



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE ESTUDOS COSTEIROS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE BRAGANÇA
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ANA CLAUDIA CARVALHO DA SILVA

**VALIDAÇÃO DE PROTOCOLO, BASEADO EM PCR MULTIPLEX, PARA
IDENTIFICAÇÃO DE FILÉS DE BAGRES DO GÊNERO *BRACHYPLATYSTOMA*.**

BRAGANÇA-PA
2023

ANA CLAUDIA CARVALHO DA SILVA

VALIDAÇÃO DE PROTOCOLO, BASEADO EM PCR MULTIPLEX, PARA IDENTIFICAÇÃO DE FILÉS DE BAGRES DO GÊNERO *BRACHYPLATYSTOMA*.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Ciências Biológicas do Instituto de Estudos Costeiros da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do título de Licenciado Pleno em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Simoni Santos da Silva

BRAGANÇA-PA
2023

ANA CLAUDIA CARVALHO DA SILVA

VALIDAÇÃO DE PROTOCOLO, BASEADO EM PCR MULTIPLEX, PARA IDENTIFICAÇÃO DE FILÉS DE BAGRES DO GÊNERO *BRACHYPLATYSTOMA*.

Este trabalho foi julgado para a obtenção do Grau de Licenciado Pleno em Ciências Biológicas do Curso de Licenciatura Plena em Ciências Biológicas, do Instituto de Estudos Costeiros, da Universidade Federal do Pará, Campus de Bragança.

Data de Aprovação: 27 /11/ 2023

Banca Examinadora

Simoni Santos da Silva

Profa. Dra. Simoni Santos da Silva (Orientadora)
IECOS, Universidade Federal do Pará

Leilane de Freitas Brito

Msc. Leilane de Freitas Brito
IECOS, Universidade Federal do Pará

BRAGANÇA-PA
2023

RESUMO

No Brasil, os peixes *Brachyplatystoma filamentosum* - filhote, *Brachyplatystoma rousseauxi* – dourada e *Brachyplatystoma vaillantii* – piramutaba, são importantes recursos pesqueiros, cujos filés vêm sendo substituídos por peixes de menor valor econômico, caracterizando fraude comercial. Portanto, foi desenvolvido protocolo, baseado em PCR multiplex do COI mitocondrial, para identificar as espécies pelo padrão de bandeamento e avaliar a autenticidade dos produtos processados. Desta forma, o presente trabalho objetivou validar o protocolo multiplex desenvolvido para identificação e autenticação destes peixes processados. Foram coletadas 128 amostras de peixes rotulados como filhote (N = 6, 4 postas e 2 filés), dourada (N = 62, 21 postas e 41 filés) e piramutaba (N = 60, 5 postas e 55 filés). O DNA foi extraído e o protocolo multiplex utilizado, resultando em 85,94% dos produtos contendo a banda controle (~650 pb) e o fragmento espécie-específico de ~254 pb para a dourada, ~405 pb para a piramutaba e ~466 pb para o filhote. Por outro lado, 14,06% (N = 18) das amostras não correspondiam à espécie descrita no rótulo, e a substituição foi observada apenas na dourada a qual foi trocada por piramutaba (N = 15) e *Sciades proops* (N = 3). A dourada possui maior valor agregado que a piramutaba e *S. proops*, portanto, sugerimos que as substituições são fraudulentas, visando o lucro das empresas em detrimento do consumidor. Diante destes resultados, conclui-se que a PCR multiplex é um protocolo eficiente, rápido, sensível e econômico, que pode ser utilizada para a autenticação de produtos processados.

Palavras-chave: Protocolo forense, Autenticação Molecular, Pescado processado.

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	1
PLANO DE TRABALHO.....	2
RELATÓRIO TÉCNICO - CIENTÍFICO FINAL.....	9
RESUMO.....	10
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. JUSTIFICATIVA.....	13
3. OBJETIVOS.....	14
3.1. OBJETIVO GERAL.....	14
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	15
5. PERSPECTIVAS.....	18
6. DIFICULDADES.....	18
7. CONCLUSÃO.....	18
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19

APRESENTAÇÃO

Este Trabalho de Conclusão de Curso é constituído por um relatório técnico-científico final de participação em projeto de pesquisa de Iniciação Científica (PIBIC) na condição de bolsista, entre o período de setembro de 2021 a outubro de 2022. Este é intitulado “Validação de protocolo, baseado em PCR multiplex, para identificação de filés de bagres do gênero *Brachyplatystoma*” e foi desenvolvido sob a orientação da Profa. Dra. Simoni Santos da Silva. Adicionalmente, este projeto de pesquisa foi aceito e apresentado durante o “V Seminário de Ensino, Pesquisa e Extensão” (SIEPE) do *Campus* de Bragança, realizado no período de 7 a 11 de novembro de 2022, quando recebi o prêmio Horácio Schneider, concedido pelo Instituto de Estudos Costeiros ao melhor trabalho na categoria pesquisa. O trabalho também foi apresentado durante o “XXXIII Seminário de Iniciação Científica da UFPA”, realizado no mesmo período de modo semipresencial.

Os resultados apresentados neste trabalho fazem parte do projeto “Avaliação da autenticidade de pescado processado comercializado no estado do Pará e desenvolvimento de tecnologias baseadas em DNA para certificação dos produtos pesqueiros processados”, cujo objetivo geral é desenvolver metodologias baseadas em DNA para autenticar o pescado processado comercializado no Estado do Pará.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DIRETORIA DE PESQUISA
COORDENADORIA DE PROGRAMAS INSTITUCIONAIS**

PROPOSTA DE PLANO DE ATIVIDADES PARA BOLSISTAS DE INICIAÇÃO
CIENTÍFICA

PLANO DE TRABALHO

Nome do Orientador: Simoni Santos da Silva

Faculdade: Engenharia de Pesca

Instituto ou Núcleo: Instituto de Estudos Costeiros- Campus Bragança

Título do Projeto de Pesquisa: AVALIAÇÃO DA AUTENTICIDADE DE PESCADO PROCESSADO COMERCIALIZADO NO ESTADO DO PARÁ E DESENVOLVIMENTO DE TECNOLOGIAS BASEADAS EM DNA PARA CERTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS PESQUEIROS PROCESSADOS

Resumo do Projeto de Pesquisa:

O Brasil exerce papel de destaque no comércio de pescado mundialmente, especialmente do pescado in natura e, em menor grau, na forma processada tais como filés, postas, enlatados, defumados entre outros. Apesar de maior aceitação e valor agregado, no comércio de pescado processado caracteres úteis para identificação das espécies são removidos, podendo gerar problemas de substituição acidental ou intencional destes recursos, casos que vêm sendo detectados globalmente. Há também problemas relativos à similaridade morfológica de espécies congêneres e ambiguidades na nomenclatura vernacular o que pode levar a erros de identificação e substituição de espécies ao longo da cadeia produtiva. Considerando que vários fatores podem resultar em substituição de espécies em diferentes etapas da cadeia produtiva na indústria pesqueira, e que as substituições, culminam com erros na rotulagem podendo gerar perdas econômicas, ecológicas e afetar a segurança

alimentar, este projeto visa utilizar sequências de DNA barcode para avaliar a autenticidade de pescado processado comercializado no Pará e verificar a ocorrência de casos de substituição destes produtos no estado. Adicionalmente, o projeto objetiva desenvolver protocolos baseados em PCR multiplex e/ou PCR-RFLP como tecnologias rápidas e de baixo custo para autenticação do pescado. Tais métodos poderão ser utilizados para a certificação molecular do pescado processado e a geração de um selo de certificação que agregará valor ao produto processado comercializado no estado.

Palavras-Chave: Identificação de espécies, Autenticação molecular, DNA barcode, pescado processado, substituição, Certificação molecular.

Título do Plano de Trabalho: Validação de protocolo, baseado em PCR multiplex, para identificação de filés de bagres do gênero *Brachyplatystoma*.

ÁREA: Ciências Biológicas

PALAVRAS-CHAVE: Autenticação molecular, protocolo forense, pescado processado, PCR multiplex.

Objetivo geral:

Validar um protocolo PCR multiplex desenvolvido para identificação de filés de bagres do gênero *Brachyplatystoma* (*B. filamentosum* - filhote, *B. rousseauxi* – dourada e *B. vaillantii* - piramutaba) que são comercializados processados no Pará.

Objetivos Específicos:

- Amostrar filés das três espécies de bagres comercializadas em supermercados;
- Avaliar a eficiência do protocolo multiplex para identificação de espécies de *Brachyplatystoma* comercializados como filés;
- Avaliar se as espécies descritas no rótulo são aquelas presentes na embalagem;
- Formação de pessoal qualificado na área de estudo.

Justificativa

Até a última estatística pesqueira oficial do Brasil os peixes do gênero *Brachyplatystoma*, especialmente, *B. filamentosum* - filhote, *B. rousseauxi* – dourada e *B. vaillantii* – piramutaba, estavam entre as principais espécies de bagres de água doce comercializadas, no Brasil e no estado do Pará (IBAMA, 2007; MPA, 2012, 2014). A produção nacional destes bagres foi de 280.099,70 toneladas (t.), 178.716,00 t. e 39.090,50 t. de piramutaba, dourada e filhote, respectivamente, entre os anos de 2000 e 2011 (IBAMA, 2001 a 2007; MPA 2012, 2014).

Estes bagres são comercializados *in natura*, nos mercados de peixe ou feiras livres, ou como postas e filés, nas grandes redes de supermercados no estado do Pará. Estes peixes são altamente valorizados quando comercializados processados, sendo o filhote vendido sob preço médio de R\$ 56,50/Kg, seguido da dourada que custa R\$ 29,49/kg e a piramutaba vendida por R\$ 21,05/kg (Carvalho, 2018).

Sabe-se que o processamento agrega valor, aumenta o tempo de prateleira e torna o produto atrativo ao consumidor. No entanto, estes produtos também são altamente suscetíveis a substituições, pois não há características morfológicas que permitam a fácil distinção das espécies (But *et al.*, 2019; Hu *et al.*, 2018). Meta-análises estimam que a taxa global de substituição em produtos pesqueiros varia entre 8 e 30% (Luque; Donlan, 2019; Pardo *et al.*, 2016). Especificamente para espécies de *Brachyplatystoma*, comercializadas processadas no Pará, foram registrados 17% de substituição global, com maior porcentagem de substituição para filhote (29%), seguidos pela dourada (26%) e piramutaba (9%) (Carvalho, 2018; Carvalho *et al.*, 2020). Considerando que as substituições podem resultar em perdas ecológicas, econômicas, em danos à saúde do consumidor entre outros aspectos negativos (Christiansen *et al.*, 2018; Carvalho *et al.*, 2020; Helgoe *et al.*, 2020; Barbosa *et al.*, 2021), faz-se necessário que sejam avaliadas a autenticidade dos produtos comercializados. Para tal, vários métodos baseados em DNA podem ser utilizados, dentre eles sequenciamento, PCR em tempo real e PCR multiplex (Böhme *et al.*, 2019).

Dentre os métodos de autenticação, a PCR multiplex é uma alternativa rápida, sensível e eficiente, pois é capaz de identificar espécies próximas, pelo padrão de bandeamento, quando se utiliza coquetéis de primers específicos que

se ligam apenas no DNA da espécie alvo (Böhme *et al.*, 2019). Adicionalmente, esta é uma metodologia de baixo custo, pois a autenticação de espécies é feita através de eletroforese em gel de agarose, dispensando a necessidade de métodos mais caros, como o sequenciamento, para a identificação das espécies (Barbosa *et al.*, 2020).

Portanto, considerando a relevância econômica das espécies de *Brachyplatystoma* e o registro de substituições nos produtos processados comercializados no Pará, foi desenvolvido um protocolo multiplex, baseados na região COI do DNA mitocondrial. Este protocolo foi testado em espécies identificadas morfologicamente, e se mostrou sensível e eficiente para a identificação inequívoca de filhote, dourada e piramutaba. Portanto, neste trabalho, pretende-se validar o protocolo multiplex de COI com peixes destas espécies comercializados filetados em supermercados paraenses.

Material e Métodos:

Serão realizadas coletas de diferentes lotes de peixes processados, rotulados como piramutaba, dourada e filhote, em grandes redes de supermercados em Belém, Castanhal, Capanema ou Bragança.

Todas as amostras terão o DNA extraído com o kit Wizard Genomics DNA Purification (Promega), seguida da avaliação da concentração e pureza do DNA no Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

As reações de PCR multiplex serão realizadas para um volume final de 15 μL , onde os iniciadores diretos (para dourada, Bro385F: 5' GGGGCCATTAACCTTTATC 3'; piramutaba, Bva 234F: 5' CCTACTCCTACTCGCCTCAG 3' e filhote, Bfi173F: 5' CACCAGATATAGCATTCCCT 3') serão combinados com o iniciador reverso universal FishR1 (Ward *et al.*, 2005), utilizando-se 2 μL de dNTPs (1,25 mM), 1,6 μL de solução tampão (10x) contendo MgCl_2 (25 mM), 0,35 μL de MgCl_2 (25 mM), 0,6 μL de BSA (5mg/ml), 1 μL de DNA total (100 ng/ μL), 0,2 μL de JumpStart Taq DNA polimerase (2,5 U/ μL) (Sigma-aldrich) e água purificada para completar o volume final. Os volumes de primers utilizados na concentração de 10 pmol/ μL será de 0,2 μL de Bro385, 0,1 μL de Bva234 e Bfi173, 0,15 μL de FishR1, para amplificação de fragmentos de 254, 405 e 466 pb em dourada, piramutaba e filhote, respectivamente. Também serão incluídos 0,05 μL (10

pmol/μl) dos primers 16SL1987 e 16SH2609 (Palumbi *et al.*, 1991), para amplificar um fragmento de aproximadamente 650 pb do gene codificador do DNA ribossomal 16S, o qual servirá de controle na reação de PCR.

O programa de amplificação consistirá em desnaturação inicial a 94 °C por 4 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, hibridização a 60,5 °C por 30 segundos, extensão a 72 °C por 1 minuto e extensão final a 72 °C por 7 minutos.

O padrão de bandeamento será avaliado através de eletroforese em gel de agarose a 2%, onde 3μL de PCR será misturado a 3μL de *blue juice* contendo GelRed e, então submetidas a eletroforese por 60 minutos a 110V. Ao final, os resultados serão fotodocumentados para análise visual do padrão do bandeamento.

Cronograma:

Aquisição das Amostras

Coletar as amostras a serem utilizadas no trabalho

Análises laboratoriais

Obtenção do DNA genômico, e PCR multiplex dos exemplares coletados

Apresentação de Relatórios

Redação de relatórios técnico-científicos com os resultados parciais e finais do trabalho

Apresentação dos Resultados no Seminário de Iniciação Científica da UFPA

Apresentação na forma de resumo e oral dos resultados do trabalho

ÁREA DE CONHECIMENTO												
Grande Área:	Ciências Biológicas											
Área:	Genética											
Sub-Área:	Genética Animal											
CRONOGRAMA DE ATIVIDADES												
Atividade	2021				2022							
	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago
COLETAR AS AMOSTRAS A SEREM UTILIZADAS NO TRABALHO												
OBTENÇÃO DO DNA GENÔMICO, E PCR MULTIPLEX DOS EXEMPLARES COLETADOS												
REDAÇÃO DE RELATÓRIOS TÉCNICO-CIENTÍFICOS COM OS RESULTADOS PARCIAIS E FINAIS DO TRABALHO												
APRESENTAÇÃO NA FORMA DE RESUMO E ORAL DOS RESULTADOS DO TRABALHO												
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA												
HISTÓRICO DE BOLSISTAS												
Discente	Data de Indicação			Início	Fim							
201912040028 - ANA CLAUDIA CARVALHO DA SILVA	02/09/2021 11:48:43			02/09/2021	31/08/2022							

Bibliografia:

- Barbosa, A. J. *et al.* Molecular authentication by DNA barcoding and multiplex PCR assay reveals mislabeling and commercial fraud of the Acoupa weakfish (*Cynoscion acoupa*), an economically important sciaenid marketed in Brazil. **Food Control**, 117, 107351, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107351>
- Barbosa, A. J.; Sampaio, I.; Santos, S. Re-visiting the occurrence of mislabeling in frozen “pescada-branca” (*Cynoscion leiarchus* and *Plagioscion squamosissimus* – Sciaenidae) sold in Brazil using DNA barcoding and octaplex PCR assay. **Food Research International**, 143, 110308, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110308>
- Böhme, K. *et al.* Review of recent DNA-based methods for main food-authentication topics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 67, 3854–3864, 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b07016>
- But, G. W-C.; Wu, H-Y.; Shaw, P. C. Identification of fish species of sushi products in Hong Kong. **Food Control**, 98, 164-173, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.11.008%20>
- Carvalho, S. C. **Autenticação molecular dos filés de bagres amazônicos do gênero *Brachyplatystoma* com o auxílio do DNA barcode**. 2018. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Pará, Bragança-PA, 2018.
- Carvalho, S. C.; Sampaio, I.; Santos, S. DNA barcoding reveals mislabeling and commercial fraud in the marketing of fillets of the genus *Brachyplatystoma* Bleeker, 1862, the Amazonian freshwater catfishes economically important in Brazil. **Heliyon**, 6, e04888, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04888>
- Christiansen, H. *et al.* Seafood substitution and mislabeling in Brussels’ restaurants and canteens. **Food Control**, 85, 66–75, 2018 <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.09.005>
- Helgoe, J.; Oswald, K. J.; Quattro, J. M. A comprehensive analysis of the mislabeling of Atlantic cod (*Gadus morhua*) products in Spain. **Fisheries Research**, 222, 105400, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2019.105400>

Hu, Y. *et al.* Study of fish products in Metro Vancouver using DNA barcoding methods reveals fraudulent labeling. **Food Control**, 94, 38–47, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.06.023>

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS (IBAMA). Estatística da pesca no Brasil: Grandes regiões e unidades da federação. Dados da pesca 2000-2007. Disponível em: (<https://www.ibama.gov.br/biodiversidadeaquatica/gestaopesqueira/estatisticapesqueira>)

Luque, G. M.; Donlan, C. J. The characterization of seafood mislabeling: A global meta-analysis. **Biological Conservation**, 236, 556-570, 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.biocon.2019.04.006>

Ministério de Pesca e Aquicultura (MPA). Boletim Estatístico da pesca e aquicultura, Brasília- DF, Brasil. 2010. 60p, 2012.

Ministério de Pesca e Aquicultura (MPA). Boletim Estatístico da pesca e aquicultura, Brasília-DF, Brasil. 2013. 59p, 2014.

Pardo, M. Á.; Jiménez, E.; Pérez-Villarreal, B. Misdescription incidents in seafood sector. **Food Control**, 62, 277–283, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.10.048>

Palumbi, S. R. *et al.* The Simple Fool's Guide to PCR. Department of Zoology: University of Hawaii, Honolulu. 1991.

Ward R. D. *et al.* DNA barcoding Australia's fish species. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, 360(13), 1847–1857, 2005. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1716>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DIRETORIA DE PESQUISA

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA – **PIBIC/UFPA, PIBIC/UFPA CAMPI DO INTERIOR, PIBIC/UFPA EBTT, PIBIC-AF/UFPA, PIBIC/CNPq, PIBIC-AF/CNPq, PIBITI/CNPq, PIBIC-EM PROGRAMA VOLUNTÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA - PIVIC, PRODUTOR e PRODUTOR/RENOVAÇÃO.**

RELATÓRIO TÉCNICO - CIENTÍFICO FINAL

Período: 08/2021 a 07/2022

1. IDENTIFICAÇÃO DO PROJETO

Título do Projeto de Pesquisa:

Avaliação da autenticidade de pescado processado comercializado no estado do Pará e desenvolvimento de tecnologias baseadas em DNA para certificação dos produtos pesqueiros processados

Nome do Orientador: Simoni Santos da Silva

Titulação do Orientador: Doutor

Faculdade: Engenharia de Pesca

Instituto/Núcleo: Instituto de Estudos Costeiros - IECOS, Campus de Bragança.

Laboratório: Laboratório de Microbiologia do Pescado- LAMIP

Título do Plano de Trabalho: **Validação de protocolo, baseado em PCR multiplex, para identificação de filés de bagres do gênero *Brachyplatystoma*.**

Nome do Bolsista: Ana Claudia Carvalho da Silva

Tipo de Bolsa:

(X) PIBIC/UFPA CAMPI DO INTERIOR

RESUMO

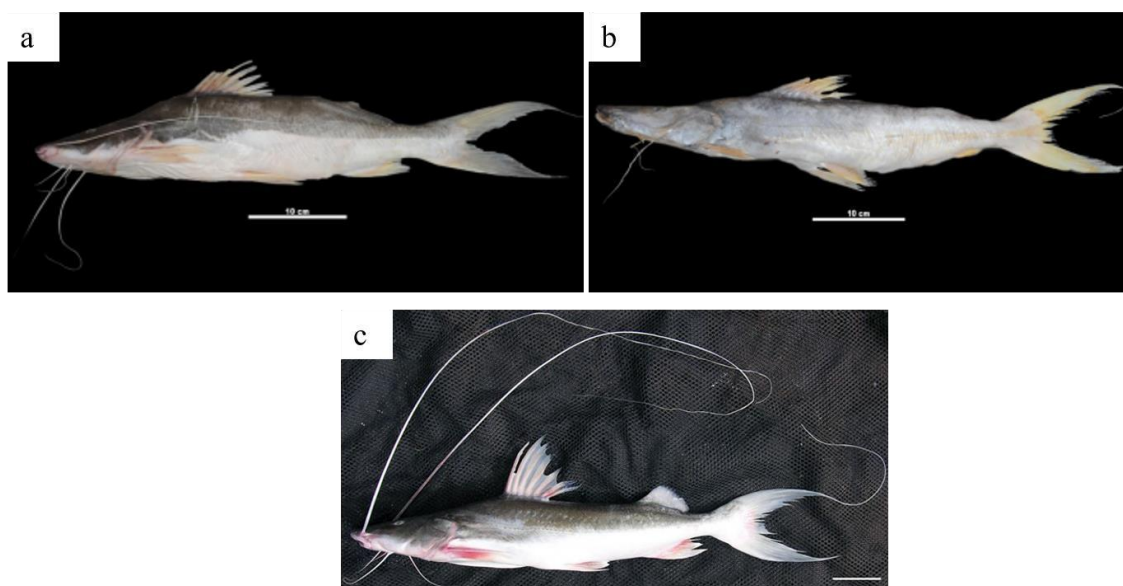
No Brasil, os peixes *Brachyplatystoma filamentosum* - filhote, *Brachyplatystoma rousseauxi* – dourada e *Brachyplatystoma vaillantii* – piramutaba, são importantes recursos pesqueiros, cujos filés vêm sendo substituídos por peixes de menor valor econômico, caracterizando fraude comercial. Portanto, foi desenvolvido protocolo, baseado em PCR multiplex do COI mitocondrial, para identificar as espécies pelo padrão de bandeamento e avaliar a autenticidade dos produtos processados. Desta forma, o presente trabalho objetivou validar o protocolo multiplex desenvolvido para identificação e autenticação destes peixes processados. Foram coletadas 128 amostras de peixes rotulados como filhote (N = 6, 4 postas e 2 filés), dourada (N = 62, 21 postas e 41 filés) e piramutaba (N = 60, 5 postas e 55 filés). O DNA foi extraído e o protocolo multiplex utilizado, resultando em 85,94% dos produtos contendo a banda controle (~650 pb) e o fragmento espécie-específico de ~254 pb para a dourada, ~405 pb para a piramutaba e ~466 pb para o filhote. Por outro lado, 14,06% (N = 18) das amostras não correspondiam à espécie descrita no rótulo, e a substituição foi observada apenas na dourada a qual foi trocada por piramutaba (N = 15) e *Sciades proops* (N = 3). A dourada possui maior valor agregado que a piramutaba e *S. proops*, portanto, sugerimos que as substituições são fraudulentas, visando o lucro das empresas em detrimento do consumidor. Diante destes resultados, conclui-se que a PCR multiplex é um protocolo eficiente, rápido, sensível e econômico, que pode ser utilizada para a autenticação de produtos processados.

Palavras-chave: Protocolo forense, Autenticação Molecular, Pescado processado.

1. INTRODUÇÃO

Os peixes do gênero *Brachyplatystoma*, especialmente, *B. filamentosum* - filhote, *B. rousseauxii* – dourada e *B. vaillantii* – piramutaba (Figura 1), são bagres de água doce, membros da família Pimelodidae, distribuídos na região Neotropical nas bacias do Amazonas e Orinoco (Lundberg; Littmann, 2003; Nelson *et al.*, 2016). Estas espécies são importantes recursos pesqueiros comercializados no Brasil, e o Pará é um dos principais produtores destes pescados (IBAMA, 2007; MPA, 2012, 2014). Entre os anos de 2000 e 2011 a produção nacional destes bagres foi de 280.099,70 toneladas (t.), 178.716,00 t. e 39.090,50 t. de piramutaba, dourada e filhote, respectivamente (IBAMA, 2001 a 2007; MPA 2012, 2014).

Figura 1. Espécime de *B. vaillantii* - piramutaba (a), *B. rousseauxii* - dourada (b) e *B. filamentosum* – filhote (c).



Fonte: Carvalho (2018); Pérez; Henry (2017).

Estes bagres, assim como a maioria do pescado vendido no Brasil, são comercializados majoritariamente *in natura*, nos mercados de peixe ou feiras livres, e em menor escala, em forma de congelados como postas e filés, nas grandes redes de supermercados no estado do Pará. Estes últimos são altamente valorizados quando comercializados processados, com o filhote

vendido sob preço médio de R\$ 88,90/Kg, seguido da dourada que custa R\$ 41,78/kg e a piramutaba vendida por R\$ 34,04/kg.

Até recentemente, os peixes *in natura* eram os mais comercializados no mundo, no entanto os produtos processados (filés, enlatados, curados entre outros) vêm ganhando mercado pois são de fácil preparo, apresentam maior durabilidade, qualidade sensorial e microbiológica (FAO, 2018; FAO, 2020). Por outro lado, o processamento acaba eliminando características morfológicas consideradas necessárias para identificação de espécies podendo ocasionar substituições e erros de etiquetagem, seja acidental ou intencionalmente (Hu *et al.*, 2018; But *et al.*, 2019), causando grandes perdas econômicas e ecológicas, além de comprometer a qualidade e a segurança alimentar do consumidor (Christiansen *et al.*, 2018; Carvalho *et al.*, 2020; Helgoe *et al.*, 2020; Barbosa *et al.*, 2021).

Meta-análises estimam que a taxa global de substituição em produtos pesqueiros varia entre 8 e 30% (Pardo *et al.*, 2016; Luque; Donlan, 2019). Especificamente para os peixes do gênero *Brachyplatystoma*, comercializados processados no Pará, foram registrados 18% de substituição global, com maior porcentagem de substituição para filhote (29%), seguidos pela dourada (26%) e piramutaba (9%) (Carvalho, 2018; Carvalho *et al.*, 2020).

Considerando que a identificação de fraudes em produtos processados requer metodologias sensíveis e acuradas, os métodos baseados em DNA vêm sendo bastante utilizados para autenticação de pescado, pois esta molécula contém regiões que permitem a identificação inequívoca das espécies (Hebert *et al.*, 2003b) e mantém-se estável mesmo em produtos altamente processados (Böhme *et al.*, 2019). Dentre os métodos de autenticação, a PCR multiplex é uma alternativa rápida, sensível e eficiente, pois é capaz de identificar espécies próximas, pelo padrão de bandeamento, quando se utiliza coquetéis de primers específicos que se ligam apenas no DNA da espécie alvo (Böhme *et al.*, 2019). Adicionalmente, esta é uma metodologia econômica, pois a autenticação de espécies é feita através de eletroforese em gel de agarose, dispensando a necessidade de métodos mais caros, como o sequenciamento, para a identificação (Barbosa *et al.*, 2020).

Portanto, considerando a relevância econômica das espécies de *Brachyplatystoma* e o registro de substituições nos produtos processados comercializados no Pará, foi desenvolvido um protocolo multiplex, baseados na região COI do DNA mitocondrial (Brito, 2021). Este protocolo foi testado em espécies identificadas morfológicamente, e se mostrou sensível e eficiente para a identificação inequívoca de filhote, dourada e piramutaba. Portanto, neste trabalho, pretende-se validar o protocolo multiplex de COI com peixes destas espécies comercializados filetados em supermercados paraenses.

2. JUSTIFICATIVA

O consumo de pescado tem aumentado significativamente nos últimos anos (FAO, 2018; FAO, 2020; FAO, 2022), com a pesca e aquicultura tendo contribuído, sobremaneira, para a segurança alimentar e nutrição global (FAO, 2022). Além dos produtos *in natura*, há a oferta de pescado processado, o qual apresenta maior praticidade e qualidade e vêm ganhando a preferência do consumidor. No entanto, o processamento pode favorecer substituições e erros de rotulagem, pois caracteres diagnósticos que facilitam a identificação morfológica de espécies são removidos (But *et al.*, 2019; Helgoe *et al.*, 2020).

Mundialmente, métodos baseados em DNA vêm sendo utilizados para autenticação de pescado e demonstram que as substituições são comuns e, geralmente, envolvem fraude comercial onde espécies mais baratas são comercializadas no lugar daquelas mais valorizadas (Pardo *et al.*, 2016; Luque; Donlan, 2019; Helgoe *et al.*, 2020; Barbosa *et al.*, 2021; Vale *et al.*, 2022). Este cenário também foi identificado para os bagres do gênero *Brachyplatystoma* (*B. filamentosum*, *B. vaillantii* e *B. roussauxii*), através de avaliação de autenticidade dos produtos utilizando-se sequências de DNA *barcode* da COI mitocondrial (Carvalho, 2018; Carvalho *et al.*, 2020).

No entanto, apesar da eficiência do sequenciamento, esta metodologia ainda tem custos elevados por isso foi desenvolvido um protocolo de autenticação baseado em PCR que também é eficiente para a identificação dos produtos, porém, mais rápida e menos dispendiosa quando comparado com o sequenciamento de DNA (Brito, 2021). Portanto, este trabalho visa validar o protocolo de PCR multiplex desenvolvido para autenticar bagres do gênero

Brachyplatystoma, comercializados em grandes redes de supermercados do Pará.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Validar um protocolo PCR multiplex desenvolvido para identificação de filés de bagres do gênero *Brachyplatystoma* (*B. filamentosum* - filhote, *B. rousseauxi* – dourada e *B. vaillantii* - piramutaba) que são comercializados processados no Pará.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Amostrar filés das três espécies de bagres comercializadas em supermercados;
- Avaliar a eficiência do protocolo multiplex para identificação de espécies de *Brachyplatystoma* comercializados como filés;
- Avaliar se as espécies descritas no rótulo são aquelas presentes na embalagem;
- Formação de pessoal qualificado na área de estudo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 128 amostras de filés e/ou postas de peixes congelados comercializados como filhote (*B. filamentosum*, N = 6, sendo 4 postas e 2 filés), dourada (*B. rousseauxii*, N = 62, sendo 21 postas e 41 filés) e piramutaba (*B. vaillantii*, N = 60, sendo 5 postas e 55 filés), as quais foram coletadas bimestralmente (visando evitar a compra de lotes repetidos), entre outubro de 2021 e maio de 2022 em oito grandes redes de supermercados nas cidades de Bragança, Ananindeua e Belém, no estado do Pará.

Um pedaço da porção mais interna do músculo destes peixes foi conservado em etanol absoluto e mantido em freezer no Laboratório de Microbiologia do Pescado (LAMIP), do Instituto e Estudos Costeiros (IECOS), da Universidade Federal do Pará (UFPA).

Foi extraído DNA total de todos os peixes, utilizando-se o kit *Wizard Genomics DNA Purification* (Promega). Em seguida, a concentração e pureza dos DNAs foram avaliados no espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

Posteriormente, foram realizadas as reações de PCR multiplex de todas as amostras, utilizando-se os primers diretos (10 pmol/μL) para dourada (Bro385F: 5' GGGGCCATTAACCTTTATC 3' (0,2 μL)); piramutaba (Bva 234F: 5' CCTACTCCTACTCGCCTCAG 3' (0,1 μL)) e filhote (Bfi173F: 5' CACCAGATATAGCATTCCCT 3' (0,1 μL)) combinados com o iniciador reverso universal FishR1 (10 pmol/μL; 0,15 μL) (Ward *et al.*, 2005). As reações foram realizadas, utilizando-se 2 μL de dNTPs (1,25 mM), 1,6 μL de solução tampão (10x) contendo MgCl₂ (25 mM), 0,35 μL de MgCl₂ (25 mM), 0,6 μL de BSA (5mg/ml), 1 μL de DNA (10 ng/μL), 0,2 μL de JumpStart Taq DNA polimerase (2,5 U/μL) (Sigma-Aldrich) e água purificada para completar o volume final. Também foram incluídos 0,05 μl (10 pmol/μl) dos primers 16SL1987 e 16SH2609 (Palumbi *et al.*, 1991), para amplificar um fragmento de aproximadamente 650 pb do gene codificador do DNA ribossomal 16S, o qual serviu de controle na reação de PCR.

O programa de amplificação consistiu em desnaturação inicial a 94 °C por 4 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, hibridização a 60,5 °C por 30 segundos, extensão a 72 °C por 1 minuto e extensão final a 72 °C por 7 minutos.

O padrão de bandeamento foi avaliado através de eletroforese em gel de agarose a 2%, onde 3μL de PCR foi misturado a 3μL de *blue juice* contendo GelRed e, então, submetidos a eletroforese por 60 minutos a 110V. Em todas as eletroforeses foi incluído PCRs de amostras controle de cada espécie, as quais foram previamente identificadas por morfologia e sequenciamento. Ao final, os resultados foram fotodocumentados para análise visual do padrão do bandeamento e identificação da espécie comercializada.

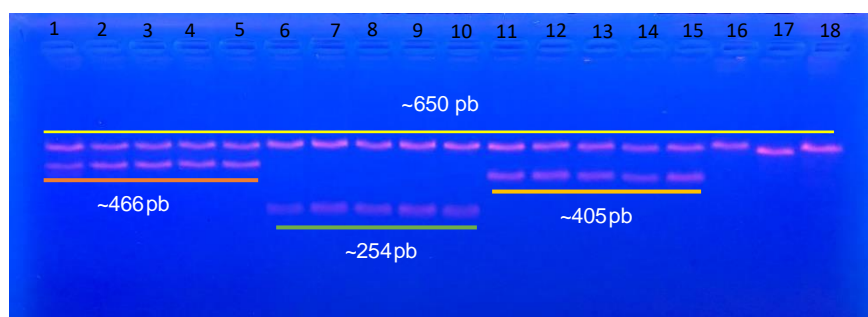
Adicionalmente, 3 amostras tiveram o fragmento *barcode* da COI amplificado através da PCR utilizando-se os iniciadores, concentrações de reagentes e condições de amplificação descrito em Carvalho *et al.* (2020), pois estas foram, anteriormente, submetidas a PCR multiplex e apenas o fragmento do gene codificador do DNA ribossomal 16S foi amplificado. As reações positivas

foram purificadas e submetidas ao sequenciamento pelo método dideoxiterminal (Sanger *et al.*, 1977) utilizando-se reagentes do Kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems), seguindo protocolo do fabricante. As eletroforeses foram realizadas no ABI 3500 XL (Thermo Fisher).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As reações de PCR geraram os padrões de bandeamento característicos para as espécies de piramutaba (~405 pb), filhote (~466 pb) e dourada (~254 pb), o que foi evidenciado pela comparação com as amostras controle (Figura 2 e 3). Todas as reações apresentaram a banda controle do rDNA 16S (~650 pb), demonstrando a presença de DNA e ausência de contaminantes nas reações de PCR (Figuras 2 e 3). Os resultados corroboram a eficiência do protocolo multiplex, desenvolvido por Brito (2021), para identificação de peixes congelados do gênero *Brachyplatystoma*, validando o método para a autenticação dos produtos processados. Portanto, o protocolo multiplex pode ser considerado uma metodologia acurada, rápida e de menor custo para autenticação de bagres *Brachyplatystoma*, quando comparado ao sequenciamento e outros métodos baseados em DNA.

Figura 2. Padrão de bandeamento obtido a partir da PCR multiplex para 18 amostras de peixes congelados. 1 a 5 - *B. filamentosum* (~466 pb), 6 a 10 - *B. rousseauxii* (~254 pb) e para 11 a 15 - *B. vaillantii* (~405pb). Nos poços 16 a 18 estão as amostras substituintes que amplificaram apenas a banda controle. O fragmento de ~650 pb em todas as amostras corresponde à banda controle do rDNA 16S.

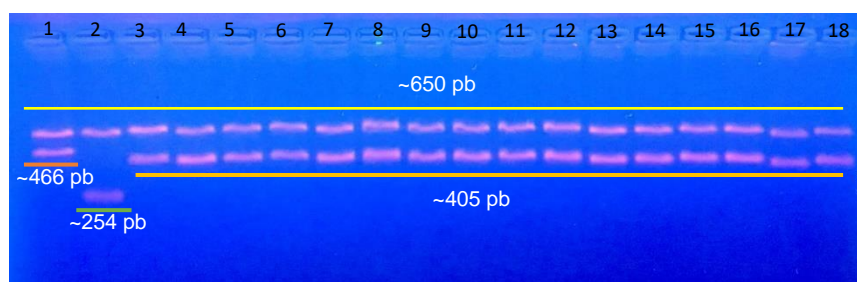


Os resultados mostraram que 85,93% (N = 110) das 128 amostras submetidas a PCR Multiplex estavam rotuladas corretamente, enquanto 14,06% (N = 18) foram substituídas, pois apresentaram divergência entre o padrão de bandeamento em comparação com a espécie descrita no rótulo. A taxa de substituição observada no presente trabalho foi menor que os 18% observados

por Carvalho (2018) quando avaliou filés de filhote, dourada e piramutaba comercializadas em supermercados do nordeste paraense.

Por outro lado, a substituição do presente estudo foi similar aos 16% observados por Gomes *et al.* (2019) quando avaliou filés de gurijuba (*Sciades parkeri*) comercializados na mesma região. Quando comparado com pescadas da família Sciaenidae, também comercializadas no nordeste paraense, a taxa de substituição observada no presente trabalho é menor que aquela encontrada para *Cynoscion acoupa* (45,4%; Barbosa *et al.*, 2020) e *Plagioscion squamosissimus* (entre 73,43 e 86,11%; Brito *et al.*, 2015; Barbosa *et al.*, 2021; Vale *et al.*, 2022), mas maior que a registrada para *Macrodon ancylodon* (5,26%; Vale *et al.*, 2022).

Figura 3. Padrão de bandeamento obtido a partir da PCR multiplex para amostras comercializadas congeladas. Poços de 1 a 3 correspondem aos padrões de bandeamento controle para filhote, dourada e piramutaba, respectivamente. Nos poços de 4 a 18 são substituições. Estas foram comercializadas sob a designação de dourada e após a eletroforese em gel observou-se que o padrão de banda característico de piramutaba. O fragmento de ~650 pb em todas as amostras corresponde à banda controle do rDNA 16S.



Neste estudo as substituições foram registradas apenas nos produtos rotulados como “dourada”, o que difere dos resultados de Carvalho (2018) e Carvalho *et al.* (2020) que encontraram troca de espécies no filhote (29%), dourada (26%) e piramutaba (9%). Das 18 amostras substituídas, 15 foram identificadas como “piramutaba” e três, só apresentaram a banda controle, não sendo possível a identificação a nível específico. No entanto, estas tiveram a região *barcode* da COI sequenciadas e foram comparadas com banco referência do BOLD (https://v4.boldsystems.org/index.php/IDS_IdentificationRequest) e apresentaram entre 99,8% e 100% de similaridade com sequência privada de *Sciades proops*, um bagre marinho da família Ariidae. Quando avaliados o valor de mercado das substituintes em relação à dourada, é possível inferir que todas

as substituintes foram espécies de menor valor de mercado, quando comparadas com a dourada, o que configura fraude comercial onde o principal objetivo das trocas é o lucro do produtor em detrimento do consumidor.

Fraude comercial é uma das causas mais comuns de substituições na indústria do pescado observadas no mundo, e no Brasil esta é a principal motivação das substituições em bagres do gênero *Brachyplatystoma* (Carvalho, 2018; Carvalho *et al.*, 2020), pargos do gênero *Lutjanus* (Veneza *et al.*, 2018) e pescadas dos gêneros *Cynoscion* (Barbosa *et al.*, 2020) e *Plagioscion* (Brito *et al.*, 2015; Barbosa *et al.*, 2021; Vale *et al.*, 2022).

Outros aspectos a serem considerados são que as substituições podem afetar a saúde humana, quando as espécies substituintes contêm alérgenos ou toxinas, bem como, podem também mascarar a taxa de exploração dos recursos pesqueiros, promovendo dano à biodiversidade. Este último ocorre porque a taxa de exploração dos estoques da espécie alvo deve estar superestimada, enquanto a da substituinte é subnotificada, o que dificultará uma avaliação acurada dos estoques de cada táxon, dificultando o ordenamento das espécies. Dessa forma, o uso de métodos sensíveis e acurados, como a PCR multiplex, são importantes para a fiscalização do comércio destes produtos processados e podem auxiliar as autoridades na tomada de decisões para mitigar os impactos das substituições.

5. PERSPECTIVAS

Sou aluna em formação do curso de Ciências Biológicas, do IECOS, UFPA Bragança. Pretendo continuar desenvolvendo atividades de pesquisa como discente de Iniciação Científica e almejo aprimorar os trabalhos desenvolvidos para a elaboração do trabalho de conclusão de curso (TCC). Adicionalmente, é do meu interesse, em conformidade com o grupo de trabalho ao qual integro, realizar submissão dos trabalhos para apresentação em congressos da área, bem como publicá-los na forma de artigo em revista científica.

6. DIFICULDADES

A demora na chegada de reagentes foi um dos problemas enfrentados. Também houve interrupção de atividades laboratoriais devido ao cenário de

aumento de casos de Covid-19 no município de Bragança e o meu acometimento de Covid-19 que atrasou o desenvolvimento das atividades.

7. CONCLUSÃO

A PCR Multiplex demonstrou ser uma técnica eficiente, rápida e econômica, sendo considerada uma ferramenta acurada para autenticação de produtos processados de bagres *Brachyplatystoma*. Também é notório que as substituições observadas têm motivação econômica, podendo ser caracterizadas como fraude comercial. É importante o desenvolvimento de políticas de monitoramento e fiscalização do comércio dos produtos pesqueiros para mitigar os impactos das substituições de pescado.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acero P. A. Order Siluriformes, Ariidae. In: K.E, Carpenter, editor. The living marine resources of the western central atlantic, volume 2: bony fishes part 1 (Acipenseridae to Grammatidae). Rome: FAO Species Identification Guide for Fishery Purposes and American Society of Ichthyologists and Herpetologists; pp. 831–845, 2002.
- Barbosa, A. J. *et al.* Molecular authentication by DNA barcoding and multiplex PCR assay reveals mislabeling and commercial fraud of the Acoupa weakfish (*Cynoscion acoupa*), an economically important sciaenid marketed in Brazil. **Food Control**, 117, 107351, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107351>
- Barbosa, A. J.; Sampaio, I.; Santos, S. Re-visiting the occurrence of mislabeling in frozen “pescada-branca” (*Cynoscion leiarchus* and *Plagioscion squamosissimus* – Sciaenidae) sold in Brazil using DNA barcoding and octaplex PCR assay. **Food Research International**, 143, 110308, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110308>
- Böhme, K. *et al.* Review of recent DNA-based methods for main food-authentication topics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 67, 3854–3864, 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b07016>
- 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**, 70, 40–46, 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.01.031>
- Brito, L. F. **Protocolos Forenses para Identificação de Bagres do Gênero *Brachyplatystoma* (Pimelodidae- Siluriformes) de Importância Comercial no Brasil**. 2021. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Pará, Bragança-PA, 2021.
- But, G. W-C. *et al.* Identification of fish species of sushi products in Hong Kong. **Food Control**, 98, 164-173, 2019.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.11.008>
- Carvalho, S. C. **Autenticação molecular dos filés de bagres amazônicos do gênero *brachyplatystoma* com o auxílio do DNA *barcode***. 2018. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Pará, Bragança-PA, 2018.
- Carvalho, S. C.; Sampaio, I.; Santos, S. DNA barcoding reveals mislabeling and commercial fraud in the marketing of fillets of the genus *Brachyplatystoma* Bleeker, 1862, the Amazonian freshwater catfishes economically important in Brazil. **Heliyon**, 6, e04888, 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04888>
- Cawthorn, D.F. M. *et al.* Generic names and mislabeling conceal high species diversity in global fisheries markets. **Conservation Letters**, 11(5), 1–12, 2018.
- Christiansen, H. *et al.* Seafood substitution and mislabeling in Brussels' restaurants and canteens. **Food Control**, 85, 66–75, 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.09.005>
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). **The state of world fisheries and aquaculture. Meeting The Sustainable Development Goals**. Rome: FAO, 2018.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). **The state of world: sustainability in action. Fisheries and aquaculture**. Rome: FAO, 2020.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). **The state of world fisheries and aquaculture. Towards blue transformation**. Rome: FAO, 2022.

- Gomes, G. *et al.* Forensic analysis reveals fraud in fillets from the “Gurijuba” *Sciades parkeri* (Ariidae – Siluriformes): a vulnerable fish in Brazilian Coastal Amazon. **Mitochondrial DNA Part A**, 5, 721-729, 2019. [https://doi:10.1080/24701394.2019.1622694](https://doi.org/10.1080/24701394.2019.1622694)
- Hebert, P. D. *et al.* Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, 270(1512), 313–321, 2003. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
- Helgoe, J. *et al.* A comprehensive analysis of the mislabeling of Atlantic cod (*Gadus morhua*) products in Spain. **Fisheries Research**, 222, 105400, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2019.105400>
- Hu, Y. *et al.* Study of fish products in Metro Vancouver using DNA barcoding methods reveals fraudulent labeling. **Food Control**, 94, 38–47, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.06.023>
- Instituto Brasileiro Do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). Estatística da pesca no Brasil: Grandes regiões e unidades da federação. Dados da pesca 2000-2007. Disponível em: (<https://www.ibama.gov.br/biodiversidadeaquatica/gestao-pesqueira/estatisticapesqueira>)
- Lundberg, J. G.; Littmann, M. W. Family Pimelodidae (Long-whiskered catfishes). *In*: REIS, R. E.; Kullander, S. O.; Ferraris, Jr., C. J. eds. **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America** Edipucrs, Porto Alegre, 432-446, 2003.
- Luque, G. M.; Donlan, C. J. The characterization of seafood mislabeling: A global meta-analysis. **Biological Conservation**, 236, 556-570, 2019. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCON.2019.04.006>
- Ministério de Pesca e Aquicultura (MPA). Boletim Estatístico da pesca e aquicultura, Brasília- DF, Brasil. 2010. 60p, 2012.
- Ministério de Pesca e Aquicultura (MPA). Boletim Estatístico da pesca e aquicultura, Brasília-DF, Brasil. 2013. 59p, 2014.
- Nelson, J. S. *et al.* **Fishes of the World**. 6ª Edição. New Jersey: Wiley, 2016.
- Pardo, M. Á. *et al.* Misdescription incidents in seafood sector. **Food Control**, 62, 277–283, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.10.048>

- Palumbi, S. R. *et al.* The Simple Fool's Guide to PCR. **Department of Zoology: University of Hawaii**, Honolulu, 1991.
- Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 74(12), 5463–5467, 1977. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- Vale, B. A. do *et al.* Substituições fraudulentas e motivadas economicamente em corvinas da família Sciaenidae comercializadas na região metropolitana de Belém, Pará. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento**, 11(9), e43811931983, 2022. <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i9.31983>.
- Veneza, I. *et al.* Molecular authentication of pargo fillets *Lutjanus purpureus* (Perciformes: *Lutjanidae*) by DNA *barcoding* reveals commercial fraud. **Neotropical Ichthyology**, 16(16), 1–6, 2018. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-20170068>
- Ward R. D. *et al.* DNA barcoding Australia's fish species. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, 360(13), 1847–1857, 2005. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1716>

Parecer do Orientador

A bolsista Ana Claudia Carvalho da Silva possui independência nas atividades laboratoriais e possui domínio das metodologias de análises dos dados de forma que, adquiriu independência nesta parte do trabalho. A aluna é proativa, se mostra bastante interessada no tema do seu projeto e considero que seu desempenho foi excelente ao longo do período de execução do trabalho.

Bragança, Pará, 27 de agosto de 2022

Simoni Santos da Silva

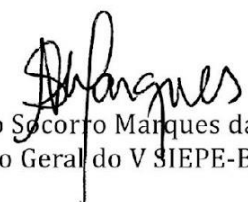
Orientadora

CERTIFICADO

Certificamos que ANA CLAUDIA CARVALHO DA SILVA apresentou o trabalho intitulado: “Validação de protocolo, baseado em PCR multiplex, para identificação de filés de bagres do gênero *Brachyplatystoma*” sob a orientação da Profa Dra Simoni Santos da Silva no V Seminário de Ensino, Pesquisa e Extensão do Campus de Bragança (SIEPE): “Democracia, Civilidade e os Desafios das Sociedades Contemporâneas”, promovido pelo Campus Universitário de Bragança e pelo Instituto de Estudos Costeiros (IECOS), no dia 07 a 11 de novembro de 2022.



Profª Drª Maria Roseane C. P. Lima
Vice - Coordenadora
Campus Universitário de Bragança - PA



Nelane do Socorro Marques da Silva
Coordenação Geral do V SIEPE-Bragança

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Certificado

A Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, da Universidade Federal do Pará, certifica que o (a) bolsista ANA CLAUDIA CARVALHO DA SILVA apresentou o trabalho intitulado "Validação de protocolo, baseado em PCR multiplex, para identificação de filés de bagres do gênero *Brachyplatystoma*", durante o XXXIII Seminário de Iniciação Científica da UFPA, realizado no período de 7 a 11 de Novembro de 2022.



Germana Maria Araújo Sales

Diretor (a) de Pesquisa

Belém, 16 de Janeiro de 2023



Luana Caetano Roriz Monteiro

Coordenador (a) do Programa de Iniciação Científica

Código de verificação **551c4b9164**

Número do Documento **72023**

Para verificar a autenticidade deste documento acesse <https://sigaa.ufpa.br/sigaa/documentos> informando a matrícula, data de emissão do documento e o código de verificação.



PRÊMIO
PROF. HORÁCIO SCHNEIDER
DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

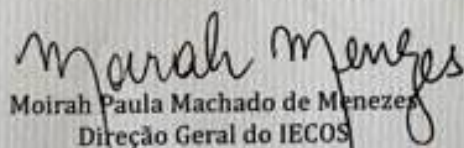
CERTIFICADO

CATEGORIA PESQUISA

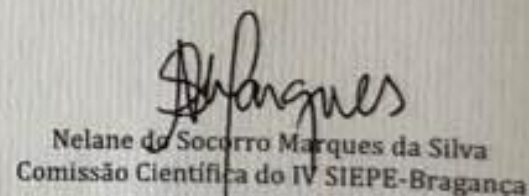
O Instituto de Estudos Costeiros confere o prêmio de Honra ao Mérito Científico a:

ANA CLAUDIA CARVALHO DA SILVA

pela execução do projeto "Validação de Protocolo, Baseado em Pcr Multiplex, para Identificação de Filés de Bagres do Gênero *Brachyplatystoma*", orientado pela Profa Dra. Simoni Santos da Silva.


Moirah Paula Machado de Menezes
Direção Geral do IECOS


Profª Drª Maria Roseane C. P. Lima
Vice - Coordenadora
Campus Universitário de Bragança - PA


Nelane do Socorro Marques da Silva
Comissão Científica do IV SIEPE-Bragança

