Merluza/Polaca e Polaca/Merluza. Posteriormente, todo o processo de identificação de espécies foi feito, extração do DNA, PCR, sequenciamento e análise dos dados. A seletividade foi avaliada determinando a porcentagem máxima de DNA da mistura que resultaram em uma identificação eficaz.

### 2.7 Repetibilidade

A precisão é a avaliação da proximidade entre os resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Para a repetibilidade, ou seja, o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas, os ensaios foram realizados sob as mesmas condições de medição. Foram feitas 12 replicatas utilizando os mesmos procedimento, analista, instrumentação e em duas semanas. Segundo INMETRO (2010) eram necessárias sete replicatas mas para fazer o teste estatístico de T Pareado, as doze replicatas foram feitas.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para uma melhor qualidade do ensaio, foi realizado o teste com sete amostras de cada uma das cinco espécies estudadas para determinar a melhor concentração de DNA que deveria ser utilizada. Para as análises, considerou-se o valor de *Phred*, que está associado à probabilidade de erro da leitura do cromatograma. O valor de *Phred* ou *Quality value* (QV) igual a 30 para uma base, significa que as chances de que esta base tenha sido incorporada erroneamente sejam um em 1000 ou 0,01% (Illumina, 2011). Como demonstrado na Tabela 1, com uma concentração de 100 ng de DNA/ $\mu\text{L}$ , 30 amostras apresentaram mais de 600 pb com o QV acima de 30 no sequenciamento e cinco amostras com mais de 500 pb. Já com 50 ng de DNA/ $\mu\text{L}$ , obtive-se 25 amostras com mais de 600 pb e 8 amostras com mais de 500 pb. Porém, duas amostras apresentaram menos da metade do tamanho do fragmento sequenciado com QV acima de 30, o que não é desejável. Isso se deve a pouca quantidade de DNA utilizada na qual diminui a precisão do ensaio. Sendo assim, ficou estabelecida que a quantidade de 100ng de DNA/ $\mu\text{L}$  é a melhor, visando um teste com melhor qualidade.

Tabela 1: Relação das concentrações do DNA com a qualidade (QV) do sequenciamento (n=35).

Quantidade de pb com QV acima de 30	Amostras com 50 ng de DNA/ $\mu$ L	Amostras com 100 ng de DNA/ $\mu$ L
600	25	30
500	8	5
400	-	-
300	1	-
200	1	-

### 3.1 Limite de detecção (LD)

O LD é a concentração mínima de DNA presente em uma amostra em que o método passa a apresentar resultados não detectáveis para amostras adicionadas. Segundo o INMETRO (2010), deve-se testar o menor nível de concentração em sete replicatas. Foram feitos testes preliminares com três amostras de cada uma das espécies com diferentes concentrações de DNA: 100, 50 e 25 ng de DNA/ $\mu$ L de amostra. Estas concentrações foram utilizadas, pois o teste mostrou a concentração de 100 ng de DNA/ $\mu$ L como a mais confiável. Nas 15 amostras testadas (Tabela 2) não foram obtidos resultados na concentração de 25ng de DNA/ $\mu$ L e nas concentrações de 50 e 100 ng de DNA/ $\mu$ L foram obtidos resultados satisfatórios, todos coincidindo com as espécies previamente identificadas quando comparadas aos bancos de sequencias nucleotídoas online BOLD.

Posteriormente, foi realizado outro teste, incluindo as sete replicatas, com a concentração de 30 e 40 ng/ $\mu$ L (Tabela 3). Essas concentrações foram escolhidas, pois, nos ensaios anteriores, foram obtidos resultado com 50 ng, mas não com 25 ng. Não foram obtidos resultados com concentração de 30 ng de DNA/ $\mu$ L, apenas com 40 ng de DNA/ $\mu$ L, no qual o resultado foi satisfatório. Com a concentração de 30 ng de DNA/ $\mu$ L não se obteve resultado por causa da baixa quantidade de DNA que não é suficiente para o processo de amplificação e sequenciamento. Desta forma, foi determinado o LD do ensaio que é a concentração de 40 ng de DNA/ $\mu$ L. É necessário ressaltar que o LD é a menor concentração na qual se consegue obter um resultado no ensaio, mas a concentração ideal a ser utilizada é de 100 ng de DNA/ $\mu$ L, como dito anteriormente.



Tabela 2: Teste preliminar para identificação do Limite de Detecção do ensaio com as concentrações de 25, 50 e 100 ng/  $\mu$ L de DNA

Amostra	Espécie identificada	25 ng / $\mu$ L	50 ng/ $\mu$ L	100 ng / $\mu$ L		
		Bases sequenciadas	Bases sequenciadas	Bases com High QV	Bases sequenciadas	Bases com High QV
Pol-1	Polaca do Alasca	-	453	363	630	422
Pol-2	Polaca do Alasca	-	564	339	654	632
Pol-3	Polaca do Alasca	-	272	162	652	599
Mer-1	Merluza	-	437	308	640	609
Mer-2	Merluza	-	425	283	652	635
Mer-3	Merluza	-	444	270	644	486
Salm-1	Salmão	-	447	309	648	603
Salm-2	Salmão	-	469	319	558	436
Salm-3	Salmão	-	479	392	645	614
Til-1	Tilápia	-	545	219	645	618
Til-2	Tilápia	-	453	331	655	625
Til-3	Tilápia	-	397	245	470	327
Tru-1	Truta	-	344	229	648	621
Tru-2	Truta	-	440	308	647	626
Tru-3	Truta	-	456	311	658	602

Tabela 3: Teste final para identificação do Limite de Detecção do ensaio com as concentrações de 30 e 40 ng/  $\mu$ L de DNA

Amostra	Espécie identificada	Bases sequenciadas	
		30 ng / $\mu$ L	40 ng/ $\mu$ L
Pol-1	Polaca do Alasca	-	354
Pol-2	Polaca do Alasca	-	157
Mer-1	Merluza	-	324
Salm-1	Salmão	-	143
Til-1	Tilápia	-	234
Tru-1	Truta	-	286
Tru-2	Truta	-	294

### 3.2 Seletividade

A especificidade do método foi avaliada através da comparação de misturas artificiais contendo diferentes porcentagens de DNA das espécies avaliadas. Foram utilizadas as proporções 90/10, 80/20, 70/30 e 60/40, incluindo as seguintes espécies: Salmão/Truta, Truta/Salmão, Tilápia/Merluza, Merluza/Tilápia, Tilápia/Polaca, Polaca/Tilápia, Merluza/Polaca e Polaca/Merluza.

Todas as amostras testadas resultaram em sequências identificadas com a espécie de maior concentração de DNA, quando comparadas ao bancos de dados online (BOLD) (Tabela 4).

O percentual de identidade pode variar dependendo dos grupos de animais. Por exemplo, diferentes espécies de vertebrados normalmente apresentam divergência nas sequências de mais de 2% para o gene do citocromo b (Avisé e Walker, 1999). Por outro lado, Hebert et al. (2003) utilizaram um valor de até 3% como corte (*threshold*) para lepidópteros. No presente estudo, foi utilizada a margem de corte de até 2% para a identificação de cada espécie, como também feito por Armani et al, (2015), Barbutto et al, (2010), Cawthorn et al. (2012), Di Pinto et al. (2013).

Os resultados das misturas apresentaram menos de 98% de similaridade (Tabela 4), ficando abaixo da margem de corte estabelecida, não sendo considerado um resultado satisfatório para identificar a espécie com precisão. Segundo o INMETRO (2016d), um método que produz

respostas para apenas um analito é chamado específico e o que produz respostas para vários analitos, mas que consegue distinguir a resposta entre eles, é chamado seletivo. Com isto, após a análise dos resultados, o ensaio proposto demonstrou ser específico, e pode ser utilizado somente para amostras puras, que não contenham misturas, como em filés, postas ou peixes inteiros, mas não em embutidos mistos.

Tabela 4: Teste para avaliação da Seletividade do ensaio com misturas de DNA de outra espécie em quatro proporções

<b>Espécie com maior concentração de DNA</b>	<b>Espécie com menor concentração de DNA</b>	<b>% de Mistura</b>	<b>Espécie Identificada</b>	<b>% de identidade no BOLD</b>	<b>Seria aceita?</b>
Salmão	-	100/0	<i>Salmo Salar</i>	100%	Sim
Salmão	Truta	90/10	<i>Salmo Salar</i>	94,06	Não
Salmão	Truta	80/20	<i>Salmo Salar</i>	92,25	Não
Salmão	Truta	70/30	<i>Salmo Salar</i>	95,01	Não
Salmão	Truta	60/40	<i>Salmo Salar</i>	93,97	Não
Truta	-	100/0	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	100%	Sim
Truta	Salmão	90/10	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	95,65	Não
Truta	Salmão	80/20	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	95,64	Não
Truta	Salmão	70/30	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	96,13	Não
Truta	Salmão	60/40	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	93,92	Não
Tilápia	-	100/0	<i>Oreochromis niloticus</i>	100%	Sim
Tilápia	Merluza	90/10	<i>Oreochromis niloticus</i>	95,58	Não
Tilápia	Merluza	80/20	<i>Oreochromis niloticus</i>	91,35	Não
Tilápia	Merluza	70/30	<i>Oreochromis niloticus</i>	89,98	Não
Tilápia	Merluza	60/40	<i>Oreochromis niloticus</i>	91,9	Não
Tilápia	Polaca do Alasca	90/10	<i>Oreochromis niloticus</i>	96,93	Não
Tilápia	Polaca do Alasca	80/20	<i>Oreochromis niloticus</i>	96,78	Não
Tilápia	Polaca do Alasca	70/30	<i>Oreochromis niloticus</i>	94,86	Não
Tilápia	Polaca do Alasca	60/40	<i>Oreochromis niloticus</i>	94,04	Não

Merluza	Alasca	-	100/0	<i>Merluccius hubbsi</i>	100%	Sim
Merluza	Tilápia	-	90/10	<i>Merluccius hubbsi</i>	93,85	Não
Merluza	Tilápia	-	80/20	<i>Merluccius hubbsi</i>	88,27	Não
Merluza	Tilápia	-	70/30	<i>Merluccius hubbsi</i>	94,15	Não
Merluza	Tilápia	-	60/40	<i>Merluccius hubbsi</i>	96,35	Não
Merluza	Polaca do Alasca	-	90/10	<i>Merluccius hubbsi</i>	94,37	Não
Merluza	Polaca do Alasca	-	80/20	<i>Merluccius hubbsi</i>	93,34	Não
Merluza	Polaca do Alasca	-	70/30	<i>Merluccius hubbsi</i>	91,96	Não
Merluza	Polaca do Alasca	-	60/40	<i>Merluccius hubbsi</i>	90,07	Não

<b>Espécie com maior concentração de DNA</b>	<b>Espécie com menor concentração de DNA</b>	<b>% de Mistura</b>	<b>Espécie Identificada</b>	<b>% de identidade no BOLD</b>	<b>Seria aceita?</b>
Polaca do Alasca	-	100/0	<i>Gadus chalcogrammus</i>	100%	Sim
Polaca do Alasca	Tilápia	90/10	<i>Gadus chalcogrammus</i>	93,03	Não
Polaca do Alasca	Tilápia	80/20	<i>Gadus chalcogrammus</i>	89,76	Não
Polaca do Alasca	Tilápia	70/30	<i>Gadus chalcogrammus</i>	91,34	Não
Polaca do Alasca	Tilápia	60/40	<i>Gadus chalcogrammus</i>	88,34	Não
Polaca do Alasca	Merluza	90/10	<i>Gadus chalcogrammus</i>	89,73	Não
Polaca do Alasca	Merluza	80/20	<i>Gadus chalcogrammus</i>	95,94	Não
Polaca do Alasca	Merluza	70/30	<i>Gadus chalcogrammus</i>	87,98	Não
Polaca do Alasca	Merluza	60/40	<i>Gadus chalcogrammus</i>	96,89	Não

### 3.3 Precisão

A precisão foi avaliada através da repetitividade (precisão intra-corrída), sendo testadas replicatas de sete amostras, conforme as normas do INMETRO (2010).

A mensuração da repetitividade do sequenciamento de DNA foi estimada pela quantidade de bases sequenciadas e sua qualidade (Tabela 5), utilizando uma amostra aleatória. Todos os procedimentos utilizados na metodologia deste trabalho (extração de DNA, PCR, sequenciamento e análise dos dados) foram feitos separadamente para cada uma das sete replicatas.

Tabela 5: Análise de 12 amostras para a identificação da Precisão do ensaio

Replicatas	Número de bases sequenciadas	Número de bases com QV <i>High</i>	Número de bases com QV <i>Medium</i>	Número de bases com QV <i>Low</i>
1	656	644	12	0
2	648	639	9	0
3	645	632	13	0
4	658	637	21	0
5	650	631	19	0
6	655	634	21	0
7	663	647	16	0
8	652	642	10	0
9	654	640	14	0
10	662	644	18	0
11	654	645	9	0
12	659	642	17	0

A quantidade de bases sequenciadas e sua qualidade podem ser observadas no programa *Sequencing Analysis Software* (Thermo Fisher, EUA). O QV é o valor de *Phred* atribuído à base sequenciada. Neste programa, classifica-se uma base como *High* quando o valor de *Phred* maior é do que 20. Isto significa mais de 99% de certeza de que aquela base não foi incorporada erroneamente. De forma similar, vai de 15 a 20 na classificação *Medium* (99 a 96,8%) e menos do que 15 na *Low* (menos de 96,8%).

Os resultados obtidos nos ensaios de repetitividade demonstram que foi possível ajustar todos os parâmetros de forma correta e que o protocolo está pronto para uso. Em todas as sete replicatas, obtivemos mais de 645 bases sequenciadas e pelo menos 630 bases com o QV acima de 30, o que nos confere uma maior confiança na identificação das espécies. Este resultado é confirmado pelo teste estatístico T Pareado que não demonstrou diferenças significativas entre eles.

Como resultados dos testes realizados, o processo foi otimizado em todas as etapas, incluindo diminuição de tempo e reagentes. Na extração de DNA foi reduzido o tempo, volume dos reagentes; na amplificação do DNA reduziu-se em 60% o volume de reagentes (principalmente a enzima Taq Polimerase); no sequenciamento, reduziu-se em 75% a quantidade do *Big Dye* na reação.

Segundo a norma ABNT ISO/TR 10013 (2002), alguns documentos são obrigatórios para o sistema de gestão da qualidade. Nesse sentido, a Instrução de Trabalho (IT) e os Registros que serão utilizados durante o ensaio são essenciais. Todos estes documentos foram elaborados, conforme o Manual da Qualidade do Laboratório de Genética da Escola de Veterinária, que já possui acreditação ISO 17025 para os ensaios de testes de identificação genética e confirmação de genealogia para bovinos, equinos e bubalinos.

Segundo Taverniers et al (2014), os métodos só podem ser considerados oficiais com a validação intralaboratorial e interlaboratorial, sendo estes complementares, ou seja, não excluindo um ao outro. Para realizar a validação interlaboratorial, deve-se ter a validação intralaboratorial completa e contar com a participação de outro laboratório que possua os equipamentos e reagentes necessários, além de pessoal qualificado para repetir o ensaio.

A Coordenação Geral de Acreditação do INMETRO (CGCRE) é o acreditador de órgãos de avaliação da conformidade, tendo total responsabilidade e autoridade sobre todos os aspectos referentes à acreditação. Atualmente, são mantidos acordos de reconhecimento mútuo com 72 órgãos de acreditação em 50 países, atuando como ferramentas facilitadoras do comércio e uma base técnica para os acordos de comércio exterior entre governos (MDIC, 2008). Com isto um produto, que tenha sua espécie identificada pelo Laboratório de Genética da Escola de Veterinária da UFMG, sendo ele acreditado pelo INMETRO, não precisa passar por outra identificação em qualquer um dos países com os quais o governo brasileiro mantém acordos

de comercio exterior. Isto facilita a entrada de produtos em outros mercados de forma considerável.

#### 4. CONCLUSÃO

Conforme definido pelo ILAC 2010, métodos não normalizados são aqueles desenvolvidos pelo próprio laboratório, ou adaptados a partir de métodos normalizados e validados. O *Food and Drug Administration* (FDA) utiliza o método de DNA Barcode para identificação de espécies de peixes nos Estados Unidos mas os *primers*, bem como outros reagentes utilizados, são diferentes dos utilizados pelo Laboratório de Genética EV-UFMG. Assim, foi necessário validar este método. Com isto, a técnica foi otimizada de forma a gastar menos reagentes e diminuir o tempo para o processamento. Para a validação foram utilizados os parâmetros definidos pelo INMETRO, (limite de detecção, seletividade e repetibilidade). O método foi considerado seletivo para o analito que é utilizado para a identificação das espécies e tendo seu limite de detecção determinado. Com isso, o ensaio padronizado pode ser incluído no escopo do Laboratório de Genética da Escola de Veterinária da UFMG e posteriormente o credenciamento junto ao MAPA.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. *ABNT NBR ISO/IEC17000 Avaliação de conformidade — Vocabulário e princípios gerais*. Rio de Janeiro: 2005a. 18p.

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. *ABNT NBR ISO/IEC17025 Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração*. Rio de Janeiro: 2005b. 31p.

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas.. *ABNT ISO/TR 10013 Diretrizes para a documentação de sistema de gestão da qualidade*. Rio de Janeiro: 2002. 11p.

ALJANABI, S. M., & MARTINEZ, I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*. v.25, n.22, p.4692-4693, 1997.

- ARMANI, A.; GUARDONE, L.; LA CASTELLANA R.; et al. DNA barcoding reveals commercial and health issues in ethnic seafood sold on the Italian market. *Food Control* v.55, p.206-214, 2015.
- AVISE, J. C. e WALKER, D. Species realities and numbers in sexual vertebrates: perspectives from an asexually transmitted genome. *proceedings of the National Academy of Sciences. USA* v.96, p.992– 995, 1999.
- BARBUTO, M., GALIMBERTI, A.; FERRI, E.; et al. DNA barcoding reveals fraudulent substitutions in shark seafood products: The Italian case of “palombo” (*Mustelus* spp.). *Food Research International*. v.43, p.376–381, 2010.
- CÁDENAS, S. e VALCÁRCEL, M. Analytical features in qualitative analysis. *Trends in Analytical Chemistry*. v.24, p.477-87, 2005.
- CAWTHORN, D.M.; STEINMAN, H.A.; WITTHUHN, R.C. DNA barcoding reveals a high incidence of fish species misrepresentation and substitution on the South African market. *Food Research International*, v.46, p.30–40, 2012.
- DI PINTO, A.; DI PINTO, P; TERIO, V.; et al. DNA barcoding for detecting market substitution in salted cod fillets and battered cod chunks. *Food Chemistry*, v.141, p.1757–1762, 2013.
- EURACHEM. *The fitness for purpose of analytical methods, a laboratory guide to method validation and related topics*. Teddington: LGC; 1998. 61p.
- GONDIM, C.S.; JUNQUEIRA, R.G.; SOUZA, S.V.C. Tendências em validação de métodos de ensaios qualitativos. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v.70, p.433-47, 2011.
- HEBERT, P.D.N; CYWINSKA, A; BALL, SL; et al. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London*, v.270, p.313-322, 2003.
- ILLUMINA. *Quality Scores for Next-Generation Sequencing - Technical Note: Sequencing*. 2p. 2011.
- INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. *O que é ISO?*. 2016<sup>a</sup>. Disponível em:



<[http://www.inmetro.gov.br/qualidade/responsabilidade\\_social/o-que-iso.asp](http://www.inmetro.gov.br/qualidade/responsabilidade_social/o-que-iso.asp)>. Acesso em 1 mar. 2016.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. *Conheça o Inmetro*. 2016<sup>b</sup>. Disponível em: <<http://ftp.inmetro.gov.br/inmetro/index.asp>>. Acesso em 1 mar. 2016.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. *Vantagens da Acreditação*. 2016<sup>c</sup>. Disponível em: <<http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/vantagens.asp>>. Acesso em 1 mar. 2016.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. *DOQ-CGCRE-008* 2016<sup>d</sup>. Disponível em: <[http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/organismos/doc\\_organismos.asp?tOrganismo=BPL&iacao=imprimir](http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/organismos/doc_organismos.asp?tOrganismo=BPL&iacao=imprimir)>. Acesso em 13 ago. 2016.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. *DOQ-CGCRE-008. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos*. Rio de Janeiro: INMETRO, 2010. 35p.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa 34/2011, de 14 de jul. *Diário Oficial*, Brasília, 2011.

MDIC - Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Portaria 82, de 1 de abr. *Diário Oficial*, Brasília, 2008.

PULIDO, A.; RUISÁNCHEZ, I.; BOQUÉ, R.; et al. Uncertainty of results in routine qualitative analysis. *Trends in Analytical Chemistry*. v. 22, p. 647-654, 2003.

TAVERNIERS, I.; DE LOOSE, M.; VAN BOCKSTAELE, E. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 23, p. 535-552, 2004.

THERMO SCIENTIFIC. *T042 - TECHNICAL BULLETIN NanoDrop Spectrophotometers*. 2p. 2011.

THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *Pure and Applied Chemistry*, v.74, p.835-55, 2002.

UNIÃO EUROPEIA. Commission decision 2002/657/ EC - 12 ago. 2002.. *Official Journal of the European Communities*; 2002.

VALENTINI, S.R.; SOMMER, W.A; MATIOLI, G. Validação de métodos analíticos. *Arquivos do Museu Dinâmico Interdisciplinar*, v. 11, n. 2, p. 26-31, 2013.

WARD, R.D.; ZEMLAK, T.S.; INNES, B.H.; et al. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*, v.360, p.1847-1857, 2005.

WOOD, R. How to validate analytical methods. *Trends in Analytical Chemistry.*, v.18, p.624-632, 1999.

### III. CAPÍTULO 3

#### **Desenvolvimento e demonstração de eficácia de método para identificação molecular de espécies de Salmão e Trutas**

##### **1. INTRODUÇÃO**

O grupo de Salmão do Pacífico é composto por seis espécies estreitamente relacionadas filogeneticamente do gênero *Oncorhynchus*: chum (*Oncorhynchus keta*), coho (*O. kisutch*), salmão real (*O. tshawytscha*), rosa (*O. gorbuscha*), sockeye (*O. nerka*) e o japonês cereja (*O. masou*). Por outro lado, o Salmão do Atlântico (*Salmo salar*), é menos intimamente relacionado aos outros, pertencendo a um outro gênero. Do Salmão do Pacífico, somente o coho e real são cultivados, numa escala limitada, enquanto que, em nível mundial, mais de 90% do salmão de cativeiro é o Salmão do Atlântico (FAO, 2016a).

A piscicultura mundial de água doce é dominada pela produção de carpas, com várias espécies entre as primeiras posições do ranking de produção, seguidas pela tilápia do Nilo. Uma espécie ainda se destaca, o Salmão do Atlântico (*Salmo salar*), que, apesar de ter a produção um pouco maior que o panga, é a espécie mais valorizada no ranking mundial da FAO, com as maiores receitas econômicas por quilo produzido. O mesmo acontece com a Truta-Arco-Íris (*Oncorhynchus mykiss*), que está na 14<sup>a</sup> posição em relação à sua produção e 7<sup>a</sup> em relação à valores (FAO, 2106b).

O Brasil vem, cada vez mais, importando pescado. Em 2013, foram importados mais de 383 milhões de toneladas, totalizando quase 1,4 milhões de dólares. O salmão ficou em segundo lugar com mais de 74 milhões de toneladas, perdendo somente para a merluza. Já a truta tem uma importação bem menos significativa, quando comparada ao salmão, pouco mais de 2 milhões de toneladas (MDIC, 2016).

A Truta Arco-Íris (*Oncorhynchus mykiss*), pertencente à ordem Salmoniformes e à família Salmonidae (Fishbase, 2016), teve origem nos rios do nordeste da Ásia e no oeste da América

do Norte. É uma espécie de distribuição cosmopolita, sendo encontrada em todos os países Europeus, da Ásia, América do Norte, Argentina, Chile, Colômbia, Peru, Equador, Venezuela e Bolívia. No Brasil, antes mesmo da década de 1950, esta espécie já estava sendo introduzida (GISP, 2005; Lazzarotto e Caramaschi, 2009; Welcome, 1988).

Na truta arco-íris são encontrados dois tipos de comportamentos: um exclusivo de água doce e outro (*Steel Head Trout*) anádromo, ou seja, peixes e outros animais aquáticos que se reproduzem em água doce, mas se desenvolvem até a forma adulta no mar (WDFW, 2016). A truta, na fase de águas oceânicas (*Steel Head Trout*), possui aspecto morfológico externo bem parecido com o *Salmo salar*. Por isso, algumas características são importantes para a diferenciação dessas espécies, como a coloração branca da boca (assoalho) e gengivas (MAPA, 2016).

A truta arco-íris também está presente no Brasil, sendo documentada em alguns estados como Minas Gerais (Magalhães et al., 2002), Rio de Janeiro (Lazzarotto e Caramaschi, 2009) e São Paulo (Faria, 1953), além dos três estados da região sul do país – Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Sosinski, 2004), entre outros. A truta arco-íris é uma das espécies mais dispersas mundialmente, mais cultivadas dentre as espécies de truta e mais comercializadas em todo o mundo (Coloso, 2003).

Por meio de sequenciamento do DNA é possível realizar a identificação de espécies. Além disso, pode-se fazer análises de diferentes fragmentos de DNA, técnica normalmente empregada na análise de microssatélites para estudos populacionais (Lopera-Barrero et al., 2016), genética forense (Algee-Hewitt et al., 2016) e exames de paternidade (Kaiser et al., 2016). Outras metodologias também utilizam a análise de fragmentos de DNA, como o minissequenciamento por SNaPshot<sup>®</sup> (Thermo Fisher, CA, EUA), que utiliza um kit comercializado para a genotipagem de SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*).

Para a identificação de espécies de pescado pode-se utilizar a técnica do DNA Barcode (Ward et al., 2005). Essa técnica utiliza-se do sequenciamento de um fragmento do DNA pelo método de Sanger (Sanger et al., 1977) e, posteriormente uma comparação em um banco de dados chamado Barcode of Life Database (BOLD).

Um SNP é a troca de apenas um nucleotídeo por outro dentro de uma determinada região do DNA, ou seja, cada SNP tem geralmente dois nucleotídeos alternativos em uma determinada posição (Kruglyak, 1997). O minissequenciamento por SNaPshot<sup>®</sup> (Thermo Fisher, CA, EUA) baseia-se na incorporação de dideoxynucleotídeos (ddNTPs) marcados com fluorescência imediatamente após o final do *primer* que se anela em uma região específica. Cada um dos ddNTPs (ddATP, ddCTP, ddGTP e ddTTP) emite um determinado comprimento de onda que é interpretado pelo sequenciador automático como uma determinada cor. A base A é visualizada pela cor verde, T em vermelho, G em azul e C em preto (Applied Biosystems, 2010).

Outra característica importante dos SNPs é sua baixa taxa de mutação, o que os torna marcadores ideais para estudos de paternidade (Sarkar et al., 2016) e identificação de espécies (Cruz et al., 2016). Eles são mais apropriados para o uso em amostras degradadas ou que passaram por processos químicos, pois, como este polimorfismo afeta apenas uma base, a chance do fragmento de interesse estar intacto é muito maior.

No presente estudo, apresenta-se o desenvolvimento de uma metodologia que utiliza a técnica de minissequenciamento para análise de SNPs, com o uso de *primers* específicos para a identificação das principais espécies de salmão e truta.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Desenho dos *primers* para o Minissequenciamento por SNaPshot<sup>®</sup>

As seqüências do DNA mitocondrial das espécies *S. salar*, *S. trutta*, *O. mykiss*, *O. keta*, *O. gorbuscha*, *O. kisutch*, *O. masou*, *O. nerka* e *O. tshawytscha* foram obtidas no banco de dados *MitoFish* (Iwasaki et al., 2013) e alinhadas com o software *Geneious*<sup>®</sup> 6.0.6 (Biomatters, NZ) para a identificação de sítios polimórficos (SNPs) utilizados como posições diagnósticas e desenho dos *primers*. É necessário ressaltar que todas as seqüências de *primers* desenvolvidas neste estudo são inéditas.

Os *primers* para o minissequenciamento foram desenhados no sentido *Forward* ou *Reverse*. Os *primers* foram desenhados buscando-se diferenciar duas ou mais espécies ou gêneros, de acordo com a fluorescência observada. Os *primers* se anelam na região imediatamente

adjacente ao sítio diagnóstico e apresentam diferentes tamanhos. Nos *primers* SnapS\_3 e SnapS\_4, foram adicionadas caudas poliC e poliA, respectivamente, aos terminais 5' para que, em uma eletroforese capilar realizada em multiplex, fosse possível diferenciar os fragmentos por seus tamanhos diferentes.

Está sendo encaminhado o processo de pedido de depósito de patente e, por este motivo, as sequências não serão descritas. Serão citados apenas os nomes - SnapS\_1, SnapS\_2, SnapS\_3, SnapS\_4 e SnapS\_5.

## 2.2 Obtenção das amostras de referência

O desenvolvimento e a padronização da técnica foram feitos utilizando-se amostras de tecido das seguintes espécies: *S. salar*, *O. mykiss*, *O. keta* e *O. gorbuscha*. Não obteve-se as amostras das espécies *S. trutta*, *O. kisutch*, *O. masou*, *O. nerka* e *O. tshawytscha* para a validação.

## 2.3 Extração do DNA

O DNA total de cada espécime foi isolado por meio do método de extração *Salting Out*, descrito por Aljanabi e Martinez (1997). Após a extração, foi feita a quantificação do DNA obtido no aparelho *NanoDrop* (Thermo Fisher, CA, EUA), tomando como base a proporção de 1,8 no parâmetro de A260/A280 como sendo um DNA satisfatório (Thermo Scientific, 2011). Posteriormente, foi feita a confecção de alíquotas que foram armazenadas em microtubos de 200µl a 4°C.

## 2.4 PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

Para garantir a identificação das espécies estudadas, fragmentos de aproximadamente 650 pares de bases (pb) do gene Citocromo Oxidase I (COI) foram amplificados utilizando os pares de *primers* FishF1 e FishR1, descritos por Ward et al. (2005).

A reação da PCR, com volume final de 10µl, consistiu em: Tampão 1x (Promega, Madison USA), MgCl<sub>2</sub> (50mM, Promega, Madison USA), *primer* (0.01mM, IDT), dNTP (0.05mM, Promega, Madison USA) e Taq polimerase (0.5 u, Promega, Madison USA). As amplificações foram realizadas com um passo inicial de desnaturação a 94°C por 2 min, seguido por 35 ciclos de: 94°C por 30 s, 54°C por 30 s e 72°C por 1 min, com uma extensão final a 72°C por 10 min em termociclador *Veriti*<sup>®</sup> 60-Well Thermal Cycler (Thermo Fisher, CA, EUA).

## 2.5 Sequenciamento e Análise dos dados

As sequências bidirecionais foram determinadas utilizando o kit *BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit*, de acordo com instruções do fabricante (Thermo Fisher, CA, EUA). Nesta etapa, também foram utilizados os *primers* FishF1 e FishR1, descritos por Ward et al. (2005).

A precipitação do DNA foi feita em placa de 96 poços e seguiu os seguintes passos: acrescentou-se 2,5 µL de EDTA [125 mM] pH 8,0 e 30 µL de etanol 100% em cada poço. Após homogeneizado, o material foi incubado em temperatura ambiente por 15 minutos. A placa foi centrifugada a 2.200 RCF (Força Centrífuga Relativa) por 45 minutos e, depois de escorrido o sobrenadante, foi acrescentado 30 µL de etanol 70%. A placa foi centrifugada novamente, a 1.850 RCF por 15 minutos. Após retirar o sobrenadante e secar a placa em estufa, acrescentou-se 15 µL de formamida HiDi (Thermo Fisher, CA, EUA). A placa foi agitada para ressuspender o DNA, sendo posteriormente levada ao Sequenciador *ABI 3130 Genetic Analyzer* (Thermo Fisher, CA, EUA) para a eletroforese capilar.

As sequências *Forward* e *Reverse* foram editadas para remoção de bases ambíguas, quando necessário, utilizando o software *SeqScape* (Thermo Fisher, CA, EUA). As sequências geradas foram comparadas àquelas depositadas no banco de dados público *BOLD System* (<http://www.boldsystems.org>), utilizando o método de pesquisa “*All Barcode Records on BOLD*” para a correta identificação das espécies presentes nas amostras utilizadas.

## 2.6 Reação de minissequenciamento por *SNaPShot*<sup>®</sup> e análise dos resultados

A metodologia de minissequenciamento utilizando o kit *SNaPShot*<sup>®</sup> (Thermo Fisher, CA, EUA) foi escolhida para o desenvolvimento do teste de identificação de salmão e trutas em nível de gênero e espécie. Sua utilização se baseou nos polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) observados entre as diferentes espécies.

Para a PCR que antecede a reação de minissequenciamento, foram utilizados os primers SnapS\_1 e SnapS\_2, que se alinham em regiões conservadas entre as espécies. As condições desta PCR foram as mesmas descritas anteriormente (item 2.4 PCR – Reação em Cadeia da Polimerase). Os produtos da PCR foram utilizados para fazer a reação de minissequenciamento. Anteriormente à reação, foi necessário fazer uma purificação para

remover os dNTPs e *primers* que não foram incorporados. Esta etapa foi realizada com o kit *GeneJET PCR Purification Kit* (Thermo Fisher, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

Para fazer as reações de minissequenciamento, foi utilizado o ABI PRISM *SNaPshot*<sup>®</sup> *Multiplex Kit* (Thermo Fisher, CA, EUA) e os *primers* específicos desenhados para a identificação de cada gênero ou espécie na concentração de 0,7 µM, segundo as instruções do fabricante. Juntamente à cada reação, foram adicionados um controle positivo e um controle negativo. As amostras foram amplificadas no termociclador *Veriti*<sup>®</sup> *60-Well Thermal Cycler* (Thermo Fisher, CA, EUA), segundo protocolo do fabricante. Semelhante ao que foi feito na primeira etapa, foi realizada uma purificação para remover os dNTPs e *primers* que não foram incorporados. Entretanto, acrescentamos ao produto a enzima *Exo-Sap USB* (Europe GmbH, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante.

Para a eletroforese capilar, foi adicionado 1 µl do produto do minissequenciamento purificado a 8,5 µl de formamida HiDi (Thermo Fisher, CA, EUA) e 0,5 µl do *GeneScan LIZ 120* (Thermo Fisher, CA, EUA). Posteriormente, as amostras foram corridas no sequenciador automático *ABI 3130 Genetic Analyzer* (Thermo Fisher, CA, EUA). Para a identificação das espécies, os eletroferogramas (picos) foram analisados utilizando-se o software *GeneMapper* (Thermo Fisher, CA, EUA).

### **3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO**

As análises do alinhamento do genoma mitocondrial obtidas pelo *MitoFish* (Iwasaki et. al., 2013) para as espécies de peixes testadas mostraram que alguns nucleotídeos únicos em diferentes posições permitiriam diferenciá-las, não apresentando variações intraespecíficas quando comparados às demais sequências. Sendo assim, *primers* específicos foram desenhados para diferenciar as principais espécies de salmão e truta. O sequenciamento das 20 amostras de referência foi satisfatório, sendo todas elas identificadas com mais de 98% de similaridade quando comparadas no BOLD.

Diante dos dados apresentados, tem-se que o minissequenciamento por *SNaPshot*<sup>®</sup> foi eficaz em identificar as espécies *S. salar*, *O. mykiss*, *O. keta* e *O. gorbuscha*. Como perspectiva, pretendemos realizar o teste nas demais amostras para possível comprovação da eficácia da



metodologia padronizada para as espécies *S. trutta*, *O. kisutch*, *O. masou*, *O. nerka* e *O. tshawytscha*. É importante ressaltar, ainda, que a correta identificação das diferentes espécies é essencial para que o consumidor tenha a certeza de que está pagando o preço adequado pelo produto e consumindo o peixe que realmente desejava comprar.

As amplificações dos fragmentos de DNA de cada espécie (n=20), utilizando os *primers* SnapS\_1 e SnapS\_2, foram feitas em reações de um único ensaio (*singleplex*), pois a padronização é mais rápida do que em *multiplex*.

Durante a padronização da metodologia de minissequenciamento proposta, foram utilizadas inicialmente as concentrações e volumes de reagentes apresentados pelo fabricante (Tabela 1). Como foi obtidos resultados satisfatórios, outras reações de otimização foram feitas, visando diminuir as quantidades utilizadas e, assim, diminuir o custo do teste. Foi reduzido em 50% o volume do kit e do *primer* (teste 2) e o resultado foi satisfatório, ou seja, apresentou picos altos. Foi diminuído para 1 $\mu$ L do kit e 1 $\mu$ L de *primer* (teste 3), continuando com bons resultados e picos altos. Diante desses resultados, a quantidade de *primer* e água foram diminuídas, para que esses reagentes não ficassem em menor concentração (teste 4). Observando que os picos estavam com uma altura satisfatória, o volume do kit foi diminuído mais uma vez (teste 5). Porém, o resultado não foi satisfatório, já que os picos se tornaram muito baixos. Foi mantido o volume do kit em 0,5 $\mu$ L e reduzido as quantidades de *primer* e água (teste 6), pois acreditava que os reagentes estivessem em baixa concentração.

Conforme pode-se observar na Tabela 1, o teste 4 apresentou os melhores resultados de custo-benefício. Por este motivo, ela foi utilizada como padrão na realização do ensaio. Desta forma, foi economizado 80% na quantidade de kit e 50% de *primer*.

Tabela 1: Padronização das quantidades dos reagentes para o método de identificação molecular de Salmão e Truta por minissequenciamento

Teste	Volume em $\mu\text{L}$				
	Kit	Primer	H <sub>2</sub> O	DNA	Volume Final
1	5	1	1	3	10
2	2,5	0,5	4	3	10
3	1	1	5	3	10
4	1	0,5	3	3	7,5
5	0,5	1	5,5	3	10
6	0,5	0,5	3,5	3	7,5

Três espécies podem ser identificadas a partir de apenas uma reação: *S. salar*, *O. mykiss* e *O. keta*. A espécie *O. gorbucha* necessita do uso de duas reações para ser identificada, pois na reação SnapS\_3 apresenta pico verde igual a *O. mykiss*, mas na reação SnapS\_4 apresentam picos vermelhos e verdes, respectivamente.

A reação do SnapS\_5 foi utilizada para diferenciar o gênero *Salmo* de *Oncorhynchus*. Como não foi possível coletar amostras de *S. trutta*, testamos apenas a espécie *S. salar*. Conseguimos, com eficiência, diferenciar a espécie *S. salar* de todas as outras do gênero *Oncorhynchus*. O pico em torno de 34pb com fluorescência em preto (dCTP) faz referência ao gênero *Salmo* (a) e com fluorescência em azul (dGTP) refere-se ao gênero *Oncorhynchus* (b, c, d) (Figura 1). Esta reação foi idealizada para caso o consumidor e/ou a indústria queira, de forma rápida e com apenas uma reação, identificar se o peixe é do gênero *Salmo* ou *Oncorhynchus*.

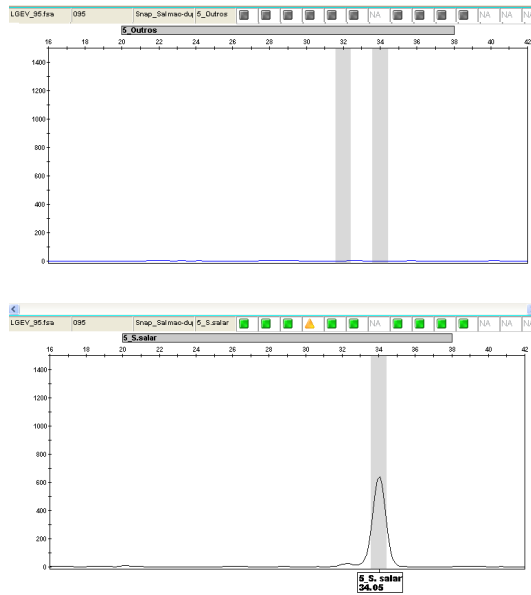
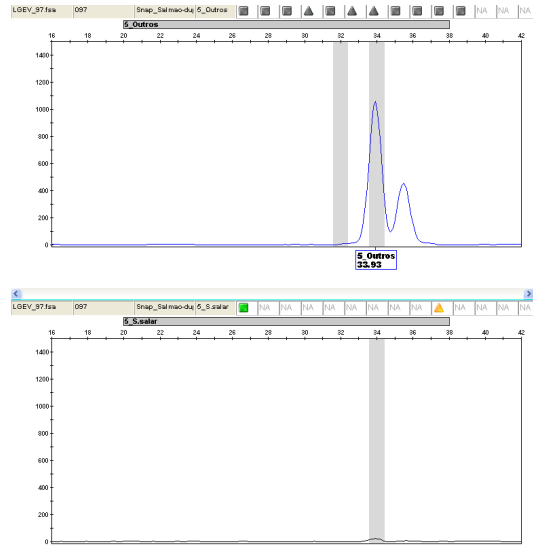
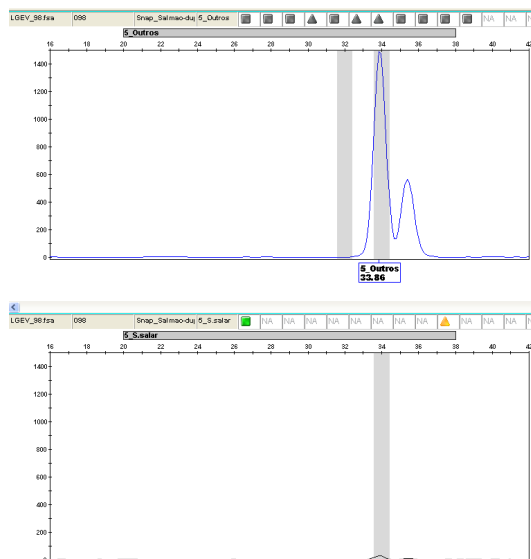
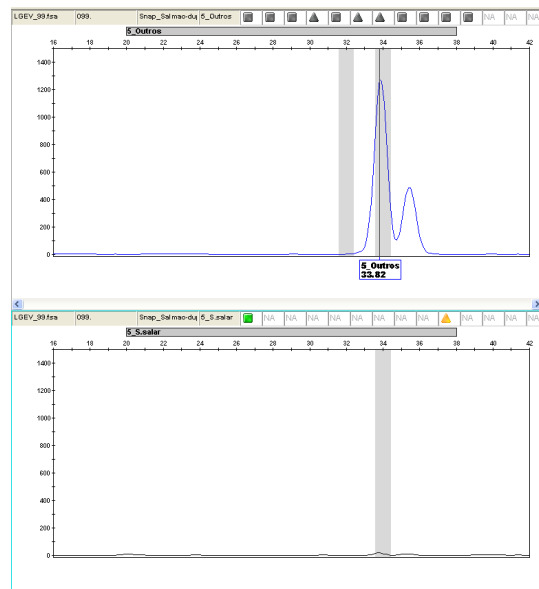
a) *S. salar*b) *O. gorbuscha*c) *O. keta*d) *O. mykiss*

Figura 1: Minissequenciamento utilizando o *Primer SnapS\_5* das amostras de *S. salar*, *O. gorbuscha*, *O. keta* e *O. mykiss*, demonstrando diferencia os gêneros *Salmo* e *Oncorhynchus*.

A reação do SnapS\_4 visa identificar a espécie *O. keta* e diferenciá-la das demais do mesmo gênero – *O. mykiss* e *O. gorbuscha*.

Como observado na (Figura 2), as espécies *O. mykiss* (b) e *O. gorbuscha* (c) apresentam pico verde (em torno de 34pb). Já na espécie *O. keta* (a) este pico não está presente. Isto se deve ao fato de que as espécies *O. mykiss* e *O. gorbuscha* apresentam o nucleotídeo T nesta posição.

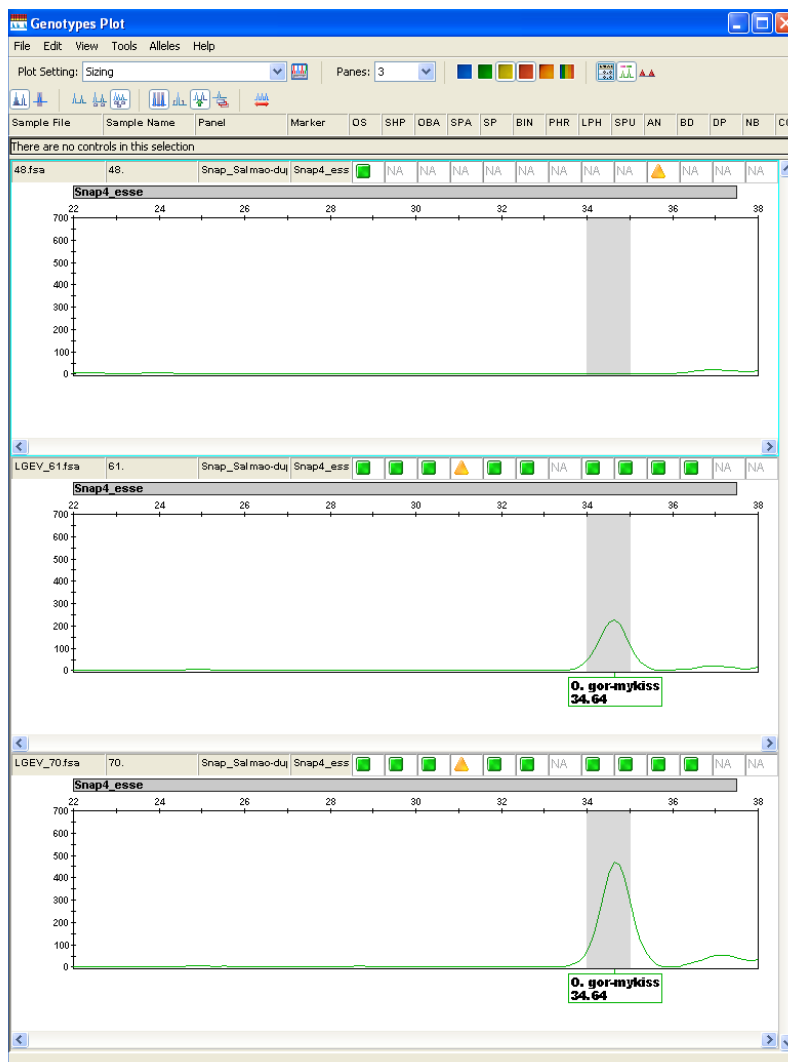


Figura 2: Minissequenciamento utilizando o *Primer* SnapS\_4 das amostras de *O. gorbuscha*, *O. keta* e *O. mykiss*, demonstrando diferença entre *O. keta* e *O. mykiss* / *O. gorbuscha*.

Segundo o Manual de inspeção para identificação de espécies de peixes e valores indicativos de substituições em produtos da pesca e aquicultura (MAPA, 2016), a única espécie que não é considerada e não pode ser comercializada como salmão é *O. mykiss*, conhecida apenas como Truta ou Truta Arco-Íris. Considerando esta informação, procuramos nas sequências disponíveis SNPs que pudessem diferenciar esta espécie, que não pode ser comercializada como salmão.

Na espécie de Truta Arco-Íris são encontrados dois tipos de comportamentos biológico, um que é exclusivamente de água doce e uma outra (*Steel Head Trout*) que é anádromo, que são animais aquáticos que se reproduzem em água doce, mas se desenvolvem até a forma adulta no mar (WDFW, 2016). A truta na fase de águas oceânicas (*Steel Head Trout*), tem o aspecto morfológico externo bem parecido com o *Salmo salar* e algumas características são importantes na diferenciação delas, como a coloração branca da boca (assoalho) e gengivas (MAPA, 2016). Isto torna ainda mais difícil a identificação morfológica destas duas espécies quando elas são capturadas em seu ambiente nativo.

As trutas, como os demais salmonídeos, têm capacidade de re-sintetizar os carotenóides consumidos durante o processo digestivo. Sendo assim, as trutas transferem, sem modificações, os carotenóides presentes em sua dieta para sua carne. Quando isso ocorre nas trutas e

Usando a reação do SnapS\_3, podemos identificar as espécies *S. salar* e *O. mykiss*. Na Figura 3 podemos verificar que o pico em torno de 43pb da cor azul (dGTP) é relacionada à espécie *S. salar* (a) e o de cor verde (dATP) se refere à espécie *O. mykiss* (b). As espécies *O. keta* e *O. gorbuscha* apresentam fluorescência em vermelho.

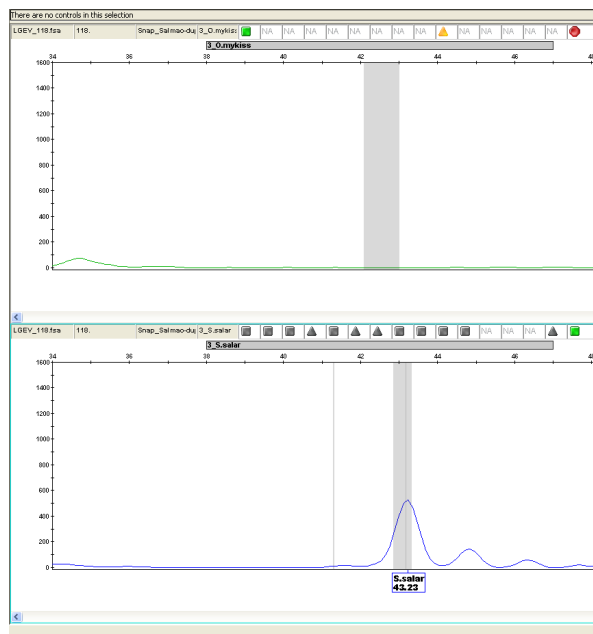
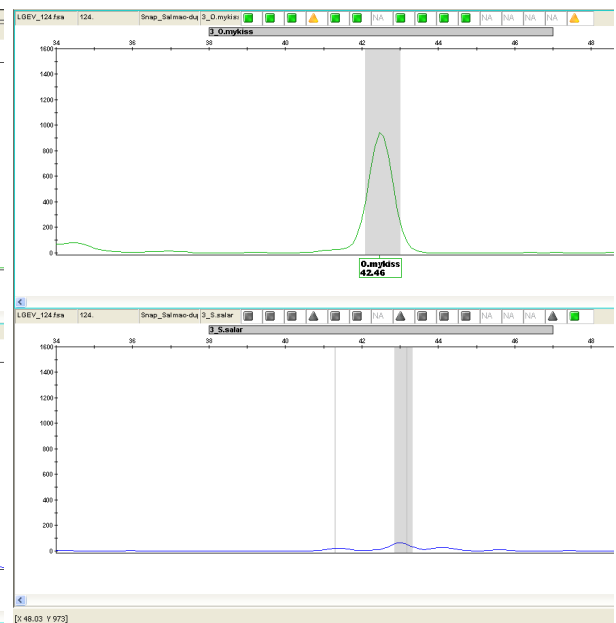
a) *S. salar*b) *O. mykiss*

Figura 3 : Minissequenciamento utilizando o *Primer SnapS\_3* das amostras de *S. salar* e *O. mykiss*, demonstrando diferença entre essas espécies.

Também com esta reação (SnapS\_3) foi possível identificar a espécie *O. gorbuscha*. Na reação de Snap\_4 as espécies *O. mykiss* e *O. gorbuscha* apresentaram o mesmo pico (verde), demonstrando que, naquela posição, as duas espécies possuíam o mesmo nucleotídeo (Figura 4 – a). Entretanto, utilizando o Snap\_3, a espécie *O. mykiss* apresentou pico verde (Figura 4 - b), enquanto a espécie *O. gorbuscha* apresentou pico vermelho (Figura 4 - c). Isto significa que pode-se utilizar duas reações para identificar esta espécie: Snap\_4 - *O. mykiss* (pico verde) e *O. gorbuscha* (pico verde), e posteriormente a reação Snap\_3 - *O. mykiss* (pico verde) e *O. gorbuscha* (pico vermelho).

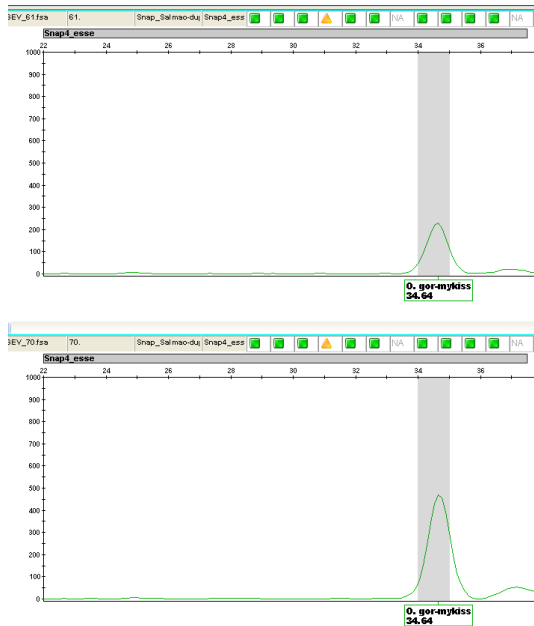
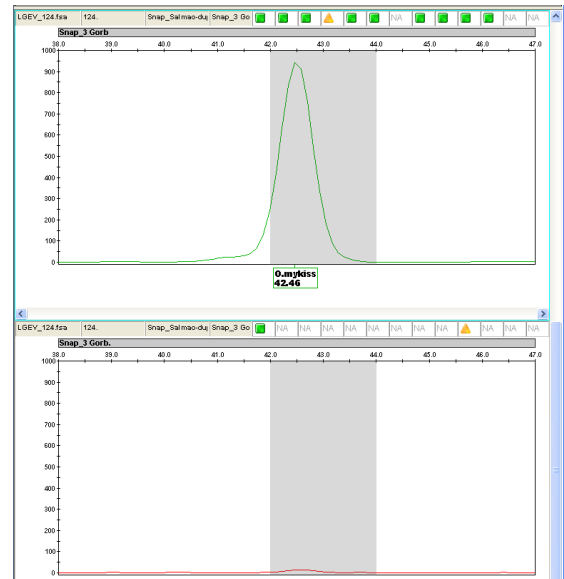
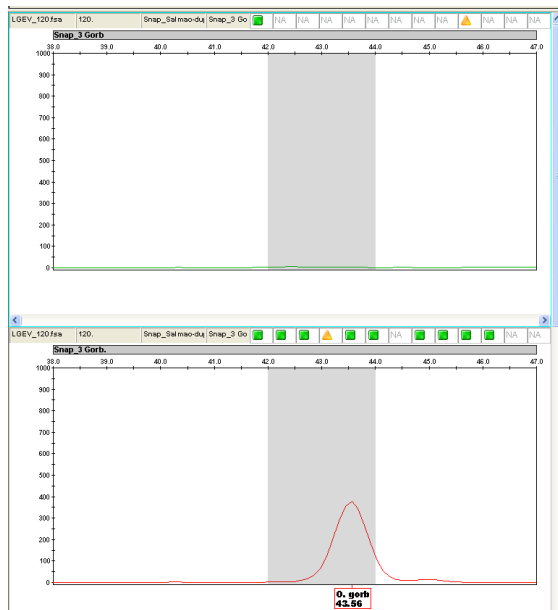
a) *O. mykiss* e *O. gorbuscha*b) *O. mykiss*c) *O. gorbuscha*

Figura 4: Minissequenciamento utilizando em conjunto os *Primers* SnapS\_4 e SnapS\_3 para a diferenciação das espécies *O. mykiss* e *O. gorbuscha*.

A parcela de salmão e truta no comércio mundial aumentou fortemente nas últimas décadas, tornando-se a maior *commoditie* (16,6%) em 2013. No geral, a demanda está crescendo rapidamente, em particular para o *S. salar* cultivado em cativeiro, e novos mercados estão se abrindo através de novos tipos de produtos processados. Os preços de salmão de viveiro têm

flutuado nos últimos dois anos, mas, no geral, permaneceram em níveis elevados. Destaca-se o salmão norueguês, que se espera que vir a representar uma parte crescente nos principais mercados (FAO, 2016b). O preço do quilo do salmão chegou recentemente a R\$60,00, enquanto o da Truta está atualmente em torno de R\$20,00. Ou seja, muito mais barato para o consumidor (G1, 2016).

No Chile, segundo maior produtor e exportador, a indústria do salmão enfrenta queda de preços e custos de produção mais elevados do que na maioria dos outros países produtores (FAO, 2016b). Outro fator agravante foi a crise que o Chile enfrentou há alguns anos em sua salmonicultura, provocada por surtos do vírus da Anemia Infecciosa do Salmão. Como resultado, além da grande perda de peixes, os preços aumentaram e alguns países, como o Brasil, diminuíram sua importação (Garcia, 2011).

Em nível mundial, a aquicultura responde por dois terços da produção total de salmão. A espécie mais cultivada é o Salmão do Atlântico, que representa 93% da produção total da aquicultura (Comissão Europeia, 2016), mas a truta salmonada também tem uma parcela bem significativa na produção. Como dito anteriormente, o *S. salar* possui maior preço em relação aos outros peixes que podem ser comercializados como salmão. Diante disso e do aumento do consumo deste tipo de peixe tanto por ser um produto saudável como pelo grande número de restaurantes japoneses observados atualmente (ACEB, 2014), são de grande importância os testes para identificação de espécies, permitindo que a indústria certifique os produtos e o consumidor tenha maior confiança durante o consumo, comprando o produto de interesse por um preço justo.

Vários marcadores ou técnicas já foram e tem sido utilizados para fazer identificação molecular de espécies, como o DNA Barcode (Carvalho et al., 2011, 2015, Cline; 2012, Lamendin et al., 2015) e uso de genes ribossomais 5S, 12S e 16S (Cawthorn et al 2012, Tognoli et al 2011). Porém, elas dependem de um sequenciamento e análise de comparação em bancos de dados, são demoradas, pois requerem uma etapa de precipitação do DNA, e o tempo de corrida no sequenciador é o dobro do tempo dispendido com a técnica do sequenciamento. Tudo isto faz com que o uso do minissequenciamento por *SNaPshot*<sup>®</sup> para a identificação de espécies se torne mais vantajoso por ser mais rápido, custo-eficiente e pela possibilidade de ser utilizado em amostras degradadas ou quimicamente processadas. Isso



ocorre porque, como este polimorfismo afeta apenas uma base, a chance do fragmento de interesse estar intacto é muito maior.

Esta é a primeira vez em que SNPs são utilizados com a técnica de minissequenciamento por *SNaPshot*<sup>®</sup> para a identificação de espécies de salmão e truta. É necessário ressaltar ainda, que essa metodologia tem sido utilizada, até o momento, na identificação de algumas espécies (Dalmasso, 2010; Bouakaze et al., 2010; Huang et al., 2012).

Reale et al. (2008) demonstraram que, através dos tamanhos dos picos gerados pelo minissequenciamento por *SNaPshot*<sup>®</sup>, é possível estimar a quantidade de DNA presente em uma amostra. Dessa forma, pretende-se utilizar esta relação para identificar a composição de produtos que possam estar em conjunto com outras espécies.

De acordo com os resultados obtidos, a técnica de minissequenciamento por *SNaPshot*<sup>®</sup> permitiu a identificação de algumas espécies de salmão e truta. A metodologia proposta, realizada de forma rápida e com custo acessível, poderá auxiliar os empresários na escolha de seus fornecedores e controle de qualidade de seus produtos, bem como os consumidores a terem maior confiança no que estão adquirindo. Órgãos do Estado pode ainda utilizar esses testes na fiscalização dos produtos para evitar a fraude de pescado, além de regular com maior eficácia produtos exportados e importados. Desta forma, é possível reduzir os prejuízos financeiros em toda a cadeia de comercialização, desde a chegada do peixe à empresa até o consumidor final.

## CONCLUSÃO

A técnica de minissequenciamento por *SNaPshot*<sup>®</sup> se mostrou útil para a identificação das espécies *S. salar*, *O. mykiss*, *O. gorbusha* e *O. keta*. Com essa técnica, utilizando os *primers* aqui descritos, é possível identificar as quatro espécies mais prevalentes no mercado comercial nacional e internacional. Comparando-se esse método com as alternativas disponíveis no mercado e na literatura, a técnica tem como vantagem a alta especificidade, precisão, reprodutibilidade, potencial para automação e maior facilidade de interpretação de resultados para identificação das principais espécies de salmão e trutas de maneira mais

rápida. Todas estas características fazem da metodologia proposta uma ferramenta apropriada para a identificação destas espécies nos produtos. Além disto, há a possibilidade de aplicação deste método para a verificação de autenticidade de espécies importadas, verificação da rastreabilidade de diferentes lotes ao longo da cadeia comercial e verificação da correta rotulagem dos produtos levando à proteção dos direitos do consumidor.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACEB - Associação Cultural e Educacional Brasil. *1o Anuário Brasileiro da Pesca e Aquicultura*. 136P. 2014.

ALGEE-HEWITT, B.F.B.; EDGE, M.D.; KIM, J., et al. Individual Identifiability Predicts Population Identifiability in Forensic Microsatellite Markers. *Current Biology*. v.26, n.7, p935–942, 2016.

ALJANABI, S.M.; MARTINEZ, I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, v.25, n.22, p.4692-4693, 1997.

APPLIED BIOSYSTEMS. *ABI PRISM® SNaPshot™ Multiplex Kit*. 42p. 2010.

BOUAKAZE, C.; KEYSER, C.; DE MARTINO, S.J.; SOUGAKOFF, W.; VEZIRIS, N.; DABERNAT, H.; LUDES, B. Identification and genotyping of Mycobacterium tuberculosis complex species by use of a SNaPshot Minisequencing-based assay. *Journal of clinical microbiology*, v.48, n.5, p.1758-1766, 2010.

CARVALHO, D.C., PALHARES, R.M., DRUMMOND, M.G.; et al. DNA Barcoding identification of commercialized seafood in South Brazil: A governmental regulatory forensic program. *Food Control*. v. 50, p.784–788, 2015.

CARVALHO, D.C.; PIMENTA NETO, D.A.; BRASIL, B.S.A.F.; et al. DNA barcoding unveils a high rate of mislabeling in a commercial freshwater catfish from Brazil. *Mitochondrial DNA*. v. 22, p.97–105, 2011.

CAWTHORN, D.M.; STEINMAN, H.A.; WITTHUHN, R.C. DNA barcoding reveals a high incidence of fish species misrepresentation and substitution on the South African market. *Food Research International*, v. 46, p.30–40, 2012.

CLINE, E. Marketplace substitution of Atlantic salmon for Pacific salmon in Washington State detected by DNA barcoding. *Food Research International* v. 45, p.388–393, 2012.

COMISSÃO EUROPEIA 2016. *O salmão do Atlântico*. Disponível em: <[http://ec.europa.eu/fisheries/marine\\_species/farmed\\_fish\\_and\\_shellfish/salmon\\_pt](http://ec.europa.eu/fisheries/marine_species/farmed_fish_and_shellfish/salmon_pt)> Acesso em: 15 dez. 2016

CRUZ, V.P; VERA, M.; PARDO, B.G.; et al. Identification and validation of single nucleotide polymorphisms as tools to detect hybridization and population structure in freshwater stingrays. *Molecular Ecology Reseources*. 2016.

DALMASSO, A.; RANTSIOU, K.; COCOLIN, L.; BOTTERO, M.T. Development of a biomolecular assay for the identification of *Listeria* at species level. *Foodborne Pathogens and Diseases*, v.7, p.565–571, 2010.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2016<sup>a</sup>. *Cultured Aquatic Species Information Programme*. Disponível em: <[http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Salmo\\_salar](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Salmo_salar)> Acesso em: 15 set. 2016.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2016b. *Fisheries and aquaculture software. FishStatJ - software for fishery statistical time series*. Disponível em: <<http://www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstatj/en>> Acesso em: 25 out. 2016.

FARIA, A. 1953. Notas sobre a biologia da truta “arco-íris” – *Salmo gairdneri irideus* (Gibbons) – importada da Dinamarca e introduzida em rios do Sertão da Bocaina, Município de Bananal, Estado de São Paulo. *Rio de Janeiro: MA/DNPA*, 1953: 31-36.

FISHBASE. 2016. *Banco de Dados*. Disponível em: <<http://www.fishbase.org/home.htm>> Acesso em: 02 jun. 2016.

GARCIA, F. - Produção de salmonídeos no Chile: o que podemos aprender a aplicar na aquicultura brasileira? - *Pesquisa & Tecnologia*, v.8, n.2, 2011.

GISP – Programa Global de Espécies Invasoras. 2005 *A crescente ameaça das espécies exóticas invasoras*. Disponível em: <<http://www.institutohorus.org.br/download/gispSAmericapo.pdf>> Acesso em: 08 jul. 2016.

G1. 2016 *Mais caro, salmão é substituído por truta em cardápios em Florianópolis*. Disponível em: <<http://g1.globo.com/sc/santa-catarina/noticia/2016/04/mais-caro-salmao-e-substituido-por-truta-em-cardapios-em-florianopolis.html>> Acesso em: 26 nov. 2016.

HUANG, C.H.; CHANG, M.T.; HUANG, M.C.; WANG, L.T.; HUANG, L.; LEE, F.L. Discrimination of the *Lactobacillus acidophilus* group using sequencing, species-specific PCR and SNaPshot mini-sequencing technology based on the *recA* gene. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.92, n.13, p.2703-2708, 2012.

IWASAKI, W.; FUKUNAGA, T.; ISAGOZAWA, R.; YAMADA, K.; et al. MitoFish and MitoAnnotator: A Mitochondrial Genome Database of Fish with an Accurate and Automatic Annotation Pipeline. *Molecular Biology and Evolution*, v.30 p.2531–2540, 2013.

KAISER, S.A; TAYLOR, S.A.; CHEN, N.; et al. A comparative assessment of SNP and microsatellite markers for assigning parentage in a socially monogamous bird *Molecular Ecology Resources*. 2016.

KRUGLYAK, L., The use of a genetic map of biallelic markers in linkage studies. *Nature Genetics*, n.17, p.21-4, 1997.

LAMENDIN, R.; MILLER, K.; WARD, R.D. Labelling accuracy in Tasmanian seafood: An investigation using DNA barcoding *Food Control* v.47 p.436-443, 2015.

LAZZAROTTO, H.; CARAMASCHI, E.P. Introdução da Truta no Brasil e na bacia do rio macaé, Estado do Rio de Janeiro: Histórico, Legislação e Perspectivas. *Oecologia Brasiliensis*, v.13, p. 649-659 2009.

LOPERA-BARRERO, N.M.; SANTOS, S.C.A.; GOES, E.S.R.; et al. Monitoramento e conservação genética de populações naturais de *Prochilodus lineatus* dos rios Pardo, Mogi-Guaçu e Tietê, São Paulo. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.68, n.6, p.1621-1628, 2016.

MAGALHÃES, A. L. B.; ANDRADE, R. F.; RATTON, T. F.; BRITO, M. F. G. Ocorrência da truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) (Pisces: Salmonidae) no alto rio Aiuruoca e tributários, bacia do rio Grande, Minas Gerais, Brasil. *Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão*, Minas Gerais, v. 14, 2002.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Manual de inspeção para identificação de espécies de peixes e valores indicativos de substituições em produtos da pesca e aquicultura* / Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília : MAPA, 2016. 188 p.

MDIC - Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. 2016. *Aliceweb* Disponível em: < <http://alicesweb.mdic.gov.br//index/home>> Acesso em: 14 out. 2016.

REALE, S., CAMPANELLA, A., MERIGIOLI, A., PILLA, F. A novel method for species identification in milk and milk-based products. *Journal of Dairy Research*, v.75, p.107-112, 2008.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.74, p.5463–5467, 1977.

SARKAR, A.; MADHUSUDAN R.; NANDINENIA. Development of a SNP-based panel for human identification for Indian populations *Forensic Science International: Genetics* v.27, p.58–66, 2016.

SOSINSKI, L.T.W. *Introdução da Truta Arco-Íris (Oncorhynchus mykiss) e suas conseqüências para a comunidade aquática dos rios de altitude do sul do Brasil*. 2004. 84p. Tese (Doutorado. em Ecologia) - Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.

THERMO SCIENTIFIC. *T042 - TECHNICAL BULLETIN NanoDrop Spectrophotometers*. 2p. 2011.

TOGNOLI, C.; SAROGLIA, M.; TEROVA, G.; et al. Identification of fish species by 5S rRNA gene amplification - *Food Chemistry* n.129, p.1860–1864, 2011.

WARD, R.D.; ZEMLAK, T.S.; INNES, B.H.; et al. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*, v.360, p.1847-1857, 2005.

WDFW - Washington Department of Fish and Wildlife. 2016 *Salmon/Steelhead Species Information*. Disponível em: <<http://wdfw.wa.gov/fishing/salmon/steelhead.html> > Acesso em: 28 set. 2016.

WELCOME, R.L. International introductions of inland aquatic species. FAO – Food and Agriculture Organization, *Fish.Tech. Paper*, n. 294, 1988.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Atualmente o comércio de pescado é regulado por barreiras tanto comerciais quanto sanitárias. Um grande problema enfrentado pelos produtores no Brasil é a concorrência pela comercialização de outros tipos de peixes considerados menos nobres para a produção de filés e produtos processados.

A identificação inequívoca dos peixes - de ovos a adultos - e seus produtos é importante para diversas áreas e pode viabilizar, por exemplo, a detecção de fraude ou substituição de espécies em transações comerciais, assistência na sustentabilidade e no manejo da pesca a longo prazo e ainda incrementar a pesquisa em conservação, na identificação de espécies crípticas.

Algumas técnicas tradicionais de identificação de espécies de pescado são utilizadas, principalmente as que envolvem proteínas ou lipídeos no processo de ensaio. Estas técnicas exigem pessoas capacitadas e são consideradas técnicas não usuais. Além disso, produtos processados quimicamente ou por calor não podem ser analisadas por esta técnica.

A validação do ensaio genético de identificação de espécies de pescado no Laboratório de Genética da Escola de Veterinária de UFMG traz uma grande oportunidade para que comerciantes, empresários, empresas do setor e órgãos do governo tenham uma ferramenta confiável para usar nas suas tomadas de decisões, tanto para saber se deve escolher um ou outro fornecedor, ou punir, dentro da legislação, fraudes existentes. Junto com isso o desenvolvimento de um método para identificação molecular de espécies de Salmão e Trutas utilizando o minissequenciamento por *SNaPshot* faz com que o teste aplicado esse grupo de peixes seja mais rápido e eficaz.