



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DO MARAJÓ-BREVES
FACULDADE DE CIÊNCIAS NATURAIS

RAYRISSON LUIS DA CONCEIÇÃO GALIZA

**USO DO CÓDIGO DE BARRAS DE DNA PARA VERIFICAR A
AUTENTICIDADE DA ROTULAGEM DE FILÉS *IN NATURA* DE
DOURADA (*Brachyplatystoma rousseauxi*, Castelnau, 1855)
COMERCIALIZADOS EM SUPERMERCADO E NA FEIRA
MUNICIPAL DE BREVES - PA.**

BREVES-PA
2018

RAYRISSON LUIS DA CONCEIÇÃO GALIZA

**USO DO CÓDIGO DE BARRAS DE DNA PARA VERIFICAR A
AUTENTICIDADE DA ROTULAGEM DE FILÉS *IN NATURA* DE
DOURADA (*Brachyplatystoma rousseauxi*, Castelnau, 1855)
COMERCIALIZADOS EM SUPERMERCADO E NA FEIRA
MUNICIPAL DE BREVES-PA**

Trabalho de conclusão de curso, apresentado à Faculdade de Ciências Naturais, do Campus Universitário do Marajó – Breves, da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Licenciado em Ciências Naturais.

Orientador: Dr. João Bráullio de Luna Sales

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

- G156u Galiza, Rayrisson Luis da Conceição.
Uso do código de barras de DNA para verificar a autenticidade da rotulagem de filés in natura de dourada (*brachyplatystoma rousseauxi*, castelnau, 1855) comercializados em supermercado e na feira municipal de Breves - PA / Rayrisson Luis da Conceição Galiza. — 2018.
27 f. : il. color.
- Orientador(a): Prof. Dr. João Bráullio de Luna Sales
Trabalho de Conclusão (Graduação) - Universidade Federal do Pará,
Campus Universitário de Breves, Faculdade de Ciências Naturais, Breves,
2018.
1. *Brachyplatystoma rousseauxii*. 2. DNA barcoding. 3. Peixe. I.
Título.

CDD 597.092081

RAYRISSON LUIS DA CONCEIÇÃO GALIZA

**USO DO CÓDIGO DE BARRAS DE DNA PARA VERIFICAR A
AUTENTICIDADE DA ROTULAGEM DE FILÉS *IN NATURA* DE
DOURADA (*Brachyplatystoma rousseauxi*. Castelnau, 1855)
COMERCIALIZADOS EM SUPERMERCADO E NA FEIRA
MUNICIPAL DE BREVES-PA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Faculdade de Ciências Naturais da Universidade Federal
do Pará, como requisito parcial para a obtenção do grau
de licenciado em ciência Naturais, aprovado com o
conceito

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. João Bráullio de Luna Sales
FACIN – CUMB, UFPA (Orientador).

Dr. Luis Fernando da Silva Rodrigues-Filho
UFRA-Campus Capanema, (Titular).

Breves (PA), 25 de Janeiro de 2018.

AGRADECIMENTOS

Esse é o momento de grande importância, pois irei mencionar aqueles que me apoiaram na minha caminhada até este Trabalho de conclusão de curso, tentarei ser bem conciso, pois a lista é grande.

Primeiramente agradeço a Universidade federal do Pará, Campus do Marajó-Breves e Campus de Bragança, que forneceram a estrutura física para realização deste; aos professores da Faculdade de Ciências Naturais e em especial o meu orientador o Dr. João Bráullio de Luna sales que foi mais que um orientador, foi um amigo que teve paciência, entendeu alguns momentos difíceis que passei e me apoiou, mesmo estando sobrecarregado dos seus próprios problemas, Obrigado professor.

A minha família que mesmo estando longe teve um papel crucial para eu não desistir, me subsidiando financeiramente e emocionalmente ; meus colegas de turma em especial a Cleuda Soares e Tiago Albuquerque que foram meus amigos mais próximos.

Ao senhor Raul que me cedeu as amostras para a realização do referido trabalho.

Por ultimo e mais importante agradeço a Deus, pois sem ele não teria tido forças para concluir esse TCC, pois foi ele quem me sustentou com saúde, sabedoria, determinação e tranquilidade.

*“Eu a sabedoria, habito com a prudência e
acho a ciência dos conselhos”
(Provérbios de Salomão)*

RESUMO

Brachyplatystoma rousseauxii, é uma espécie da família Pimelodidae, popularmente conhecida como dourada, onde a mesma apresenta uma elevada importância comercial para região amazônica brasileira. Recentemente, com a abertura da exploração comercial desta espécie, e principalmente a modernização das formas de comercialização, como a filetagem, tem gerado dúvidas junto aos consumidores sobre possíveis substituições de espécies de elevado valor comercial, por outras de menor valor, o que acarreta fraude comercial. O presente estudo, através da ferramenta de DNA de código de barras, investigou amostras de peixe comercializadas como “dourada” no município de Breves (feira livre e supermercado) bem como amostras provenientes de outros municípios para inferir se *B. rousseauxii* é alvo de substituições comerciais. 54 amostras foram utilizadas no presente estudo, tendo uma porção do gene citocromo oxidase subunidade I (COI) amplificado para cada espécime. Os resultados apontam que a ferramenta de DNA foi efetiva em identificar 100% dos indivíduos utilizados no presente estudo, indicando que apenas duas amostras não correspondiam geneticamente a *B. rousseauxii*, mas sim a *B. capapretum* que possui a mesma distribuição de *B. rousseauxii* embora, com características morfológica bem distintas. Todos os indivíduos coletados em supermercado e identificados como “dourada” foram geneticamente idênticos a *B. rousseauxii*. Os resultados aqui obtidos reforçam a necessidade da implementação de metodologias de identificação de pescado adicionais, as quais possam garantir aos consumidores a validade das espécies que os mesmos desejam consumir.

Palavras-Chaves: *Brachyplatystoma rousseauxii*, DNA Barcoding, Substituição não intencional, Citocromo oxidase subunidade I

ABSTRACT

Brachyplatystoma rousseauxii, is a species of the Pimelodidae family, popularly known as golden, where it has a high commercial importance for the Brazilian Amazon region. Recently, with the opening of commercial exploitation of this species, and mainly the modernization of forms of commercialization, such as filleting, it has generated doubts among consumers about possible replacements of species with high commercial value, for others of lower value, which leads to commercial fraud. The present study, using the DNA barcode tool, investigated fish samples sold as “dourada” in the municipality of Breves (free market and supermarket) as well as samples from other municipalities to infer whether *B. rousseauxii* is the target of commercial substitutions. 54 samples were used in the present study, with a portion of the cytochrome oxidase subunit I (COI) gene amplified for each specimen. The results indicate that the DNA tool was effective in identifying 100% of the individuals used in the present study, indicating that only two samples did not genetically correspond to *B. rousseauxii*, but *B. capapretum*, which has the same distribution as *B. rousseauxii*, although with very different morphological characteristics. All individuals collected in the supermarket and identified as “golden” were genetically identical to *B. rousseauxii*. The results obtained here reinforce the need to implement additional fish identification methodologies, which can guarantee consumers the validity of the species they wish to consume.

Keywords: *Brachyplatystoma rousseauxii*, DNA Barcoding, Unintentional substitution, Cytochrome oxidase subunit I

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 - Mosaico das espécies do gênero <i>Brachyplatystoma</i>	12
Tabela 1 - Lista de amostras utilizadas no presente estudo contendo os códigos utilizados, origem, locais de coleta, empresa de pesca e procedência das amostras de <i>B. Rousseauxi</i>	17
Figura 2 - <i>B. rousseauxii</i> (Dourada).....	12
Figura 3 - Mapa mostrando os pontos de coleta das amostras do presente estudo, compreendendo os municípios de Breves, Prainha, Oriximiná Monte Alegre, Cametá e Mocajuba.....	16
Figura 4 - <i>B. rousseauxii</i> (Dourada).....	19
Figura 5 - <i>B. capapretum</i> (Piraíba escura).....	19
Figura 6 - Arvore filogenética de agrupamento de vizinhos (NJ) das amostras de dourada utilizadas no presente estudo. MP (mercado de peixe), SP (Supermercado).....	20

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	O ATUAL CENÁRIO DA PESCA NA AMAZÔNIA.....	10
1.2	BRACHYPLATYSTOMA BLEEKER, 1862: CARACTERÍSTICAS GERAIS...	11
1.3	FRAUDES COMERCIAIS.....	13
1.4	FERRAMENTAS MOLECULARES PARA IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTITUIÇÃO DE ALIMENTOS.....	14
2	JUSTIFICATIVA	15
3	OBJETIVOS	15
3.1	OBJETIVO GERAL.....	15
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
4	MATERIAIS E METODOS	16
4.1	AMOSTRAGEM.....	16
4.2	EXTRAÇÃO DE DNA, PCR'S E SEQUÊNCIAMENTOS DE DNA.....	18
4.3	ANÁLISES DE DADOS.....	18
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
6	CONCLUSÃO	23
	REFERÊNCIAS	24

1 INTRODUÇÃO

1.1 O ATUAL CENÁRIO DA PESCA NA AMAZÔNIA

A região Amazônica compreende aproximadamente 6.500 km² de extensão, possuindo uma das maiores riquezas ictiológicas do mundo (LÉVÊQUE et al., 2008). Estimativas mais recentes indicam que o número de espécies de peixes pode ultrapassar 5.000, tendo atualmente 2.700 espécies aproximadamente endêmicas a região (NELSON, 2006). A riqueza de espécies de peixes na região, representa tanto uma diversidade de fauna quanto uma fonte de recurso (proteína) para consumo humano, quanto fonte de renda para populações ribeirinhas que habitam a região (FABRÉ & BARGES, 2005). Na década de 70, com a abertura de novas rotas de transporte, bem como incentivos fiscais do governo (ampliação de frota de pesca e construção de frigoríficos), intensificou as pesca de água doce na região brasileira (FABRÉ & BARGES, 2005).

Dentre as espécies que são alvo mais intenso tanto de pesca industrial quanto artesanal, estão os bagres em especial os membros da família Pimelodidae onde normalmente as espécies são de grande porte (BARTHEN & GOLDING, 1997). A região norte do Brasil, em especial o estado do Pará produziu aproximadamente 800.000 toneladas de pescado de água doce para o ano de 2013, levando o estado a atingir o primeiro lugar no ranking nacional de produção nacional, o que representou 34% da produção pesqueira do Brasil (MPA, 2014). Apesar da importância atual da pesca de bagres na região amazônica, o conhecimento de aspectos biológicos, genéticos e populacionais, bem como a situação da pesca destas espécies em algumas regiões da Amazônia, ainda são deficientes (BATISTA, 2010; ORREGO, 2012). Atualmente, muitas espécies de peixes de grande valor comercial (principalmente os bagres de água doce) ainda não foram alvo de inferências moleculares que visem estimar os níveis de variabilidade das espécies. De acordo com relatos dos pescadores, o tamanho das espécies tem diminuído consideravelmente nas últimas décadas, o que tem levado a preocupações junto aos órgãos de fiscalização como o IBAMA (BARTHEN & GOLDING, 1997; LUNDBERG & LITTMANN, 2003).

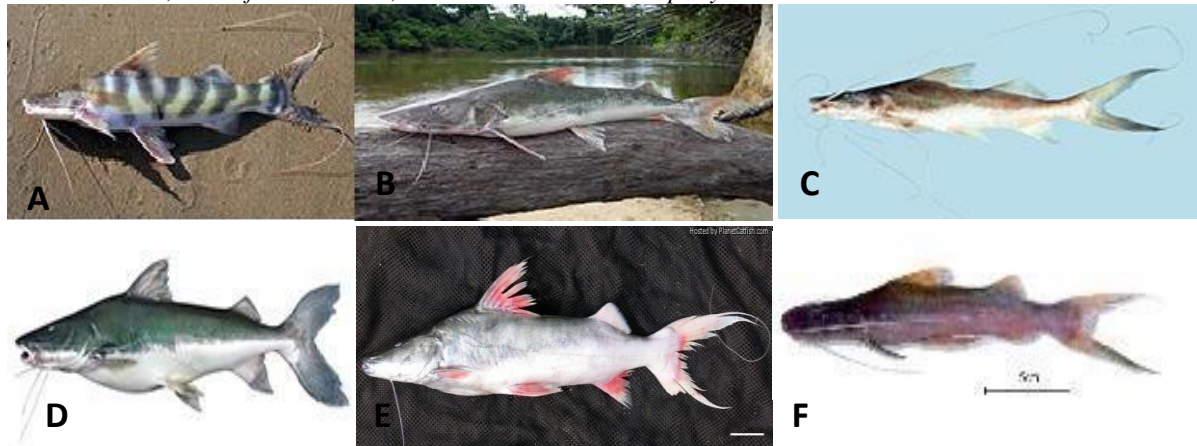
1.2 *BRACHYPLATYSTOMA* BLEEKER, 1862: CARACTERÍSTICAS GERAIS

A família Pimelodidae apresenta espécies endêmicas de regiões neotropicais em especial a região amazônica (NELSON, 2006). Atualmente, a família é constituída por aproximadamente 30 gêneros e 194 espécies (ESCHMEYER & FONG, 2016). As espécies são popularmente conhecidas como “bagres” ou “peixes gatos” basicamente devido a presença de três pares de barbilhões, onde para algumas espécies, seu comprimento ultrapassa o comprimento corpóreo (NELSON, 2006). Além desta característica, não apresentam escamas no corpo onde alguns grupos podem possuir espinhos nas nadadeiras dorsal e peitoral (NELSON, 2006).

Habitam as regiões bentônicas, estando restritos a lagos, riachos e rios de ambientes tropicais. (LUNDBERG & LITTMANN, 2003) se alimentando de espécies de peixes e invertebrados pequenos. Também são conhecidos pela alta capacidade migratória em período reprodutivo (OCHOA et al., 2015). Outra característica relevante as espécies deste grupo é o grande tamanho corpóreo alcançado por algumas espécies onde existem indivíduos que passam de dois metros de comprimento (LUNDBERG & LITTMANN, 2003).

Dentre todas as espécies que compõem os pimelodideos, as espécies do gênero *Brachyplatystoma*, são extremamente importantes principalmente do ponto de vista comercial e ecológico. O gênero é atualmente formado pelas espécies *Brachyplatystoma rousseauxi* Castelnau, 1855; *Brachyplatystoma filamentosum* Lichtenstein, 1819; *Brachyplatystoma capapretum* (LUNDBERG & AKAMA, 2005); *Brachyplatystoma vaillantii* Valenciennes, 1840; *Brachyplatystoma juruense* Boulenger, 1898 e *Brachyplatystoma platynemum* Boulenger, 1898, onde aproximadamente 80% da captura de siluriformes são representadas por 4 destas espécies: *B. filamentosum* (filhote), *B. rousseauxi* (dourada), *B. vaillantii* (piramutaba) e *B. capapretum* (piraíba escura) (BARTHEN & GOLDING, 1997; ORREGO, 2012). Destas espécies, uma das mais importantes comercialmente é a dourada (*B. rousseauxi*).

Figura 1: Mosaico de espécies que compõem o gênero *Brachyplatystoma* (A- *B. juruense*; B- *B. capapretum*; C- *B. vaillantii*; D- *B. filamentosum*; E- *B. rousseauxi* e F- *B. platynemum*)



Fonte: site www.fishbase.org.

A espécie se caracteriza pelos reflexos dourados presentes no corpo, cabeça prateada, e presença de dois pequenos barbilhões maxilares (BARTHEN & GOLDING, 1997). Amplamente distribuída em água doce, ocorre nas bacias do Rio Amazonas e Orinoco, podendo ser encontrado no Peru, Colômbia, Bolívia Equador e Brasil (LUNDBERG & LITTMANN, 2003). *B. rousseauxi* é a espécie que apresenta a maior migração registrada de peixes de água doce, onde os juvenis chegam a realizar migrações de aproximadamente 5.000 km para completar seu ciclo de vida (BATISTA & ALVES-GOMES, 2006).

Figura 2: *B. Rousseauxii*



Fonte: site: www.fishbase.org

A dourada é frequentemente pescada na região Norte do Brasil, sendo o estado do Pará o maior produtor (IBAMA, 2006). Entretanto, os índices de captura tem sofrido declínio muito acentuado nos últimos anos, passando de aproximadamente 15.000 toneladas para o ano de 2005 para aproximadamente 6.000 toneladas para o ano de 2008 (IBAMA 2006), o que indica um provável processo de sobre-exploração da espécie atualmente (PRETERE JR. et al., 2004).

1.3 FRAUDES COMERCIAIS

No mundo, a principal forma de beneficiamento de pescado é a filetagem a qual aumenta a aceitação do produto, a praticidade no preparo das refeições e o aproveitamento total no consumo (Contreras & Gusmán, 2004). A substituição de espécies pode ocorrer em diferentes etapas da cadeia de produção, desde a fase de classificação das espécies pós-captura até durante a embalagem do produto processado (CAWTHORN, *et al.* 2012).

Apesar do pescado processado ser um gerador de produtos de alto valor agregado e de grande aceitação no mercado consumidor, a retirada de características morfológicas utilizadas na identificação das espécies, durante o processamento, dificulta a identificação precisa das espécies no processo de comercialização (OGDEN, 2008), o que pode resultar em substituições acidentais ou intencionais dos produtos (CLINE, 2012). Estudos recentes tem demonstrado que as substituições algumas vezes, não são intencionais. Substituições não intencionais muitas vezes estão relacionadas ao fato que diferentes espécies muitas vezes carregam característica morfológicas muito similares, bem como o uso do mesmo nome vernacular para espécies diferentes (ARDURA ET AL., 2010; BARBUTO ET AL., 2010; BRITO, 2013).

Entretanto, nos casos de substituições intencionais normalmente elas ocorrem com a finalidade de aumento dos lucros, quando espécies de baixo valor ou pouca aceitação no mercado são comercializadas como sendo outras de alto valor comercial ou grande aceitação (Cawthorn *et al.*, 2012; Cline, 2012), bem como, quando alguma espécie de alto valor comercial ameaçada de extinção tem sua pesca proibida (Garcia-Vasquez *et al.*, 2009.). Os efeitos da substituição de espécies além de ser fraude econômica, podem gerar riscos para a saúde como também para o comércio ilegal de áreas protegidas de determinadas espécies (CARVALHO *et al.*, 2011; DIAS *et al.* 2008). Portanto, a detecção de espécies substituídas tornou-se um tema importante dentro da indústria alimentícia principalmente para garantir uma negociação honesta e informações corretas ao consumidor (RASMUSSEN & MORRISSEY, 2008; CARVALHO *et al.*, 2011).

Em alguns países como EUA e Europa, são exigidos a identificação no rótulo de produtos de pesca informando o nome comum e científico da espécie além de uma lista oficial contendo os nomes comuns, científicos e fotos (www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/RFE), o que ajuda o consumidor na escolha dos produtos e principalmente evitar fraude comercial.

Diferentemente do Brasil onde as leis de comércio não exigem que no rótulo dos produtos de pesca estejam identificados com o nome comum e científico e não possui também uma lista oficial contendo os nomes comuns e científicos das espécies (MAPA, 2005). Fatos que favorecem tanto a substituição não intencional como a fraude comercial de fato.

1.4 FERRAMENTAS MOLECULARES PARA IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTITUIÇÃO DE ALIMENTOS.

Nos últimos anos, a implementação de formas diferentes de identificação de espécies comercializadas, auxiliou muito a identificação de problemas de rotulagem, indicando muitas vezes que espécies com alto valor comercial podem ser substituídas por espécies de menor valor (BRITO et al., 2015). Uma destas ferramentas atualmente utilizadas é o DNA de código de barras (*DNA barcoding*), onde comumente o gene citocromo oxidase subunidade 1 (COI) e a região selecionada para essas interferências, tendo sido aplicada com sucesso ao longo dos anos recentes. (CARVALHO et al. 2011 ; BRITO et al 2015).

Desde a proposta de utilização da COI como código de barras para identificação das espécies animais (HEBERT *et al.* 2003), esta ferramenta vem sendo utilizada para autenticação de pescado inteiro e processado para detectar substituições de espécies, acidentais ou intencionais (BARBUTO, *et al.* 2009). Um fragmento, do gene mitocondrial COI com aproximadamente 600 pares de base e amplificado através de reação em cadeia (PCR), desta forma, fornecendo informações genéticas suficiente para correta discriminação entre as espécies.

Nos últimos anos, a técnica baseada em DNA tem sido fortemente difundidas em análises forenses, incluindo as avaliações de rotulagem errônea e fraude comercial em pescado, pois o DNA apresenta vantagens tais como: estabilidade da molécula, alta taxa de informação, facilidade no isolamento, podendo ser isolado mesmo de alimentos altamente processados, além de métodos baseados em DNA apresentarem alta sensibilidade, especificidade e confiabilidade nos resultados (RASMUSSEN & MORRISSEY, 2008). A ferramenta molecular também tem sido eficaz para a identificação de outras substituições (intencional ou não) como: *Pseudoplatystoma corruscans*, conhecido popularmente como “surubim” substituído por bagres *P. tigrinum* e *P. reticulatum* (CARVALHO *et al.*, 2011). Outras fraudes ocorrem também com os grupos de tubarões *Mustelus mustelus* cujo nome vernacular é “palombo” amplamente comercializado, substituídos por espécies do mesmo gênero *Mustelus* e de gênero diferente, *Squalus* (BARBUTO *et al.*, 2010).

2 JUSTIFICATIVA

B. rousseauxii popularmente conhecido como dourada, e uma espécie de elevada importância comercial na região amazônica do Brasil, ainda mais, para populações ribeirinhas. Devido a espécie ser capturada basicamente ao longo de todo o ano na região de Breves, faz-se necessária investigações moleculares para correta identificação dos indivíduos desta espécie comercializados em Breves, tanto na feira de pescado do município, quanto em redes varejistas, onde a espécie é vendida processada. Desta forma, o presente estudo é o primeiro trabalho a utilizar a ferramenta de DNA *barcoding* para identificação genética de *B. rousseauxi* comercializado em feiras livres e supermercado no município de Breves, Ilha do Marajó.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a autenticidade da rotulagem dos filés congelados e na forma natural de Dourada (*Brachyplatystoma rousseauxi*) vendidos no supermercado e na feira municipal de Breves, Cameté e Mocajuba, PA utilizando a ferramenta de DNA barcode.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

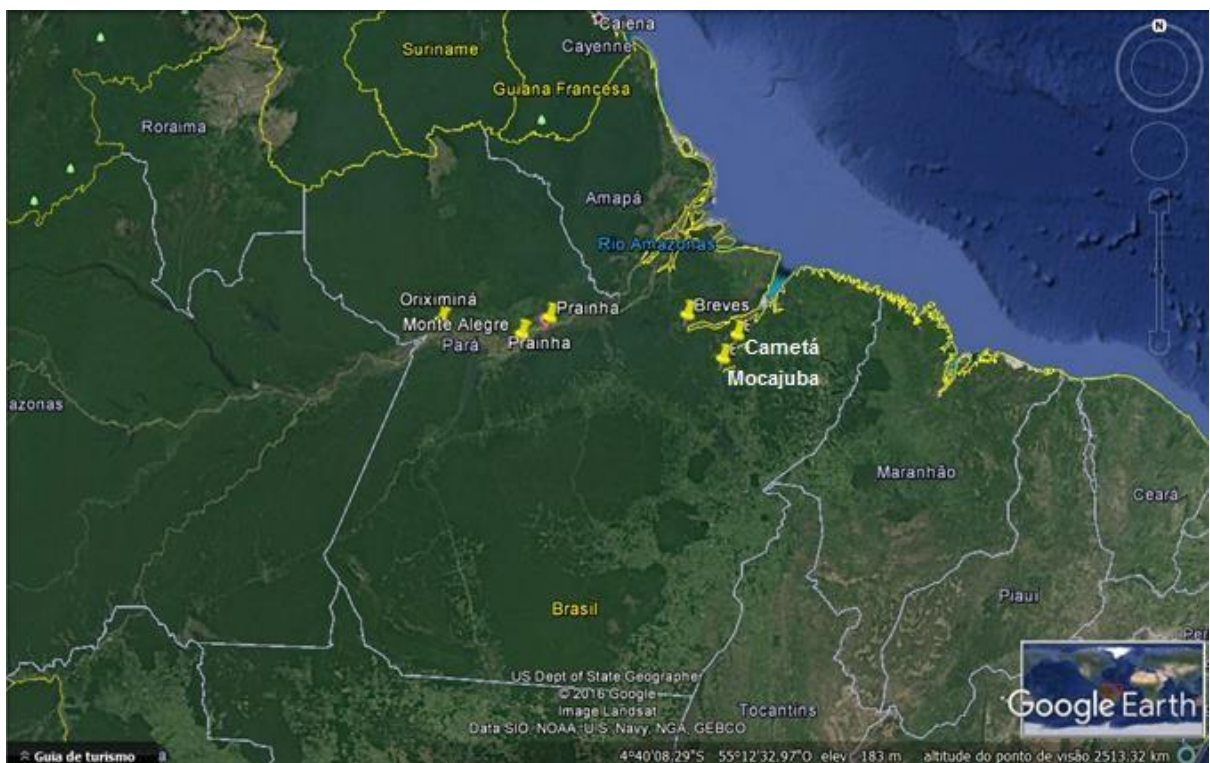
- Inferir se ha substituição na comercialização de dourada na cidade de Breves;
- Relatar em caso de substituição, qual espécie esta sendo comercializada como dourada, tanto em feira livre quanto supermercado;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAGEM

Amostras de *B. rousseauxii* foram coletadas inicialmente nas feiras de peixe no município de Breves, ilha do Marajó além de amostras adquiridas em supermercados na cidade, onde as bandejas estavam identificadas como “dourada” que, em teoria correspondem à espécie *B. rousseauxii* (Figura 3 Tabela 1). Adicionalmente, amostras provenientes de Cameté e Mocajuba, foram incorporadas no banco de amostras totalizando 54 amostras. No momento da compra nos mercados de peixes, informações a respeito da origem das amostras foram coletadas juntamente com os feirantes. Os indivíduos coletados foram fotografados e tiveram uma porção de tecido muscular retirada e acondicionada em tubos *ependorf* contendo etanol a 100% de concentração. Posteriormente, os tecidos foram acondicionados em freezers a -10°C antes do procedimento de extração de DNA. Adicionalmente aos indivíduos coletados no presente estudo, sequencias de *B. rousseauxii* que foram baixadas do site Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) e incorporadas no banco de dados.

Figura 3: Mapa mostrando os pontos de coleta das amostras do presente estudo, compreendendo os municípios de Breves, Prainha, Oriximiná, Monte Alegre, Cameté e Mocajuba



Fonte: software Google Earth.

Tabela 1: Lista de amostras utilizadas no presente estudo contendo os códigos utilizados, origem, locais de coleta, empresa de pesca e procedência das amostras de *B. rousseauxi*.

Código	Origem	Local de coleta	Procedência
DOU1	Monte alegre	Mercado de peixe (municipal)	Natural
DOU2	-	-	-
DOU3	-	-	-
DOU4	-	-	-
DOU5	-	-	-
DOU6	-	-	-
DOU7	-	-	-
DOU8	-	-	-
DOU9	-	-	-
DOU10	-	-	-
DOU11	Prainha	-	-
DOU12	-	-	-
DOU13	-	-	-
DOU14	-	-	-
DOU15	-	-	-
DOU16	-	-	-
DOU17	-	-	-
DOU18	-	-	-
DOU19	-	-	-
DOU20	-	-	-
DOU21	Breves	-	-
DOU22	Breves	Supermercado	Congelado
DOU24	-	-	-
DOU25	-	-	-
DOU26	-	-	-
DOU27	-	-	-
DOU28	-	-	-
DOU30	Oriximiná	Mercado de peixe	Natural
DOU32	-	-	-
DOU33	-	-	-
DOU34	-	-	-
DOU35	-	-	-
DOU37	-	-	-
DOU38	-	-	-
DOU39	-	-	-
DOU43	Breves	Supermercado	Congelado
DOU44	-	-	-
DOU45	-	-	-
DOU46	-	-	-
DOU47	-	-	-
DOU48	-	-	-
DOU71	-	Mercado de peixe	Natural
DOU72	-	-	-
DOU77	Cametá	-	-
DOU78	-	-	-
DOU79	-	-	-
DOU80	-	-	-
DOU81	-	-	-
DOU83	-	-	-
DOU85	-	-	-
DOU86	-	-	-
DOU87	Mocajuba	-	-
DOU91	-	-	-

Fonte:
Pesquisa de campo

4.2 EXTRAÇÃO DE DNA, PCR E SEQUENCIAMENTO DE DNA

O DNA foi isolado com a utilização do Kit Wizard Genomics DNA Purification (Promega Corporation, Madison, USA), seguindo-se o protocolo Mouse Tail. A partir da extração, foi realizada a amplificação, através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) do gene Citocromo oxidase subunidade I – COI, utilizando os seguintes pares de *primers*: FishF1, 5'-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3' e FishR1, 5'-TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA-3' (Ward et al., 2005). Os PCR's foram realizados com uma concentração final de 25µl contendo: 0.5 µl de cada primer, 2 µl de MgCl₂, 4 µl de dNTP (1.25mM), 5.0 µl de 5x buffer, 0.2 µl de Taq polimerase (5U/µl) e o restante completado com água ultra pura.

As condições de amplificação dos PCRs foram as seguintes: 35 ciclos de desnaturação, temperatura inicial de 92°C por 4 minutos, 92°C por 1 minuto; anelamento de 52°C por 35 segundos; extensão a 72°C por 90 segundos e uma extensão final foi realizada a 72°C por 5 minutos. Para o sequenciamento dos fragmentos obtidos, as PCR's foram previamente purificadas com a enzima ExoSAP-IT (Amersham Pharmacia Biotech Inc.), e as reações de sequenciamento realizadas com os reagentes do Kit BigDye (AppliedBiosystems) e então sequenciadas no sequenciador automático ABI 3500 (AppliedBiosystems).

4.3 ANÁLISES DOS DADOS

As sequencias obtidas foram alinhadas no programa BioEdit v.5.0.6 (Hall, 1999), através da ferramenta Clustal W (Thompson et al., 1997). Uma árvore de agrupamento de vizinhos (NJ) (Saitou & Nei, 1987) foi construída no programa MEGA 7 (Kumar et al., 2016) com o intuito de fornecer uma representação das divergências entre as amostras analisadas. O suporte para os nós foi verificado através de 1.000 réplicas de *bootstrap* (Felsenstein, 1985). Para sequencias utilizadas do banco de dados do *Genbank*, o critério de identificação estabelecido através da similaridade genética foi de 98% de comparação entre as sequencias obtidas e os bancos de dados utilizados.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as amostras utilizadas no presente estudo puderam ser geneticamente identificadas pela ferramenta de *DNA barcoding* com 100% de precisão. De todas as amostras coletadas em supermercado, 100% foram geneticamente similares a sequência de *B. rousseauxii* disponível no *Genebank* (Figura 2), indicando que as amostras vendidas como dourada em supermercado, são realmente *B. rousseauxii*. Entretanto, duas amostras provenientes do mercado de peixe vendidas como dourada, na verdade correspondiam geneticamente a *B. capapretum* conhecida popularmente como piraíba escura (Figura 2). No restante das amostras utilizadas no presente estudo proveniente do mercado de peixe, todas corresponderam geneticamente a *B. rousseauxii*, com valores de suporte elevado.

Os resultados também demonstram o posicionamento filogenético de *B. rousseauxii* em relação às outras espécies do gênero, sendo mais filogeneticamente relacionada a *B. capapretum*.

Infelizmente, não há sequências do gene COI para *B. platynemum*, a única espécie do gênero ausente no banco de dados. *B. filamentosum* e *B. vaillantii* não obtiveram valores de suporte adequados para definir o posicionamento destas espécies junto as outras do gênero.

Figura 4: *B. rousseauxii* (Dourada)



Fonte: site: www.oglobo.com

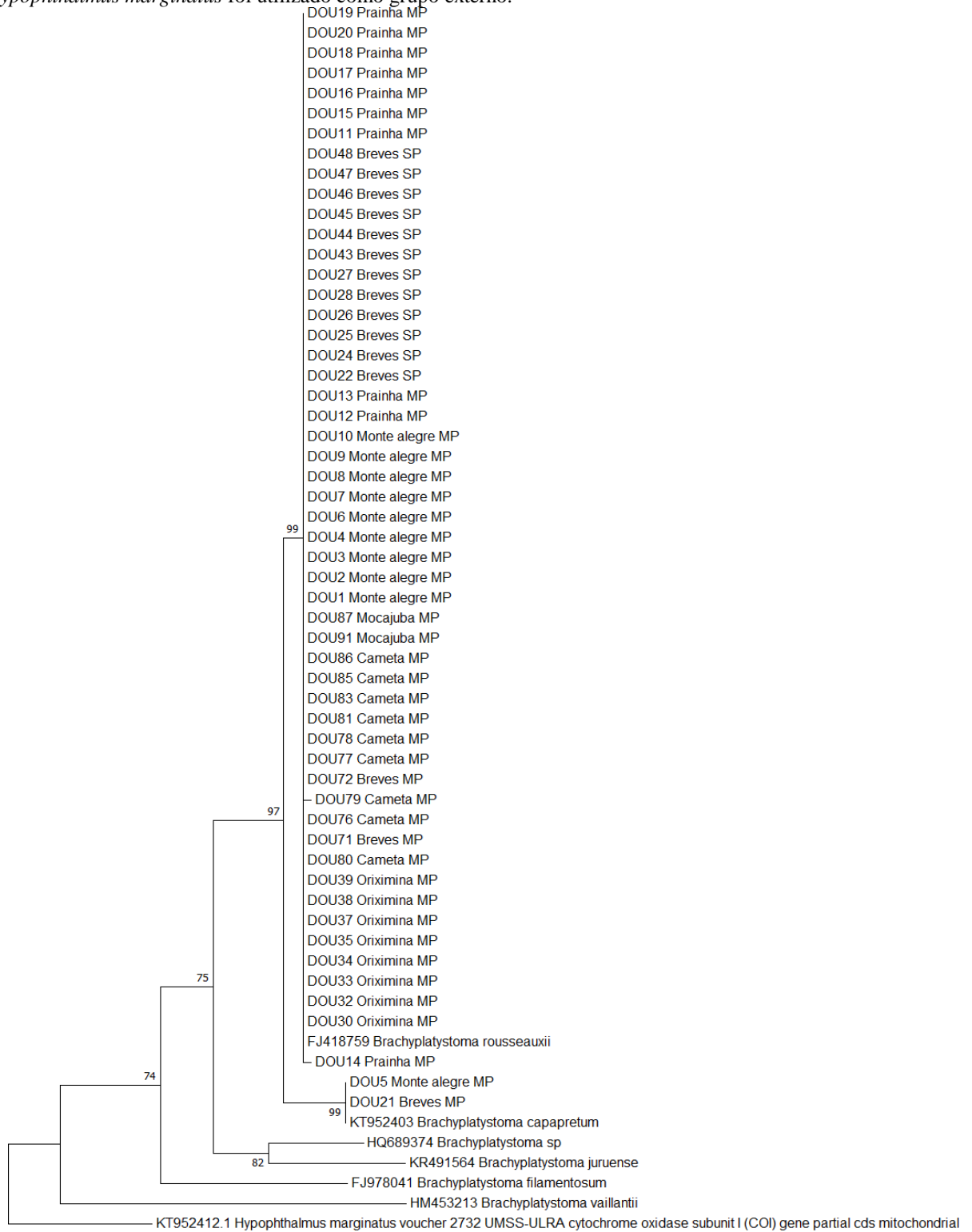
Figura 5: *B. capapretum* (Piraíba escura)



Fonte: site: www.oglobo.com

As consequências de erros de rotulagem e substituição de pescado são danosas sob vários aspectos, implicando em perdas financeiras aos consumidores e aos setores governamentais, no manejo de espécies alvo de pesca, principalmente aquelas em perigo ou em sobre pesca (VON DER HEYDEN, 2010). Adicionalmente a estes fatores, o risco a saúde a qual os consumidores estão sujeitos devido ao consumo de espécies de peixes que podem desencadear reações alérgicas, as quais podem ser fatais (TRIANTAFYLLIDIS et al., 2010). Em alguns casos, erros de rotulagem de espécies vendidas como “bacalhau” (*Gadus morhua*) na verdade correspondia à cavala africana (*Ruvettus pretiosus*), uma espécie venenosa (HALSTEAD, AUERBACH & CAMPBELL, 1990), fato que causou uma série de intoxicações severas (LAM, 2007).

Figura 6: Arvore filogenética de agrupamento de vizinhos (NJ) das amostras de dourada utilizadas no presente estudo. MP (mercado de peixe), SP (Supermercado). Apenas valores superiores a 70% são mostrados. *Hypophthalmus marginatus* foi utilizado como grupo externo.



Fonte: Pesquisa de campo.

Os resultados obtidos no presente estudo indicam que não houve substituição da espécie conhecida como “dourada” (*B. rousseauxii*) por outras de menor valor comercial provenientes de supermercados, onde todas as espécies correspondiam geneticamente ao que estava indicado no rótulo do produto (Figura 2). Entretanto, a identificação de produtos pesqueiros apenas pelo nome comum, muitas vezes podem esconder substituições muitas vezes não intencionais. Brito et al. (2015), investigando a comercialização de pescada branca marinha (*Cynoscion leiarchus*) através de identificação genética com DNA barcoding encontrou índices de substituições de 100% em files rotulados e comercializados em supermercados na região de Belém, encontrando nas bandejas também a pescada branca dulcícola *Plagioscion squamosissimus* sendo comercializada. As duas espécies diferentes apresentam o mesmo nome comum, o que pode acarretar elevados índices de substituição. No caso do nome comum de *B. rousseauxii*, existe no Brasil outra espécie de água doce que possui um nome comum bastante similar. A espécie *Salminus brasiliensis* é conhecida como dourado e ocorre principalmente na região do Pantanal brasileiro (PAIVA, 1997).

Casos de substituição em pescado processado são muito comuns ao redor do mundo (MARKO et al., 2004; BARBUTO et al., 2010; CARVALHO, et al., 2011). MARKO et al. (2004) através do sequenciamento do gene COI, demonstraram que 77% dos peixes vendidos como pargo vermelho (*L. campechanus*) são na verdade outras espécies. (BARBUTO, et al. 2010) também utilizando o gene COI encontram 77% de substituições de tubarões do gênero *Mustelus* por espécies de tubarões de outras famílias. (CARVALHO, et al., 2011) investigando quais espécies de peixe são vendidas como surubim e pintado (*Pseudoplatystoma corruscans* e *Pseudoplatystoma reticulatum*) tanto de peixes inteiros como filetados em mercados de peixe do Brasil encontrou índice de 80% das espécies filetadas apresentavam erro de rotulagem com relação à espécie que estava sendo comercializada.

Os resultados do presente estudo foram similares aos encontrados por Gonçalves (2017), onde a autora também investigou prováveis substituições em *B. filamentosum* (conhecida como filhote ou piraíba) com amostras provenientes no mesmo local de amostragem do presente estudo. Assim como os resultados obtidos no presente estudo, Gonçalves (2017) encontrou baixos níveis de substituição das amostras vendidas como filhote, havendo 25% de substituição de *B. filamentosum* por *B. capapretum*. No caso dos resultados obtidos por Gonçalves 2017, provavelmente a similaridade morfológica das duas espécies principalmente de indivíduos mais jovens (onde o padrão de manchas escuras de *B. capapretum* ainda não está presente de forma tão clara), o que pode ter influenciado na troca dos indivíduos (BARTHEN & GOLDING, 1997). Entretanto, *B. rousseauxii* apresenta

coloração clara-dourada desde o período juvenil, fato que facilita a sua discriminação morfológica em relação as outras espécies do gênero *Brachyplatystoma*. Pela quantidade de indivíduos com identificação errônea obtidos no presente estudo (2 indivíduos de 54), podemos inferir que não houve substituição intencional de dourada nos resultados obtidos no presente estudo.

A legislação brasileira não exige que os produtos de origem animal e vegetal possuam no rótulo, o nome comum e científico das espécies (MPA, 2014). Somando-se a este fato, não existe uma lista oficial contendo os nomes comuns, comerciais ou científicos das espécies de pescado comercializadas no país, o que seria essencial para orientação correta aos consumidores das espécies pretendidas, o que poderia auxiliar nas tentativas de rotulagem (BRITO, 2013). Desta forma, a adoção e implementação de novas legislações comerciais se tornam primordiais para proteger o consumidor tanto de danos financeiros, como possíveis danos a saúde.

Os resultados obtidos no presente estudo reforçam a importância da adoção de ferramentas moleculares para identificação de pescado comercializado no Brasil, técnica esta que poderia ser prontamente implementada pelas agências de regulação brasileiras com o intuito tanto de proteger os consumidores contra eventuais fraudes comerciais de empresas que visam maior lucro, quanto proteção de comercialização de espécies ameaçadas de extinção ou eventual comercialização de espécies que possuem potencial para acarretar reações alérgicas. Neste sentido, o uso de ferramentas moleculares se torna imprescindível do ponto de vista econômico e conservacionista.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A ferramenta de DNA barcoding utilizada no presente estudo se mostrou efetiva em identificar as amostras de dourada comercializadas no município de Breves, apontando dois resultados interessantes: 1-Todos os indivíduos comprados em supermercado corresponderam geneticamente a *B. rousseauxi*. 2-Ouve um nível baixo de substituição não intencional das amostras provenientes de mercado de peixe.

Desta forma, a ferramenta molecular se mostra novamente efetiva em discriminar espécies animais de interesse comercial. Faz-se necessário, a implementação de medidas que visem uma melhor identificação dos produtos vendidos em feiras e mercados de peixe para minimizar riscos de substituição aos consumidores como a padronização de nomes comuns, bem como adoção pelos distribuidores de pescado de ferramentas que garantam a correta rotulagem dos produtos vendidos, como o método de DNA Barcoding.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, O. **A indústria pesqueira na Amazônia**. ProVárzea/IBAMA, 2006.
- ARDURA, A.; POLA, I. G.; GINUINO, I.; GOMES, V.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Application of barcoding to Amazonian commercial fish labelling. **Food Research International**, 43,1549–1552. 2010.
- BARBUTO, M.; GALIMBERTI, A.; FERRI, E.; LABRA, M.; MALANDRA, R.; GALLI, P.; CASIRAGHI, M. DNA barcoding reveals fraudulent substitutions in shark seafood products: The Italian case of “palombo” (*Mustelus* spp): **Food Research International**. 43 (2010) 376–381. 2009.
- BARTHEM, R.; GOULDING, M. **Os bagres balizadores: ecologia, migração e conservação de peixes amazônicos**. Tefé – Amazonas. Ed. Sociedade Civil Mamiaurá. CNPq. IPAAM. 1997. 140p
- BATISTA, J.S. **Caracterização genética da dourada - *Brachyplatystoma rousseauxii*, Castelnau, 1855 (Siluriformes-Pimelodidae) na Amazônia por meio de marcadores moleculares mitocondriais e microssatélites**: subsídios para conservação e manejo. 2010. Tese de doutorado. INPA. Manaus. 2010.
- BATISTA, J.S.; ALVES-GOMEZ, J.A. Phylogeography of *Brachyplatystoma rousseauxii* (Siluriformes - Pimelodidae) in the Amazon Basin offers preliminary evidence for the first case of “homing” for an Amazonian migratory catfish. **Genetic and Molecular Research**. 5 (4): 723-740. 2006.
- BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA). **Boletim Estatístico da pesca e aquicultura**. Brasília: MPA, 2014. 128p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 22. Aprova o Regulamento Técnico para rotulagem de produto de origem animal embalado. **Diário oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 2005.
- BRITO, Mayara Alves de. **Uso do código de barras do DNA (coi) para avaliar a autenticidade da rotulagem de filés de pescada branca (sciaenidae) comercializados em supermercados de Belém-PÁ**. 2013. Dissertação (Mestrado em Recursos Biológicos da Zona Costeira Amazônica) Universidade Federal do Pará. Belém, 2013.
- BRITO, M.A.; SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I & SANTOS, S. DNA barcoding reveals high substitution rate and mislabeling in croaker fillets (*Scianidae*) marketed in Brazil: The case of “pescada branca” (*Cynoscion leiarchus* and *Plagioscion squamosissimus*). **Food Research International**, 70, 40-46. 2015.

- CARVALHO, D. C.; NETO, D. A.; BRASIL, B. S. & OLIVEIRA, D. A. DNA barcoding revela uma alta taxa de erro de rotulagem em um peixe de água doce comercial do Brasil. **Mitochondrial DNA**, v. 22, n. sup1, p. 97-105, 2011.
- CAWTHORN, D. M.; STEINMAN, H. A.; & WITTHUHN, R. C. DNA barcoding reveals a high incidence of fish species misrepresentation and substitution on the South African market. **Food Research International**, 46(1), 30-40. 2012.
- CONTRERAS-GUSMÁN, E. S. **Bioquímica dos pescados e derivados**. Jaboticabal: FUNEP. 2004. 409p.
- CLINE, E. DNA barcoding reveals a high incidence of fish species misrepresentation and substitution on the South African Market. **Food Research International**, 45, 388–393, 2012.
- DIAS, A. C.; GUIMARÃES, J. R.; MALM, O., & COSTA, P. A. Total mercury in muscle of the shark *Prionace glauca* (Linnaeus, 1758) and swordfish *Xiphias gladius* Linnaeus, 1758, from the South-Southeast coast of Brazil and the implications for public health. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 9, p. 2063-2070. 2008.
- ESCHMEYER, W. N.; FONG, J. D. **Catalog of fishes**. Eletronic version, San Francisco: California Academy of Sciences. 2016. Disponível em: <<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>>. Acesso em: 23/12/2017.
- FABRÉ, NN.; BARTHEM, R. **O manejo da pesca dos grandes bagres migradores: Piramutaba e Dourada no eixo Solimões-Amazonas**. Manaus: Pro-várzea/IBAMA; 2005.
- FABRE, N.; BORGES, R. Organizadores. **Coleção Documentos Técnicos: estudos estratégicos I**. Manaus: Ibama, Pró-Várzea. 2005.
- FELSENSTEIN, J. Confidence-limits on phylogenies-an approach using the bootstrap. **Evolution**, 39, 783-791. 1985.
- GARCÍA, A.; SÁNCHEZ, H.; RODRÍGUEZ, R.; MONTREUIL, V.; VARGAS, G.; Tello, S. Hábitos alimenticios del dorado *Brachyplatystoma rousseauxii* (Castelnau, 1855) en la Amazonía peruana. **Folia Amaz.**, 2009.
- GARCIA-VAZQUEZ, E.; HORREO, J. L., CAMPO, D., MACHADO-SCHIAFFINO, G., BISTA, I.; TRIANTAFYLIDIS A.; JUANES, F. Mislabeling of Two Commercial North American Hake Species Suggests Underreported Exploitation of Offshore Hake. **Transactions of the American Fisheries Society**, 138, 790–796. 2009.

GONÇALVES, A. S. **O uso do DNA *barcoding* para análise de substituição do peixe *Brachyplatystoma filamentosum*, pimelodidae (filhote) comercializadas *in natura* no município de breves, ilha do marajó.** 2017 40 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Naturais). Universidade Federal do Pará, Campus Universitario Marajó-Breves. 2017.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, 41. 95-98. 1999.

HALSTEAD, B. W.; AUERBACH, P. S.; CAMPBELL, D. **A colour atlas of dangerous marine animals.** Wolfe Medical Publications Ltd, W. S. Cowell Ltd, Ipswich, England. 1990. 192p.

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

KUMAR, Sudhir; STECHER, Glen; & TAMURA, Koichiro. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Mol. Biol. Evol.**, 33(7):1870-1874. 2016.

LAM, V. Oilfish – The case of the imitation Atlantic cod. *Sea Around US Project* 27. **Newsletter**, 40, 1-2. 2007.

LEVEQUE, C; OBERDORFF, T; PAUGY, D; STIASSNY, M.L.J; TEDESCO, P.A. **Global diversity of fish (Pisces) in freshwater.** *Hydrobiologia*: 545–567. 2008.

LUNDBERG, J. LITTMANN, M.W. Family Pimelodidae: Long-Whiskered catfishes. In: Reis, R.E.; Kulander, S.O.; Ferraris, C.J., (Eds.). **Check list of the freshwater fishes of south and central America.** Porto Alegre - RS. pp. 432-446. 2003.

NELSON, J.S. **Fishes of the world.** John Wiley & Sons, New York. 2006.

OCHOA, L. E., PEREIRA, L. H. G., COSTA-SILVA, G. J., ROXO, F. F., BATISTA, J. S., FORMIGA, K.; OLIVEIRA, C. Genetic structure and historical diversification of catfish *Brachyplatystoma platynerum* (Siluriformes: Pimelodidae) in the Amazon basin with implications for its conservation. **Ecology and evolution**, 5(10), 2005-2020. 2015.

OGDEN, R. Fisheries forensics: The use of DNA tools for improving compliance, traceability and enforcement in the fishing industry. **Fish and Fisheries**, 9, 462–472. 2008.

ORREGO, L. E. O., **Análise Filogeografia de *Brachyplatystoma platynerum* (Siluriformes: Pimelodidae).** 2012. 89 f. Dissertação de mestrado. Programa de Pós Graduação em Zoologia. UNESP. Botucatu. 2012.

PAIVA, M.P. **Recursos Pesqueiros e Estuarinos do Brasil**. Fortaleza. Ed. EUFC, 1997.

PETRERE, M.; BARTHEM, R.; CORDOBA, E.; GOMEZ, B. Review of the large catfish fisheries in the upper Amazon and the stock depletion of piraiba (*Brachyplatystoma filamentosum* Lichtenstein). **Rev. Fish. Biol. Fish.**, 14: 403-414. 2004.

RASMUSSEN, R. S.; MORRISSEY, M. T. DNA-Based Methods for the Identification of Commercial Fish and Seafood Species. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 7, n. 3, p. 280-295. 2008.

SAITOU, N., & NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstruction phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, 4, 406-425. 1987.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F. & HIGGINS, D. G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic acids research**, 25 (24), 4876-4882. 1997.

TRANTAFYLIDIS, A.; Karaiskou, N.; PEREZ, J.; MARTINEZ, J. L.; ROCA, A.; LOPEZ, B., *et al.* Fish allergy risk derived from ambiguous vernacular fish names: Forensic DNA based detection in Greek markets. **Food Research International**, 43: 2214–2216. 2010.

VON DER HEYDEN, S.; BARENDSE, J.; SEEBREGTS, A. J., & MATTHEE, C. A. Misleading the masses: detection of mislabelled and substituted frozen fish products in South Africa. **ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil**, 67(1), 176-185. 2010.

WARD, R. D.; ZEMLAK, T. S.; INNES, B. H.; LAST, P. R. & HEBERT, P. D. N. DNA barcoding Australia's fish species. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B**, 360, 1847–1857. 2005.

WILSON; D. W.; BEERS, P. Global trade requirements and compliance with World Trade Organization agreements: The role of tracing animals and animal products. **Reviews of Scienc. Science and Technology**, 20(2): 379–384. 2001.