

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA E BIOCÊNCIAS**

Mariana Londero Becker

**AVALIAÇÃO DA APLICABILIDADE DA TÉCNICA
DNA BARCODING EM INVERTEBRADOS
MARINHOS APÓS PROCESSAMENTO CULINÁRIO**

Florianópolis

2018

Mariana Londero Becker

**AVALIAÇÃO DA APLICABILIDADE DA TÉCNICA
DNA BARCODING EM INVERTEBRADOS
MARINHOS APÓS PROCESSAMENTO CULINÁRIO**

Dissertação de Mestrado submetida
ao Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia e Biociências para a ob-
tenção do Grau de Mestre em Bio-
tecnologia e Biociências.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Andrea Rita
Marrero

Florianópolis

2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Becker, Mariana Londero
Avaliação da aplicabilidade da técnica DNA
BARCODING em invertebrados marinhos após
processamento culinário / Mariana Londero Becker ;
orientadora, Andrea Rita Marrero, 2018.
111 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas,
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e
Biociências, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

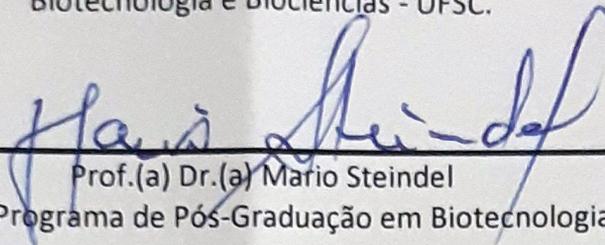
1. Biotecnologia e Biociências. 2. COI. 3.
Identificação molecular. 4. Frutos do mar. 5. Fraude
alimentar. I. Marrero, Andrea Rita. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. III.
Título.

"Avaliação da aplicabilidade da técnica DNA Barcoding em invertebrados marinhos após processamento culinário"

Por

Mariana Londero Becker

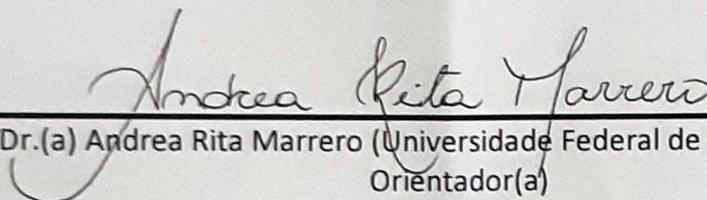
Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (09/PPGBTC/2018) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências - UFSC.



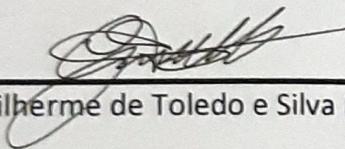
Prof.(a) Dr.(a) Mario Steindel

Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências

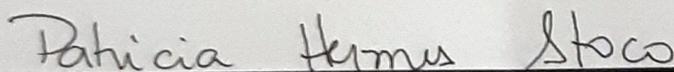
Banca examinadora:



Dr.(a) Andrea Rita Marrero (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)



Dr.(a) Guilherme de Toledo e Silva (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr.(a) Patricia Hermes Stoco (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 25 de abril de 2018.

Este trabalho é dedicado aos meus pais.
Passarinhos que são, me abrigam em
suas asas quando pouso, mas também
as batem por mim quando acho difícil
voar.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à UFSC pela estrutura e por ter me recebido por mais de 8 anos. Obrigada a CAPES pela bolsa disponibilizada.

Agradeço aos meus pais, Mirtes e Carlos, e à minha irmã, Clarice, pelo suporte, apoio, incentivo e ensinamentos. Cada ano que passa vejo o quanto aprendi e continuo aprendendo com vocês. Amo muito vocês.

Aos meus familiares, que embora longe, mantém uma fonte inesgotável de amor e torcida.

À Franciele por todos estes anos de amizade e companheirismo. Seu apoio é essencial e eu aprendo muito com você, inclusive sobre mim. Obrigada por me entender e me manter na sua vida.

Aos amigos que carreguei da graduação e aos que me aproximei nos últimos dois anos: Tomás, Gabriela, Bárbara, Fabíola, Leonardo, e principalmente aos três que foram companhias excelentes para gastar dinheiro em bares por aí, Gabriel, Thaís e Maria Flavia. Vocês forneceram o alívio cômico que eu necessitei tantas vezes. Nesta lista também entram Cândia e Ana Gabriela, duas lindas que o Mestrado me trouxe. Aliás, Gabi, obrigada pelos almoços rápidos de seis horas de duração e pelos cafês programados em março e executados em novembro. Teu abraço forte sempre me enche de energia. A todos vocês, obrigada por se fazerem presentes. Fico feliz pois carregá-los em minha bagagem só a torna mais leve.

Às minhas amigas punks por serem meus laços com o passado (estamos, realmente, velhas) e ainda assim esbanjarem jovialidade por aí. Mesmo com a convivência rara vocês são capazes de colorir os meus dias.

À Andrea Rita Marrero por ter me acolhido por tantos anos. Obrigada pelos ensinamentos e pela orientação em todo este tempo.

Aos membros da banca, Dr. Guilherme de Toledo e Silva, Dr^a Patricia Hermes Stoco, Dr. Rafael Diego da Rosa e Dr.^a Yara Costa Netto Muniz, por aceitarem corrigir e contribuir para a melhoria deste trabalho.

Ao LAPOGE e equipe pelas oportunidades e experiências que dividimos nestes anos, e especialmente à Leandra e Mazza, que contribuíram muito neste trabalho. Agradeço também à Sophia, Iara, Mairiam e Lucas por terem auxiliado nas coletas e bancada.

Ao LIAA e equipe pelos ensinamentos e equipamentos disponibilizados para execução deste trabalho. Especialmente à Mariana Rangel Pilotto, que auxiliou em partes laboratoriais, e ao Gabriel, que contribuiu muito em ser a ponte com o laboratório.

Ao LAMEB pela disponibilidade de equipamentos e técnicos para a realização de etapas essenciais do trabalho.

E por fim, muito obrigada àqueles que não estão presentes neste pequeno espaço, mas que contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

“Ser o que penso? Mas penso ser tanta coisa!”

Álvaro de Campos

RESUMO

O pescado é uma fonte importante de nutrientes necessários para uma alimentação saudável e seu consumo tem aumentado no Brasil e no mundo. Para acompanhar a crescente demanda na produção e exploração dos estoques pesqueiros mundiais, é essencial que haja regulamentação e monitoramento em todas as etapas da cadeia de produção, da indústria aos restaurantes. No entanto, a perda de características morfológicas através de beneficiamento e processamento culinário dificulta a identificação visual das espécies, possibilitando a substituição acidental ou intencional de espécies. Técnicas de identificação molecular como o DNA *barcoding* permitem que as espécies sejam identificadas através de um fragmento específico de sua sequência de DNA, mesmo que este esteja altamente degradado, como ocorre em alimentos processados por métodos culinários. O objetivo deste trabalho foi testar o uso da técnica DNA *barcoding* em invertebrados marinhos frescos e processados consumidos em Santa Catarina. Adicionalmente, foi desenvolvido um protótipo de banco de dados biológicos que será utilizado para auxiliar na organização e armazenamento de dados gerados dentro do “Projeto Gato por Lebre”, ao qual este trabalho pertence. Foram coletadas amostras (n=55) de quatro grupos principais (camarão, lula, polvo e siri) em peixarias e os nomes populares fornecidos foram comparados com as espécies descritas na literatura para o estado de Santa Catarina e com as sequências depositadas em bancos de dados públicos. Três protocolos de extração de DNA foram testados e comparados através de análises de absorbância e gel de agarose, e o protocolo Cloreto de Sódio foi escolhido para uso no restante das amostras cruas e processadas. As amostras foram submetidas à fritura e fervura, e amostras dos três tratamentos (cru, fritura, fervura) tiveram os fragmentos de DNA do gene citocromo oxidase I (COI) sequenciados e comparados com os bancos de dados BOLD e GenBank. O uso do COI permitiu a identificação de 10 de 13 amostras cruas, 11 de 12 amostras fritas e 11 de 12 amostras fervidas, confirmando a eficácia do método no uso em amostras processadas de frutos do mar. As amostras de polvo e lula encontradas nas peixarias não encontravam-se listadas como espécies consumidas no Brasil, enquanto as amostras de siri foram todas identificadas como *Callinectes sapidus*, espécie distribuída por

toda a costa do Brasil. Evidenciou-se a confusão de nomes populares nas amostras identificadas de camarões e a falta de sequências depositadas equivalentes a espécies declaradas, tornando clara a necessidade de mais estudos voltados a identificação e depósito de sequências de frutos do mar em bancos de dados públicos.

Palavras-chave: COI. Identificação molecular. Frutos do mar. Fraude alimentar.

ABSTRACT

Seafood is an important source of nutrients needed for a healthy diet and its consumption has been increasing in Brazil and in the world. To keep pace with the growing demand in production and exploitation of the fish stocks worldwide, it is imperative that all stages of the production chain, from industry to restaurants, are regulated and monitored. However, the loss of morphological characteristics through processing and cooking makes it difficult to visually identify species, allowing the accidental or intentional substitution of species. Molecular identification techniques such as DNA barcoding allow species to be identified through a specific fragment of their DNA sequence, even if said DNA is highly degraded, as occurs in food processed through culinary methods. The aim of this study was to test the use of DNA barcoding in fresh and cooked samples of marine invertebrates consumed in Santa Catarina. In addition to the main objective, a prototype biological database was developed in order to assist in organizing and storing data generated within the “Cat by Hare Project”, to which this study belongs. Samples (n=55) were collected from four main groups (shrimp, squid, octopus and crab) in fishmongers and the popular names provided were compared with the species described in the literature for the state of Santa Catarina and also with the sequences deposited in public databases. Three DNA extraction protocols were tested and compared through absorbance and agarose gel analysis, and the Sodium Chloride Protocol was chosen to be used in the rest of the raw and processed samples. Samples were fried and boiled and samples of the three treatments (raw, fried, boiled) had the DNA fragments of the cytochrome oxidase I (COI) gene sequenced and compared to the BOLD and GenBank databases. The use of COI allowed the identification of 10 out of 13 raw samples, 11 of 12 fried samples and 11 of 12 boiled samples, confirming the efficacy of the method for use in processed seafood samples. The samples of octopus and squid found in fishmongers were not listed as species consumed in Brazil, while the crab samples were all identified as *Callinectes sapidus*, which is distributed through all the coast of Brazil. The confusion of popular names and the lack of deposited sequences equivalent to declared species was evidenced in the identification of shrimp species, making clear the need for

more studies aimed at identification and deposition of seafood DNA sequences in public databases.

Keywords: COI. Molecular identification. Seafood. Food fraud.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Posição do gene Citocromo Oxidase I (COI) no genoma mitocondrial de peixes. Fonte: Trivedi et al. (2016). 32
- Figura 2 Gel de agarose contendo as mesmas amostras, submetidas aos três métodos de extração testados. S = siri, C = camarão, P = polvo e L = lula. 52
- Figura 3 Gel de agarose contendo produto de PCR das amostras amplificadas cruas, utilizado para escolha das amostras a serem processadas e sequenciadas. Em destaque, as amostras escolhidas de siri, polvo, e duas das amostras escolhidas de lula. As amostras dos grupos POLVO e SIRI eram todas denominadas, respectivamente, “polvo” e “carne de siri”. No caso das amostras de lula, estas incluem as denominadas “lula chilena” (I8), “lula do Pacífico” (I12) e “lula exportada” (I21). 53
- Figura 4 Dois géis de agarose submetidos a eletroforese contendo produtos de PCR das amostras amplificadas cruas, utilizados para escolha das amostras a serem processadas e sequenciadas. Em destaque, a terceira amostra escolhida de lula (A) e as três amostras escolhidas de camarão (B). As amostras de lula incluem as denominadas “lula chilena” (I8), “lula do Pacífico” (I12) e “lula exportada” (I21). Já as amostras de camarão F61, F69 e I32 incluem os denominados “camarão 7 barbas”, “camarão vermelho” e “camarão branco”, respectivamente. 54
- Figura 5 Geis de qualificação de extração de DNA de A. crustáceos e B. moluscos fritos e fervidos..... 55
- Figura 6 Exemplos de geis de agarose mostrando a amplificação de DNA de A. moluscos e B. crustáceos processados.. 56
- Figura 7 Entidade Relacional do Banco de Dados..... 58
- Figura 8 Simulação de busca por sequência de DNA dentro do ambiente do bando de dados do Access. 59
- Figura 9 Resultado de busca por uma sequência de DNA

correspondente à espécie *Dosidicus gigas* no banco de dados. 59

Figura 10 Em vermelho, distribuição conhecida da espécie *Enterocyathus megalocyathus*. Fonte: (ROPER; NIGMATULLIN; JEREB, 2010). 78

Figura 11 Em vermelho, distribuição conhecida da espécie *Dosidicus gigas*. Fonte: (ROPER; NIGMATULLIN; JEREB, 2010). 78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Descrição das amostras que compõe o estudo.....	40
Tabela 2	Principais diferenças entre os protocolos de extração de DNA utilizados.....	41
Tabela 3	Componentes da reação de amplificação	44
Tabela 4	Nomes populares, sinônimos e nomes científicos de espécies de camarões encontrados ou produzidos no Brasil. .	50
Tabela 5	Número de sequências de COI depositadas nos bancos de dados BOLD e GenBank em fevereiro de 2018.....	51
Tabela 6	Comparação da concentração calculada de DNA e das relações de absorvância com cada um dos protocolos de extração, para cada amostra do grupo-alvo. PAP = Protocolo Acetato de Potássio; PCS = Protocolo Cloreto de Sódio e PFC = Protocolo Fenol-Clorofórmio. Os valores em negrito indicam as relações com valores ideais (maiores que 1.8 para a relação A_{260}/A_{280} e entre 2.0-2.2 para a relação A_{260}/A_{230}).	52
Tabela 7	Amostras selecionadas para sequenciamento e processamento culinário.....	54
Tabela 8	Valores de absorvância obtidos para as amostras cruas, fritas e fervidas. Valores = 0 representam leituras negativas, mesmo nas repetições.	55
Tabela 9	Quantidade de DNA em ng/ μ l obtidos através dos valores de absorvância a 260nm.....	56
Tabela 10	Lista de amostras analisadas no estudo. A porcentagem de similaridade é apresentada apenas para as amostras que apresentaram valores maiores de 98% em ao menos um dos bancos de dados. As amostras com valores menores estão apresentadas como no match	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BDB	Banco de Dados Biológicos
BOLD	<i>Barcode of Life Database System</i>
COI	Citocromo Oxidase subunidade I
DD	<i>Data deficient</i>
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
ER	Entidade relacional
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
IUCN	<i>International Union for Conservation of Nature</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LAPOGE	Laboratório de Polimorfismos Genéticos
LIAA	Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
NCM	Nomenclatura Comum do Mercosul
PROCON	Órgão de Proteção e Defesa ao Consumidor
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SOFIA	<i>The State of World Fisheries and Aquaculture</i>
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 SUBSTITUIÇÃO E INCERTEZA	25
1.1.1 Políticas públicas de combate à fraude alimentar	27
1.2 INVERTEBRADOS	28
1.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES	30
1.3.1 DNA <i>barcoding</i>	31
1.4 JUSTIFICATIVA	33
2 OBJETIVOS	35
2.1 OBJETIVO GERAL	35
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
3 MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 LEVANTAMENTO DE ESPÉCIES	37
3.2 ANÁLISES LABORATORIAIS	38
3.2.1 Descrição da Amostra	38
3.2.2 Coleta e Armazenamento	39
3.2.3 Extração de DNA	40
3.2.3.1 Escolha do protocolo de extração de DNA	40
3.2.3.2 Extração de DNA de amostras cruas e processadas ...	42
3.2.4 Processamento das amostras	42
3.2.5 Amplificação dos fragmentos de DNA e eletro- forese em gel de agarose	43
3.2.6 Sequenciamento	44
3.2.7 Análise de eletroferogramas	45
3.3 BANCO DE DADOS BIOLÓGICOS	46
4 RESULTADOS	47
4.1 LEVANTAMENTO DE ESPÉCIES	47
4.1.1 Nomes comuns fornecidos nas peixarias	47
4.1.2 Espécies do estado de Santa Catarina	48
4.1.3 Levantamento das espécies e gêneros nos bancos de dados públicos	50
4.2 EXTRAÇÃO DE DNA	51
4.3 AMOSTRAS SELECIONADAS PARA SEQUENCIA- MENTO E PROCESSAMENTO CULINÁRIO	53

4.3.1	Processamento culinário e extração de DNA das amostras processadas	54
4.3.2	Amplificação do DNA das amostras processadas	56
4.4	SEQUENCIAMENTO	57
4.5	BANCO DE DADOS	58
5	DISCUSSÃO	61
5.1	ESCOLHA DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE DNA ..	61
5.1.1	Crustáceos	61
5.1.2	Moluscos	62
5.1.3	Diferenças gerais entre os protocolos	63
5.2	EFICIÊNCIA DA TÉCNICA PARA AMOSTRAS PROCESSADAS	66
5.2.1	Extração de DNA	66
5.2.2	Amplificação de DNA e sequenciamento	68
5.3	ESPÉCIES IDENTIFICADAS	71
5.3.1	POLVO	71
5.3.2	LULA	72
5.3.3	SIRI	74
5.3.4	CAMARÃO	75
5.4	BANCO DE DADOS	79
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS ..	81
	REFERÊNCIAS	83
	APÊNDICE A – Esquema dos processos envolvidos na parte laboratorial	95
	APÊNDICE B – Tabela completa de coletas	99
	ANEXO A – Extração de DNA - Protocolo Acetato de Potássio	103
	ANEXO B – Extração de DNA - Protocolo Cloreto de Sódio	107
	ANEXO C – Extração de DNA - Protocolo Fenol-Clorofórmio	111

1 INTRODUÇÃO

A expressão “frutos do mar” é utilizada para definir invertebrados marinhos, como crustáceos e moluscos, extraídos do mar e utilizados na alimentação humana. Já o termo “pescado” engloba tanto os peixes quanto os frutos do mar, passando assim pela pesca extrativista e pela aquicultura.

O pescado é fonte de aminoácidos essenciais, ferro, zinco e vitaminas D e E, além de conter elevadas quantidades de ácidos graxos polinsaturados como ômega 3 e baixo teor de gorduras saturadas, todos componentes essenciais de uma dieta saudável (UCHIDA; ROHEIM; JOHNSTON, 2017; TUR et al., 2012; KAWARAZUKA; BÉNÉ, 2011). Por isso, peixes e frutos do mar vêm sendo indicados como fontes importantes de nutrição saudável, particularmente nas últimas duas décadas. A recomendação da Food and Agriculture Organization (FAO) é de que o consumo individual de pescado seja maior que 12kg por habitante ao ano (FAO, 2016).

Os fatores que determinam o consumo de peixes e frutos do mar variam entre os países, tradições e hábitos de cada região (PIENIAK et al., 2008). O consumo de pescado aumentou significativamente no Brasil nos últimos anos, saltando de cerca de 4kg/habitante em 2008 para 14,4kg/habitante no ano de 2014 (PORTAL BRASIL, 2017). No ano de 2011, o estado de Santa Catarina foi o maior produtor de pescado oriundo da pesca extrativa marinha, respondendo por 22% da produção nacional (MPA, 2010).

Mundialmente, a média de consumo é ainda maior do que a média brasileira, aproximando-se dos 20kg anuais por pessoa, embora varie bastante entre países desenvolvidos e países em desenvolvimento. Em média, 16,7% do consumo de proteína animal no mundo provém de pescado (FAO, 2016).

Com o acesso ao pescado aumentando e para suprir o crescente consumo de frutos do mar e peixes no mundo, é necessário que a aquicultura e a pesca extrativista também cresçam em

ritmo similar. O último relatório bianual da FAO, “O Estado Mundial da Pesca e Aquicultura” (SOFIA), divulgado em 2016, estima que o Brasil deve registrar crescimento de 104% na pesca e aquicultura até 2025, o maior aumento previsto registrado na região.

No entanto, este aumento na demanda acaba alertando para a situação dos estoques pesqueiros no país e no resto do mundo. A FAO (2016) afirma que 90% dos estoques pesqueiros mundiais encontram-se sobrepescados ou plenamente explorados. No Brasil, estima-se que 100% dos recursos mais importantes para a pesca marinha nacional encontram-se na mesma situação (DIAS-NETO; DIAS, 2015).

A sobrexploração dos estoques e a falta de gestão adequada dos estoques pesqueiros no mundo pode ameaçar a sustentabilidade da atividade pesqueira e causar danos aos ecossistemas aquáticos, como desequilíbrios ambientais e aumento da ameaça da extinção de certas espécies já vulneráveis (PARDO; JIMÉNEZ; PÉREZ-VILLARREAL, 2016; FAO, 2016). Existem esforços de conservação em todo o mundo para regulamentar e possibilitar este aumento considerável na demanda e na pressão de pesca, porém, a falta de fiscalização adequada para gerir espécies ameaçadas de extinção e atividades pesqueiras ilegais, como pesca realizada em épocas de defeso, pesca por barcos ilegais não-registrados ou ainda utilizando métodos de pesca altamente destrutivos faz com que o problema da sobrepesca seja exacerbado (CHRISTIANSEN et al., 2018; D’AMICO et al., 2016).

É essencial, portanto, que haja um grande esforço dos órgãos públicos para regulamentar a pesca e controlar os níveis dos estoques pesqueiros no mundo. Por isso, a FAO lança bianualmente o SOFIA, que fornece informações sobre o estado da pesca extrativista e aquicultura a nível mundial. No Brasil, no entanto, a situação é diferente. O último “Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura” do extinto Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA) foi publicado em 2011, com dados referentes ao ano de 2010. Já para Santa Catarina, o boletim mais recente traz dados referentes ao ano de 2012 (UNIVALI / CTTTMar, 2013).

Ou seja, o país está há 6 anos sem divulgar dados, dificultando trabalhos de conservação e pesquisa.

Dada as situações dos estoques pesqueiros a nível mundial, é importante que o consumidor tenha consciência do que está consumindo ao adquirir peixes e frutos do mar, tanto em peixarias quanto em restaurantes. Porém, surge a questão: sabe-se identificar o que se consome?

1.1 SUBSTITUIÇÃO E INCERTEZA

Uma das características marcantes do comércio mundial de pescado é a incerteza quanto a natureza real do produto que está sendo consumido (CHRISTIANSEN et al., 2018). Esta incerteza pode ter suas raízes em diversos motivos. Um deles é a dificuldade de reconhecimento das espécies através das características morfológicas: muitas vezes, é impossível diferenciar visualmente espécies altamente relacionadas, seja no momento da captura ou ao adquiri-las para consumo (BEGG; WALDMAN, 1999). A dificuldade na identificação pode se dar ainda pela falta de conhecimento em respeito às espécies consumidas, situação comum para a maioria dos consumidores de pescado. Outro motivo muito comum, especialmente no que diz respeito aos frutos do mar, é a ambiguidade dos nomes populares. Muitas vezes, um mesmo termo pode ser aplicado para mais de uma espécie, impedindo sua correta identificação (CARVALHO et al., 2015).

Além disso, o comércio de pescado envolve uma longa e complexa cadeia de fornecimento, devido à natureza altamente perecível destes produtos (LEAL et al., 2015). Os peixes e frutos do mar podem ainda passar por um processo intenso de transformação até chegar às mãos do consumidor em restaurantes e peixarias (CHRISTIANSEN et al., 2018). A identificação correta é prejudicada pela retirada dos caracteres morfológicos utilizados para o diagnóstico das espécies. É muito comum que o pescado seja vendido em variações como “limpo”, em postas, filetado ou congelado, o que retira suas características ou as torna instáveis, no caso da cor dos produtos congelados (PARDO; JIMÉNEZ; PÉREZ-

VILLARREAL, 2016; GLEADALL, 2013).

Logo, erros na identificação das espécies são relativamente fáceis de acontecer. A substituição de espécies de forma acidental ou intencional é facilitada, a última constituindo fraude econômica ou adulteração, quando espécies de alto valor comercial são substituídas por espécies de menor valor financeiro visando ganho econômico (CARVALHO et al., 2015).

A substituição ainda pode ocorrer com espécies protegidas ou ameaçadas de extinção, exacerbando a situação delicada de conservação de muitas espécies (GALAL-KHALLAF et al., 2016b), que ainda podem sofrer com a pesca ilegal em períodos de defeso ou em locais em que a prática é proibida (DIAS-NETO; DIAS, 2015). Nestes casos, vende-se uma espécie protegida por legislações ambientais com outra denominação, caracterizando crime ambiental (GALIMBERTI et al., 2013).

Ademais, a substituição de espécies pode causar danos à saúde dos consumidores, quando espécies potencialmente tóxicas são comercializadas com a identificação incorreta, originando, assim, questões relevantes à saúde pública (JACQUET; PAULY, 2008).

Para regulamentar e diminuir o volume de fraudes econômicas e erros de rotulagem neste mercado, diversos países implementam políticas públicas determinando a rotulagem e a equivalência entre nomes populares e nomes científicos de produtos relacionados ao comércio de pescado. A *Food and Drug Administration* (FDA), agência regulatória dos Estados Unidos, mantém uma lista de nomes comuns aceitos para o pescado vendido no país, intitulada “*The Seafood List*”. Já a Europa adotou, em dezembro de 2013, a *Regulation (EU) n° 1380/2013*, que além de regulamentar as atividades de pesca, aquicultura, importação e exportação de pescado na União Europeia como um todo, ainda designa os nomes comerciais aceitos e nomes científicos equivalentes (D’AMICO et al., 2016). No Brasil, a Instrução Normativa n° 29 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) estabelece a correlação entre os nomes comuns e os respectivos nomes científicos adotados para as principais espécies de peixes comercializados nacionalmente. Além disso, ainda deter-

mina que a rotulagem de certas famílias como Salmonidae deve conter, além do nome comum listado, também o nome comercial (BRASIL, 2015). No entanto, esta Instrução deixa de fora os frutos do mar e de fato, no que diz respeito aos nomes comuns de invertebrados marinhos utilizados comercialmente no país, não existe nenhuma legislação para regulamentar este comércio.

Em 2016 o MAPA também publicou um manual que trata da correta identificação de espécies de peixes através de características morfológicas e valores indicativos de substituições em produtos da pesca e aquicultura (MAPA, 2016). Novamente, não há menção alguma dos invertebrados e além disso, a identificação de espécies baseada em critérios morfológicos só é possível em peixes crus ou que são submetidos a um processamento leve, como alguns casos de filetagem. Uma vez preparados, não é possível realizar esta identificação, aumentando a chance de substituições (SULTANA et al., 2018).

1.1.1 Políticas públicas de combate à fraude alimentar

Para combater a substituição acidental ou intencional de espécies, metodologias de identificação molecular são essenciais para a aplicação de políticas públicas eficientes de combate à fraude alimentar.

Além das regulamentações existentes quanto aos nomes populares oficialmente aceitos para cada espécie, países da Europa e também os Estados Unidos possuem campanhas contínuas de combate à pesca ilegal, não-declarada e não-regulada (IUU, do inglês *illegal, unreported and unregulated fishing*) e à fraude do pescado (U.S. FOOD & DRUG ADMINISTRATION, 2018; EUROPEAN COMMISSION, 2018).

Este tipo de esforço, em conjunto com regulamentações claras por parte dos órgãos públicos notavelmente diminuem o número de fraudes detectadas ao longo dos anos (MARIANI et al., 2015). No Brasil, o primeiro programa governamental que surgiu sobre este assunto foi implementado em 2014 em Florianópolis, Santa Catarina. Intitulado “DNA do Pescado”, surgiu

pela iniciativa da Secretaria de Pesca e Maricultura da Prefeitura Municipal de Florianópolis. O projeto avaliou fraudes no comércio de bacalhau, em restaurantes japoneses e em peixarias. Nestas, detectou 24% de substituições intencionais ou acidentais no município (CARVALHO et al., 2015).

Outro projeto importante para a identificação de fraudes no Estado é realizado pelo Laboratório de Polimorfismos Genéticos (LAPOGE) na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Intitulado “Gato por Lebre: Identificação Molecular (*barcode*) de Pescados Comercializados em Santa Catarina“, o projeto iniciou-se em 2014 e já atuou em conjunto com o PROCON e a Prefeitura de Florianópolis na identificação de fraudes em peixarias e restaurantes, mas também atua de forma independente, de modo que protocolos de extração, amplificação e sequenciamento têm sido otimizados e aplicados nos últimos quatro anos. Este projeto identificou 30% de substituições em peixarias e 26% em restaurantes de comida japonesa na capital do Estado de Santa Catarina (STAFFEN & STAFFEN et al., 2017).

O presente trabalho participa de uma das novas frentes do projeto, que é a identificação de invertebrados marinhos consumidos em Santa Catarina, para trazer novas informações quanto às relações de pesca e consumo dentro do estado.

1.2 INVERTEBRADOS

Apesar de não ser considerado nas políticas nacionais de rotulagem de produtos marinhos, o grupo dos invertebrados é um importante representante do consumo de pescado no mundo. Entre os frutos do mar preferidos para consumo humano, podemos citar os siris, camarões, lulas e polvos.

Os frutos do mar corresponderam a 13% da pesca marinha no país no ano de 2011, sendo o camarão-sete-barbas e o camarão-rosa as espécies mais capturadas do país, representando 45% da produção de crustáceos marinhos no Brasil. Em relação às importações, sabe-se que houve um aumento de 40% na importação de crustáceos de 2010 para 2011, enquanto a importação de molus-

cos cresceu 2% no mesmo período (MPA, 2010). Do volume total desembarcado pela frota industrial no estado de Santa Catarina em 2012, 4,5% foram invertebrados marinhos. Embora ainda seja uma porcentagem pequena se comparado ao desembarque de peixes ósseos, que representam 83% da produção, é relevante o crescimento da produção em relação aos anos anteriores: houve um acréscimo de 56,5% no desembarque de crustáceos e 20% no de moluscos (UNIVALI / CTTTMar, 2013).

Nos restaurantes, os frutos do mar são comercializados após passarem por altos níveis de processamento culinário. A carne de siri é um exemplo disso: em Santa Catarina, é comum encontrá-la vendida em “casquinha”, conchas ou bolinhos fritos. Porém, o consumidor final não consegue saber se realmente é siri que está sendo vendido dentro destes produtos, já que a carne foi altamente processada. Já os camarões fazem parte de um cardápio muito variado no país e são consumidos nas mais diversas apresentações. Os restaurantes também podem ser enganados pelos fornecedores, já comprando a carne processada e embalada em pacotes, em mais um exemplo da complexidade da cadeia de fornecimento de produtos marinhos, e por isso, substituições são mais comuns em restaurantes do que em peixarias (PARDO; JIMÉNEZ; PÉREZ-VILLARREAL, 2016). A variedade de espécies comercializadas no país também é alta e diretamente relacionada com a alta variedade de espécies encontradas ao longo do extenso litoral brasileiro (DIAS-NETO; DIAS, 2015).

Nos últimos anos, com a depleção dos estoques globais de peixes, detectou-se um aumento na população de cefalópodes, e conseqüentemente um aumento em suas capturas (FAO, 2016). Cefalópodes são espécies que crescem rápido, de vida curta e fortemente influenciadas pela variação ambiental (ROPER; NIGMATULLIN; JEREB, 2010). Lulas representam a grande maioria das pescas de invertebrados no Brasil e no mundo, representadas mundialmente pelas espécies *Dosidicus gigas* no leste do Pacífico e *Illex argentinus* no sudoeste do Oceano Atlântico; no Brasil é listada a espécie *Loligo* sp. como a principal e única representante do nosso litoral (MPA, 2010; FAO, 2016; UNIVALI / CTTTMar,

2013). Outro representante dos cefalópodos relevante no Estado são os polvos (UNIVALI / CTTTMar, 2013). Embora sua pesca seja reduzida em relação às lulas, os polvos são também muito apreciados na culinária.

Com o crescente consumo de invertebrados marinhos no mundo, fica clara a necessidade de ferramentas para a identificação das espécies, tanto pelos consumidores quanto pelos restaurantes. No entanto, como já citado anteriormente, a perda das características morfológicas e a falta de conhecimento torna o processo de reconhecimento visual impossível na maior parte das vezes. Assim, é necessário recorrer a outros métodos de identificação, utilizando técnicas moleculares.

1.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES

Para realizar a identificação de espécies em produtos processados, é necessário desenvolver e aplicar métodos moleculares que permitam a identificação destes produtos. Metodologias baseadas em DNA representam uma ferramenta valiosa na identificação de fraudes alimentares, particularmente em identificação de produtos marítimos (TELETCHÉA, 2009). De fato, para produtos altamente processados com calor, técnicas baseadas em DNA mostram-se muito mais eficazes do que técnicas baseadas em proteínas, além de serem técnicas facilmente replicáveis (WARD; HANNER; HEBERT, 2009; ARMANI et al., 2015).

Entre as técnicas utilizadas, destaca-se o uso de fragmentos de genes altamente conservados dentro de espécies para identificação da sua sequência de DNA e comparação com sequências já existentes em bancos de dados. Alguns dos marcadores clássicos utilizados na identificação de pescado em fraudes alimentares incluem os genes mitocondriais citocromo B (LEONARDO et al., 2016; KAPPEL; SCHRÖDER, 2016; CUTARELLI et al., 2014), 16S (ARMANI et al., 2015; SARRI et al., 2014; GALAL-KHALLAF et al., 2016b, 2016a) e o citocromo oxidase I, cujo uso gerou o termo DNA *barcoding* (HEBERT; RATNASINGHAM; WAARD, 2003).

1.3.1 DNA *barcoding*

Uma das técnicas de identificação molecular mais utilizadas é a de DNA *barcoding*, proposta por Hebert, Ratnasingham e Ward (2003), que consiste em designar uma espécie a uma amostra sequenciando um pequeno fragmento padronizado de sua sequência de DNA, conhecido como DNA *barcode*, e comparar este fragmento a um banco de dados referência (BOURLAT et al., 2013).

O sucesso na identificação através de DNA *barcoding* está na utilização de dois critérios principais: 1) distância genética mínima padrão separando as variabilidades interespecíficas e intraespecíficas, chamada de *barcoding gap*, com ausência ou baixa presença de sobreposição e 2) que as espécies possam ser organizadas em uma árvore filogenética (HEBERT; RATNASINGHAM; WAARD, 2003; WIENS; PENKROT, 2002). O DNA *barcoding* ideal deve ser robusto, com regiões conservadas e ampliações e sequenciamento confiáveis e o fragmento sequenciado deve possuir poucas ou nenhuma variação nas bases em indivíduos da mesma espécie, mas ser suficientemente diferente entre espécies (ZHANG; HANNER, 2012).

Para a aplicação da técnica, Hebert, Ratnasingham e Ward (2003) propuseram o uso do gene mitocondrial Citocromo C Oxidase I (COI), apontado na figura 1. Utilizando a primeira porção do gene, em um espaço cujo tamanho gira em torno de 650 pares de base, obtém-se um marcador robusto, que permite a amplificação do fragmento de DNA desejado não só em amostras frescas, mas também em amostras degradadas e processadas por métodos culinários (CHRISTIANSEN et al., 2018; WARD; HANNER; HEBERT, 2009).

O COI tem sido amplamente utilizado para identificação de espécies em estudos de segurança alimentar ao redor do mundo, sendo frequentemente descrito para identificação de fraudes em peixes, em suas mais diversas apresentações e preparos. É possível encontrar estudos de DNA *barcoding* aplicado para identificação de peixes em muitos países, como por exemplo no Brasil (STAFFEN & STAFFEN et al., 2017; CARVALHO et al., 2015, 2017;

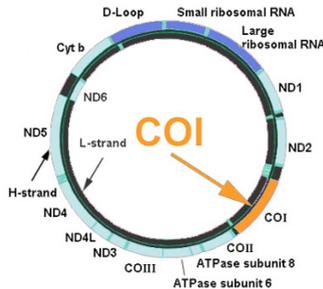


Figura 1. Posição do gene Citocromo Oxidase I (COI) no genoma mitocondrial de peixes. Fonte: Trivedi et al. (2016).

DE BRITO et al., 2015), Itália (CUTARELLI et al., 2014; DI PINTO et al., 2015, 2016), Estados Unidos (KHAKSAR et al., 2015; WARNER et al., 2013; CLINE, 2012), Malásia (CHIN CHIN et al., 2016), Egito (GALAL-KHALLAF et al., 2016a), África do Sul (CAWTHORN et al., 2015) e Taiwan (BRÉCHON; HANNER; MARIANI, 2016; CHIU et al., 2015; CHANG et al., 2016). Além de peixes, também encontram-se alguns estudos sobre substituição de outros produtos alimentares marítimos, como águas-vivas, crustáceos e moluscos (EISCHEID et al., 2016; ARMANI et al., 2015, 2013).

Para fins de análises filogenéticas e proteção ambiental, o uso do COI também é comum, sendo descrito na literatura para espécies variadas de peixes, lagartos, crustáceos, caracóis, moluscos e muitos outros grupos (WIENS; PENKROT, 2002; LU et al., 2011; ZIELSKE; HAASE, 2015; CHETOUI et al., 2016; SALES et al., 2017).

A principal vantagem do uso de DNA *barcoding* em relação ao uso de outros marcadores moleculares encontra-se na existência de um banco de dados biológicos exclusivo para sequências do gene COI. O *Barcode of Life Data System* (BOLD), disponível em <<http://www.boldsystems.org/>>, fornece uma plataforma integrada para depósito de sequências e identificação, possuindo um sistema de qualidade que garante a qualidade das informações lá depositadas (RATNASINGHAM; HEBERT, 2007). Atualmente,

conta com mais de 1,7 milhões de dados públicos de sequências para 188 mil espécies animais (fevereiro de 2018).

Apesar de ser um sistema de identificação bem estabelecido para peixes e outros grupos de vertebrados, poucos estudos disponíveis no uso do gene COI na determinação de invertebrados marinhos. Além disso, a maioria destes estudos não utilizou amostras processadas e por isso informações sobre sua eficácia nestes casos são escassas.

Até hoje, poucos estudos contribuem com o banco de dados referência para moluscos, e por isso, a certeza de uma identificação correta com base nestes bancos é menor. De fato, Armani et al. (2015) testaram a qualidade de sequenciamento e identificação através de fragmentos maiores e menores do gene COI em peixes e moluscos com diferentes formas de processamento. Apenas 90% dos moluscos foram sequenciados com sucesso e somente 84% das amostras sequenciadas apresentou identificação maior que 98% nos bancos de dados BOLD e GenBank. Quanto mais estudos forem adicionados, espera-se que o poder de resolução dos bancos de dados aumente mas também é possível que conflitos e incertezas sobre a identificação deste táxon apareçam (ARMANI et al., 2015).

O uso de um sistema de DNA *barcoding* utilizando o COI foi aplicado com sucesso em crustáceos de interesse alimentar, mas só há registro do seu uso em amostras frescas (COSTA et al., 2007; HAYE et al., 2012).

1.4 JUSTIFICATIVA

Considerando o aumento do consumo de frutos do mar no mundo e as altas taxas de substituição que permeiam o comércio de pescado, é importante que técnicas de identificação molecular sejam desenvolvidas para permitir a correta identificação de espécies deste grupo, estando os alimentos crus ou processados através da culinária. Assim, será possível desenvolver programas de monitoramento que abordem todos os grupos de pescado comercializados no país.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver a técnica DNA *barcoding* para identificação molecular de espécies de invertebrados marinhos de interesse para a indústria alimentícia catarinense, frescos ou após processamentos culinários.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Definir um método de extração a ser padronizado para todos os invertebrados marinhos;
- Verificar a aplicabilidade da técnica de DNA *barcoding* para invertebrados marinhos após processamento culinário (fritura e fervura);
- Elucidar os nomes populares de invertebrados marinhos comercializados em Santa Catarina;
- Desenvolver um protótipo de banco de dados biológicos para uso interno.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi dividido em três etapas descritas a seguir. A primeira etapa consiste no levantamento de nomes populares e nomes científicos, descritos na seção 3.1. A seção 3.2 descreve os procedimentos laboratoriais para verificação da aplicabilidade da técnica DNA *barcoding* em amostras processadas. Por fim, a seção 3.3 descreve os passos envolvidos na criação do banco de dados biológico proposto por este trabalho.

3.1 LEVANTAMENTO DE ESPÉCIES

Ao realizar as coletas nas peixarias, os atendentes foram questionados quanto a nomenclatura do material sendo fornecido. Estes foram considerados “nomes populares” e foram anotados exatamente conforme descritos pelos funcionários.

Para determinar as espécies de invertebrados marinhos de interesse para o estudo que ocorrem no estado de Santa Catarina, foram levados em conta o Boletim Estatístico da Pesca Industrial de Santa Catarina - Ano 2012 (UNIVALI / CTTTMar, 2013) e o Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura - Brasil 2010 (MPA, 2010). Além destes, também foram consideradas as espécies descritas no livro de Lindner (2014), “Vida Marinha de Santa Catarina” e o livro de Dias-Neto e Dias (2015), “O uso da biodiversidade aquática no Brasil: uma avaliação com foco na pesca”. A equivalência dos nomes comuns para nomes científicos também baseou-se nas descritas na literatura acima, além de levar em conta as fichas informativas de espécies aquáticas, disponibilizadas pela Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) no domínio www.fao.org/fishery/species/search/en.

De acordo com os nomes populares fornecidos nas peixarias durante as coletas e também com as espécies constantes na bibliografia consultada, foram realizadas buscas nos bancos de dados públicos BOLD (disponível em www.boldsystems.org) e GenBank

(disponível em www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank). No caso do Gen-Bank, a consulta foi realizada para nucleotídeos, utilizando o nome da espécie seguido de COI, para localizar apenas sequências depositadas que contivessem o gene de interesse Citocromo Oxidase I.

3.2 ANÁLISES LABORATORIAIS

Os principais processos envolvidos estão esquematizados no apêndice A, organizados em quatro etapas principais. A primeira etapa refere-se à escolha do protocolo de extração de DNA a ser utilizado; a segunda etapa refere-se à extração de DNA das amostras cruas; a terceira etapa, à seleção de amostras cruas para sequenciamento e também para processamento culinário e, por fim, a quarta etapa refere-se à purificação e sequenciamento de todas as amostras cruas, fritas e fervidas selecionadas.

3.2.1 Descrição da Amostra

A amostra é composta por 55 exemplares organizados em quatro grandes grupos: 31 amostras compõem o grupo declarado CAMARÃO, 9 compõem o grupo LULA, 5 o grupo POLVO e 10 o grupo SIRI, provenientes das cidades de Florianópolis e Laguna, Santa Catarina.

O estudo dispensa aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais por tratar-se de um estudo utilizando animais invertebrados, conforme o Art. 2º da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008 (BRASIL, 2008). Além disso, por serem as amostras obtidas no comércio já na condição em que foram utilizadas no estudo, também não é necessário obter aprovação de Comitê de Ética.

3.2.2 Coleta e Armazenamento

As amostras foram coletadas em onze peixarias do Mercado Público de Florianópolis-SC, uma peixaria localizada no bairro Rio Tavares, em Florianópolis-SC e uma peixaria no município de Laguna-SC. A lista completa de amostras e local de procedência está no apêndice B, onde os nomes das peixarias foram omitidos. As coletas no Mercado Público de Florianópolis ocorreram em dois momentos diferentes, sendo a primeira coleta realizada simultaneamente com a coleta de fiscalização realizada pelo PROCON de Florianópolis em Outubro de 2016 (amostras identificadas pela letra F). A coleta seguinte foi realizada de forma independente e as amostras estão identificadas com a letra I. As amostras coletadas na peixaria de Laguna foram compradas, assim como a casquinha de siri obtida na peixaria do bairro Rio Tavares.

As amostras de tecido cedidas foram cortadas em pedaços com cerca de 1cm^3 e imediatamente estocadas individualmente em duplicatas em microtubos de 1,5 ml contendo etanol 92,8%. As amostras foram levadas ao Laboratório de Polimorfismos Genéticos (LAPOGE), na Universidade Federal de Santa Catarina, onde foram estocadas a -20°C . No caso das amostras obtidas no Mercado Público, os funcionários foram informados da coleta e colaboraram com a identificação das mesmas. Portanto, o nome dado a cada amostra condiz com o nome utilizado pelo atendente da peixaria no momento da coleta ou com o rótulo da embalagem, no caso de carne de siri embalada e da casquinha de siri.

Um resumo das amostras encontra-se na tabela 1, onde encontram-se agrupadas por similaridade de nome popular fornecido pelos funcionários das peixarias.

Tabela 1. Descrição das amostras que compõe o estudo.

Nome fornecido	n
Polvo	5
Lula	2
Lula chilena	2
Lula do Pacífico	2
Lula exportada	1
Lula internacional	2
Camarão sete-barbas	7
Camarão cinza	5
Camarão rosa	2
Camarão vermelho	4
Camarão branco	3
Camarão colinha	2
Camarão de cativo	3
Camarão da Armação	2
Camarão de Laguna	3
Carne de siri	10

Fonte: Elaborado pela autora.

3.2.3 Extração de DNA

Esta subseção engloba a escolha do método de extração de DNA a ser utilizado para as amostras de invertebrados e também a utilização do protocolo selecionado para as amostras cruas e processadas.

3.2.3.1 Escolha do protocolo de extração de DNA

Foram comparados três protocolos de extração de DNA. Estes foram nomeados Acetato de Potássio (PAP, adaptado de protocolo inicialmente cedido pelo Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura - LIAA), Cloreto de Sódio (PCS, adaptado de Aljanabi e Martinez (1997)) e Fenol-Clorofórmio (PFC, adaptado de Sambrook e Russel (2001)), conforme os apêndices A, B e C, respectivamente. Os protocolos foram nomeados conforme

o reagente principal que os diferencia no mesmo momento da extração. Além destes compostos, outros passos, concentrações e reagentes que variam entre os protocolos estão resumidamente listados na tabela 2.

Tabela 2. Principais diferenças entre os protocolos de extração de DNA utilizados.

Reagente/passo	Acetato de Potássio	Cloreto de Sódio	Fenol-Clorofórmio
Quantidade de tecido	20mg	20mg	50mg
Tampão de lise	400µl	400µl	600µl
Tris-HCl	100mM, pH 8.5	100mM, pH 8.0	50mM, pH 7.5
NaCl	0.1M	0.4M	0.05M
EDTA	50mM, pH 7.4	2mM, pH 8.0	5mM, pH 8.0
SDS	1%	2%	0.5%
RNase	7µg/ml (a 1mg/ml)	7µg/ml (a 1mg/ml)	5µg/ml (a 10mg/ml)
Proteinase K	350µg/ml	400µg/ml	200µg/ml
	Spin down		Esfriar até T ambiente
	15000 RPM, 1min		
	Transferir sobrenadante		
Sal	200µl Acetato de Potássio 3M	300µl NaCl 6M	700µl fenol-clorofórmio-álcool isoamil (25:24:1)
	Incubar em gelo por 30min		
Centrifugar	15000 RPM, 10min, 4°C	13000 RPM, 30min	10000 RPM, 10 min
			700µl clorofórmio-isoamil (24:1)
			Misturar manualmente
			Centrifugar 10000 RPM, 10min
			Transferir sobrenadante
			100µl Acetato de Sódio (AcNa) 3M pH 4.8
Isopropanol 100%	250µl	500µl gelado	400µl gelado
Incubar	3h a -20°C ou overnight	1h a -20°C ou overnight	Overnight a -20°C
Centrifugar	15000 RPM, 30min, 4°C	13000 RPM, 15min	10000 RPM, 10min
Etanol 70%	500µl	200µl	200µl
	Inverter tubo 10x		
	Descansar 1min TA	Descansar 5min TA	
Centrifugar	15000 RPM, 10min, 4°C	13000 RPM, 15min	10000 RPM, 5min
		20µl etanol 100%	
		Centrifugar 13000 RPM, 15min	

Fonte: Elaborado pela autora.

Os três protocolos foram aplicados para uma mesma amostra de cada um dos grupos-alvo definidos no estudo: POLVO, LULA, SIRI e CAMARÃO em amostras cruas. A eficiência e qualidade dos protocolos foi comparada para cada grupo através da análise de quantificação de DNA e relações de absorvância A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} no espectrofotômetro de luz NanoVue[®] (GE

Healthcare Life Sciences), em duas análises das quais foi considerada a média dos resultados. Para verificar a qualidade do DNA extraído também foi realizada eletroforese em gel de agarose, onde em gel 1% agarose (0,4g de agarose e 40ml de TBE 0,5x), foram acrescentados 2,0 μ l de DNA, 0,3 μ l de GelRed[®] (Biotium) e 0,3 μ l de solução carreadora em cada poço. A eletroforese ocorreu a 85V por 20 minutos.

As bases para a escolha do protocolo foram os valores de absorvância, a quantificação do DNA obtido, a qualidade das bandas no gel de agarose, o tempo de execução do protocolo e a disponibilidade de equipamentos e materiais no LAPOGE.

3.2.3.2 Extração de DNA de amostras cruas e processadas

Após escolhido o método de extração de DNA a ser utilizado no resto do estudo, 31 das amostras cruas coletadas foram submetidas ao processo de extração de DNA. Estas 31 amostras englobam todas as 05 amostras de POLVO, as 09 de LULA, 10 de CAMARÃO (escolhidas levando em conta a variedade de nomes populares fornecidos) e 07 de SIRI. As amostras de DNA extraído foram quantificadas e verificadas em gel de agarose como descritas acima. Ao final da extração, os valores de quantificação de DNA serviram como base para que o DNA fosse diluído para a concentração de 20ng/ μ l.

As amostras processadas por fritura e fervura (processos descritos na seção seguinte) também foram submetidas ao mesmo protocolo de extração, quantificação, qualificação e diluição do DNA.

3.2.4 Processamento das amostras

Três amostras de cada grupo principal foram selecionadas para serem processadas através de fritura e fervura. A escolha das amostras baseou-se na qualidade das bandas obtidas nos géis de eletroforese após amplificação dos fragmentos de interesse.

Para a fritura, um pequeno pedaço de amostra foi colocado em frigideira quente em fogo baixo com óleo de milho por aproximadamente 10 a 20 segundos. A frigideira e os materiais utilizados para manuseio foram higienizados a cada amostra para evitar contaminação cruzada. Ao retirar do fogo, as amostras foram lavadas em água destilada para retirada do excesso de óleo.

Para a fervura, as amostras foram colocadas em água fervente por 4 minutos. A água foi trocada para cada amostra para evitar contaminação cruzada.

Ao final dos processos, as amostras foram estocadas em microtubos de 2,0ml contendo água destilada para transporte até o laboratório.

3.2.5 Amplificação dos fragmentos de DNA e eletroforese em gel de agarose

A amplificação da região 5' do gene COI foi realizada utilizando o conjunto de *primers* descritos por Folmer et al. (1994):

LCO1490 5' GGTCAAACAATCATAAAGATATTGG 3'
HCO2198 5' TAA AATTCAGGGTGACCAAAAATCA 3'

A reação para amplificação foi determinada conforme as especificações da *platinum*[®] *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), com pequenas modificações, conforme a tabela 3.

As amostras foram colocadas no termociclador *Veriti Thermal Cycler* (Applied Biosystems) e submetidas a uma desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, a 35 ciclos de: desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 50°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos e um passo final de extensão a 72°C por 5 minutos. A temperatura de anelamento de 50°C foi previamente testada e escolhida baseada em uma PCR de gradiente de temperatura, onde foram testadas temperaturas de 48, 50, 52, 52,5, 53, 54 e 56°C e também corroborada por Eischeid et al. (2016).

Os produtos amplificados foram visualizados em gel de aga-

Tabela 3. Componentes da reação de amplificação

Componente	Concentração	Volume (μl)	Concentração Final
Tampão	10x	2,5	1x
MgCl ₂	50mM	0,75	1,5mM
dNTP	8mM	0,5	0,16mM
Primer F	10 μM	0,5	0,2 μM
Primer R	10 μM	0,5	0,2 μM
Platinum <i>taq</i>	5U/ μl	0,1	0,5U/reação
DNA	20ng/ μl	2,0–4,0	1,6–3,2ng/ μl
H ₂ O milli-Q	—	16,15–18,15	—
Volume Final	—	25,0μl	—

Fonte: Elaborado pela autora.

rose 1%. As corridas ocorreram a 95V por 40 minutos. Os produtos foram corados com 0,3 μl de *gelRed* e acompanhados de 0,3 μl de solução carreadora para 2 μl de produto de amplificação.

Nos casos de insucesso da amplificação do DNA (bandas fracas ou não visíveis no gel de agarose), as amostras foram rediluídas e foi utilizada uma maior quantidade de DNA para a repetição das reações. Controles negativos e positivos foram utilizados em todas as amplificações para assegurar a não-contaminação e sucesso da PCR.

Das 31 amostras cruas que tiveram seu DNA extraído, todas foram submetidas à amplificação conforme este protocolo. O mesmo protocolo foi utilizado para amplificar o DNA das 12 amostras fervidas e fritas.

3.2.6 Sequenciamento

Foram sequenciados os fragmentos de DNA das amostras cruas que também foram selecionadas para processamento culinário. No total, foram sequenciadas 12 amostras cruas, 11 amostras fritas e 11 amostras fervidas.

Os produtos de PCR foram purificados para degradação do excesso de *primers* e para a desfosforilação dos dNTPs não incorporados. O procedimento de purificação foi realizado utilizando

1,0 μ l de ExoSAP-IT[®] (Applied Biosystems) e 9,0 μ l de produto de PCR. As amostras foram colocadas no termociclador *Veriti Thermal Cycler* (Applied Biosystems) e submetidas a um ciclo de reação de 37°C por 60 minutos e 75°C por 15 minutos.

As amostras cruas foram sequenciadas nas duas direções, utilizando os *primers* R (HCO2198) e F (LCO1490) previamente descritos, enquanto as amostras processadas foram sequenciadas em uma única direção utilizando o *primer* R. Além das amostras selecionadas, também foi sequenciada unidirecionalmente a amostra C1, por conter carne de siri misturada com molho de tomate e condimentos.

A reação de sequenciamento foi realizada utilizando o reagente *BigDye*[®] versão 3.1 e o *primer* F ou R como explicado acima. Em cada poço de uma placa foi adicionado 1 μ l do *primer*, 1 μ l de *BigDye* 3.1, 6,5 μ l de produto de PCR purificado, 1,5 μ l de tampão 5x Sequencing (Applied Biosystems) e q.s.p. 10 μ l de água milliQ. A placa foi colocada no termociclador e foi submetida a uma desnaturação inicial a 96°C por 1 minuto, e, a seguir, 35 ciclos de: 96°C por 15 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por 4 minutos.

A precipitação dos produtos foi realizada adicionando 2,5 μ l de EDTA 125mM e 25 μ l de etanol 100% (Merck) em cada poço da placa. A placa foi selada e homogeneizada por inversão quatro vezes. Em seguida, foi centrifugada por 45 minutos a 2880 X g a 20°C. Removeu-se o sobrenadante por inversão e então foi acrescentado 150 μ l de etanol 70% (temperatura ambiente), a placa foi selada novamente e centrifugada a 2880 X g por 15 minutos. Novamente o sobrenadante foi descartado. Após a evaporação completa do etanol, a placa foi estocada a -4°C até que fosse realizado o sequenciamento das amostras conforme protocolo do sequenciador ABI 3500 (Applied Biosystems).

3.2.7 Análise de eletroferogramas

As sequências obtidas foram editadas utilizando o programa Chromas v. 2.6.4 (Technelysium Pty Ltd). As sequências fo-

ram editadas para descartar as partes iniciais e finais das sequências geradas devido à baixa qualidade (abaixo de 20 segundo o critério do programa Chromas) e também para gerar o reverso-complemento das sequências criadas com o *primer* reverso R.

As sequências obtidas foram comparadas com sequências depositadas nos bancos de dados BOLD e NCBI (Standard Nucleotide BLAST) para identificação espécie-específica. Apenas valores de similaridade acima de 98% para o BOLD e valores de Identificação acima de 98% (com E value de 0.0 e Query cover acima de 98%) para o BLAST foram considerados para identificação correta de espécies.

3.3 BANCO DE DADOS BIOLÓGICOS

Os dados obtidos pelo estudo estão armazenados em tabelas (planilhas do Microsoft Excel e também dentro do Microsoft Access). Para a diagramação e programação do banco de dados biológicos, foram identificadas as informações relevantes que a busca deve fornecer, e estas foram separadas em categorias. Após a identificação e divisão das categorias, um diagrama chamado de Entidade Relacional (ER) foi criado para visualizar as informações.

O BDB foi programado em linguagem SQL (Microsoft Access), tendo sua interface gráfica desenvolvida também no Microsoft Access, que baseia-se na linguagem Visual Basic e utiliza o SQL para acessar as informações no banco de dados.

4 RESULTADOS

4.1 LEVANTAMENTO DE ESPÉCIES

Para este conjunto de resultados, dividiu-se o levantamento em três partes: os nomes comuns fornecidos nas peixarias, conforme descritos na subseção 4.1.1; as espécies de invertebrados que ocorrem no estado de Santa Catarina, considerando tanto as desembarcadas e contabilizadas no Estado quanto as ocorrências em ambiente natural, conforme descrito na subseção 4.1.2 e, por fim, as espécies e gêneros levantados nesta seção foram procuradas nos bancos de dados BOLD e GenBank, a fim de verificar a possibilidade de comparação com as amostras obtidas nas coletas, conforme consta na subseção 4.1.3.

4.1.1 Nomes comuns fornecidos nas peixarias

Ao realizar as coletas de invertebrados de interesse nas peixarias e questionar o que estava sendo fornecido naquele momento, os nomes foram anotados exatamente conforme fornecidos, como pode ser visto na lista completa no apêndice A. Todas as 05 amostras pertencentes ao grupo POLVO foram denominadas “polvo”, assim como o grupo SIRI, em que todas as 09 amostras foram fornecidas como “carne de siri”, exceto uma das peixarias que ainda forneceu a informação adicional de procedência, intitulado-a “carne de siri de Laguna”.

Em relação ao grupo de interesse LULA, das 09 amostras coletadas duas foram identificadas apenas como “lula”, duas como “lula chilena”, duas como “lula do Pacífico”, e as três restantes foram denominadas “lula exportada”, “lula internacional” e “lula de fora”. Os camarões foram o grupo mais diverso avaliado, conforme demonstrado na tabela 1.

4.1.2 Espécies do estado de Santa Catarina

O levantamento bibliográfico das espécies que ocorrem no Estado de Santa Catarina levou em conta as espécies descritas no estado de Santa Catarina em ambiente natural, fornecidas por Lindner (2014) e Dias-Neto e Dias (2015), e também os registros das espécies desembarcadas no Estado no Boletim Estatístico da Pesca Industrial de Santa Catarina mais recente (UNIVALI / CTTT-Mar, 2013). Como as informações são escassas, foram considerados também os nomes vulgares e sua correspondência com nomes científicos fornecidos pelo Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura - BRASIL 2010 (MPA, 2010), que considera as atividades de pesca e aquicultura a nível nacional.

No Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura - BRASIL 2010, o MPA (2010) descreve como polvos capturados na região Sul do Brasil as espécies *Octopus vulgaris* e *Octopus insularis*. Na listagem dos nomes vulgares e nomes científicos, os polvos estão agrupados no gênero *Octopus spp.*. Já o boletim do estado de Santa Catarina desenvolvido pela UNIVALI / CTTTMar (2013) cita como desembarcados pelas frotas pesqueiras industriais no estado em 2012 as espécies *Octopus vulgaris*, *Eledone massyae* e *Eledone gaucha*.

Para as lulas, foram encontrados nos registros três nomes populares: calamar-argentino (também chamado de lula-saco-de-boi, correspondente à espécie *Illex argentinus*) e o nome vulgar lula utilizado para as seguintes espécies da família Loliginidae: *Loligo sanpaulensis*, *Loligo surinamensis*, *Loliguncula brevis*, *Doryteuthis plei* e *Sepioteuthis sepioidea*. Cabe ressaltar que segundo o World Register of Marine Species (WoRMS), cujas páginas foram consultadas em janeiro de 2018, os nomes *Loligo sanpaulensis* e *Loligo surinamensis* não são mais nomes científicos aceitos, tendo sido substituídos por *Doryteuthis sanpaulensis* (Brakonieccki, 1984) e *Doryteuthis surinamensis* (Voss, 1974), respectivamente. O nome vulgar lula também foi utilizado para designar as seguintes espécies da família Ommastrephidae: *Todarodes filippovae*, *Ornithoteuthis antillarum*, *Ommastrephes pteropus*

(cujo nome científico aceito atualmente é *Sthenoteuthis pteropus* (Steenstrup, 1855)), *Symplectoteuthis luminosa* e *Hyaloteuthis pelagica* (MPA, 2010; UNIVALI / CTTTMar, 2013).

O desembarque de siris não foi registrado por UNIVALI / CTTTMar (2013), mas consta no Boletim desenvolvido por MPA (2010), relacionando o nome vulgar “siri” com o gênero *Callinectes* spp.. Dias-Neto e Dias (2015) detalha a pesca de siri como fauna acompanhante na pesca de outras espécies variadas, e detalham as espécies de siri pescadas como *Callinectes danae*, *Callinectes ornatus* e *Callinectes sapidus*, conhecido como siri-azul. A ocorrência natural de crustáceos deste grupo no estado inclui o caranguejo maria-farinha *Ocyroide quadrata*, o siri-fantasma *Arenaeus cribrarius*, o caranguejo-uçá *Ucides cordatus*, o chama-maré *Uca* sp., os caranguejos *Eriphia gonagra*, *Pachygrapsus transversus*, *Mithrax hispidus*, *Mithraculus forceps*, *Menippe nodifrons*, *Stenorhynchus seticornis*, *Calappa* sp., além dos siris *Portunus spinimanus*, *Cronius ruber* e os já mencionados *C. danae*, *C. ornatus* e *C. sapidus* (LINDNER, 2014).

De acordo com MPA (2010) e UNIVALI / CTTTMar (2013), os camarões estão todos alocados na família Penaeidae e possuem uma variedade de nomes populares. Para facilitar a visualização destes dados, a tabela 4 detalha a equivalência entre os nomes populares e nomes científicos das espécies desembarcadas no Brasil e no Estado. As espécies aqui listadas correspondem tanto a espécies produzidas no Brasil pela pesca industrial ou artesanal quanto a espécies produzidas no Brasil pela aquicultura. Segundo Dias-Neto e Dias (2015), o camarão-rosa corresponde a três espécies distintas, sendo a espécie *Farfantepenaeus subtilis* conhecido como o camarão-rosa da costa norte do país, enquanto *F. brasiliensis* e *F. paulensis* são os camarões-rosa das regiões sudeste e sul do Brasil. *F. brasiliensis* pode ainda ser chamado de camarão-rosa-pintado (LINDNER, 2014).

Tabela 4. Nomes populares, sinônimos e nomes científicos de espécies de camarões encontrados ou produzidos no Brasil.

Nome vulgar	Sinônimos	Nome científico
Camarão-barba-ruça	Camarão-serrinha; Ferrinho	<i>Artemesia longinaris</i>
Camarão-branco	Camarão-legítimo	<i>Litopenaeus schmitti</i>
Camarão-rosa	Camarão-pistola	<i>Farfantepenaeus paulensis</i> <i>Farfantepenaeus brasiliensis</i>
Camarão-rosa	Camarão-espigão	<i>Farfantepenaeus subtilis</i>
Camarão-santana	Camarão-vermelho	<i>Pleoticus muelleri</i>
Camarão-sete-barbas		<i>Xiphopenaeus kroyeri</i>
Camarão	Camarão-marinho; camarão-branco	<i>Litopenaeus vannamei</i>

Fonte: elaborado pela autora.

4.1.3 Levantamento das espécies e gêneros nos bancos de dados públicos

As buscas nos bancos de dados também foram separadas por grupos de interesse. Para estas buscas, foram considerados os táxons encontrados no levantamento bibliográfico, conforme a subseção 4.1.2. No GenBank, utilizou-se a construção “*espécie + COI*” para procurar apenas por sequências do gene mitocondrial citocromo oxidase I. As quantidades de sequências aqui listadas correspondem ao mês de fevereiro de 2018 e estão resumidas na tabela 5.

Tabela 5. Número de sequências de COI depositadas nos bancos de dados BOLD e GenBank em fevereiro de 2018.

Táxon	BOLD	GenBank	Táxon	BOLD	GenBank
<i>Octopus vulgaris</i>	211	241	<i>Symplectoteuthis luminosa</i>	0	0
<i>Octopus insularis</i>	10	27	<i>Symplectoteuthis</i> sp	0	0
<i>Octopus</i> sp	0	275	<i>Hyaloteuthis pelagica</i>	2	2
<i>Eledone massyae</i>	0	1	<i>Hyaloteuthis</i> sp	2	2
<i>Eledone gaucha</i>	0	0	<i>Callinectes danae</i>	0	1
<i>Eledone</i> sp	11	12	<i>Callinectes ornatus</i>	0	1
<i>Illex argentinus</i>	16	16	<i>Callinectes sapidus</i>	40	178
<i>Illex</i> sp	62	60	<i>Callinectes</i> sp	53	246
<i>Doryteuthis sanpaulensis</i>	2	2	<i>Artemesia longinaris</i>	60	60
<i>Doryteuthis surinamensis</i>	3	3	<i>Artemesia</i> sp	60	60
<i>Doryteuthis plei</i>	64	64	<i>Litopenaeus schmitti</i>	0	1
<i>Doryteuthis</i> sp	88	85	<i>Litopenaeus vannamei</i>	65	101
<i>Loliguncula brevis</i>	0	0	<i>Litopenaeus</i> sp	66	114
<i>Loliguncula</i> sp	0	0	<i>Farfantepenaeus paulensis</i>	47	51
<i>Sepioteuthis sepioidea</i>	2	2	<i>Farfantepenaeus brasiliensis</i>	84	92
<i>Sepioteuthis</i> sp	227	216	<i>Farfantepenaeus subtilis</i>	3	20
<i>Todarodes flippovae</i>	3	1	<i>Farfantepenaeus</i> sp	180	220
<i>Todarodes</i> sp	14	16	<i>Pleoticus muelleri</i>	1	37
<i>Ornithoteuthis antillarum</i>	0	1	<i>Pleoticus</i> sp	5	44
<i>Ornithoteuthis</i> sp	1	2	<i>Xiphopenaeus kroyeri</i>	0	14
<i>Sthenoteuthis pteropus</i>	2	5	<i>Xiphopenaeus</i> sp	0	28
<i>Sthenoteuthis</i> sp	91	124			

Fonte: elaborado pela autora.

4.2 EXTRAÇÃO DE DNA

As três metodologias de extração de DNA foram testadas em uma amostra de cada grupo-alvo e foram comparadas através das bandas geradas no gel de agarose (figura 2) e da razão dos valores de absorbância A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} e quantidade de DNA obtido (tabela 6) Os valores apresentados correspondem à média de valores obtidos após repetição das medições em duplicatas ou triplicatas, onde o valor divergente foi desconsiderado.

Baseado nos resultados dos géis de agarose, das relações de absorbância e quantificação do DNA e também na facilidade de obtenção dos reagentes e tempo de execução dos protocolos de extração de DNA comparados, foi escolhido o protocolo **Cloreto de sódio** (conforme consta no anexo B) para extração do DNA de todas as amostras cruas e processadas.

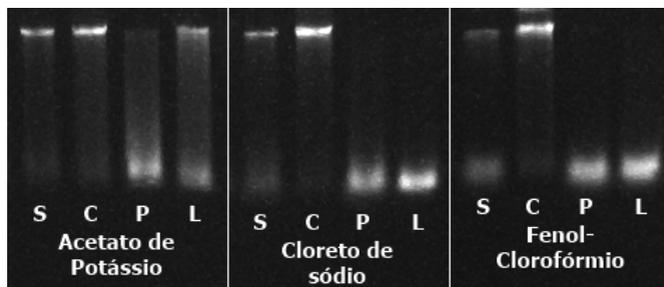


Figura 2. Gel de agarose contendo as mesmas amostras, submetidas aos três métodos de extração testados. S = siri, C = camarão, P = polvo e L = lula.

Tabela 6. Comparação da concentração calculada de DNA e das relações de absorvância com cada um dos protocolos de extração, para cada amostra do grupo-alvo. PAP = Protocolo Acetato de Potássio; PCS = Protocolo Cloreto de Sódio e PFC = Protocolo Fenol-Clorofórmio. Os valores em negrito indicam as relações com valores ideais (maiores que 1.8 para a relação A_{260}/A_{280} e entre 2.0-2.2 para a relação A_{260}/A_{230}).

Grupo	Protocolo	Concentração (ng/ μ l)	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
Siri	PAP	31	2.006	0.733
	PCS	81	2.041	1.557
	PFC	88	1.77	1.639
Camarão	PAP	326	1.64	0.593
	PCS	69	1.93	1.903
	PFC	152	1.808	1.699
Polvo	PAP	186	1.893	0.867
	PCS	183	1.951	1.37
	PFC	175	1.73	1.287
Lula	PAP	37	1.767	0.974
	PCS	256	1.969	2.134
	PFC	282	1.82	2.445

Fonte: elaborado pela autora.

4.3 AMOSTRAS SELECIONADAS PARA SEQUENCIAMENTO E PROCESSAMENTO CULINÁRIO

A amplificação do DNA foi realizada para 31 das amostras sem processamento seguindo o protocolo de extração escolhido para uso, **Cloreto de Sódio**. Destas, foi possível amplificar 29 amostras, incluindo todas as amostras declaradas polvos, 8 de 9 lulas, todas as carnes de siri e 7 de 10 camarões.

Com base na qualidade das bandas obtidas (figuras 3 e 4) e também visando uma variedade de nomes populares fornecidos, foram escolhidas as amostras para subsequente processamento e sequenciamento, resumidas na tabela 7. No caso do siri, também foi considerado a aparência da amostra, visando obter variedade das possíveis partes utilizadas das carnes de siri.

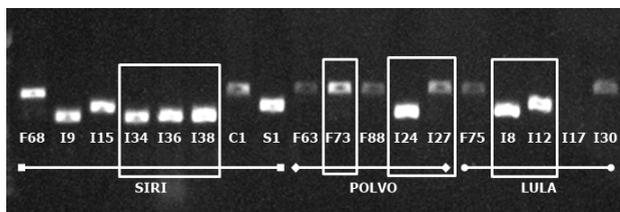


Figura 3. Gel de agarose contendo produto de PCR das amostras amplificadas cruas, utilizado para escolha das amostras a serem processadas e sequenciadas. Em destaque, as amostras escolhidas de siri, polvo, e duas das amostras escolhidas de lula. As amostras dos grupos POLVO e SIRI eram todas denominadas, respectivamente, “polvo” e “carne de siri”. No caso das amostras de lula, estas incluem as denominadas “lula chilena” (I8), “lula do Pacífico” (I12) e “lula exportada” (I21).

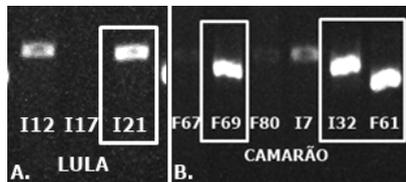


Figura 4. Dois géis de agarose submetidos a eletroforese contendo produtos de PCR das amostras amplificadas cruas, utilizados para escolha das amostras a serem processadas e sequenciadas. Em destaque, a terceira amostra escolhida de lula (A) e as três amostras escolhidas de camarão (B). As amostras de lula incluem as denominadas “lula chilena” (I8), “lula do Pacífico” (I12) e “lula exportada” (I21). Já as amostras de camarão F61, F69 e I32 incluem os denominados “camarão 7 barbas”, “camarão vermelho” e “camarão branco”, respectivamente.

Tabela 7. Amostras selecionadas para sequenciamento e processamento culinário.

Polvo	Lula	Siri	Camarão
F73	I8	I34	F61
I24	I12	I36	F69
I27	I21	I38	I32

Fonte: Elaborado pela autora.

4.3.1 Processamento culinário e extração de DNA das amostras processadas

As amostras escolhidas (tabela 7) foram submetidas aos processos de fritura e fervura descritos na seção 3.2.4 com sucesso. Em seguida, foram submetidas à extração de DNA conforme descrito no protocolo **Cloreto de sódio** (anexo B). Fotos dos géis de agarose gerados pela extração dos moluscos e crustáceos processados estão na figura 5.

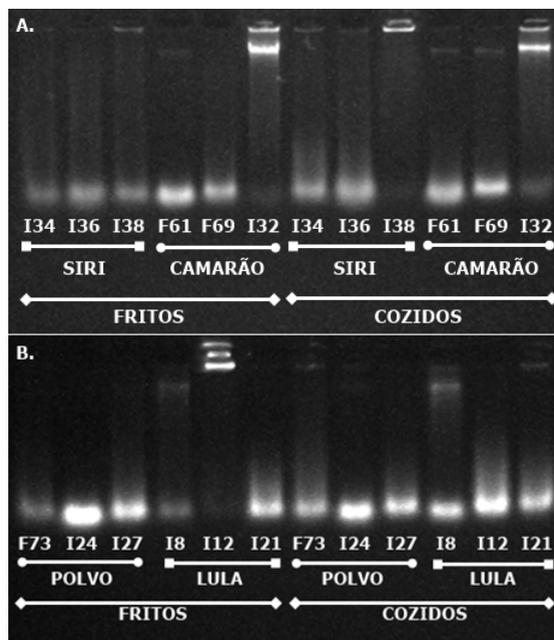


Figura 5. Geis de qualificação de extração de DNA de A. crustáceos e B. moluscos fritos e fervidos.

Tabela 8. Valores de absorbância obtidos para as amostras cruas, fritas e fervidas. Valores = 0 representam leituras negativas, mesmo nas repetições.

Amostra	Nome declarado	Crua		Fritura		Fervura	
		A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
F73	Polvo	1.985	1.638	1.49	1.09	3.263	2.228
I24	Polvo	2.145	1.511	1.55	1.11	0	2.213
I27	Polvo	2.043	1.543	1.89	1.53	2.363	1.243
I8	Lula Chilena	1.985	1.645	0	1.13	3.253	2.303
I12	Lula do Pacífico	1.368	0.661	2.065	0.398	1.96	1.677
I21	Lula Exportada	1.843	1.535	1.967	1.583	5.423	2.92
I34	Carne de Siri	2.063	4.522	0	0	3.445	2.66
I36	Carne de Siri	1.771	1.899	1.875	2.3	0	0
I38	Carne de Siri	2.051	1.792	2.13	1.055	0.48	1.01
F61	Camarão 7 barbas	2.607	11.219	3.655	1.535	3.62	0.575
F69	Camarão Vermelho	2.585	1.646	3.945	2.125	22.115	0.765
I32	Camarão Branco	2.037	1.788	2.14	1.3	2.765	0.385

Fonte: elaborado pela autora.

Tabela 9. Quantidade de DNA em ng/ μ l obtidos através dos valores de absorbância a 260nm.

Amostra	Nome declarado	Quantidade de DNA (ng/ μ l)		
		Crua	Fritura	Fervura
F73	Polvo	130	304	33
I24	Polvo	145	288	58
I27	Polvo	227	376	243
I8	Lula Chilena	207	20	146
I12	Lula do Pacífico	67	69	426
I21	Lula Exportada	276	390	97
I34	Carne de Siri	145	117	137
I36	Carne de Siri	174	2142	6095
I38	Carne de Siri	489	207	12
F61	Camarão 7 barbas	37	99	125
F69	Camarão Vermelho	28	78	78
I32	Camarão Branco	309	302	145

Fonte: elaborado pela autora.

4.3.2 Amplificação do DNA das amostras processadas

O DNA das amostras selecionadas foi amplificado independentemente dos valores de absorbância e da presença ou ausência de bandas no gel de extração. Dois exemplos de geis de amplificação encontram-se na figura 6. Quando não foi detectado presença de banda ou a intensidade não foi considerada satisfatória, as reações de cadeia em polimerase foram repetidas.

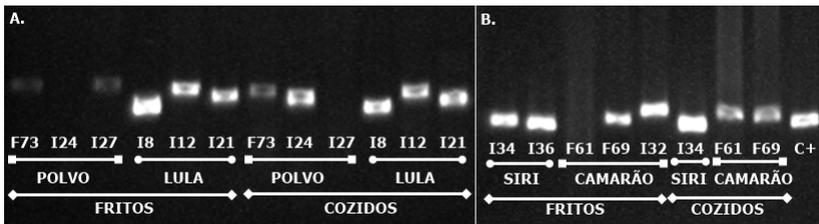


Figura 6. Exemplos de geis de agarose mostrando a amplificação de DNA de A. moluscos e B. crustáceos processados.

4.4 SEQUENCIAMENTO

As amostras cruas e processadas foram sequenciadas, editadas e comparadas com os bancos de dados BOLD e GenBank e, finalmente, as amostras que apresentaram porcentagem de similaridade maior que 98% em pelo menos bancos de dados estão na tabela 10.

Tabela 10. Lista de amostras analisadas no estudo. A porcentagem de similaridade é apresentada apenas para as amostras que apresentaram valores maiores de 98% em ao menos um dos bancos de dados. As amostras com valores menores estão apresentadas como **no match**.

Amostra	Nome declarado	Tratamento	Melhor ID	% de similaridade	
				BOLD	GenBank
I24	Polvo	Crua	<i>Enteroctopus megalocyathus</i>	100	99
		Frita	<i>Enteroctopus megalocyathus</i>	99.41	97
		Fervida	<i>Enteroctopus megalocyathus</i>	100	99
I8	Lula chilena	Crua	<i>Dosidicus gigas</i>	100	97
		Frita	<i>Dosidicus gigas</i>	99.81	92
		Fervida	<i>Dosidicus gigas</i>	99.6	93
I12	Lula do Pacifico	Crua	<i>Dosidicus gigas</i>	100	99
		Frita	<i>Dosidicus gigas</i>	100	97
		Fervida	<i>Dosidicus gigas</i>	100	99
I21	Lula exportada	Crua	no match	n/a	n/a
		Frita	<i>Dosidicus gigas</i>	100	94
		Fervida	<i>Dosidicus gigas</i>	98.1	87
I34	Carne de siri	Crua	<i>Callinectes sapidus</i>	100	99
		Frita	<i>Callinectes sapidus</i>	100	99
		Fervida	<i>Callinectes sapidus</i>	99.68	99
I36	Carne de siri	Crua	<i>Callinectes sapidus</i>	100	100
		Frita	<i>Callinectes sapidus</i>	100	98
		Fervida	<i>Callinectes sapidus</i>	100	99
I38	Carne de siri	Crua	<i>Callinectes sapidus</i>	100	100
		Frita	<i>Callinectes sapidus</i>	100	99
		Fervida	<i>Callinectes sapidus</i>	100	99
C1	Carne de siri	Crua (com condimentos)	<i>Callinectes sapidus</i>	100	99
F61	Camarão-sete-barbas	Crua	<i>Artemesia longinaris</i>	99.69	99
		Frita	n/a	n/a	n/a
		Fervida	<i>Artemesia longinaris</i>	100	99
F69	Camarão-vermelho	Crua	<i>Pleoticus muelleri</i>	100	99
		Frita	<i>Pleoticus muelleri</i>	98,11	95
		Fervida	no match	n/a	n/a
I32	Camarão-branco	Crua	<i>Farfantepenaeus brasiliensis</i>	100	98
		Frita	<i>Farfantepenaeus brasiliensis</i>	99,81	95
		Fervida	<i>Farfantepenaeus brasiliensis</i>	100	96

Fonte: elaborado pela autora.

As amostras de polvo F73 e I27 não apresentaram similaridade

maior que 98% para nenhum dos bancos de dados consultados e, por isso, não foram consideradas válidas para o estudo. Não foi possível amplificar o DNA da amostra F61 frita, e por isso, esta não foi sequenciada.

4.5 BANCO DE DADOS

Para o Banco de Dados Biológicos, as informações foram organizadas em uma Entidade Relacional, conforme a figura 7. A ER serve como ferramenta para visualizar o conceito do BDB, auxiliando na definição da estrutura e das restrições durante o seu desenvolvimento.

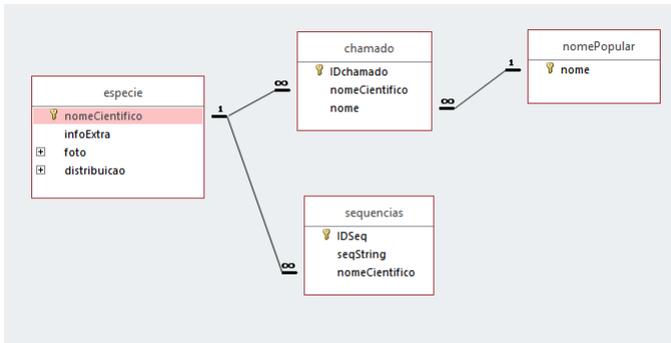


Figura 7. Entidade Relacional do Banco de Dados.

Foram consideradas duas situações de busca: a primeira situação considera uma busca por nomes científicos ou nomes populares (categoria chamado). A segunda situação é a busca por uma sequência de DNA de acordo com o código genético IUPAC. Como uma espécie pode ter mais de um nome popular OU um nome popular pode corresponder a mais de uma espécie, estes foram separados em uma categoria distinta.

Ao buscar por uma sequência de DNA, como demonstrado na figura 8, o banco de dados fará uma busca por similaridade entre as sequências nele depositadas e retornará informações como: nome científico, nomes populares, foto de um indivíduo da espécie, distribuição mundial e informações extras, como situação atual

na Lista Vermelha da União para Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais (*The IUCN Red List of Threatened Species*, épocas de defeso e legislação vigente que envolva aquela espécie (figura 9). As mesmas informações surgirão quando se realizar uma busca por nomes populares ou nomes científicos.

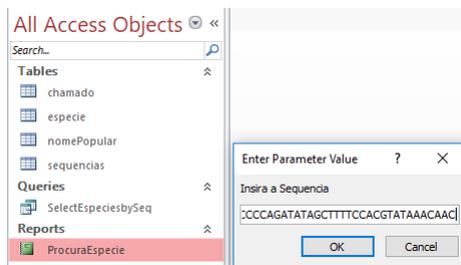


Figura 8. Simulação de busca por sequência de DNA dentro do ambiente do bando de dados do Access.

Espécies Encontradas		
Nome Científico Dosidicus gigas	Informações IUCN: DD (Data deficient)	Foto 
Nomes Populares Lula Gigante Lula		Distribuição 

Página 1 de 1

Figura 9. Resultado de busca por uma sequência de DNA correspondente à espécie *Dosidicus gigas* no banco de dados.

5 DISCUSSÃO

5.1 ESCOLHA DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE DNA

Para comparar as três técnicas testadas, considerou-se os resultados dos valores de absorvância, como demonstrado na tabela 6 e também as bandas geradas nos géis de agarose, como na figura 2.

5.1.1 Crustáceos

As amostras de CAMARÃO apresentaram DNA isolado íntegro e de alto peso molecular nos três métodos de extração. Já na amostra de SIRI, verificou-se presença de banda de alto peso molecular nos três métodos de extração. Porém, além da banda gerada pela aplicação do PFC ser mais fraca quando comparada aos outros protocolos, este método gerou ainda uma segunda banda mais fraca de baixo peso molecular, o que indica a presença de excesso de RNA na amostra ou ainda a presença de DNA altamente degradado (LINACERO; RUEDA; VÁZQUEZ, 1998).

No que diz respeito às relações de absorvância dos crustáceos, para a amostra de SIRI todas as relações A_{260}/A_{280} ficaram acima ou próximas de 1.8 e são consideradas ideais conforme indicado na literatura, o que demonstra que não há excesso de proteínas na amostra extraída e que o DNA obtido é de boa qualidade (DE MASI et al., 2015; CHIN CHIN et al., 2016). No caso do CAMARÃO, os valores de relação encontrados foram próximos, mas o método Acetato de Potássio foi o único que apresentou uma relação A_{260}/A_{280} menor que 1.8 (1.64), indicando um possível excesso de proteínas misturado ao DNA extraído (LINACERO; RUEDA; VÁZQUEZ, 1998).

Já a relação A_{260}/A_{230} deve apresentar valores entre 2.0 e 2.2, mas para o SIRI e o CAMARÃO todos os métodos apresentaram valores menores que 2.0. Relações fora deste intervalo indicam a presença de resíduos contaminantes orgânicos utilizados nos processos de extração, como o fenol e o EDTA, além de carboidratos e peptídeos (ARMANI et al., 2012; THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2010; VAN DER COLFF; PODIVINSKY, 2008). Os protocolos que apresentaram melhores valores nesta relação foram o PFC para SIRI (1.639) e o

PCS para CAMARÃO (1.903).

É relevante apontar a diferença entre a concentração de DNA medida por espectrofotometria de luz e por análise da intensidade das bandas no gel de agarose. Segundo Linacero, Rueda e Vázquez (1998) e Kress e Erickson (2012), quanto mais intensa a banda no gel, maior a quantidade de DNA extraído. No entanto, para a amostra SIRI, os protocolos PAP, PCS e PFC apresentaram, respectivamente, concentrações de 31, 81 e 88 ng/ μ l segundo a espectrofotometria de luz. Porém, no gel, a banda mais intensa é justamente a do protocolo PAP, apesar do menor valor de quantificação por espectrofotometria, enquanto a banda do PFC é muito fraca, apesar do valor quantificado ser similar ao do protocolo PCS. A quantificação de 88 ng/ μ l para o protocolo PFC pode justificar-se pelo excesso de RNA detectado no gel de agarose, pois este também absorve luz a 260nm e portanto irá contribuir para o valor total de absorbância usado para calcular a concentração das amostras (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2010; CHIN CHIN et al., 2016; VAN DER COLFF; PODIVINSKY, 2008). Outra possibilidade é a presença de DNA degradado, já que exemplos de moléculas que absorvem luz a 260nm incluem RNA, nucleotídeos livres e proteínas (CHIN CHIN et al., 2016; VAN DER COLFF; PODIVINSKY, 2008).

5.1.2 Moluscos

A amostra de POLVO não apresentou banda de alto peso molecular em nenhum dos protocolos testados. É possível notar um rastro da posição de alto peso molecular até um peso molecular menor no protocolo Acetato de Potássio, além de uma banda larga de baixo peso molecular nos três protocolos. O rastro indica uma possível degradação da amostra, enquanto a banda de baixo peso molecular é indicativa da possível presença de RNA e DNA degradado (KRESS; ERICKSON, 2012; LINACERO; RUEDA; VÁZQUEZ, 1998; THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2010; CHIN CHIN et al., 2016). A amostra do grupo LULA testada para os três protocolos apresentou o mesmo padrão de bandas que o grupo POLVO, exceto por uma banda fraca de alto peso molecular para o protocolo Fenol-Clorofórmio.

A relação A_{260}/A_{280} para POLVO e LULA foi maior ou próxima a 1.8 para todos os protocolos, indicando, como já comentado anteriormente, retirada satisfatória das proteínas e DNA de boa

qualidade para uso (CHIN CHIN et al., 2016; DE MASI et al., 2015; THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2010). Os maiores valores encontrados foram para o protocolo PCS (1.951 para POLVO e 1.969 para LULA). Já para a relação A_{260}/A_{230} , que deve possuir valores entre 2.0 e 2.2 (ARMANI et al., 2012; VAN DER COLFF; PODIVINSKY, 2008), a amostra POLVO não apresentou resultados satisfatórios em nenhum dos protocolos utilizados, sendo o maior valor obtido para o protocolo PCS (1.37). Para a LULA, o uso do protocolo Cloreto de Sódio gerou uma relação A_{260}/A_{230} de 2.134, dentro do intervalo ideal sugerido na literatura.

Em relação à concentração de DNA obtida, quando medida por espectrofotômetro de luz na faixa dos 260nm, os três protocolos geraram resultados similares para o POLVO, mas para LULA o protocolo PAP gerou um valor muito menor se comparado aos outros. Assim como no caso dos crustáceos, há discrepância em relação à quantificação por intensidade da banda do gel de agarose. As amostras de POLVO e LULA possuem banda de baixo peso molecular em todos os protocolos, indicando a presença de RNA ou DNA degradado, como já mencionado anteriormente. Portanto, é possível que o valor de concentração de DNA obtido por espectrofotometria de luz esteja superestimado (ARMANI et al., 2012; LINACERO; RUEDA; VÁZQUEZ, 1998), mas também é possível que o valor esteja relacionado à presença de DNA degradado na amostra, já que para os três métodos de extração foi utilizada a enzima RNase para degradação do RNA.

5.1.3 Diferenças gerais entre os protocolos

As principais diferenças entre os protocolos de extração testados neste trabalho estão no sal escolhido. Foram escolhidos estes três protocolos para teste por serem utilizados para os grupos-alvo do estudo em trabalhos relacionados (DE MASI et al., 2015; ALJANABI; MARTINEZ, 1997). A comparação passo a passo da tabela 2 ajuda a visualizar as diferenças entre os protocolos. Além de pequenas variações no tamanho do tecido, pH e molaridade de componentes em comum, duração, temperatura e número de centrifugações, os passos que mais diferem são o sal utilizado em cada protocolo, como apontado no nome dado aos protocolos (exceto pelo protocolo Fenol-Clorofórmio, que utiliza o sal acetato de sódio).

O protocolo Fenol-Clorofórmio (PFC) utiliza os reagentes fenol-clorofórmio baseando-se nas diferentes solubilidades das moléculas da amostra em dois líquidos que, misturados e posteriormnete centrifugados, geram duas fases distintas: a fase orgânica, mais densa, onde depositam-se os sais e proteínas, e a fase aquosa, onde os ácidos nucleicos ficam dispersos. A adição do álcool isoamílico impede a formação de espuma durante a centrifugação. Neste protocolo, o pH das soluções é especialmente importante pois é necessário que o pH da mistura esteja em torno de 7,8-8,0 para que os ácidos nucleicos não misturem-se à fase orgânica da solução. Quanto mais ácida a solução, mais DNA será misturado à fase orgânica e mais RNA ficará livre na fase aquosa. Além disso, o pH ácido também minimizará a atividade da RNase (SAMBROOK; RUSSEL, 2001; ZUMBO, 2012).

Em relação aos sais utilizados para precipitação do DNA, o acetato de sódio (utilizado no protocolo PFC) tem como atributo principal uma alta eficiência na precipitação de proteínas e, por isso, não se recomenda seu uso em soluções em que haja uma grande quantidade das mesmas. No entanto, as relações A_{260}/A_{280} para todas as amostras ficaram acima ou próximas de 1,8, indicando que houve uma boa eficiência na separação das proteínas do DNA, eficiência essa possivelmente relacionada ao uso de fenol-clorofórmio, como explicado acima. Já o sal cloreto de sódio, utilizado no PCS, é o sal ideal para uso em soluções com alta quantidade de detergentes como o SDS, pois o uso deste permite que o SDS permaneça solúvel em etanol 70%, aumentando a eficiência da retirada de elementos orgânicos do DNA extraído. Embora a relação A_{260}/A_{230} , indicativa de retirada de componentes orgânicos variados, só tenha ficado dentro do intervalo ideal para a LULA no protocolo PCS, as outras amostras extraídas com este protocolo apresentaram relações mais altas do que para o protocolo PAP. Este protocolo, cujo sal utilizado para precipitação é o acetato de potássio, apresentou valores de relação A_{260}/A_{230} muito baixos (abaixo de 1.0 para todas as amostras), que podem estar relacionados ao excesso de sais de potássio misturados ao DNA extraído, pois os sais de potássio encontrados no reagente dodecil sulfato de sódio (SDS) são altamente insolúveis e o uso do acetato de potássio causa precipitação desses sais (GENE LINK INC, 2014; KRESS; ERICKSON, 2012; ZUMBO, 2012; SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

Os métodos foram testados e avaliados considerando a ob-

tenção de DNA de alto peso molecular íntegro. Porém, deve-se ressaltar que o uso pretendido do DNA obtido é para amplificação por reação de cadeia da polimerase (PCR) de um fragmento pequeno (em torno de 650 pares de base) e posterior sequenciamento. Além disso, o protocolo seria utilizado também para extração de DNA de alimentos processados por calor, onde já se espera altos níveis de degradação do DNA. Portanto, a ausência de bandas de alto peso molecular no gel comparativo dos protocolos não foi considerado fator limitante para seu uso, mas sim, apenas para comparação entre os métodos utilizados, especialmente porque os valores obtidos por espectrofotometria de luz, embora não sejam conclusivos por si só, também indicam a presença de DNA adequado ao uso.

Para a aplicação de um programa de identificação molecular de substituições forte e consistente, é necessário que protocolos sejam padronizados e que possam ser reproduzidos posteriormente (DI PINTO et al., 2015; EISCHEID et al., 2016; MARALIT et al., 2013). Além disso, é importante que as técnicas possam ser utilizadas considerando a diversidade dos organismos a serem estudados e que a metodologia envolva processos rápidos e de baixo custo, aumentando a eficácia e o custo-benefício, interesses principais de programas de monitoramento (LINACERO; RUEDA; VÁZQUEZ, 1998; FERRITO; BERTOLINO; PAPPALARDO, 2016).

Considerando os valores de espectrofotometria de luz obtidos para os três protocolos e testes preliminares realizando PCRs (resultados não apresentados), o protocolo que apresentou valores mais consistentes e satisfatórios foi o Cloreto de Sódio (PCS). Além disso, o protocolo é realizado com o uso de reagentes relativamente baratos e de fácil acesso, além de não utilizar reagentes perigosos (como seria o caso do protocolo Fenol-Clorofórmio). Portanto, o protocolo escolhido para extração de DNA de invertebrados marinhos de interesse deste estudo foi o protocolo **Cloreto de Sódio**.

5.2 EFICIÊNCIA DA TÉCNICA PARA AMOSTRAS PROCESSADAS

5.2.1 Extração de DNA

Determinado o uso do protocolo padrão, foram realizadas as extrações de DNA para as 31 amostras cruas. Como estas foram submetidas a amplificação através de PCR e apenas 03 amostras de cada grupo-alvo foram selecionadas para sequenciamento e processamento culinário, os únicos resultados discutidos são os destas 03 amostras, para poder comparar a extração de DNA para amostras cruas, fritas e fervidas.

A qualidade do DNA (tabela 8) analisada através da relação dos valores de absorvância A_{260}/A_{280} para as amostras na condição crua demonstra que o método de extração utilizado permitiu a obtenção de DNA de boa qualidade, já que os valores encontrados foram maiores que 1.8 para 10 de 12 amostras, indicando eficiência na eliminação de proteínas (CHIN CHIN et al., 2016; DE MASI et al., 2015). As duas amostras que apresentaram valores menores foram a amostra I12 (lula do Pacífico, 1.368) e uma amostra de carne de siri (I36), que apresentou um valor muito próximo a 1.8 (1.771). Para as amostras fritas, das 10 amostras que foi possível efetuar a leitura, 8 apresentaram valores de A_{260}/A_{280} maiores que 1.8. As exceções foram duas amostras de polvo, F73 e I24 (1.49 e 1.55, respectivamente). Já para as amostras fervidas, de 10 amostras cujas leituras não foram negativas, 9 foram maiores que 1.8 (exceto a amostra I38, carne de siri, cujo valor foi de 0.48).

A relação A_{260}/A_{230} , cujos valores ideais ficam entre 2.0 e 2.2, não apresentou resultados satisfatórios para nenhuma amostra crua ou fervida. Para as amostras fritas, apenas a amostra de camarão vermelho apresentou um valor dentro do intervalo ideal (2.125) (ARMANI et al., 2012; THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2010; VAN DER COLFF; PODIVINSKY, 2008). Como citado anteriormente, valores muito altos ou muito baixos nesta relação podem indicar a presença de contaminantes orgânicos que absorvem luz a 230nm (DE MASI et al., 2015; HASHIMOTO et al., 2015).

Ao analisar as bandas geradas pelo DNA extraído em gel de agarose (figura 5), observam-se rastros da região de alto peso molecular até um menor peso molecular, estes característicos de

degradação do DNA, em todas as amostras de moluscos, com exceção da amostra I12 (lula) frita (CORRADO, 2016). Esta foi a única amostra de molusco que apresentou uma banda intensa e clara de alto peso molecular, indicando DNA íntegro (LINACERO; RUEDA; VÁZQUEZ, 1998; KRESS; ERICKSON, 2012). Da mesma maneira, todas as amostras fritas e fervidas de moluscos apresentaram uma banda de baixo peso molecular de intensidade variada representando possível presença de RNA misturado ao DNA íntegro extraído ou DNA altamente degradado (LINACERO; RUEDA; VÁZQUEZ, 1998; CHIN CHIN et al., 2016). Ao analisar os crustáceos, detectou-se banda indicando a presença de DNA para a amostra I32 (camarão branco) frita (banda intensa), e uma banda fraca para a amostra F61 (camarão 7 barbas) frita. Para as amostras fervidas, novamente a amostra I32 apresentou uma banda intensa, mas os outros dois camarões apresentaram bandas fracas. Não foi possível detectar bandas indicando a presença de DNA íntegro nas amostras de siri em qualquer dos tratamentos, apenas bandas de baixo peso molecular indicativas de RNA ou DNA degradado.

Tratamentos com o uso de calor podem ocasionar a degradação do DNA e em sua fragmentação em tamanhos menores, fazendo com que a presença de DNA não seja evidente nos géis de agarose após eletroforese. Da mesma forma, o grau de degradação depende da intensidade e da duração da exposição ao calor. Em amostras frescas e não processadas, geralmente o DNA encontra-se intacto, inalterado e presente em grandes quantidades. Porém, em amostras encontradas em restaurantes ou submetidas à processos industriais, é comum que o DNA encontrado esteja degradado e presente em menores quantidades, o que reduz o número de fragmentos de DNA adequados para análises moleculares (BAUER et al., 2003; TELETCHEA, 2009; MUSTO, 2011; VAN DER COLFF; PODIVINSKY, 2008).

Considerando que quase todas as amostras apresentaram bandas indicativas de RNA para os tratamentos fritura e fervura, é possível que as quantidades de DNA medidas por espectrofotometria de luz a 260nm (tabela 9) estejam superestimadas para todas as amostras, com exceção da I12 frita, I32 frita e I32 cozida (ARMANI et al., 2012; LINACERO; RUEDA; VÁZQUEZ, 1998). No entanto, como já explicado acima, como o uso de RNase se deu para todos os protocolos de extração de DNA e foi possível amplificar DNA mesmo das amostras em que não encontrou-se banda de DNA íntegro, as

bandas de baixo peso molecular mais provavelmente são indicativas de presença de DNA degradado, que ainda pode ser utilizado para detecção de fraudes pelo método DNA *barcoding* (WARD; HANNER; HEBERT, 2009; CORRADO, 2016). Ainda em relação a esta tabela, não houve diferenças significativas consistentes entre os tratamentos (cru, frito ou fervido) para cada grupo-alvo. Em alguns casos, a quantidade de DNA obtida após a fritura foi maior do que na amostra crua (situação que ocorreu para todos os polvos, 1 lula, 1 siri e 2 camarões). O mesmo ocorreu com o tratamento fervura para 1 polvo, 1 lula, 1 siri e 2 camarões. A obtenção de uma menor quantidade de DNA nas amostras cruas pode-se explicar pela ruptura das membranas celulares causadas pelos processos de aquecimento, permitindo a liberação de mais DNA das células musculares após desnaturação das proteínas de membrana. Já nos casos em que a quantidade de DNA foi maior na amostra crua do que nas amostras processadas, altas temperaturas no interior da carne devido a uma alta eficiência na transferência de calor pode romper o DNA em pedaços menores, causando sua degradação e por isso, diminuindo a quantidade de DNA disponível detectado (MUSTO, 2011; BAUER et al., 2003; ARMANI et al., 2012; CHIN CHIN et al., 2016; SULTANA et al., 2018).

Mesmo que a qualidade da extração de DNA seja baixa conforme as análises do gel e de absorbância, as amostras cruas e processadas foram submetidas à amplificação do DNA de qualquer maneira, pois, como já explicitado, o fragmento de interesse tem tamanho pequeno e por isso, espera-se ser possível recuperar os fragmentos de DNA de interesse apesar da aparente degradação das amostras, (WARD; HANNER; HEBERT, 2009; CORRADO, 2016).

5.2.2 Amplificação de DNA e sequenciamento

Das 12 amostras cruas amplificadas e selecionadas para as etapas seguintes (conforme as figuras 3 e 4), foi possível amplificar todas as 12 amostras cruas, 11 de 12 amostras fervidas (com exceção da amostra I27 do grupo POLVO) e 11 de 12 amostras fritas, com exceção da amostra F61 (“camarão 7 barbas”). O sucesso da amplificação por PCR depende de vários fatores, entre eles, a pureza e qualidade do DNA obtido pela extração. Porém, outros fatores como a o tempo e método de armazenamento, as temperaturas atin-

gidas durante os processos culinários, pH e presença de inibidores também podem afetar o sucesso e tamanho dos fragmentos gerados (MUSTO, 2011; CORRADO, 2016; VAN DER COLFF; PODIVINSKY, 2008; KRESS; ERICKSON, 2012).

Já em relação à obtenção de sequências de qualidade para identificação das espécies, das três amostras de polvo escolhidas para a análise, só foi possível sequenciar com sucesso a amostra I24, que correspondeu à espécie *Enteroctopus megalocyathus* nos bancos de dados. As amostras F73 e I27, assim como as outras amostras de polvo coletadas e amplificadas cruas, apresentaram bandas fracas no gel de eletroforese, sugerindo uma quantidade baixa de DNA específico gerado com o uso dos *primers* escolhidos ou ainda degradação das amostras antes das coletas, devido à complexa cadeia envolvendo o abastecimento de frutos do mar (CHIN CHIN et al., 2016; MUSTO, 2011; LEAL et al., 2015). Da mesma maneira, foram encontradas as mesmas dificuldades na obtenção de amplificação de qualidade para as amostras de polvo processadas, incluindo uma amostra que não gerou bandas em nenhuma das tentativas (I27 frita). Este conjunto de *primers* foi utilizado com sucesso para identificação filogenética de polvos da espécie *Enteroctopus megalocyathus* por Strugnell et al. (2011) e também para outras espécies de polvos (UNDHEIM et al., 2010; ALLCOCK et al., 2011; KHAKSAR et al., 2015). No entanto, não se pode afirmar qual é a espécie contida nas amostras F73 e I27, indicando a necessidade de uso de um segundo conjunto de marcadores específicos para o grupo ou ainda o uso de um mini DNA *barcode* para permitir a determinação espécie-específica (SHOKRALLA et al., 2015; COSTA et al., 2016; PARDO; JIMÉNEZ; PÉREZ-VILLARREAL, 2016; KRÜCK et al., 2013).

O uso dos *primers* escolhidos para o estudo mostrou-se adequado para uso em amostras do grupo LULA, onde foi possível amplificar e sequenciar com sucesso duas de três amostras escolhidas cruas (I8 e I12). A amostra I21 crua não apresentou um sequenciamento de qualidade apesar de apresentar uma banda forte no gel de agarose, porém, foi possível realizar identificação da amostra nas condições frita e fervida, indicando possível contaminação da amostra crua durante a extração de DNA, co-amplificação de fragmentos não-alvo ou degradação do DNA após a extração (SHOKRALLA et al., 2015; COSTA et al., 2016). Não houve prejuízos causados pelo processamento na qualidade das amostras fritas ou fervidas para o

grupo, e todas apresentaram valores de identificação maiores que 98% para o BOLD.

Para o grupo SIRI, a técnica DNA *barcoding* mostrou-se altamente eficaz para identificação das espécies. Cabe ressaltar que todas as carnes de siri analisadas já haviam passado por um tipo de processamento mecânico, pois eram desfiadas e estavam preparadas em blocos ou, no caso da amostra C1, dentro de uma carapaça dura misturada com outros ingredientes. Segundo o rótulo da embalagem, a casquinha de siri continha “carne de siri, tomate, cebola, salsa, maisena, tempero caseiro, catupiri e queijo mussarela”. Este processamento mecânico dificulta ainda mais o reconhecimento de características morfológicas e possibilita que ocorra a mistura de espécies, que só poderão ser reconhecidas por métodos moleculares (CHRISTIANSEN et al., 2018; GÜNTHER; RAUPACH; KNEBELSBERGER, 2017). No entanto, a técnica de DNA *barcoding* utiliza *primers* universais no sequenciamento de Sanger, que gera apenas uma sequência e possibilita a identificação de apenas uma espécie por amostra, e, por isso, produtos misturados não podem ser identificados corretamente. A mistura de espécies distintas resultaria em sequências com sinais sobrepostos e, para vencer esta barreira, outros métodos de identificação são sugeridos, como o sequenciamento de nova geração (HEBERT; RATNASINGHAM; WAARD, 2003; GÜNTHER; RAUPACH; KNEBELSBERGER, 2017; SHOKRALLA et al., 2015).

Para camarões, não obteve-se amplificação da amostra F61 frita. A fritura de amostras finas faz com que elas atinjam altas temperaturas, e o grau de degradação do DNA relaciona-se com a temperatura atingida, a duração do tratamento e o tamanho da amostra tratada, podendo ter impossibilitado a extração de quantidade e tamanho suficiente de DNA para amplificação (VAN DER COLFF; PODIVINSKY, 2008; SULTANA et al., 2018; ARMANI et al., 2015). Para a amostra F69 fervida, não foi possível obter identificação a nível de espécie com similaridade maior que 98% nos bancos de dados; para esta amostra só foi possível obter um fragmento de 570 pares de base após a retirada manual das partes inicial e final da sequência gerada por conterem bases de baixa qualidade, enquanto para as amostras crua (F e R) e frita foram obtidos fragmentos de 659, 652 e 623 pares de base, respectivamente. A baixa qualidade do sequenciamento relaciona-se com a obtenção de uma banda fraca de DNA após amplificação desta amostra, indicando degradação do

DNA causada pelo tratamento com calor (MUSTO, 2011; VAN DER COLFF; PODIVINSKY, 2008). Conjuntos de *primers* que geram fragmentos menores a partir do COI podem ser utilizados juntamente com o DNA *barcode* padrão para auxiliar nos casos em que não é possível obter uma identificação de amostras processadas (SHOKRALLA et al., 2015; GÜNTHER; RAUPACH; KNEBELSBERGER, 2017; SULTANA et al., 2018; ARMANI et al., 2015).

Para este trabalho, o gene COI confirmou-se como um marcador robusto para uso em crustáceos e lulas, permitindo a identificação das espécies não só em amostras frescas, mas também em amostras degradadas e processadas por métodos culinários. O uso do COI permitiu a amplificação do fragmento de DNA desejado já que o tamanho do amplicon gerado pelo uso dos *primers* LCO1490 e HCO2198 é pequeno o suficiente para que o produto de DNA seja gerado em diversas condições, exceto de DNA severamente danificado. Para estes casos, sugere-se que a técnica DNA *barcoding* seja utilizada em conjunto com marcadores que geram fragmentos menores, como o mini DNA *barcoding* (HEBERT; RATNASINGHAM; WAARD, 2003; VAN DER COLFF; PODIVINSKY, 2008; FOLMER et al., 1994; ARMANI et al., 2015).

5.3 ESPÉCIES IDENTIFICADAS

5.3.1 POLVO

No Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura do MPA divulgado em 2011, as espécies de polvo consideradas no Brasil são as espécies *Octopus* spp. e *Eledone* spp., detalhadas no boletim de SC (2013) como *O. vulgaris*, *E. massyae* e *E. gaucha*. Surpreendentemente, a amostra coletada I24 foi identificada como *Enteroctopus megalocyathus*. Conhecida popularmente como polvo vermelho do sul, polvo gigante, polvo gigante da Patagônia ou simplesmente polvo, a espécie é encontrada no sul da América do Sul, distribuindo-se do sudeste do oceano Pacífico até o Sudoeste do oceano Atlântico (figura 10) e pode chegar a 1 metro de comprimento (ROPER; NIGMATULLIN; JEREB, 2010; PÉREZ et al., 2006).

No BOLD e no GenBank, encontram-se registros de 2 sequências depositadas para a espécie *Enteroctopus megalocyathus*. A

espécie não é protegida e não existem registros sobre seu estado de conservação na *Red List* da IUCN. Sua pesca é considerada apenas artesanal e temporária, realizada através de anzóis nas zonas intermarés ou por mergulho (ROPER; NIGMATULLIN; JEREB, 2010). Este é um dos dois polvos de importância comercial do Chile, que desde 2011 estabeleceu uma de limite da pesca artesanal de *Enteroctopus megalocyathus* de 117 toneladas anuais (CHILE, 2011).

Os relatórios consultados neste estudo (FAO, 2016; Dias-Neto, 2015; MPA, 2011 e UNIVALI/CTTTMar, 2013) não mencionam em momento algum o gênero *Enteroctopus* como uma espécie relevante para os estoques pesqueiros ou como consumidas ou pescadas no Brasil. De fato, como os registros de pesca da espécie só a relacionam com pesca artesanal no Chile, não se esperava encontrá-la em peixarias no Brasil. A Nomenclatura Comum do Mercosul (NCM), que dispõe sobre os nomes das mercadorias importadas e exportadas na área do Mercosul, detalha o molusco polvo apenas como *Octopus* spp.

A ausência de informações quanto a estoques pesqueiros, distribuição, sazonalidade e estado de conservação da espécie de polvo identificada neste estudo levanta preocupações sobre a situação atual da espécie. Sua identificação afirma que ela está sendo consumida, mas sua origem, procedência e sua situação mundial não é conhecida nem considerada por grandes órgãos como a FAO, que não a inclui em seu relatório bianual SOFIA (FAO, 2016). Quando compara-se com a grande disponibilidade de estudos de conservação disponíveis para outras espécies da família Octopodidae, como *Octopus* spp., fica ainda mais evidente a necessidade de ampliar os estudos sobre a espécie. Só para o gênero *Octopus* há mais de 200 sequências de COI depositadas no BOLD e GenBank e muitas fraudes são detectadas envolvendo espécies do grupo (ESPIÑEIRA; VIEITES, 2012; ALLCOCK et al., 2011; PRAMOD et al., 2014).

5.3.2 LULA

O nome fornecido pelos atendentes das peixarias entregava, de fato, que os produtos não teriam sido pescados na costa brasileira: as três amostras eram chamadas de “lula chilena”, “lula do Pacífico” e “lula exportada”. Sugere-se que a última tenha sido chamada “exportada” por um engano do atendente entre os termos *importada*

e *exportada*, já que os outros nomes fornecidos para as amostras não sequenciadas também traziam a noção de que as amostras seriam externas ao Brasil. No entanto, antes de realizar as análises das sequências, não foram encontradas informações relativas às espécies de lula importadas no Brasil e por isso a espécie encontrada não foi incluída nas pesquisas iniciais.

Para as três amostras sequenciadas do grupo lula, o *top hit* foi a espécie *Dosidicus gigas*. Do inglês *jumbo flying squid*, a espécie pode ser chamada de **lula gigante** no Brasil. A espécie não foi listada nos boletins que analisaram os desembarques em Santa Catarina e no Brasil nos anos de 2010, 2011 e 2012 (MPA, 2010; UNIVALI / CTTTMar, 2013). Não constando informações dela para o Brasil, suas informações não foram previamente consultadas nos bancos de dados BOLD e GenBank. De fato, o BOLD conta com 82 sequências de *D. gigas* e o GenBank possui 64 sequências depositadas do gene COI para a espécie.

No relatório mundial da FAO (2016), que a menciona como uma das duas espécies principais de lulas capturadas no mundo, foi registrado um aumento de 37% na sua captura entre os anos de 2013 e 2014. A espécie pertence a família Ommastrephidae, mesma família da espécie *Illex argentinus*, esta última encontrada no sudoeste do Oceano Atlântico, enquanto *Dosidicus gigas* é encontrada no leste do Oceano Pacífico, como pode ser observado na figura 11 (ROPER; NIGMATULLIN; JEREB, 2010).

Segundo a lista vermelha de espécies ameaçadas da União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN) (*The IUCN Red List of Threatened Species*), é considerado *DATA DEFICIENT* (DD), ou seja, não há dados suficientes para determinar o status de conservação da espécie pois não há estimativas confiáveis de biomassa total ou tamanho de estoque, apesar de ser um dos alvos dos maiores esforços de pesca de invertebrados no mundo e segundo recurso pesqueiro mais importante do Peru (BARRATT; ALLCOCK, 2014; YONGJIU et al., 2017). Sabe-se que fenômenos de mudanças climáticas globais, como El Niño e La Niña, podem afetar fortemente os estoques de cefalópodes, incluindo os da espécie, justamente por cefalópodes serem espécies de crescimento rápido e vida curta (ROSA et al., 2013; FAO, 2016). De fato, detectou-se uma diminuição da população na costa do Peru causada por mudanças climáticas (YONGJIU et al., 2017).

A identificação da espécie em trabalhos de autenticação de frutos do mar é escassa, mas foi encontrada, sem substituições, em peixarias no nordeste da Itália e no Egito (NICOLÈ et al., 2012; GALAL-KHALLAF et al., 2016a). A espécie é comumente utilizada em substituição ao polvo comum, *Octopus vulgaris*, em produtos enlatados na Europa (ESPIÑEIRA; VIEITES; SANTA CLARA, 2010; ESPIÑEIRA; VIEITES, 2012).

Enquanto a espécie encontrada *D. gigas* não possui seu status de conservação monitorado, podemos compará-la com outras espécies de lulas que poderiam ser comercializadas no Brasil. A espécie *Illex argentinus*, por exemplo, possui o status *Least concern* (baixa preocupação) na *Red List* da IUCN. Por ser uma espécie de alto interesse comercial, há acompanhamento e regulamentação na sua disponibilidade e no seu estoque (FAO, 2016). Embora acredite-se que a espécie esteja sobrepescada ou no limite do seu potencial, não há preocupação quanto a sua conservação, especialmente porque sua variação de disponibilidade ao longo dos anos foi relacionada a variações ambientais, e não com sobrepesca (ROSA et al., 2013; FAO, 2016).

5.3.3 SIRI

Não sem surpresa, as diferentes amostras de siri corresponderam todas à espécie *Callinectes sapidus*, o siri azul. Imaginava-se que, com a impossibilidade de identificação morfológica dentro dos blocos de carne desfiada de carne de siri, pudessem ser encontradas outras espécies de pescado. Novamente, o sequenciamento de Sanger não é o ideal no uso em amostras misturadas, mas as amostras aqui identificadas continham apenas fragmentos de tecido de *C. sapidus*, pois a qualidade do sequenciamento não aponta para a mistura de espécies (GÜNTHER; RAUPACH; KNEBELSBERGER, 2017).

A espécie, segundo a FAO (2016), pode ser facilmente confundida visualmente com outras espécies do gênero *Callinectes* como *C. bocourti*, *C. maracaiboensis*, *C. rathbunae*, *C. ornatus* e *C. danae*, que ocorrem nas mesmas áreas e apresentam poucas diferenças físicas notáveis do siri azul. Sua distribuição pelo globo é ampla, ocorrendo em toda a costa do Atlântico nas Américas (FAO, 2016).

Assim como para as espécies de lula e polvo encontradas, não há registros da situação da espécie na *Red List* da IUCN e também

não há avaliação de fraudes no comércio de carne de siri para o Brasil. Um estudo realizado nos Estados Unidos detectou 38% de substituições em “bolinhos de siri azul” que deveriam conter apenas a espécie *Callinectes sapidus*, mas detectou outras espécies de siri e caranguejo nos bolinhos (WARNER et al., 2015).

Assim como no caso dos nomes populares de lulas e polvos, o nome popular siri também é amplo e pode ser aplicado a muitas espécies distintas, e, portanto, não é possível indicar responsabilidade ou fraude pela ausência de regulamentação clara quanto ao uso dos nomes populares e do comércio de espécies no Brasil. Aqui também fica evidenciada a necessidade de mais estudos de levantamento de pesca industrial e aquicultura no Brasil, pois não há como saber se a espécie encontrada é sobreexplorada ou se há ameaça à seus estoques com o ritmo atual de pesca e consumo.

5.3.4 CAMARÃO

A espécie conhecida oficialmente como camarão-sete-barbas no Brasil é a espécie *Xiphopenaeus kroyeri*. No entanto, na amostra F61, assim declarada, a espécie identificada molecularmente foi a espécie *Artemesia longinaris*, conhecida popularmente como camarão-barbaruça (MPA, 2010; UNIVALI / CTTTMar, 2013). Para *A. longinaris*, existem 60 sequências depositadas nos bancos de dados BOLD e GenBank, mas não há registros da espécie *X. kroyeri* no BOLD e 14 sequências depositadas no GenBank. O método DNA *barcoding* baseia-se no uso do marcador genético COI para identificação de organismos baseado em classificações pré-existentes, mas, por não haver registros de *X. kroyeri*, seria impossível identificá-la através do BOLD (HEBERT; RATNASINGHAM; WAARD, 2003; LEAL et al., 2015). As espécies *A. longinaris* e *X. kroyeri* são morfologicamente semelhantes, e diferem-se pelo número e forma dos espinhos rostrais dorsais e a espécie encontrada neste estudo é prevista como fauna acompanhante da frota autorizada para a pesca de camarão-sete-barbas (DIAS-NETO; DIAS, 2015). As espécies *X. kroyeri* e *A. longinaris* possuem períodos de defeso que vão de 15 de novembro a 15 de janeiro e de 01 de abril a 31 de maio (BRASIL, 2008).

No entanto, a pesca do camarão-barbaruça pode ser exagerada, justamente por sua captura ser prevista individualmente mas também como captura acessória tanto do camarão *X. kroyeri* quanto

do camarão-rosa. Além disso, a pesca da espécie possui conhecidos impactos sobre sua fauna acompanhante, que inclui fêmeas ovígeras do siri-azul *Callinectes sapidus*, novamente evidenciando a necessidade de levantamento de estoques das espécies de siri comercializadas no Brasil (DIAS-NETO; DIAS, 2015; FAO, 2016).

A amostra F69, fornecida corretamente como camarão-vermelho, foi identificada como *Pleoticus muelleri* pelas análises moleculares. A espécie compartilha o mesmo período de defeso do que as espécies *X. kroyeri* e *A. longinaris* e pode ainda ser chamada de camarão-santana ou camarão-vermelho argentino (BRASIL, 2008; FAO, 2016). A espécie ocorre no oceano Atlântico ocidental desde o Espírito Santo (Brasil) até a Província de Santa Cruz (Argentina) e é o principal alvo das pescarias comerciais de camarão na Argentina. No Brasil, ocorre de forma sazonal durante os meses da primavera e verão. Sua captura é vista como alternativa ou como fauna acompanhante da frota autorizada para a pesca de camarão-rosa e camarão-sete-barbas (DIAS-NETO; DIAS, 2015; FAO, 2016).

Por fim, a amostra I32, identificada pelos atendentes como camarão-branco, foi identificada como *Farfantepenaeus brasiliensis*. Camarão-branco é o nome popular utilizado no Brasil para as espécies de camarão *Litopenaeus vannamei* e *L. schmitti*, enquanto a espécie *F. brasiliensis* corresponde à camarão-rosa ou camarão-pistola (DIAS-NETO; DIAS, 2015; LINDNER, 2014; MPA, 2010; UNIVALI / CTTTMar, 2013).

As espécies *L. schmitti* e *F. brasiliensis* compartilham períodos de defeso, sendo de 01 de março a 31 de maio a nível nacional, e de 15 de julho a 15 de novembro no Complexo Lagunar de Santa Catarina (BRASIL, 2008, 2009). Segundo as Instruções Normativas que regulamentam estes períodos de defeso, em até 7 dias após o início do período, deve-se fornecer uma relação detalhada do estoque das espécies e o transporte e comercialização durante o período devem ser acompanhados de comprovação da origem do produto. A coleta da amostra I32 foi realizada durante um destes períodos de defeso, no mês de setembro. Porém, não foi requisitado que fosse apresentada a declaração de origem do produto.

A espécie *Farfantepenaeus brasiliensis* tem ampla distribuição, ocorrendo desde a costa leste dos Estados Unidos até o Sul do Brasil, registrada para todos os estados costeiros do país. Embora se reproduza o ano inteiro, são conhecidos dois picos de maior intensidade de

reprodução: de abril a junho e de setembro a novembro, enquanto os maiores picos de recrutamento ocorrem de fevereiro a abril e de outubro a dezembro, justificando os períodos de defeso (DIAS-NETO; DIAS, 2015). A pesca industrial ocorre por arrasto de fundo e tem impacto registrado tanto na espécie *F. brasiliensis* quanto na *F. paulensis*, entre os estados do Rio de Janeiro e Santa Catarina (FAO, 2016; UNIVALI / CTTTMar, 2013).

Até 2014, as espécies de camarão *Farfantepenaeus brasiliensis*, *F. paulensis*, *F. subtilis*, *Litopenaeus schmitti* e *Xiphopenaeus kroyeri* e o siri azul *C. sapidus* encontravam-se na “Lista nacional das espécies de invertebrados aquáticos e peixes sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração”, que era regulamentada pela Instrução Normativa nº5 de 21 de maio de 2004 do MMA (VIANA, 2013). No entanto, a Instrução em questão foi revogada em 2014 pela Portaria nº 445/2014, que transformou a lista na “Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção - Peixes e Invertebrados Aquáticos”, atualizando os parâmetros avaliados para inclusão na lista. Agora, apenas os animais sob ameaça de extinção estão protegidos pela legislação e as espécies acima citadas não constam mais na lista. Porém é cada vez mais difícil afirmar a situação das espécies nos estoques nacionais pois, com a falta de boletins estatísticos e levantamentos a nível estadual e nacional para avaliar os níveis de estoques e exploração pesqueira no país, não é possível afirmar se as espécies são ou não sobreexploradas atualmente. Mais uma vez, os esforços de conservação de espécies a longo prazo são prejudicados, principalmente se for levado em conta as previsões feitas do aumento de consumo e pesca no mundo para os próximos anos (FAO, 2016).



Figura 10. Em vermelho, distribuição conhecida da espécie *Enteroctopus megalocyathus*. Fonte: (ROPER; NIGMATULLIN; JEREB, 2010).



Fig. 294 *Dosidicus gigas*
 Known distribution

Figura 11. Em vermelho, distribuição conhecida da espécie *Dosidicus gigas*. Fonte: (ROPER; NIGMATULLIN; JEREB, 2010).

5.4 BANCO DE DADOS

A ideia de desenvolver neste trabalho um protótipo de banco de dados biológicos para uso interno prevê o armazenamento das informações coletadas ao longo do projeto “Gato por Lebre”, desenvolvido no LAPOGE, que tem perspectivas de crescimento não só no número de amostras analisadas de peixes e invertebrados marinhos, mas também de outras frentes de pesquisa de fraudes e substituições. As amostras coletadas e identificadas dentro do projeto não podem ser depositadas nos bancos de dados BOLD e GenBank por não serem provenientes de amostras *voucher*, mas armazenando-as em um banco de dados interno é possível utilizá-las para informações cruzadas, principalmente nas situações encontradas em que não há muitos dados disponíveis para certas espécies, como por exemplo, a espécie de polvo *Enteroctopus megalocyathus*.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Em relação ao processamento culinário, a técnica *DNA barcoding* mostrou-se eficiente para a maior parte das análises feitas e, se combinada com outro conjunto de marcadores para estudos futuros, pode-se ampliar ainda mais suas possibilidades de uso.

Por ser o primeiro estudo realizado com invertebrados marinhos no Brasil, não é surpreendente que as espécies efetivamente encontradas (de acordo com as informações obtidas através dos bancos de dados BOLD e GenBank) sejam distintas das espécies esperadas e registradas anteriormente nos Boletins estatísticos, tanto nacional quanto estadual. Também pesa neste ponto o fato dos últimos boletins divulgados serem datados de 2011 e 2013, equivalentes ainda a períodos de pesca ainda mais antigos (2008-2010). Isso significa um período de 10 anos sem informações precisas sobre o que está sendo pescado no Brasil.

Em nenhum caso deste estudo é possível configurar fraude econômica ou substituição pois não há legislação vigente no país para designar os nomes vulgares corretos para os nomes científicos nem para rotulagem de produtos de invertebrados marinhos. No entanto, considerando as listas utilizadas pelos boletins estatísticos e pela nomenclatura utilizada pela FAO, é possível fazer algumas afirmações em relação a nomenclatura encontrada dos camarões. Constatou-se que a consolidação por nomes vulgares é um problema por si só, mas considerando a variedade de nomes populares ao longo dos estados do Brasil, é ainda mais grave pela dificuldade de identificar-se qual é a espécie sendo consumida. Assim, os boletins nacionais que não consideram esta informação do estado de origem em conta na hora de fazer a relação entre os nomes vulgares e os nomes científicos, tem sua importância diminuída para fins de análise da pesca nacional. O melhor exemplo disso é o camarão rosa. A espécie da costa norte, *Farfantepenaeus subtilis*, é totalmente diferente das espécies chamadas camarão rosa na costa sul e no sudeste (*F. brasiliensis* e *F. paulensis*). Além dos seus estoques serem diferentes, sua gestão também necessita ser diferente (DIAS-NETO; DIAS, 2015). Não só isso, a espécie *F. brasiliensis* foi fornecida como camarão-branco, cujo nome comum corresponde à espécie que teriam condições de manejo totalmente diferentes, especialmente por ser o nome utilizado

para a única espécie cultivada por aquicultura no país, o *Litopenaeus vannamei*.

Para ampliar as possibilidades de identificação, é necessário que mais esforços de identificação de espécies sejam realizados e que espécies *voucher* de espécies como o camarão *Xiphopenaeus kroyeri* e o polvo *Enteroctopus megalocyathus* sejam depositados nos bancos de dados públicos para ampliar o poder de resolução da técnica para estas espécies.

Por fim, dentro do projeto “Gato por Lebre”, considerando os períodos variados de defeso e de reprodução das espécies comercializadas no país (mesmo as que não possuem períodos de defeso definidos), coletas sazonais nas peixarias e restaurantes poderiam aumentar as informações disponíveis sobre o comércio de frutos do mar no país.

REFERÊNCIAS

- ALJANABI, S.; 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.
- ALLCOCK, A. L. et al. Cryptic speciation and the circumpolarity debate: A case study on endemic Southern Ocean octopuses using the COI barcode of life. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, v. 58, n. 1-2, p. 242–249, 2011.
- ARMANI, A. et al. Multiplex conventional and real-time PCR for fish species identification of Bianchetto (juvenile form of *Sardina pilchardus*), Rossetto (*Aphia minuta*), and Icefish in fresh, marinated and cooked products. *Food Chemistry*, Elsevier Ltd, v. 133, p. 184–192, 2012.
- ARMANI, A. et al. DNA barcoding reveals commercial and health issues in ethnic seafood sold on the Italian market. *Food Control*, Elsevier Ltd, v. 55, p. 206–214, 2015.
- ARMANI, A. et al. What is inside the jar? Forensically informative nucleotide sequencing (FINS) of a short mitochondrial COI gene fragment reveals a high percentage of mislabeling in jellyfish food products. *Food Research International*, Elsevier Ltd, v. 54, n. 2, p. 1383–1393, dec 2013.
- BARRATT, I.; ALLCOCK, L. *Dosidicus gigas*. 2014. <<http://www.iucnredlist.org/details/162959/0>>.
- BAUER, T. et al. The effect of processing parameters on DNA degradation in food. *European Food Research and Technology*, v. 217, n. 4, p. 338–343, 2003.
- BEGG, G. A.; WALDMAN, J. R. An holistic approach to fish stock identification. *Fisheries Research*, v. 43, p. 35–44, 1999.
- BOURLAT, S. J. et al. Genomics in marine monitoring: New opportunities for assessing marine health status. *Marine Pollution Bulletin*, Elsevier Ltd, v. 74, n. 1, p. 19–31, 2013.

BRASIL. *Instrução Normativa IBAMA n. 189, de 23 de setembro de 2008*. 2008.

BRASIL. *Instrução Normativa IBAMA n. 21, de 07 de julho de 2009*. 2009.

BRASIL. *Instrução Normativa MAPA n. 29, de 23 de setembro de 2015*. 2015.

BRÉCHON, A. L.; HANNER, R.; MARIANI, S. A systematic analysis across North Atlantic countries unveils subtleties in cod product labelling. *Marine Policy*, v. 69, p. 124–133, jul 2016.

CARVALHO, D. C. et al. Nationwide Brazilian governmental forensic programme reveals seafood mislabelling trends and rates using DNA barcoding. *Fisheries Research*, Elsevier B.V., v. 191, p. 30–35, 2017.

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

CAWTHORN, D.-M. et al. Fish species substitution and misnaming in South Africa: An economic, safety and sustainability conundrum revisited. *Food Chemistry*, v. 185, p. 165–181, oct 2015.

CHANG, C.-H. et al. DNA barcode identification of fish products in Taiwan: Government-commissioned authentication cases. *Food Control*, Elsevier Ltd, v. 66, p. 38–43, aug 2016.

CHETOUI, I. et al. Genetic diversity and phylogenetic analysis of two Tunisian bivalves (Mactridae) *Mactra corallina* (Linnaeus, 1758) and *Eastonia rugosa* (Helbling, 1799) based on COI gene sequences. *Comptes Rendus Biologies*, v. 339, n. 3-4, p. 115–122, 2016.

CHILE. *Cuota artesanal Pulpo Enterocotopus megalocyathus*. 2011.

CHIN CHIN, T. et al. Detection of mislabelled seafood products in Malaysia by DNA barcoding: Improving transparency in food market. *Food Control*, Elsevier Ltd, v. 64, p. 247–256, 2016.

CHIU, T.-H. et al. Genetic diversity of ivory shell (*Babylonia areolata*) in Taiwan and identification of species using DNA-based assays. *Food Control*, Elsevier Ltd, v. 48, p. 108–116, feb 2015.

- CHRISTIANSEN, H. et al. Seafood substitution and mislabeling in Brussels' restaurants and canteens. *Food Control*, Elsevier Ltd, v. 85, p. 66–75, 2018.
- CLINE, E. Marketplace substitution of Atlantic salmon for Pacific salmon in Washington State detected by DNA barcoding. *Food Research International*, v. 45, n. 1, p. 388–393, jan 2012.
- CORRADO, G. Advances in DNA typing in the agro-food supply chain. *Trends in Food Science & Technology*, v. 52, p. 80–89, 2016.
- COSTA, F. O. et al. Biological identifications through DNA barcodes: the case of the Crustacea. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, v. 64, n. 2, p. 272–295, 2007.
- COSTA, J. et al. HRM analysis targeting ITS1 and matK loci as potential DNA mini-barcodes for the authentication of *Hypericum perforatum* and *Hypericum androsaemum* in herbal infusions. *Food Control*, v. 61, p. 105–114, 2016.
- CUTARELLI, A. et al. Italian market fish species identification and commercial frauds revealing by DNA sequencing. *Food Control*, Elsevier Ltd, v. 37, n. 1, p. 46–50, 2014.
- D'AMICO, P. et al. New provisions for the labelling of fishery and aquaculture products: Difficulties in the implementation of Regulation (EU) n. 1379/2013. *Marine Policy*, v. 71, p. 147–156, 2016.
- DE BRITO, M. A. et al. DNA barcoding reveals high substitution rate and mislabeling in croaker fillets (Sciaenidae) marketed in Brazil: The case of “pescada branca” (*Cynoscion leiarchus* and *Plagioscion squamosissimus*). *Food Research International*, Elsevier Ltd, v. 70, p. 40–46, 2015.
- DE MASI, L. et al. Identification of *Doris verrucosa* mollusc via mitochondrial 16S rDNA. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 58, p. 21–29, 2015.
- DI PINTO, A. et al. Species identification in fish fillet products using DNA barcoding. *Fisheries Research*, Elsevier B.V., v. 170, p. 9–13, oct 2015.

DI PINTO, A. et al. Packaged frozen fishery products: species identification, mislabeling occurrence and legislative implications. *Food Chemistry*, v. 194, n. 1169, p. 279–283, 2016.

DIAS-NETO, J.; DIAS, J. d. F. O. *O uso da biodiversidade aquática no Brasil: uma avaliação com foco na pesca*. Brasília: Ibama, 2015. 288 p.

EISCHEID, A. C. et al. Optimization and evaluation of a method for the generation of DNA barcodes for the identification of crustaceans. *LWT - Food Science and Technology*, Elsevier Ltd, v. 73, p. 357–367, 2016.

ESPIÑEIRA, M.; VIEITES, J. M. Rapid method for controlling the correct labeling of products containing common octopus (*Octopus vulgaris*) and main substitute species (*Eledone cirrhosa* and *Dosidicus gigas*) by fast real-time PCR. *Food Chemistry*, v. 135, n. 4, p. 2439–2444, 2012.

ESPIÑEIRA, M.; VIEITES, J. M.; SANTACLARA, F. J. Species authentication of octopus, cuttlefish, bobtail and bottle squids (families Octopodidae, Sepiidae and Sepiolidae) by FINS methodology in seafoods. *Food Chemistry*, Elsevier Ltd, v. 121, n. 2, p. 527–532, 2010.

EUROPEAN COMMISSION. *Molecular Technologies to fight IUU fishing and to support traceability along the supply chain*. 2018. Acessado em 21/02/2018. <<https://fishreg.jrc.ec.europa.eu/projects/iuu>>.

FAO. *The state of world fisheries and aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2016. 200 p.

FERRITO, V.; BERTOLINO, V.; PAPPALARDO, A. M. White fish authentication by COIBar-RFLP: Toward a common strategy for the rapid identification of species in convenience seafood. *Food Control*, Elsevier Ltd, v. 70, n. 8, p. 130–137, 2016.

FOLMER, O. et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, v. 3, n. 5, p. 294–299, 1994.

GALAL-KHALLAF, A. et al. PCR-based assessment of shellfish traceability and sustainability in international Mediterranean seafood markets. *Food Chemistry*, Elsevier Ltd, v. 202, p. 302–308, 2016.

GALAL-KHALLAF, A. et al. Towards more sustainable surimi? PCR-cloning approach for DNA barcoding reveals the use of species of low trophic level and aquaculture in Asian surimi. *Food Control*, Elsevier Ltd, v. 61, n. 2065, p. 62–69, 2016.

GALIMBERTI, A. et al. DNA barcoding as a new tool for food traceability. *Food Research International*, v. 50, n. 1, p. 55–63, 2013.

GENE LINK INC. DNA & RNA Precipitation Solutions. 2014.

GLEADALL, I. G. A molecular sequence proxy for *Muusoctopus januarii* and calibration of recent divergence among a group of mesobenthic octopuses. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, Elsevier B.V., v. 447, p. 106–122, 2013.

GÜNTHER, B.; RAUPACH, M. J.; KNEBELSBERGER, T. Full-length and mini-length DNA barcoding for the identification of seafood commercially traded in Germany. *Food Control*, Elsevier Ltd, v. 73, p. 922–929, 2017.

HASHIMOTO, H. et al. Method for the detection of shrimp/prawn and crab DNAs to identify allergens in dried seaweed products. *Japanese Journal of Food Chemistry and Safety*, v. 22, n. 1, p. 1–10, 2015.

HAYE, P. A. et al. Authentication of commercialized crab-meat in Chile using DNA Barcoding. *Food Control*, v. 25, n. 1, p. 239–244, 2012.

HEBERT, P. D. N.; RATNASINGHAM, S.; WAARD, J. R. de. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 270, n. Suppl_1, p. S96–S99, 2003.

JACQUET, J. L.; PAULY, D. Trade secrets: Renaming and mislabeling of seafood. *Marine Policy*, v. 32, n. 3, p. 309–318, 2008.

KAPPEL, K.; SCHRÖDER, U. Substitution of high-priced fish with low-priced species: Adulteration of common sole in German restaurants. *Food Control*, v. 59, p. 478–486, 2016.

KAWARAZUKA, N.; BÉNÉ, C. The potential role of small fish species in improving micronutrient deficiencies in developing countries: Building evidence. *Public Health Nutrition*, v. 14, n. 11, p. 1927–1938, 2011.

KHAKSAR, R. et al. Unmasking seafood mislabeling in U.S. markets: DNA barcoding as a unique technology for food authentication and quality control. *Food Control*, v. 56, p. 71–76, oct 2015.

KRESS, J. W.; ERICKSON, D. L. *DNA Barcodes - Methods and Protocols*. 1. ed. Washington: Humana Press, 2012. 470 p.

KRÜCK, N. C. et al. Multi-gene barcoding to discriminate sibling species within a morphologically difficult fish genus (*Sillago*). *Fisheries Research*, Elsevier B.V., v. 143, p. 39–46, 2013.

LEAL, M. C. et al. Seafood traceability: Current needs, available tools, and biotechnological challenges for origin certification. *Trends in Biotechnology*, v. 33, n. 6, p. 331–336, 2015.

LEONARDO, R. et al. Molecular testing on sardines and rulings on the authenticity and nutritional value of marketed fishes: An experience report in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Food Control*, v. 60, p. 394–400, 2016.

LINACERO, R.; RUEDA, J.; VÁZQUEZ, A. M. Quantification of DNA. In: KARP, A.; ISAAC, P. G.; INGRAM, D. S. (Ed.). *Molecular tools for screening biodiversity: plants and animals*. 1. ed. London: Chapman and Hall, 1998. cap. 1.4, p. 18–21.

LINDNER, A. O. *Vida Marinha de Santa Catarina*. 1. ed. Florianópolis: Editora UFSC, 2014. 128 p.

LU, X. et al. An effective method for parentage determination of the clam (*Meretrix meretrix*) based on SSR and COI markers. *Aquaculture*, Elsevier B.V., v. 318, n. 1-2, p. 223–228, 2011.

- MAPA. *Manual de inspeção para identificação de espécies de peixes e valores indicativos de substituições em produtos da pesca e aquicultura*. Brasília: MAPA, 2016. 188 p.
- MARALIT, B. A. et al. Detection of mislabeled commercial fishery by-products in the Philippines using DNA barcodes and its implications to food traceability and safety. *Food Control*, Elsevier Ltd, v. 33, n. 1, p. 119–125, 2013.
- MARIANI, S. et al. Low mislabeling rates indicate marked improvements in European seafood market operations. *Frontiers in Ecology and the Environment*, v. 13, n. 10, p. 536–540, 2015.
- MPA. *Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura - BRASIL 2010*. 2010. 101 p. <[http://www.mpa.gov.br/files/docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim Estatístico MPA 2010.pdf](http://www.mpa.gov.br/files/docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim_Estatístico_MPA_2010.pdf)>.
- MUSTO, M. DNA quality and integrity of nuclear and mitochondrial sequences from beef meat as affected by different cooking methods. *Food Technology and Biotechnology*, v. 49, n. 4, p. 523–528, 2011.
- NICOLÈ, S. et al. DNA Barcoding as a Reliable Method for the Authentication of Commercial Seafood Products. *Food Technol. Biotechnol.*, v. 50, n. 4, p. 387–398, 2012.
- PARDO, M. Á.; JIMÉNEZ, E.; PÉREZ-VILLARREAL, B. Misdescription incidents in seafood sector. *Food Control*, v. 62, n. 1379, p. 277–283, 2016.
- PÉREZ, M. C. et al. Feeding and growth in captivity of the octopus *Enteroctopus megalocyathus* Gould, 1852. *Aquaculture Research*, v. 37, n. 6, p. 550–555, 2006.
- PIENIAK, Z. et al. Fish consumption and its motives in households with versus without self-reported medical history of CVD: A consumer survey from five European countries. *BMC Public Health*, v. 8, p. 1–14, 2008.
- PORTAL BRASIL. *Produção de peixes no Brasil cresce com apoio de pesquisas da Embrapa*. 2017. Acessado em 12/01/2018. <<http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2017/01/producao-de-peixes-no-brasil-cresce-com-apoio-de-pesquisas-da-embrapa>>.

- PRAMOD, G. et al. Estimates of illegal and unreported fish in seafood imports to the USA. *Marine Policy*, Elsevier, v. 48, p. 102–113, 2014.
- RATNASINGHAM, S.; HEBERT, P. D. N. BOLD : The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Molecular Ecology Notes*, v. 7, n. April 2016, p. 355–364, 2007.
- ROPER, C.; NIGMATULLIN, C.; JEREB, P. Cephalopods of the World. An annotated and illustrated catalogue of cephalopod species known to date. In: JEREB, P.; C. F. E. Roper (Ed.). *FAO Species Catalogue for Fishery Purposes*. Rome: FAO, 2010. v. 2, n. 4, p. 605.
- ROSA, R. et al. *Dosidicus gigas*, Humboldt Squid. In: ROSA, R.; PIERCE, G.; O'DOR, R. (Ed.). *Advances in Squid Biology, Ecology and Fisheries. Part II - Oegopsid squids*. New York: Nova, 2013. v. 2, cap. 6, p. 169–206.
- SALES, J. B. d. L. et al. Divergence of cryptic species of *Doryteuthis plei* Blainville, 1823 (Loliginidae, Cephalopoda) in the Western Atlantic Ocean is associated with the formation of the Caribbean Sea. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 106, p. 44–54, 2017.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. Commonly Used Techniques in Molecular Cloning. In: Cold Spring Harbor Laboratory Press (Ed.). *Molecular cloning*. 3. ed. NY, USA: Cold Spring Harbor, 2001. cap. Appendix 8.
- SARRI, C. et al. A new set of 16S rRNA universal primers for identification of animal species. *Food Control*, v. 43, p. 35–41, 2014.
- SHOKRALLA, S. et al. A DNA Mini-Barcoding System for Authentication of Processed Fish Products. *Scientific Reports*, Nature Publishing Group, v. 5, p. 1–11, 2015.
- STAFFEN & STAFFEN, C. F. e. M. D. et al. DNA barcoding revealing the mislabeling of fish in a highly tourist capital in Brazil. p. 1–13, 2017.
- STRUGNELL, J. M. et al. The Southern Ocean: Source and sink? *Deep-Sea Research II*, v. 58, p. 196–204, 2011.

- SULTANA, S. et al. Universal mini COI barcode for the identification of fish species in processed products. *Food Research International*, Elsevier, v. 105, n. November 2017, p. 19–28, 2018.
- TELETCHEA, F. Molecular identification methods of fish species: reassessment and possible applications. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, v. 19, n. 3, p. 265–293, 2009.
- THERMO FISHER SCIENTIFIC. *Nucleic Acid. Thermo Scientific NanoDrop Spectrophotometers*. 2010.
- TRIVEDI, S. et al. DNA barcoding: Tool for assessing species identification in Reptilia. *Journal of Entomology and Zoology Studies JEZS*, v. 332, n. 41, p. 332–337, 2016.
- TUR, J. A. et al. Dietary sources of omega 3 fatty acids: Public health risks and benefits. *British Journal of Nutrition*, v. 107, n. SUPPL. 2, 2012.
- UCHIDA, H.; ROHEIM, C. A.; JOHNSTON, R. J. Balancing the health risks and benefits of seafood: How does available guidance affect consumer choices? *American Journal of Agricultural Economics*, v. 99, n. 4, p. 1056–1077, 2017.
- UNDHEIM, E. A. B. et al. Genetic identification of Southern Ocean octopod samples using mtCOI. *Comptes Rendus Biologies, Academie des sciences*, v. 333, n. 5, p. 395–404, 2010.
- UNIVALI / CTTTMar. *Boletim Estatístico da Pesca Industrial de Santa Catarina – Ano 2012*. Itajaí, 2013. 66 p.
- U.S. FOOD & DRUG ADMINISTRATION. *Seafood Species Substitution and Economic Fraud*. 2018. Acessado em 21/02/2018. <<https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/RFE/ucm071528.htm>>.
- VAN DER COLFF, L.; PODIVINSKY, E. Cooking DNA: the effect of 'domestic' cooking methods on detection of GM potato. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 43, p. 2105–2112, 2008.
- VIANA, P. J. Recursos Pesqueiros Do Brasil: Situação Dos Estoques, Da Gestão, E Sugestões Para O Futuro. *Boletim Regional, Urbano E Ambiental*, p. 45–59, 2013.

WARD, R. D.; HANNER, R.; HEBERT, P. D. N. The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. *Journal of Fish Biology*, v. 74, n. 2, p. 329–356, 2009.

WARNER, A. K. et al. Oceana Reveals Mislabeling of Iconic Chesapeake Blue Crab. *Oceana*, n. April, 2015.

WARNER, K. et al. Oceana study reveals seafood fraud nationwide. *Oceana*, n. February, p. 1–69, 2013.

WIENS, J. J.; PENKROT, T. A. Delimiting Species Using DNA and Morphological Variation and Discordant Species Limits in Spiny Lizards (*Sceloporus*). *Systematic Biology*, v. 51, n. 1, p. 69–91, 2002.

YONGJIU, F. et al. A Comparative Study of Spatially Clustered Distribution of Jumbo Flying Squid (*Dosidicus gigas*) Offshore Peru. v. 16, n. 3, p. 490–500, 2017.

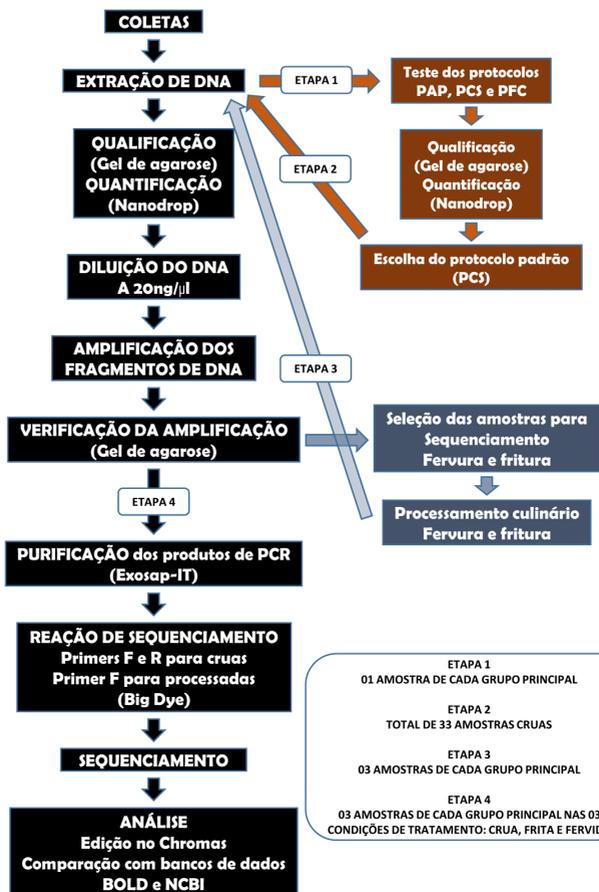
ZHANG, J.; HANNER, R. Molecular Approach to the Identification of Fish in the South China Sea. *PLoS ONE*, v. 7, n. 2, p. e30621, 2012.

ZIELSKE, S.; HAASE, M. Molecular phylogeny and a modified approach of character-based barcoding refining the taxonomy of New Caledonian freshwater gastropods (Caenogastropoda, Truncatelloidea, Tateidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, Elsevier Inc., v. 89, p. 171–181, 2015.

ZUMBO, P. Phenol-chloroform Extraction. *Weill Cornell Medical College*, p. 1–7, 2012.

**APÊNDICE A – Esquema dos processos envolvidos na
parte laboratorial**

A.1 ESQUEMA DOS PRINCIPAIS PROCESSOS ENVOLVIDOS NA PARTE LABORATORIAL



Fonte: elaborado pela autora.

APÊNDICE B - Tabela completa de coletas

B.1 TABELA COMPLETA DE COLETAS

Códigos das amostras, nomes declarados e local de coleta das amostras que compõe o estudo. PMP = Peixaria do Mercado Público, onde a numeração diferencia as peixarias. PL = Peixaria de Laguna. PRT = Peixaria do Rio Tavares.

Código	Declarado	Peixaria
F61	Camarão 7 Barbas	PMP01
F62	Camarão Cinza	PMP01
F63	Polvo	PMP01
F65	Lula	PMP01
F67	Camarão Cinza	PMP01
F68	Carne de Siri	PMP01
F69	Camarão Vermelho	PMP01
F73	Polvo	PMP02
F75	Lula	PMP02
F76	Camarão 7 Barbas	PMP02
F80	Camarão Branco	PMP02
F81	Camarão 7 Barbas	PMP03
F83	Camarão Cinza	PMP03
F88	Polvo	PMP03
F92	Camarão 7 Barbas	PMP04
F93	Camarão Cinza	PMP04
F94	Camarão Vermelho	PMP04
F103	Camarão Cinza	PMP05
F111	Camarão Branco Colinha	PMP06
F113	Camarão Vermelho Grande	PMP06
F114	Camarão Vermelho Pequeno	PMP06
F117	Camarão Cativoiro	PMP06
I7	Camarão Branco	PMP07
I8	Lula Chilena	PMP08
I9	Carne de Siri (Laguna)	PMP08
I10	Camarão Colinha	PMP08
I11	Camarão da Armação	PMP08
I12	Lula do Pacífico	PMP05
I13	Camarão Cativoiro da Bahia	PMP05
I15	Carne de Siri	PMP04

Continuação da tabela.

Código	Declarado	Peixaria
I16	Camarão 7 Barbas	PMP04
I17	Lula do Pacífico	PMP06
I18	Camarão da Armação	PMP06
I19	Camarão de Cativeiro	PMP06
I20	Camarão de Laguna	PMP06
I21	Lula Exportada	PMP03
I22	Camarão 7 Barbas	PMP03
I23	Camarão de Laguna	PMP01
I24	Polvo	PMP01
I25	Camarão Rosa	PMP01
I26	Lula Chilena	PMP01
I27	Polvo	PMP02
I28	Lula internacional	PMP02
I29	Camarão 7 Barbas	PMP02
I30	Lula (de fora)	PMP09
I31	Camarão de Laguna	PMP09
I32	Camarão Branco	PMP09
I33	Camarão Rosa	PMP09
I34	Carne de Siri	PL01
I35	Carne de Siri	PL01
I36	Carne de Siri	PL01
I37	Carne de Siri	PL01
I38	Carne de Siri	PL01
I39	Carne de Siri	PL01
C1	Carne de Siri	PRT01

ANEXO A - Extração de DNA - Protocolo Acetato de Potássio

Protocolo Acetato de Potássio - modificado de Laboratório de Imunologia
Aplicada à Aquicultura (LIAA)

1. Macerar manualmente em torno de 20mg de tecido com tesoura e pinça após deixar o etanol evaporar da amostra, incubando o tubo à temperatura ambiente (TA) por 5min;
2. Acrescentar 200 μ l de água destilada e dar um *spin* (20 segs a 14000 RPM). Retirar a água do tubo e repetir mais 2 lavagens, com um *spin* final mais longo. Retirar totalmente a água;
3. Adicionar 400 μ l de tampão de lise (0,1M Tris-HCl pH 8,5; 0,1M NaCl; 0,05M EDTA pH 7,4; SDS 1%; completar volume com água miliQ) e em seguida homogeneizar com vortex;
4. Adicionar RNase (1mg/ml) e incubar a 37°C por 40min;
5. Adicionar 5 μ l de proteinase K a 20mg/ml e incubar por 4h à 55°C, dando leves batidas no tubo eventualmente para auxiliar na lise do tecido. Não vortexar;
6. *Spin down* (15000 RPM por 1min) e transferir o sobrenadante para um novo tubo;
7. Adicionar 200 μ l de acetato de potássio 3M. *Up and down*;
8. Incubar em gelo por 30min;
9. Centrifugar a 15000 RPM por 10min a 4°C;
10. Transferir o sobrenadante para um novo tubo;
11. Adicionar 250 μ l de isopropanol 100%;
12. Incubar as amostras por 3h a -20°C ou *overnight*;
13. Centrifugar a 15000 RPM por 30min a 4°C e descartar o sobrenadante, vertendo o tubo e secando com papel toalha;
14. Reidratar o precipitado com 500 μ l de etanol 70%;
15. Inverter os tubos 10x e incubar por 1min a TA;
16. Centrifugar a 15000 RPM por 10min a 4°C;
17. Descartar o sobrenadante retirando-o com o auxílio de pipetas. Incubar o tubo aberto a TA por 5min para completa evaporação do etanol;
18. Ressuspender o *pellet* em 50 μ l de água miliQ previamente aquecida a 70°C. Caso necessário, acrescentar mais água.

ANEXO B – Extração de DNA - Protocolo Cloreto de Sódio

Protocolo Cloreto de Sódio - proposto por Aljanabi e Martinez (1997), com modificações

1. Macerar manualmente em torno de 20mg de tecido com tesoura e pinça após deixar o etanol evaporar da amostra, incubando o tubo à temperatura ambiente (TA) por 5min;
2. Acrescentar 200 μl de água destilada e dar um *spin* (20 segs a 14000 RPM). Retirar a água do tubo e repetir mais 2 lavagens, com um *spin* final mais longo. Retirar totalmente a água;
3. Acrescentar 400 μl de tampão de lise (10mM Tris-HCl pH 8.0; 0,4M NaCl; 2mM EDTA pH 8.0; completar volume com água miliQ) e vortexar por 30 segundos;
4. Adicionar 20 μl de SDS 20% (para uma concentração final de 2%) e 7 μl de RNase. Incubar a 37°C por 30min;
5. Adicionar 8 μl de proteinase K a 20mg/ml e vortexar por 30 segundos;
6. Incubar a 55°C por 4h, agitando eventualmente o tubo;
7. Adicionar 300 μl de NaCl 6M e mexer os tubos por inversão manual por 3min;
8. Centrifugar por 30min a 13000 RPM;
9. Transferir 500–600 μl de sobrenadante para microtubos de 1,5ml novos;
10. Adicionar igual volume de isopropanol gelado e virar os tubos suavemente até visualizar o DNA;
11. Colocar no freezer por 1h ou *overnight*;
12. Centrifugar por 15min a 13000 RPM;
13. Verter cuidadosamente para não perder o *pellet*;
14. Adicionar 200 μl de etanol 70% e deixar descansar em TA por 5min;
15. Centrifugar por 15min a 13000 RPM;
16. Verter cuidadosamente o sobrenadante para não perder o *pellet*;
17. Adicionar 200 μl de etanol 100%;
18. Centrifugar por 15min a 13000 RPM;
19. Descartar o sobrenadante e deixar o *pellet* secar bem;
20. Eluir o *pellet* em 50 μl de água miliQ e deixar em TA por 1 hora.

ANEXO C - Extração de DNA - Protocolo Fenol-Clorofórmio

Protocolo Fenol-Clorofórmio - adaptado de Sambrook e Russel (2001)

1. Macerar manualmente em torno de 50mg de tecido com tesoura e pinça após deixar o etanol evaporar da amostra, incubando o tubo à temperatura ambiente (TA) por 5min;
2. Acrescentar 200 μ l de água destilada e dar um *spin* (20 segs a 14000 RPM). Retirar a água do tubo e repetir mais 2 lavagens, com um *spin* final mais longo. Retirar totalmente a água;
3. Adicionar 600 μ l de tampão de lise (50mM NaCl; 50mM Tris-HCl pH 7.5; 5mM EDTA pH 8.0; SDS 0,5%; completar volume com água miliQ), 5 μ l de RNase a 10mg/ml e incubar a 37°C por 30min;
4. Adicionar 5 μ l de proteinase K (10mg/ml), misturar bem e incubar a 55°C por 4h;
5. Deixar esfriar até TA, adicionar 700 μ l de fenol-clorofórmio-álcool isoamil (25:24:1) e misturar manualmente por 10 min para homogeneizar a mistura;
6. Centrifugar a 10000 RPM por 10min, em seguida, remover o sobrenadante e transferi-lo para um novo tubo;
7. Adicionar 700 μ l de clorofórmio-álcool isoamil (24:1) e misturar manualmente por 10min para homogeneizar a mistura;
8. Centrifugar a 10000 RPM por 10min, em seguida, remover o sobrenadante e transferi-lo para um novo tubo;
9. Adicionar 100 μ l de acetato de sódio (AcNa 3M, pH 4.8), misturar bem e adicionar 700 μ l de isopropanol absoluto gelado para precipitar o DNA, agitando gentilmente até visualizar a nuvem de DNA. Se não aparecer nuvem de DNA, congelar *overnight* a -30°C;
10. Centrifugar a 10000 RPM por 10min; o DNA precipitará no fundo do tubo na forma de um *pellet*;
11. Descartar o sobrenadante por inversão do tubo cuidadosamente;
12. Adicionar 200 μ l de etanol 70% e centrifugar a 10000 RPM por 5min e em seguida descartar cuidadosamente o sobrenadante;
13. Secar o *pellet* de DNA na estufa a 37°C, até a completa evaporação do álcool;
14. Dissolver o *pellet* de DNA em água miliQ, agitando o tubo eventualmente.