



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE BRAGANÇA  
INSTITUTO DE ESTUDOS COSTEIROS  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA AMBIENTAL

IVANA BARBOSA VENEZA

**AUTENTICAÇÃO MOLECULAR DE FILÉS DE PARGO E  
PROTOCOLO FORENSE PARA LUTJANÍDEOS (LUTJANIDAE –  
PERCIFORMES).**

Bragança  
2015

IVANA BARBOSA VENEZA

**AUTENTICAÇÃO MOLECULAR DE FILÉS DE PARGO E  
PROTOCOLO FORENSE PARA LUTJANÍDEOS (LUTJANIDAE –  
PERCIFORMES).**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós graduação em Biologia Ambiental do Instituto de Estudos Costeiros da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Biologia Ambiental.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Iracilda da Cunha Sampaio**  
**Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Grazielle Fernanda Evangelista Gomes**

Bragança  
2015

IVANA BARBOSA VENEZA

**AUTENTICAÇÃO MOLECULAR DE FILÉS DE PARGO E  
PROTOCOLO FORENSE PARA LUTJANÍDEOS (LUTJANIDAE –  
PERCIFORMES).**

Banca examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Iracilda da Cunha Sampaio (Orientadora).  
IECOS, UFPA, Campus de Bragança.

---

Prof. Dr. Igor Guerreiro Hamoy (Titular).  
UFRA, Campus de Capanema.

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Simoni Santos da Silva (Titular).  
IECOS, UFPA, Campus de Bragança.

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Juliana Araripe Gomes da Silva (Titular).  
IECOS, UFPA, Campus de Bragança.

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Janice Muriel Fernandes Lima da Cunha (Suplente).  
IECOS, UFPA, Campus de Bragança.

Bragança  
2015

À minha mãe, Nelita, a quem devo tudo e à minha filha, Mirela, por quem faço tudo.

“Os passos não conduzem,  
apenas, a uma meta; cada passo é  
já em si uma meta.”

Émile-Auguste Chartier

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à UFPA e ao IECOS, pela estrutura necessária à realização desse trabalho;

Ao PPGBA, pela oportunidade de cursar esse mestrado. Obrigada a todo o corpo docente, que torna possível a existência dessa Pós-Graduação, em especial aos professores que ministraram disciplinas na área de Sistemática e Evolução, pelos valiosos ensinamentos, importantes para o amadurecimento desse documento e para meu crescimento acadêmico;

Ao CNPq, por fomentar essa pesquisa;

Às minhas grandes orientadoras, eu não poderia ter melhores. Irá, obrigada por todo cuidado, por todas as portas que me abriu, as experiências novas que me proporcionou me fizeram ter tantos ganhos que eu nem sou capaz de enumerar aqui. Grazi, obrigada pela orientação tão efetiva, pela amizade, por não medir esforços em ajudar, mesmo com a chegada do pequeno Daniel, por tudo que a senhora tem feito por mim não só nesse mestrado, mas ao longo desses quatro anos, desde que me apresentou à genética. Vocês são espelhos para mim, as admiro muito e tenho muito orgulho de fazer parte desse time.

Ao LAGA, onde pude realizar todo o trabalho experimental. Agradeço a todos que fazem parte dessa minha segunda Família: à Leilane, pela grande contribuição, tanto na amostragem, quanto nos experimentos e também pelos vários *insights* na redação. Tenha certeza de que você foi fundamental; à Samia, pela amizade e pelo companheirismo no laboratório, principalmente “fora do expediente”; ao João Paulo e Rafael pelos constantes questionamentos, sempre me instigando a refletir, sempre me fazendo renovar a pesquisa bibliográfica; ao Danillo, que sempre que eu pedi, esteve disposto em opinar sobre como alocar uma informação no texto, ou como ficaria melhor a edição de uma figura;

Ao “Everest”, que merece um parágrafo a parte. Meu grande amigo, eu nem sei por onde começo a te agradecer. Obrigada por ser sempre tão prestativo; por todas as colocações sempre tão pertinentes; por sempre esclarecer toda dúvida que eu tenha; por sempre ter um artigo interessante para compartilhar; por estar sempre por perto; por ser um grande companheiro de coleta; por toda contribuição efetiva e direta para a conclusão desse trabalho. Eu não sei o que faria sem você!

A todos que foram indispensáveis durante as coletas pelo Nordeste. Em Aracaju: ao professor Roberto Schwartz e seus alunos Allan, Marcel, Crislaine Rosualdo e sua família, por serem tão prestativos na obtenção das amostras. Em Penedo: ao professor Cláudio Sampaio, por ser tão hospitaleiro, nos alojando em sua casa e por nos direcionar para os pontos possíveis para coleta. Agradeço também à Adriana e seu marido, que nos acolheram e se dispuseram a coletar conosco. Em Natal: à Joelma e seu marido, sempre tão receptivos, por nos direcionarem ao André, pescador que nos auxiliou imensamente na busca por nossas amostras. Em Fortaleza: à família do Bruno, que foi maravilhosa em nos hospedar, especialmente a sua tia Naná, muito atenciosa, se dispondo inclusive a nos levar aos pontos de coleta. Muito obrigada a todos vocês.

Ao amigo “Jef”, por todas as longas e proveitosas conversas sobre nossos trabalhos, discussões sobre temas relevantes ao projeto, por sempre estar pronto a me ouvir, opinar, ajudar. Obrigada por tudo, bom contar contigo.

Agradeço a minha família: minha mãe, que é minha base, sem ela eu simplesmente desmorono! Não conseguiria sem a senhora, mãe! Meu irmão Técio, que mesmo de longe é uma razão a mais pra eu batalhar; e a minha pequena Mirela. Filha, você nem sabe, mas mamãe está aqui hoje por você e para você. No início mamãe foi ignorante, achou que você fosse atrapalhar, mas você com suas maõzinhas no meu rosto e seus “te amo, mamãe!” foi a principal responsável para que eu fosse em frente. Para mim, você é pequenina, porém gigante! Toda força vem de você.

Ao meu namorado, Kellby, que nesse último semestre, em meio a tantas tensões, foi compreensivo, amoroso, presente apesar da distância. Obrigada por me acalmar, por sempre me incentivar e estar comigo nesse momento tão importante. Saiba que todas as pressões foram amenizadas com o seu companheirismo e carinho. Amo você!

A todos que de alguma forma contribuíram para a conclusão desse trabalho, para o fechamento deste ciclo. Obrigada.

## SUMÁRIO

<b>ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO</b> .....	vii
<b>RESUMO</b> .....	viii
<b>ABSTRACT</b> .....	ix
<b>LISTA DE FIGURAS E TABELAS</b> .....	x
<b>CAPÍTULO I. Introdução Geral</b> .....	11
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>1.1. Considerações Gerais</b> .....	12
<b>1.2. A Família Lutjanidae</b> .....	14
<b>1.2.1. Taxonomia, Distribuição e Bioecologia</b> .....	14
<b>1.2.2. Ocorrência na Costa Atlântica Ocidental</b> .....	17
<b>1.2.3. Importância Econômica, Problemas de Registro Estatístico e de Nomenclatura Vernacular</b> .....	25
<b>1.3. Ferramentas Moleculares Aliadas à Ictiologia</b> .....	28
<b>1.3.1. DNA barcode: Aplicações para Ictiofauna</b> .....	28
<b>1.3.2. Uso do DNA barcode na Manutenção da Confiabilidade no Consumo de Produtos Pesqueiros</b> .....	30
<b>1.3.3. PCR Multiplex como Metodologia Alternativa para Autenticação de Produtos Pesqueiros</b> .....	32
<b>1.4. Justificativa</b> .....	33
<b>1.5. Objetivos</b> .....	35
<b>1.5.1. Objetivo Geral</b> .....	35
<b>1.5.2. Objetivos específicos</b> .....	35
<b>1.6. Referências Bibliográficas</b> .....	36
<b>CAPÍTULO II. Substituição em filés de Pargo (<i>Lutjanus Purpureus</i> – Lutjanidae) detectada utilizando DNA <i>barcode</i></b> .....	42
<b>RESUMO</b> .....	44
<b>1. Introdução</b> .....	45
<b>2. Material e Métodos</b> .....	47
<b>2.1. Amostragem</b> .....	47
<b>2.2. Extração de DNA</b> .....	47
<b>2.3. Amplificação e Sequenciamento da Região Barcode</b> .....	48

## SUMÁRIO

2.4. <i>Análises Computacionais</i> .....	48
<b>3. Resultados</b> .....	49
<b>4. Discussão</b> .....	50
<b>5. Considerações Finais</b> .....	53
<b>Agradecimentos</b> .....	54
<b>Referências</b> .....	54
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	57
<b>CAPÍTULO III. Protocolo rápido para autenticação molecular de lutjanídeos (Lutjanidae)</b> .....	60
<b>RESUMO</b> .....	62
<b>1. Introdução</b> .....	63
<b>2. Material e métodos</b> .....	64
2.1. <i>Amostragem</i> .....	64
2.2. <i>Isolamento, Amplificação e Sequenciamento de DNA</i> .....	65
2.3. <i>Análises Computacionais</i> .....	66
2.4. <i>Desenho da Reação de PCR multiplex</i> .....	66
2.5. <i>Especificidade, Replicabilidade e Validação do Protocolo de Autenticação</i> .....	67
2.6. <i>Avaliação do padrão de bandejamento</i> .....	67
<b>3. Resultados e discussão</b> .....	67
<b>4. Conclusão</b> .....	69
<b>Agradecimentos</b> .....	69
<b>Referências</b> .....	70
<b>LISTA DE FIGURAS E TABELAS</b> .....	73
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	80

## ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

Considerando os diferentes enfoques que o trabalho possui, serão apresentados três capítulos, cujos títulos estão listados abaixo:

- **Capítulo I:** Introdução Geral;
- **Capítulo II:** Substituição em filés de Pargo (*Lutjanus purpureus* – Lutjanidae) detectada utilizando DNA *barcode*;
- **Capítulo III:** Protocolo rápido para autenticação molecular de lutjanídeos (Lutjanidae).

O **Capítulo I** descreve o grupo alvo do estudo – Família Lutjanidae –, destacando aspectos gerais da sua bioecologia, importância econômica e problemáticas relacionadas à comercialização das principais espécies alvo da pesca comercial. Apresenta, dessa forma, toda a fundamentação teórica necessária para a compreensão das questões que serão abordadas nos capítulos seguintes, além dos objetivos do trabalho.

No **Capítulo II**, foi utilizado o gene mitocondrial Citocromo Oxidase – subunidade I (COI) para verificar se os filés comercializados como “Pargo” na região pertencem à espécie *Lutjanus purpureus*. Devido às incertezas de classificação sistemática dentro da Família Lutjanidae, o que também é consequência da grande similaridade morfológica entre muitos táxons e é agravado pela forma de comercialização desses peixes, as substituições de uma espécie por outra, no momento da comercialização, são comuns. Por isso, além da identificação molecular dos filés de pargo, pretendeu-se desenvolver um protocolo de autenticação para espécies de lutjanídeos baseado em PCR multiplex, o que foi descrito no **Capítulo III**. Os capítulos II e III resultarão em artigos científicos.

Por fim, haverá uma seção reunindo as principais conclusões do trabalho, mostrando as contribuições que foram geradas.

## RESUMO

A demanda por frutos do mar tem aumentado notavelmente, e devido a isso, segmentos industriais tem diversificado a forma de apresentação do pescado, oferecendo produtos processados como filés, por exemplo. Tal tendência por um lado estimula o consumo, mas por outro diminui sua confiabilidade, uma vez que pescados processados apresentam altas taxas de substituição. O processamento remove partes do corpo utilizadas no reconhecimento das espécies, e então a identificação fica comprometida, especialmente em um grupo de peixes com grandes semelhanças morfológicas, como é o caso dos pargos ou vermelhos da Família Lutjanidae. Tais peixes tem grande interesse econômico mundialmente, e no Brasil a espécie mais procurada é o Pargo – *Lutjanus purpureus*. Existem vários outros fatores que propiciam a substituição dessa espécie: captura conjunta a outros lutjanídeos, registro estatístico impreciso, nomenclatura popular despadronizada e rotulagem inadequada do produto filetado. Portanto, o presente trabalho investigou se os filés comercializados em supermercados de Bragança-PA, sob o rótulo de “Pargo”, pertenciam de fato a espécie *L. purpureus*. Através da metodologia de DNA *barcode*, foi possível detectar que 22% dos filés amostrados correspondiam à espécie *Rhomboplites aurorubens*, lutjanídeo de baixo valor comercial na região. Os resultados apontam para a necessidade de prevenir práticas dessa natureza, e fornecem subsídio para auxiliar no combate a substituições, junto a órgãos competentes, indústrias e supermercados. Apesar da eficácia da técnica de DNA *barcode* para identificação, há metodologias mais práticas e baratas que vêm sendo sugeridas para a elaboração de protocolos de autenticação de produtos pesqueiros, como aqueles baseados em PCR multiplex. Tendo em vista os inúmeros relatos de fraudes em produtos derivados de lutjanídeos, foi desenvolvido um protocolo de identificação forense por padrão de bandeamento, para três das principais espécies de vermelhos comercializadas no Brasil: *L. purpureus*, *L. synagris* e *Ocyurus chrysurus*. Esse protocolo representa uma alternativa a ser aplicada tanto pela fiscalização, na busca por substituição, como na proteção dos direitos do consumidor; quanto na rotina de setores comerciais e industriais, no sentido de controlar a qualidade e garantir a autenticidade dos produtos.

**Palavras-chave:** filés, substituição, Pargo, DNA *barcode*, autenticação.

## ABSTRACT

The demand for seafood has increased remarkably, and because of this, industries have diversified the presentation of fish, offering products processed as fillets, for example. This tendency on the one hand stimulates consumption, but on the other reduces its reliability since processed fish have high replacement rates. The process removes parts of the body used to recognize the species, and then the identification is compromised, especially in a large group of fish with morphological similarities, as is the case of the red snappers of Lutjanidae family. These fish have large worldwide economic interest, and in Brazil the most popular species is the Pargo - *Lutjanus purpureus*. There are several other factors that favor the replacement of this species: Joint capture the other snappers, inaccurate statistical record, popular nomenclature standard out and mislabelling of product. Therefore, this study investigated whether the fillets sold in supermarkets in Bragança-PA, under the label of "Pargo", to belong to species *L. purpureus*. Through DNA barcode method was able to detect 22% of the sampled fillets corresponded to the species *Rhomboplites aurorubens*, low commercial value snapper in the region. The results point to the need to prevent such practices, and provide grant to help fight the replacements, with the competent bodies, industry and supermarkets. Despite the effectiveness of barcode DNA technique for identification, there are more practical and inexpensive methods that have been suggested for the development of authentication protocols fishery products, such as those based on multiplex PCR. In view of the numerous reports of fraud in derivative products snappers, we developed a protocol for forensic identification banding pattern, for three of the main species of red marketed in Brazil: *L. purpureus*, *L. synagris* and *Ocyurus chrysurus*. This protocol is an alternative to be applied both for the supervision, in the search for replacement and so on protection of consumer rights; as in routine commercial and industrial sectors, in order to control quality and ensure the authenticity of products.

**Keywords:** fillets, replacement, Pargo, DNA barcode, authentication.

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

<b>Figura 1.</b> Esquema dos táxons inseridos em Lutjanidae. As imagens são representantes de cada gênero. (Modificado de ALLEN, 1985) (Fotos: FishBase). .....	15
<b>Figura 2.</b> Padrão de distribuição das subfamílias de Lutjanidae ao longo dos Oceanos Índico, Pacífico e Atlântico. (Modificado de ALLEN, 1985). .....	16
<b>Figura 3.</b> Exemplos adultos representantes das espécies de pargos vermelhos, gênero <i>Lutjanus</i> . <b>A.</b> <i>L. purpureus</i> ; <b>B.</b> <i>L. buccanella</i> ; <b>C.</b> <i>L. vivanus</i> . .....	21
<b>Figura 4.</b> Exemplos adultos representantes das espécies <i>L. synagris</i> ( <b>A</b> ), <i>L. jocu</i> ( <b>B</b> ) e <i>L. analis</i> ( <b>C</b> ). .....	22
<b>Figura 5.</b> Outros representantes do gênero <i>Lutjanus</i> . <b>A.</b> <i>L. cyanopterus</i> ; <b>B.</b> <i>L. apodus</i> ; <b>C.</b> <i>L. griseus</i> ; <b>D.</b> <i>L. alexandrei</i> . .....	23
<b>Figura 6.</b> Espécies dos gêneros monotípicos de Lutjanidae ocorrentes no Atlântico Ocidental. <b>A.</b> <i>Ocyurus chrysurus</i> ; <b>B.</b> <i>Rhomboplites aurorubens</i> . .....	24
<b>Figura 7.</b> Contribuição dos lutjanídeos na produção total de peixes marinhos da costa brasileira ao longo dos anos de 2000 a 2011 (IBAMA, 2000-2007; MPA, 2010-2013). .....	26
<b>Figura 8.</b> Participação dos principais lutjanídeos capturados pela pesca extrativa marinha na costa brasileira ao longo dos anos de 2000 a 2011 (IBAMA, 2000-2007; MPA, 2010-2013). .....	26
<b>Tabela 1.</b> Táxons da Família Lutjanidae distribuídos ao longo da Costa Atlântica Ocidental (ALLEN, 1985; CERVIGÓN, 1993; NELSON, 2006; SCHWARTZ, 2007; MOURA; LINDEMAN, 2007; ALLEN; WHITE; ERDMANN, 2013). .....	20

## Capítulo I

---

---

# Introdução Geral

---

---

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Considerações Gerais

O pescado tem apresentado grande significância como alimento humano ao longo dos anos, possuindo várias propriedades nutricionais relevantes ao metabolismo. Sua carne representa um alimento proteico de alta qualidade, possuindo vitaminas e minerais, além de ácidos graxos poli-insaturados, capazes, por exemplo, de atuar na prevenção de doenças (MOZAFFARIAN; RIMM, 2006; DOMINGO et al., 2007; KRIS-ETHERTON; HARRIS; APPEL, 2011). Isso influencia em uma demanda crescente por peixes e conseqüentemente no aumento do esforço de pesca para o abastecimento de setores comerciais. Segundo mostram dados estatísticos globais, desde o início dos anos de 1990, a produção pesqueira utilizada para fins de alimentação humana tem crescido. Na década de 1980, cerca de 70% do peixe produzido foi destinado a alimentação humana, essa participação subiu para 73% em 1990, e para 81% em 2000. Em 2012, das 154 milhões de toneladas de peixes produzidos mundialmente, mais de 86% (136,2 milhões de toneladas) foi dirigida para o consumo humano direto (FAO, 2014).

Em virtude de fatores como importância alimentar que a carne do pescado possui, a ampliação de sua busca, a alteração na preferência dos consumidores, a evolução tecnológica e a melhoria na logística, a indústria pesqueira tem se tornado versátil, dinamizando sua produção ao mesmo tempo em que adiciona valor comercial, o que vêm convergindo no desenvolvimento de produtos como: enlatados, defumados, fatiados e filés congelados (FAO, 2014). Dessa tendência atual, deriva o fornecimento de produtos com praticidade no manuseio, prontos para consumo e/ou quantidades controladas por porção, que geram refeições uniformes e de qualidade. Aliado a isso, a facilidade de exportação contribui para a intensa procura de derivados pesqueiros no setor de congelados (FAO, 2014; MPA, 2013). Segundo as estatísticas oficiais de pesca do Brasil, em 2011 produtos pesqueiros comercializados de forma congelada têm apresentado um aumento em volume de aproximadamente 42% quando comparados ao ano anterior. Ainda neste ano, em valores monetários, a categoria “Congelados” representou 34% da pauta brasileira de exportação de pescado (MPA, 2013).

O processamento industrial do pescado tem vantagens e desvantagens. Quando o pescado passa pela linha industrial, um valor lhe é agregado, e portanto, ele se torna um produto mais atrativo para o consumidor e mais vantajoso em termos comerciais para o fornecedor. Entretanto, muitas vezes a transformação de um pescado inteiro fresco em um produto mais elaborado, além de comprometer a confiabilidade no consumo, pode ter uma série de outras consequências.

Peixes vendidos pós processamento tem apresentado altos índices de substituições de espécies comercialmente mais valorizadas por outras menos visadas. Esses problemas na rotulagem podem trazer severos prejuízos econômicos (FILONZI et al., 2010; CAWTHORN; STEINMAN; WITTHUHN, 2012; DI PINTO et al., 2013; CUTARELLI et al., 2014), além de riscos à saúde humana (GUALLAR et al., 2002; COHEN et al., 2009; VAN LEEUWEN et al., 2009; MARALIT et al., 2013). Ao mesmo tempo, a identificação incorreta de espécies pode comprometer o monitoramento de estoques pesqueiros, aumentando a vulnerabilidade de espécies ameaçadas (ARDURA et al., 2010; OGDEN; DAWNAY; MCEWING, 2009; PALMEIRA et al., 2013).

Durante a elaboração de produtos na indústria pesqueira, ocorre à retirada de porções corporais úteis no reconhecimento morfológico das espécies, fato este que contribui para a prática ilícita de substituição, uma vez que a distinção visual torna-se inviável (WARD, 2000). Dessa forma, a identificação inequívoca é o requisito principal para controlar esse tipo de atividade indevida. Dentro desse contexto, a genética tem auxiliado eficientemente questões dessa natureza, fornecendo ferramentas de identificação bastante confiáveis (HUBERT et al., 2008; FILONZI et al., 2010; HELLBERG; MORRISSEY, 2011; ARMANI et al., 2012).

A já mencionada dificuldade de identificação de produtos pesqueiros ainda se agrava quando se trata de um grupo de espécies com um vasto conjunto de caracteres morfológicos similares, como é o caso dos membros da Família Lutjanidae, os vermelhos, como são conhecidos popularmente (ALLEN, 1985; CERVIGÓN, 1993). Tais peixes representam importantes recursos pesqueiros ao longo de suas áreas de ocorrência, inclusive no Brasil (IBAMA, 2000-2007; MPA, 2010- 2013).

## 1.2. A Família Lutjanidae

### 1.2.1. Taxonomia, Distribuição e Bioecologia

A Divisão Teleostei, dentre os grupos inseridos no Subfilo Vertebrata, representa o de maior expressão em termos de heterogeneidade e abundância de espécies, englobando 96% de todos os peixes viventes, com aproximadamente 26 mil espécies agrupadas em 4.278 gêneros, 448 famílias e 40 ordens (NELSON, 2006). Destas últimas, destaca-se a Ordem Perciformes, por ser a mais diversificada entre todos os peixes e dentre os demais vertebrados, contando com aproximadamente 10.033 espécies, 1.530 gêneros e cerca de 160 famílias, muitas delas com ampla distribuição, encontradas em mares tropicais e subtropicais, como por exemplo, Lutjanidae (NELSON, 2006).

A Família Lutjanidae é composta por aproximadamente 17 gêneros e 110 espécies organizadas em quatro subfamílias: Etelinae, Apsilinae, Paradichthyinae e Lutjaninae (ALLEN, 1985; CERVIGÓN, 1993; NELSON, 2006; MOURA; LINDEMAN, 2007; FROESE; PAULY, 2013; ALLEN; WHITE; ERDMANN, 2013). Na **Figura 1** destacam-se os gêneros organizados por subfamília, além de imagens de espécies representantes. Os peixes do grupo são de médio e grande portes, sendo o comprimento máximo registrado de um metro (NELSON, 2006). São conhecidos popularmente como *snappers*, pargos, vermelhos e ciobas e estão amplamente distribuídos ao longo dos Oceanos Atlântico, Índico e Pacífico (CERVIGÓN, 1993; NELSON, 2006). Um padrão geral de distribuição geográfica para este grupo, considerando as subfamílias citadas, pode ser observado na **Figura 2**.

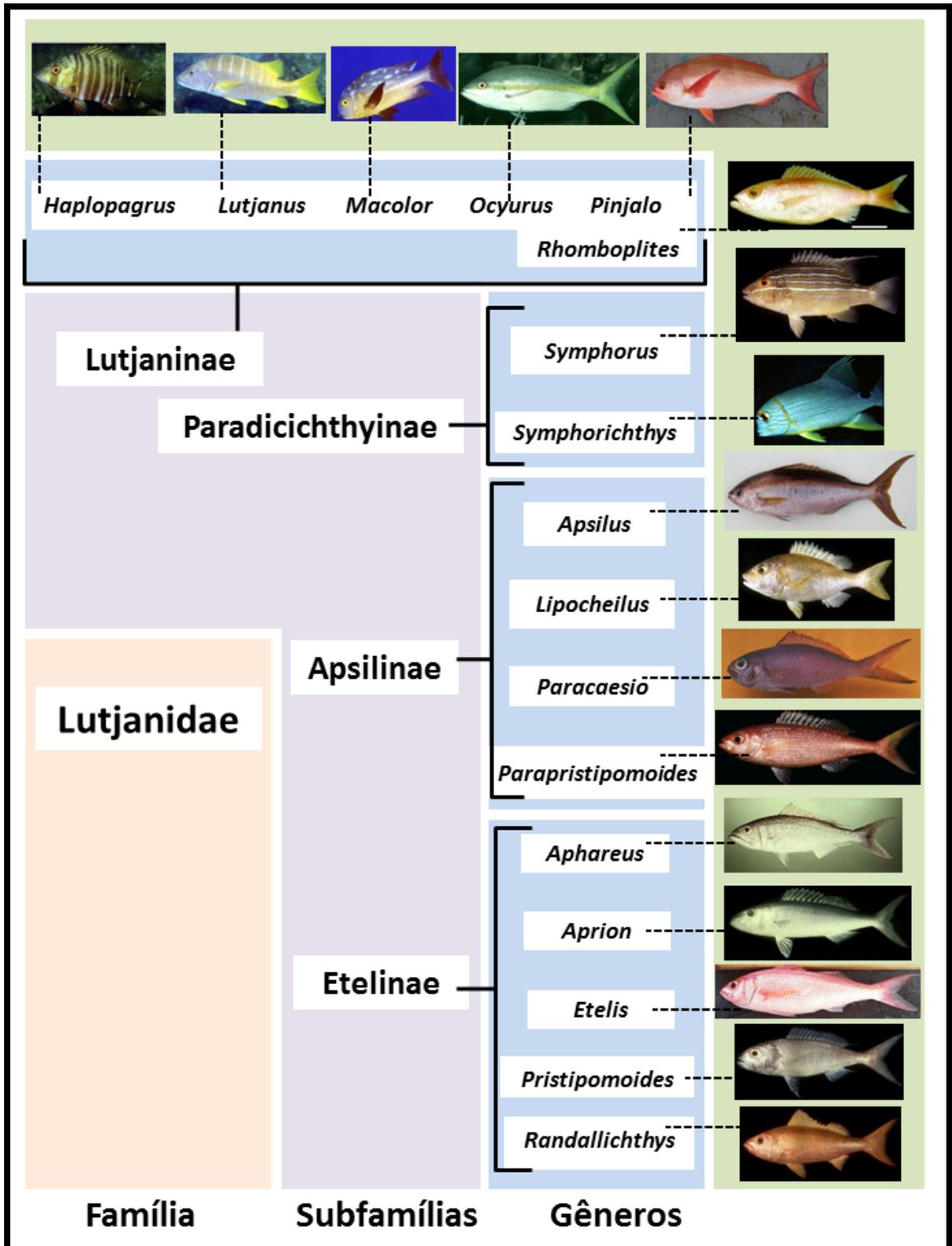
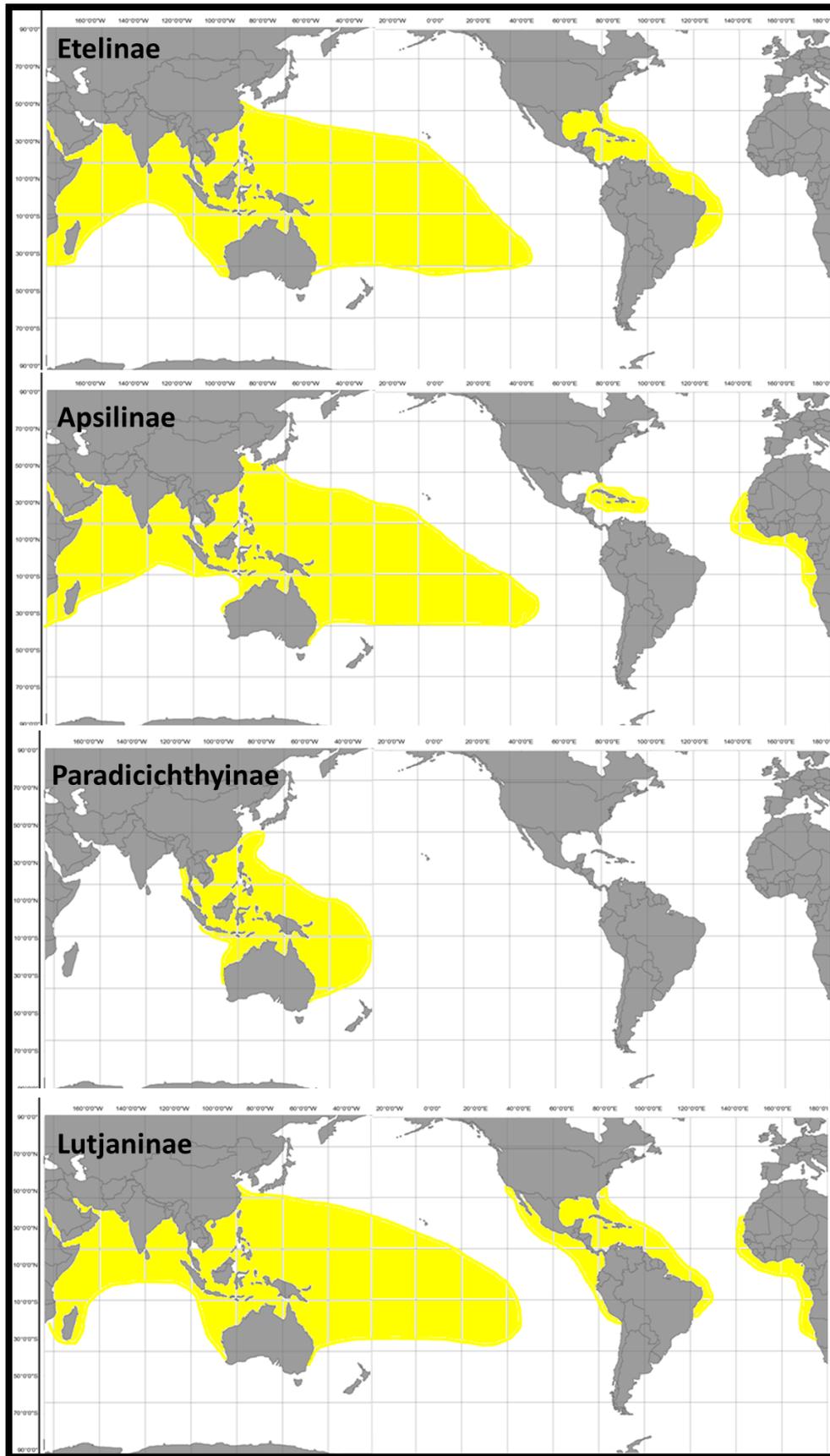


Figura 1. Esquema dos táxons inseridos em Lutjanidae considerando cada subfamília. As imagens são representantes de cada gênero (Modificado de ALLEN, 1985) (Fotos: FishBase).



**Figura 2.** Padrão de distribuição das subfamílias de Lutjanidae ao longo dos Oceanos Índico, Pacífico e Atlântico (Modificado de ALLEN, 1985).

Os lutjanídeos são peixes marinhos demersais, podendo ser capturados a até 450 metros de profundidade, encontrados em águas costeiras tropicais e subtropicais, geralmente associados a substratos rochosos e recifes de coral. (CERVIGÓN, 1993; NELSON, 2006). Raramente são observados em ambientes de água doce e estuários, com exceção dos juvenis de algumas espécies (MENEZES; FIGUEIREDO, 1980; CERVIGÓN, 1993; NELSON, 2006).

Com relação ao aspecto geral do corpo, apresentam cabeça triangular em vista lateral, corpo alongado e coberto por escamas ctenóides. A nadadeira dorsal com IX-XII espinhos na porção anterior e de nove a 18 raios moles na posterior, podendo ser contínua ou entalhada na região mediana (MENEZES; FIGUEIREDO, 1980; NELSON, 2006). A nadadeira caudal é geralmente bifurcada. Possuem boca terminal e entre esta e os olhos não se encontram escamas (MENEZES; FIGUEIREDO, 1980; CERVIGÓN, 1993; NELSON, 2006).

Quanto aos aspectos reprodutivos, os membros desta Família são dióicos e não exibem dimorfismo sexual (CERVIGÓN, 1993). O padrão reprodutivo é de gonocorismo e uma vez que ocorreu a diferenciação sexual, o sexo continua constante ao longo do ciclo de vida, alcançando a primeira maturação sexual quando atingem em média entre 33% a 51% do tamanho máximo (ALLEN, 1985; CLARO; LINDEMAN, 2008).

A longevidade de lutjanídeos foi calculada entre quatro e 21 anos, com base em estudos de anéis de crescimento e estruturas esqueléticas como otólitos e vértebras. Em geral, as espécies de maior porte têm expectativa de vida mais elevada, em torno de 15 a 20 anos (ALLEN, 1985).

São predadores ativos, alimentando-se principalmente à noite com uma dieta bem variada, embora pequenos peixes representem o alimento preferencial para muitas espécies. Outros alimentos comuns são caranguejos, camarões, gastrópodes, cefalópodes e organismos planctônicos, particularmente urocordados (ALLEN, 1985).

### **1.2.2. Ocorrência na Costa Atlântica Ocidental**

Dentre as 110 espécies de Lutjanidae, 19 são registradas para o Atlântico Ocidental, estando agrupadas em três subfamílias: Lutjaninae, Etelinae e Apsilinae (ALLEN, 1985; CERVIGÓN, 1993; NELSON, 2006). Das espécies ocorrentes nessa região do Atlântico, 15 encontram-se distribuídas ao longo da costa brasileira, sendo

elas pertencentes à Lutjaninae (gêneros *Lutjanus*, *Ocyurus* e *Rhomboplites*) e Etelinae (gêneros *Etelis* e *Pristipomoides*) (CERVIGÓN, 1993; ALLEN; WHITE; ERDMANN, 2013). Na **Tabela 1** estão apresentados os táxons que ocorrem no Atlântico Ocidental, destacando as espécies encontradas na costa do Brasil.

Dentre as subfamílias de Lutjanidae, a que mais se destaca em termos de diversidade de espécies é Lutjaninae. Esta reúne a maior parte dos peixes comercialmente importantes do grupo, sendo composta por seis gêneros (*Pinjalo*, *Macolor*, *Haplopagrus*, *Ocyurus*, *Rhomboplites* e *Lutjanus*) e aproximadamente 76 espécies. Esse subgrupo é o mais diversificado e abundante, com notada plasticidade fenotípica, além de muitas espécies com morfologia semelhante, como por exemplo, os vermelhos do gênero *Lutjanus* - *L. purpureus*, *L. buccanella* e *L. vivanus* (**Figura 3 A - C**) (CERVIGÓN, 1993; CERVIGÓN et al., 1993).

*Lutjanus* é o gênero mais abundante da subfamília, abrangendo cerca de 70 espécies (ALLEN; TALBOT, 1985; NELSON, 2006; MOURA; LINDEMAN, 2007; ALLEN; WHITE; ERDMANN, 2013). Peixes desse táxon são identificados pela boca grande e protátil; nadadeira dorsal com X-XI espinhos na região anterior e 11-16 raios na região posterior; nadadeira anal com III espinhos e 7-10 raios moles, sendo sua base recoberta por escamas (CERVIGÓN, 1993; CERVIGÓN et al., 1993). Podem chegar a 160 cm de comprimento, com morfologia do corpo alargada e comprida lateralmente (ALLEN, 1985; CERVIGÓN, 1993).

Na **Figura 4** são mostradas espécies de Lutjanidae consumidas no Brasil: *L. synagris*, *L. jocu*, *L. analis* (**Figura 4 A - C**) além de *L. purpureus* (CERVIGÓN, 1993; Cervigón et al., 1993). Na **Figura 5 A - D** estão representadas outras espécies do gênero: *L. cyanopterus*, *L. apodus*, *L. griseus* e a espécie recentemente descrita *L. alexandrei* (MOURA; LINDEMAN, 2007).

Os gêneros monotípicos *Ocyurus* e *Rhomboplites* contam com as espécies *O. chrysurus* e *R. aurorubens* (**Figura 6 A - B**) (CERVIGÓN, 1993; CERVIGÓN et al., 1993). O primeiro pode alcançar 86 cm e apresenta uma coloração que varia de verde-azulada ao avermelhado, com uma linha longitudinal amarela característica que vai desde o focinho até a nadadeira caudal. *R. aurorubens* tem coloração rosada no dorso e ventre esbranquiçado. Além disso, tem um porte menor, alcançando até 60 cm. Possui XII espinhos na porção anterior da nadadeira dorsal, uma das características

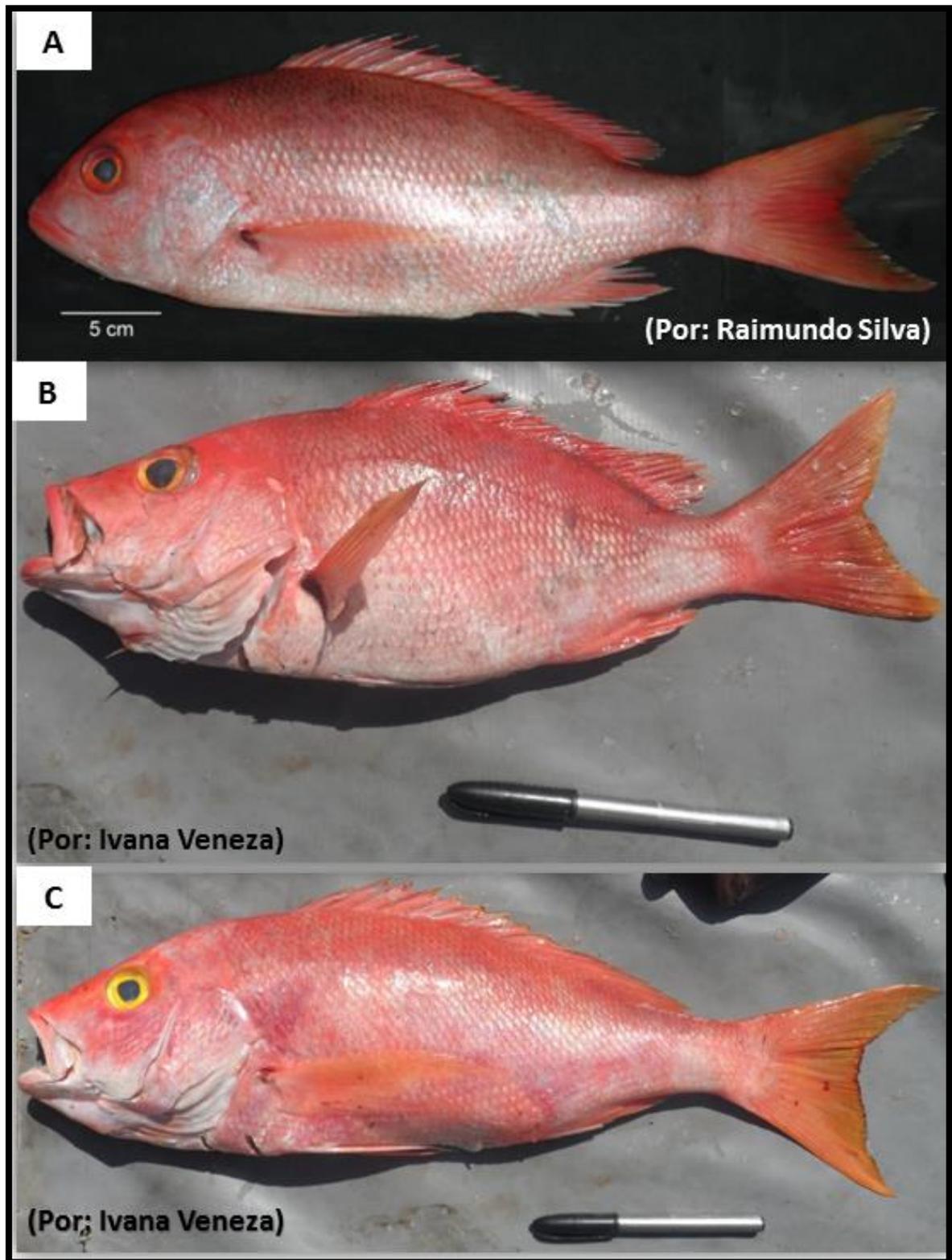
que geralmente se utiliza para diferenciá-lo das espécies de *Lutjanus* (CERVIGÓN, 1993; CERVIGÓN et al., 1993).

Várias das espécies mencionadas habitam áreas da Costa do Atlântico Ocidental, incluindo a Costa do Brasil, e na maioria dos casos ocorrem em simpatria (ALLEN, 1985; CERVIGÓN, 1993).

**Tabela 1.** Táxons da Família Lutjanidae distribuídos ao longo da Costa Atlântica Ocidental (ALLEN, 1985; CERVIGÓN, 1993; NELSON, 2006; SCHWARTZ, 2007; MOURA; LINDEMAN, 2007; ALLEN; WHITE; ERDMANN, 2013).

SUBFAMÍLIAS	GENÉROS	ESPÉCIES	NOME VERNACULAR Português/Inglês
<b>Lutjaninae</b>	<i>Lutjanus</i> Bloch, 1790	<i>Lutjanus analis</i> *	Cioba/ Mutton snapper
		<i>Lutjanus apodus</i> *	Baúna/ Schoolmaster snapper
		<i>Lutjanus buccanella</i> *	Vermelho/ Blackfin snapper
		<i>Lutjanus cyanopterus</i> *	Caranha/ Cubera snapper
		<i>Lutjanus griseus</i> *	Caranha do Mangue/ Grey snapper
		<i>Lutjanus jocu</i> *	Dentão/ Dog snapper
		<i>Lutjanus purpureus</i> *	Pargo/ Caribbean red snapper
		<i>Lutjanus synagris</i> *	Ariacó/ Lane snapper
		<i>Lutjanus vivanus</i> *	Olho de vidro/ Silk snapper
		<i>Lutjanus campechanus</i>	Red snapper
		<i>Lutjanus mahogoni</i>	Mahogany snapper
		<i>Lutjanus alexandrei</i> *	Brazilian snapper
		<i>Ocyurus</i> Gill, 1862	<i>Ocyurus chrysurus</i> *
<i>Rhomboplites</i> Gill, 1862	<i>Rhomboplites aurorubens</i> *	Piranga/ Vermilion snapper	
<b>Etelinae</b>	<i>Etelis</i> Cuvier, 1828 <i>Pristipomoides</i> Bleeker, 1852	<i>Etelis oculatus</i> *	Vermelho Olhão/ Queen snapper
		<i>Pristipomoides freemani</i> *	Slender wenchman
		<i>Pristipomoides aquilonaris</i> *	Wenchman
		<i>Pristipomoides macrophthalmus</i>	Cardinal snapper
<b>Apsilinae</b>	<i>Apsilus</i> Valenciennes, 1830	<i>Apsilus dentatus</i>	Black snapper

\* Espécies com registro de ocorrência para a costa brasileira.



**Figura 3.** Exemplos adultos representativos das espécies de pargos vermelhos, gênero *Lutjanus*. **A.** *L. purpureus*; **B.** *L. buccanella*; **C.** *L. vivanus*.

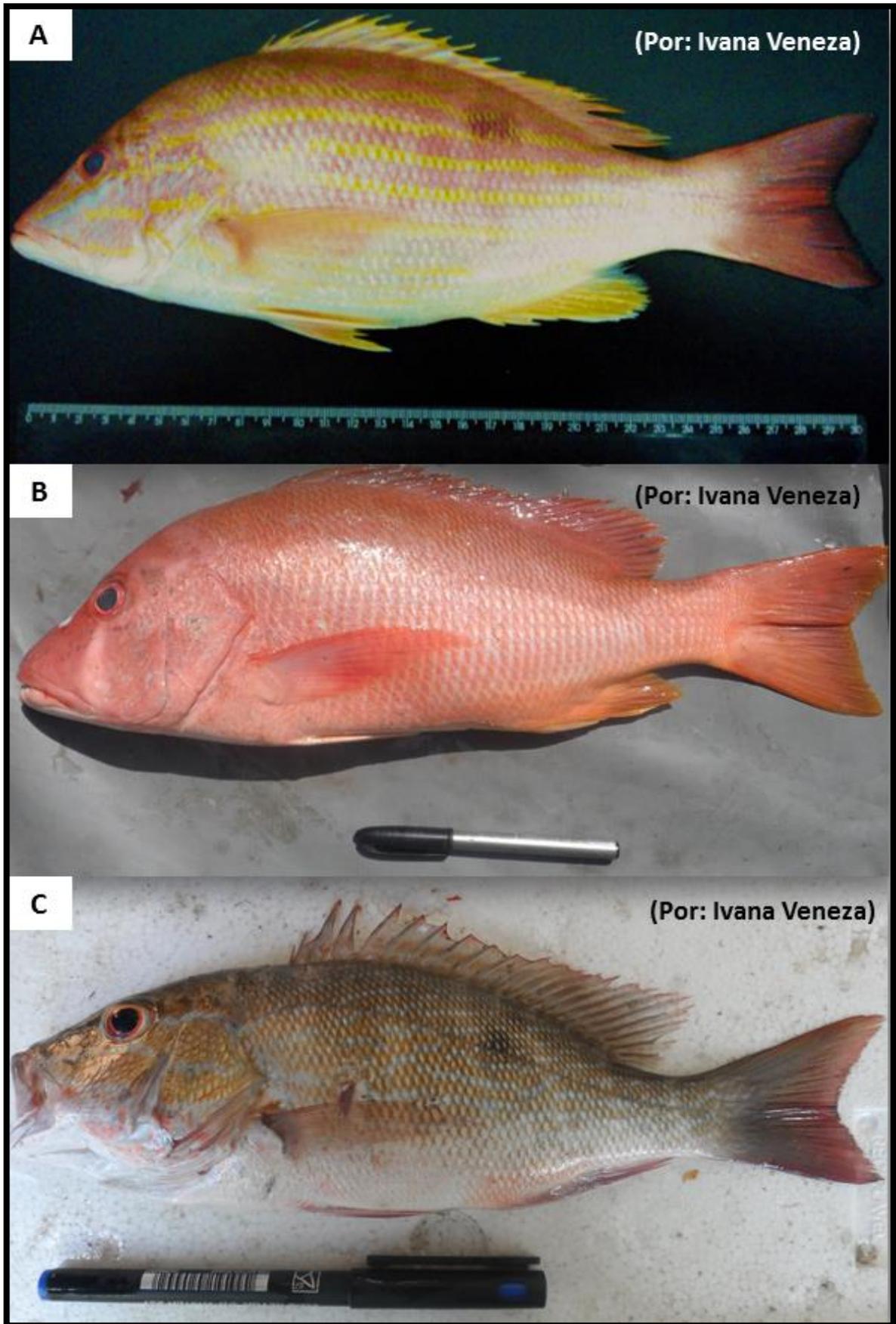
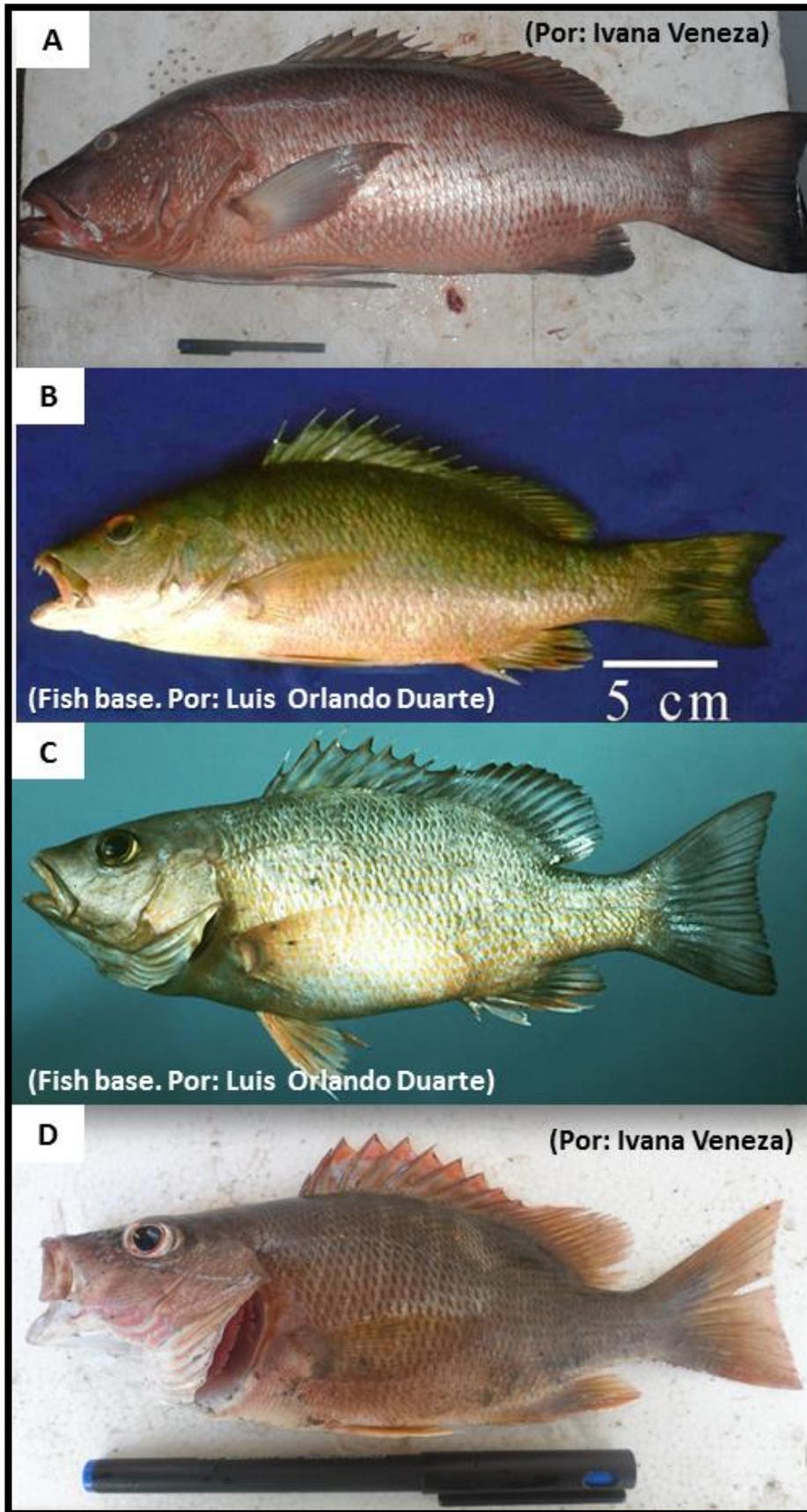
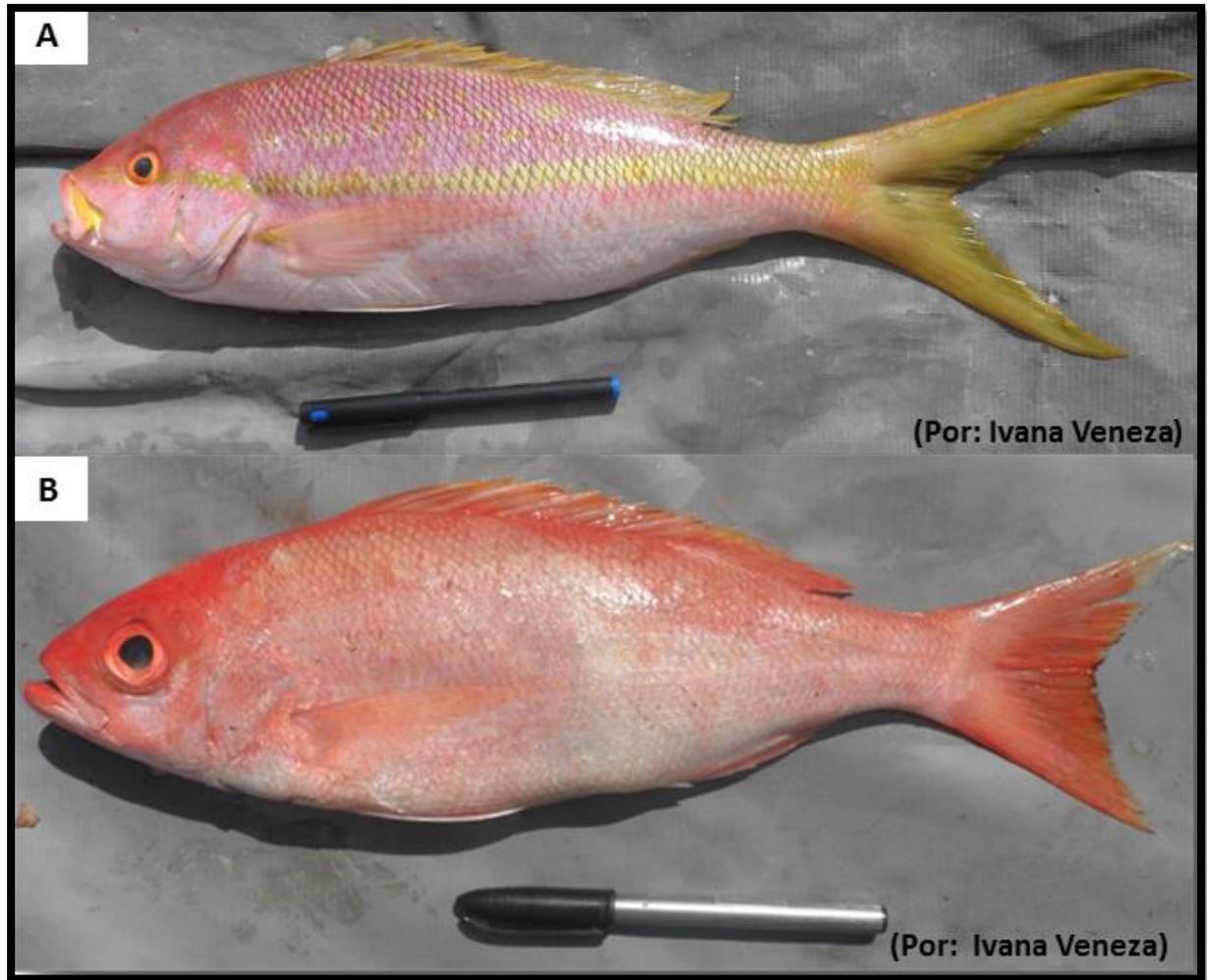


Figura 4. Exemplos adultos representantes das espécies *L. synagris* (A), *L. jocu* (B) e *L. analis* (C).



**Figura 5.** Outros representantes do gênero *Lutjanus*. **A.** *L. cyanopterus*; **B.** *L. apodus*; **C.** *L. griseus*; **D.** *L. alexandrei*.



**Figura 6.** Espécies dos gêneros monotípicos de Lutjanidae ocorrentes no Atlântico Ocidental. **A.** *Ocyurus chrysurus*; **B.** *Rhomboplites aurorubens*.

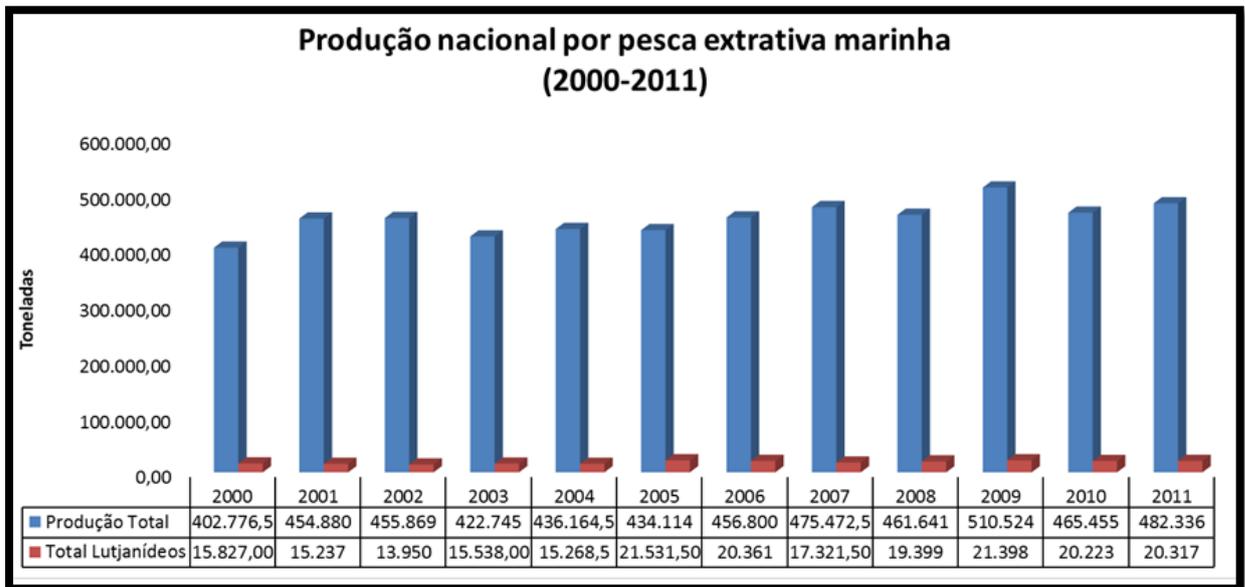
### 1.2.3. Importância Econômica, Problemas de Registro Estatístico e de Nomenclatura Vernacular

No que diz respeito à pesca dos lutjanídeos, o registro de suas capturas se iniciaram em 1800 em algumas regiões da América Central e Sul dos Estados Unidos, mas foi apenas no período compreendido entre 1950 e 1960 que passaram a ter interesse comercial no Brasil, o que provavelmente aconteceu em virtude do declínio das pescarias de atum e lagosta (POLOVINA; RALSTON, 1987).

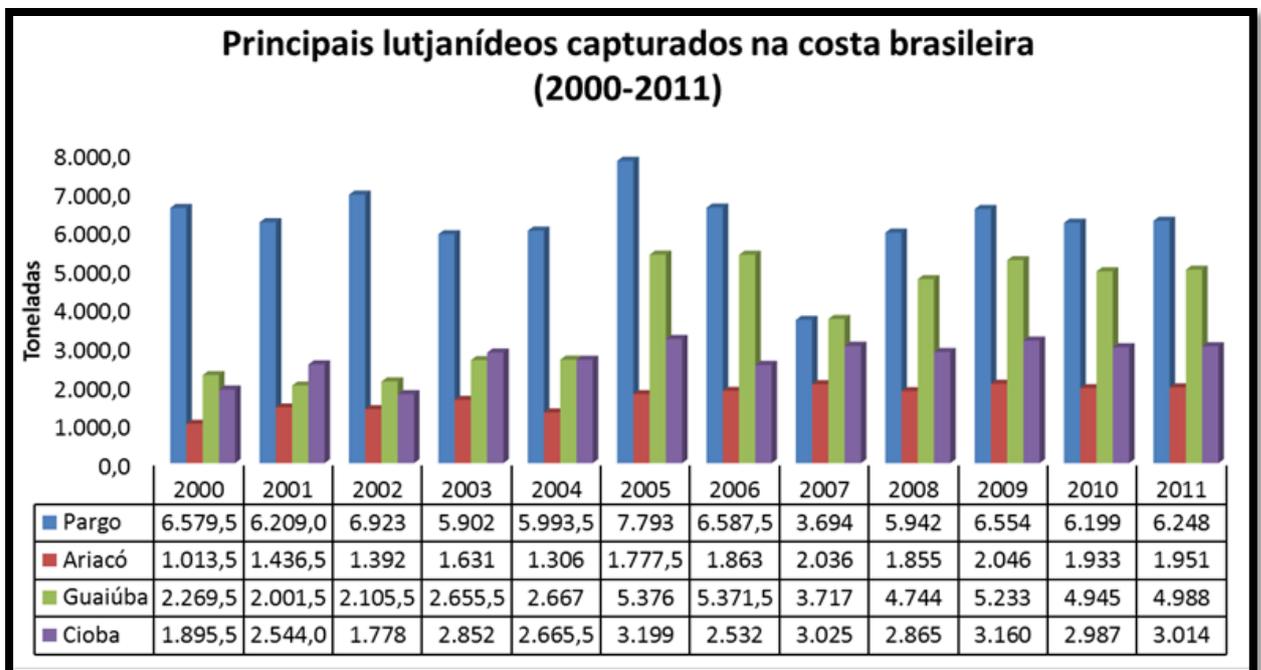
Atualmente os pargos são recursos pesqueiros amplamente explorados ao longo de suas áreas de ocorrência, o que pode ser observado pelos registros de captura de espécies dos gêneros *Pristipomoides*, *Caesio*, *Lutjanus* e *Pinjalo*, no Sul do Mar da China (ZHANG; LIU, 2006; GUO et al., 2007); *Lutjanus gibbus*, na região de Okinawa (MASUDA et al. 1984; NANAMI; YAMADA, 2009); *R. aurorubens* e *L. vivanus* na Venezuela (CERVIGÓN, 1993; MENDOZA; LAREZ, 2004); *Etelis oculatus*, em Barbados (PRESCOD; OXENFORD; TAYLOR, 1996) e Porto Rico (MATOS-CARABALLO, 2000); várias espécies na Carolina do Norte (SCHWARTZ, 2007); *O. chrysurus* e *R. aurorubens*, além de diversas espécies de *Lutjanus*, no Brasil (PINHEIRO; FRÉDOU, 2004; IBAMA, 2000-2007; MPA, 2010- 2013).

Segundo as estatísticas de pesca oficiais do Brasil, várias espécies de Lutjanidae são registradas regularmente na lista de peixes capturados pela pesca extrativa marinha, representando uma média de aproximadamente 4% de contribuição em relação ao total da captura de peixes marinhos, considerando o período de 2000 a 2011 (**Figura 7**). Essa contribuição reflete a captura conjunta de nove lutjanídeos: Ariacó (*L. synagris*); Dentão (*L. jocu*; *Lutjanus spp.*); Cioba (*L. analis*, *O. chrysurus*); Guaiúba (*O. chrysurus*); Caranha (*Lutjanus spp.*, *R. aurorubens*); Caranha-vermelha, Carapitanga, Vermelho (*Lutjanus spp.*) e Pargo (*L. purpureus*) (IBAMA, 2000-2007; MPA, 2010-2013).

A participação dos lutjanídeos nas capturas nacionais é devida majoritariamente a quatro tipos: Pargo, Cioba, Guaiúba e Ariacó, sendo o primeiro a principal espécie alvo das pescarias (**Figura 8**).



**Figura 7.** Contribuição dos lutjanídeos na produção total de peixes marinhos da costa brasileira ao longo dos anos de 2000 a 2011 (IBAMA, 2000-2007; MPA, 2010-2013).



**Figura 8.** Participação dos principais lutjanídeos capturados pela pesca extrativa marinha na costa brasileira ao longo dos anos de 2000 a 2011 (IBAMA, 2000-2007; MPA, 2010-2013).

Observa-se que o Pargo sempre foi o principal alvo da pesca, mas ao longo dos anos a participação de outras espécies vem aumentando notavelmente, em função de vários fatores, entre eles o declínio das pescarias de *L. purpureus*. Isso se deve ao colapso de alguns estoques dessa espécie, como já vem sendo relatado há algum tempo para o Nordeste do Brasil (DIAS-NETO; DORNELLES, 1996; PAIVA, 1997), enquanto outros estoques, como os do Norte, já estão sendo pescados no seu limite sustentável (SOUZA, 2002). Com isso, lutjanídeos que outrora não eram tão visados ganharam importância nas capturas e são potenciais candidatos a espécies substituidoras do Pargo. Alguns fatores que contribuem para a efetivação dessa substituição são: distribuição mais costeira de algumas espécies, por exemplo, *L. synagris* e *O. chrysurus*, sendo portanto, mais facilmente capturadas; semelhança morfológica entre várias espécies de Lutjanidae (CERVIGÓN, 1993; CERVIGÓN et al., 1993); além da forma de comercialização, em que frequentemente há a retirada de partes corpóreas utilizadas como características morfológicas distintivas, inviabilizando a discriminação visual das espécies.

Outro agravante para a substituição de espécies é que, no caso dos pargos, os nomes vernaculares variam com a região. Por exemplo, Cioba e Ariacó no Nordeste são designações para as espécies *L. analis* e *L. synagris*, respectivamente, enquanto que no Norte acontece exatamente o oposto. Além disso, é muito provável que nas estatísticas de pesca brasileiras, o registro de *L. purpureus* seja utilizado não apenas para o Pargo, e sim como uma categoria para um grupo de lutjanídeos que se assemelham, por exemplo, *L. vivanus* e *L. buccanella*, e que não puderam ser claramente distinguidos, refletindo portanto, a captura de espécies cuja estatística de pesca é negligenciada, capturadas indiscriminadamente.

Os principais portos de desembarques de lutjanídeos do país situam-se ao Norte, no Estado do Pará, considerado um polo de distribuição de peixes desse grupo, sendo majoritariamente a espécie *L. purpureus* a mais visada para comercialização (IBAMA, 2000-2007; MPA, 2010-2013).

No Pará, o Pargo é pescado tanto pela frota artesanal quanto pela industrial. Os pescadores artesanais normalmente comercializam os peixes nos mercados locais, na forma *in natura*, ao passo que as frotas industriais, que geralmente pertencem a entrepostos de pescado localizados no Estado, transportam os peixes até as empresas onde passarão pela linha de processamento e serão transformados em

produtos como filés. Grande parte dessa produção é destinada para exportação, tanto para outros Estados do Brasil, como para outros países.

Como já mencionado, o Pargo tem representado ao longo dos anos uma maior importância nas capturas, e isso se reflete também na sua demanda pelo consumidor. Concomitantemente, a espécie tem um maior valor comercial e as substituições, nesse caso, deflagram prejuízos econômicos ao consumidor.

Dessa forma, é de suma importância que haja um correto diagnóstico de espécies e uma rotulagem adequada, sendo o uso de ferramentas moleculares uma tendência crescente como alternativa para autenticação de produtos pesqueiros processados (HELLBERG; MORRISSEY, 2011; ARMANI et al., 2012; PALMEIRA et al., 2013).

### 1.3. Ferramentas Moleculares Aliadas à Ictiologia

A genética tem sido amplamente utilizada em ictiologia com as mais diversas abordagens. Algumas aplicações do uso de marcadores moleculares são: resolução de questões populacionais, como sub-estruturação e diversidade genética (GARBER; TRINGALI; STUCK, 2004; HEYDEN; LIPINSKI; MATTHEE, 2010; ARARIPE et al., 2013); esclarecimento da história evolutiva, elucidando problemáticas filogenéticas e filogeográficas (COOKE; CHAO; BEHEREGARAY, 2012; WAINWRIGHT et al., 2012; BETANCUR-R et al., 2013); e também identificação de táxons, importante em pesquisas forenses e de conservação (CÉSPEDES et al., 1999; HEBERT et al., 2003; PINHAL et al., 2008; PALMEIRA et al., 2013). Para esta última, o gene mitocondrial Citocromo Oxidase, subunidade I (COI) tem sido vastamente empregado, desde que foi proposto como DNA *barcode* por HEBERT et al. (2003) (WARD et al., 2005; ARDURA et al., 2010; BARBUTO et al., 2010; WONG et al., 2011; CLINE, 2012; DI PINTO et al., 2013).

#### 5.3.1. DNA *barcode*: Aplicações para Ictiofauna

No seu estudo, HEBERT et al. (2003) se basearam na variação interna de uma região padrão do genoma, a qual denominaram DNA *barcode*, para sugerir um novo sistema de identificação. A designação “DNA *barcode*” faz alusão ao sistema de identificação a partir do Código Universal do Produto (*Universal Product Code - UPC*),

no qual um infravermelho identifica inequivocamente um produto por meio de listras pretas.

Estritamente falando, tal metodologia não é completamente inovadora, já que abordagens com discriminação molecular já vinham sendo usadas. Por outro lado, a técnica de código de barras de DNA combina notáveis novidades, são elas a molecularização, a padronização e a informatização do processo de identificação (CASIRAGHI et al., 2010; GALIMBERTI et al., 2013).

Uma metodologia de identificação baseada em DNA requer universalização, que se refere a uma elevada cobertura taxonômica a partir da amplificação correta da região alvo; e exige uma resolução que garanta a discriminação de diferentes táxons através de diferenças interespecíficas em sequências nucleotídicas (HEBERT et al., 2003). Um princípio básico para a aplicação de uma sequência de DNA como código de barras é que essa região genômica deve ter alta variabilidade interespecífica e baixo polimorfismo intraespecífico (GALIMBERTI et al., 2013). Tendo em vista este aspecto, HEBERT et al. (2003) postularam a porção inicial do gene mitocondrial COI como região padrão de DNA *barcode* para metazoários, levando em conta seu poder discriminatório que em peixes, por exemplo, varia de 93% em espécies dulcícolas a 98% para espécies marinhas (WARD; HANNER; HEBERT, 2009).

O ponto forte da metodologia DNA *barcode* está na disponibilidade de uma plataforma internacional – o BOLD (*Barcode of Life Database*), gerenciada pelo Projeto *Barcode of Life* (iBOL). Este banco de dados é um depósito que abriga sequências de DNA *barcode*, atuando como uma biblioteca de referência para todas as espécies vivas (RATNASINGHAM; HEBERT, 2007). O BOLD é utilizado para relacionar uma sequência de DNA *barcode* disponível neste conjunto de dados e seu espécime *voucher*, a uma sequência nucleotídica da região *barcode* da COI de outro indivíduo, e dessa forma predizer se pertencem ao mesmo táxon ou não. Esta plataforma é dotada de alguns elementos, com destaque para a ferramenta de identificação (BOLD-IDS), que permite a submissão de sequências de DNA *barcode*, retornando uma identificação específica do táxon em questão (GALIMBERTI et al., 2013).

Qualquer pesquisador pode acessar o BOLD-IDS, de modo que haverá identificação a nível de espécie sempre que para a amostra desconhecida houver uma sequência referência depositada. O banco de dados público admite uma identificação

confiável para distâncias a partir de 98% e para os casos em que o sistema não seja capaz de fornecer a espécie da amostra inserida, a busca retorna uma lista de táxons relacionados a esta.

Em 2004, uma pesquisa em colaboração internacional resultou na *Fish Barcode of Life Initiative* (FISH-BOL - [www.fishbol.org](http://www.fishbol.org)), que representa uma poderosa ferramenta para análise de peixes e frutos do mar (WARD; HANNER; HEBERT, 2009). Essa é uma iniciativa que reúne muitos pesquisadores em torno do objetivo de gerar sequências *barcode* de referência para todas as espécies de peixes do mundo, organizadas e disponibilizadas publicamente na plataforma BOLD (RATNASINGHAM; HEBERT, 2007). Este recurso é seguro e aplicável, inclusive para fins de rastreabilidade alimentar de produtos pesqueiros (GALIMBERTI et al., 2013).

### **5.3.2. Uso do DNA barcode na Manutenção da Confiabilidade no Consumo de Produtos Pesqueiros**

A correta identificação de táxons é um pré-requisito essencial na manutenção de um padrão de qualidade para o setor alimentício (MYERS, 2011). Erros na discriminação de táxons, inclusive em peixes e produtos derivados, causam inúmeros problemas, entre os quais estão perdas econômicas para o consumidor e diminuição da confiabilidade no consumo (MARKO et al., 2004; FILONZI et al., 2010; CAWTHORN; STEINMAN; WITTHUHN, 2012).

Fragmentos de genes vêm sendo amplamente utilizados em abordagens forenses, visto que substituições de espécies em produtos alimentares têm sido bastante notificadas na comercialização de derivados pesqueiros, seja para produtos inteiros ou processados (DE SALLE; BIRSTEIN, 1996; HUBERT et al., 2008; HELLBERG; MORRISSEY, 2008; ARDURA et al., 2010; FILONZI et al., 2010; ARMANI et al., 2012).

Nesse âmbito, a identificação inequívoca de espécies é necessária no combate a práticas ilícitas de modo geral, sendo que para isso a metodologia de código de barras de DNA se mostra uma ferramenta robusta (FILONZI et al., 2010; CAWTHORN; STEINMAN; WITTHUHN, 2012; CLINE, 2012; DI PINTO et al., 2013). Através da metodologia de DNA *barcode* é possível certificar a origem da matéria-prima e detectar adulterações de várias naturezas, como mistura e substituição de táxons (GALIMBERTI et al., 2013).

As sequências *barcode* têm se mostrado especialmente úteis na rastreabilidade de frutos do mar (BECKER; HANNER; STEINKE, 2011), e isso se deve a alguns fatores como a grande diversidade de organismos aquáticos disponíveis para consumo humano, em comparação a outros grupos animais, fazendo com que a eficiência da técnica seja ressaltada; os métodos de identificações tradicionais não se aplicam em casos, por exemplo, de alimentos processados; e por fim, a identificação molecular em pescados permite um passo a mais que a detecção da espécie a qual pertence certo alimento, possibilitando a discriminação de variedades locais e consequentemente fornecendo informações sobre a origem do produto (GALIMBERTI et al., 2013).

Em abordagens forenses, o potencial do fragmento *barcode* também vêm sendo ressaltado (RASMUSSEN; MORRISSEY, 2008; FILONZI et al., 2010; DI PINTO et al., 2013; CARVALHO et al., 2015). O órgão dos Estados Unidos responsável pela regulação de alimentos e drogas (*US Food and Drug Administration*), propôs a utilização do DNA *barcode* para a autenticação de produtos pesqueiros. Tal instituição possui sequências *barcode* na Enciclopédia Regulatória de Peixes, facilitando a investigação de rotulagem inadequada e substituição de espécies (YANCY et al., 2008). A disponibilidade de um banco público dotado de sequências de diversas espécies de peixes, tal como o FISH-BOL, implementado no BOLD, aponta para o potencial do DNA *barcode* como ferramenta de fiscalização, auxiliando órgãos reguladores na rastreabilidade alimentar e controle de qualidade.

Como descrito, a metodologia de código de barras de DNA se mostra promissora como apoio a instituições fiscalizadoras, no sentido de prevenir a rotulagem inadequada e substituições ilícitas em produtos pesqueiros, e este sucesso está ligado a fatores como o barateamento e popularização de procedimentos moleculares, como o sequenciamento de DNA, o qual é exaustivamente relatado por sua acurácia (WARD et al., 2005; HUBERT et al., 2008; FILONZI et al., 2010; ARDURA et al., 2010).

Ainda assim, existem técnicas moleculares com abordagens forenses que eliminam a etapa de sequenciamento e, portanto tendem a ser mais baratas, práticas e com potencial para uso rotineiro de órgãos competentes no controle de qualidade alimentar em indústrias e supermercados. Nesse segmento, a PCR multiplex vem sendo largamente empregada em investigações de fraudes alimentares com

derivados de pescado (ASENSIO, 2008; DURAND et al., 2010; RASMUSSEN; MORRISSEY; HANNER, 2010; ARMANI et al., 2012).

### **5.3.3. PCR Multiplex como Metodologia Alternativa para Autenticação de Produtos Pesqueiros**

A técnica de PCR multiplex consiste em desenvolver iniciadores específicos para amplificação de fragmentos de DNA de diferentes tamanhos, que possam ser analisados diretamente, pós PCR, em géis de agarose concentrados. Nestas análises, padrões diferentes de bandeamentos são atribuídos à espécies distintas.

Tal metodologia tem sido sugerida como ferramenta para autenticação de produtos advindos da pesca e baseados nesse procedimento, protocolos de autenticação vem sendo propostos.

ASENSIO (2008) investigou refeições elaboradas supostamente com a espécie *Epinephelus marginatus*. O autor analisou 37 pratos comercializados em universidades e restaurantes, e aplicando a técnica de PCR multiplex, utilizando iniciadores espécie-específicos do gene rDNA 5S, pôde concluir que apenas nove destes pertenciam de fato à espécie em questão. O estudo aponta para a utilidade da metodologia como protocolo para a autenticação de refeições elaboradas a partir desse peixe na indústria alimentícia.

RASMUSSEN; MORRISSEY; HANNER (2010) utilizando o gene COI, desenvolveram um método multiplex para espécies de salmão e truta, objetivando fornecer uma alternativa confiável e prática para a investigação de fraudes comerciais em produtos à base desses peixes. Os autores ressaltaram sua aplicação como um recurso para indústrias e agências reguladoras na detecção e prevenção de substituição de espécies.

Um protocolo multiplex foi desenvolvido por CATANESE et al. (2010) para autenticar produtos processados derivados do gênero *Scomber*. Os testes, que foram realizados em 40 produtos, incluindo enlatados variados e filés frescos, confirmaram que a identificação estava de acordo com a rotulagem.

Em um estudo forense realizado por ARMANI et al. (2012), uma abordagem multiplex foi desenvolvida para detectar substituições fraudulentas em quatro espécies de peixes que apresentam morfologia similar e são capturadas conjuntamente. O procedimento foi validado por meio de testes em quatro pratos típicos preparados com

base nas espécies-alvo. Os resultados apontaram o sucesso da ferramenta, uma vez que embora haja degradação do DNA dependendo dos ingredientes utilizados e temperatura de cozimento, todas as amostras puderam ser identificadas corretamente.

Em última análise, esses e diversos outros estudos relatam a sensibilidade e a rapidez da metodologia de PCR multiplex na identificação precisa, reforçando sua aplicabilidade como um recurso capaz de auxiliar o controle de qualidade de produtos pesqueiros, prevenindo substituições e adulterações, portanto com potencial para fiscalização de produtos frescos, processados e misturados.

#### 1.4. Justificativa

Os peixes pertencentes à Família Lutjanidae são muito semelhantes, havendo em vários casos sobreposição do padrão de coloração, de medidas morfométricas e das áreas de ocorrência no Atlântico Ocidental (CERVIGÓN, 1993; CERVIGÓN et al., 1993). Esses fatos denotam a dificuldade de uma identificação precisa, com base apenas em caracteres fenotípicos e/ou bioecológicos.

A morfologia homogênea desses animais também gera problemas que se estendem até sua comercialização. Os lutjanídeos, como já evidenciado outrora, são bastante consumidos e devido a isso são de grande interesse econômico. No entanto, o principal alvo de captura dentre os peixes do grupo, é a espécie *L. purpureus*, possuindo o maior valor de mercado no Brasil. Este pode ser comercializado fresco ou processado, originando principalmente filés congelados. Ao passar pelo processo de filetagem, os caracteres diagnósticos da espécie são removidos, impossibilitando seu reconhecimento visual. De acordo com HAYE et al. (2012), a substituição de uma espécie por outra pode ser facilmente camuflada quando amostras de alimentos são processadas.

Ainda existe uma série de outros fatores que cooperam para que essa substituição seja praticada, por exemplo, i) o declínio nas pescarias de Pargo, em virtude da diminuição dos estoques naturais (DIAS-NETO; DORNELLES, 1996; PAIVA, 1997; SOUZA, 2002), impulsionando o ii) o aumento da captura de outras espécies do grupo (IBAMA, 2000-2007; MPA, 2010-2013). Somando-se a isso, iii) a captura conjunta de várias espécies, devido habitarem áreas em simpatria

(ALLEN, 1985; CERVIGÓN et al., 1993); iv) a falta de padronização na denominação popular, fazendo com que a mesma espécie tenha diferentes nomes, dependendo da região; v) a categorização do Pargo, englobando mais de uma espécie, quando deveria referenciar apenas *L. purpureus*; vi) a falta de precisão dos registros oficiais de pesca do país, em que vários lutjanídeos não têm sua identificação esclarecida até o nível de espécie, com diversos nomes vulgares referindo-se a *Lutjanus spp* (IBAMA, 2000-2007; MPA 2010-2013). Todos esses são agravantes que podem contribuir para eventos de substituições de *L. purpureus* por outras espécies.

Adicionalmente, trabalhos informam substituições para o grupo. Segundo estudos recentes na Europa e América do Norte, a frequência desse tipo de prática varia de 15%-45% do total de produtos pesqueiros, sendo 75% destas relatadas para a espécie *Lutjanus campechanus* (MARKO, et al., 2004; WONG; HANNER, 2008; LOGAN et al., 2008; JACQUET; PAULY, 2008; HELLBERG; MORRISSEY, 2011; WARNER et al., 2013; STILES et al., 2013).

Esta rotulagem inadequada pode ter graves consequências, prejudicando o sucesso de programas de manejo e conservação (WARD, 2000), além de gerar prejuízos financeiros ao consumidor (MARKO et al., 2004). Dentro desse contexto, há necessidade da adoção de uma medida efetiva no auxílio da fiscalização de fraudes alimentares, sendo a identificação inequívoca um pré-requisito, no sentido de garantir a autenticidade da rotulagem e a integridade do consumo. Nesse âmbito, ferramentas moleculares têm sido amplamente empregadas na detecção e prevenção de práticas dessa natureza, inclusive com produtos pesqueiros, por meio de genética forense (WONG; HANNER 2008; RASMUSSEN; MORRISSEY; HANNER, 2010; ARMANI et al., 2012).

Tendo em vista a eficiência do gene COI para identificar espécies de pescado (WONG; HANNER, 2008; ARDURA et al., 2010; VENEZA et al. 2014), e o crescente processo de substituição em produtos processados, o presente trabalho pretendeu utilizar o DNA *barcode* para investigar se os filés comercializados em mercados locais, rotulados como Pargo, pertencem de fato à espécie *L. purpureus* e no caso de substituições, identificar a(s) espécie(s) em questão.

Haja vista a necessidade de uma metodologia eficiente e prática, para uso cotidiano, adequada tanto para o controle de qualidade das indústrias pesqueiras e redes de supermercados, quanto para os órgãos fiscalizadores do setor de produtos

alimentícios, vários trabalhos vêm descrevendo a eficiência da PCR multiplex em abordagens forenses com peixes e produtos derivados, ressaltando sua praticidade e menor custo, em relação a outras técnicas empregadas para o mesmo tipo de investigação (ASENSIO, 2008; DURAND et al., 2010; RASMUSSEN; MORRISSEY; HANNER, 2010; ARMANI et al., 2012). Logo, a fim de prevenir/minimizar esse tipo de prática ilícita, a presente pesquisa também objetivou desenvolver um protocolo de PCR multiplex para autenticação de lutjanídeos.

## 1.5. Objetivos

### 1.5.1. Objetivo Geral

- ✓ Autenticar filés rotulados como pargo utilizando DNA *barcode* e gerar um protocolo de Autenticação Molecular para lutjanídeos usando apenas o padrão de bandas de PCR.

### 1.5.2. Objetivos Específicos

- ✓ Investigar a ocorrência de substituições de espécies em filés rotulados como pargo (*L. purpureus*), utilizando a metodologia de DNA *barcode*;
- ✓ Identificar, no caso de haver substituições, quais as espécies utilizadas para tal fim;
- ✓ Desenvolver um protocolo de autenticação molecular para lutjanídeos, baseado em padrão de bandas de PCR multiplex;
- ✓ Validar a metodologia do padrão de bandas de PCR de COI através da submissão de filés previamente identificados por sequenciamento, ao protocolo desenvolvido.

## 1.6. Referências Bibliográficas

ALLEN, G. -R. **Snappers of the world. An annotated and illustrated catalogue of Lutjanid species known to date.** Rome: FAO. 1985. 208 p.

ALLEN, G. R.; TALBOT, F. H. **Review of the snappers of the genus *Lutjanus* (Pisces: Lutjanidae) from the Indo-Pacific, with the description of a new species.** Bernice Pauahi Bishop Museum, 1985.

ALLEN, G. -R.; WHITE, W. T.; ERDMANN, M. V. Two new species of snappers (Pisces: Lutjanidae: *Lutjanus*) from the Indo-West Pacific. **Journal of the Ocean Science Foundation**, n. 6, p. 33-51, 2013.

ARARIPE, J. et al. Dispersal capacity and genetic structure of *Arapaima gigas* on different geographic scales using microsatellite markers. **PloS one**, v. 8, n. 1, p. e54470, 2013.

ARDURA, A. et al. DNA barcoding for conservation and management of Amazonian commercial fish. **Biological Conservation**, v. 143, n. 6, p. 1438-1443, 2010.

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**, v. 133, n. 1, p. 184-192, 2012.

ASENSIO, L. Application of multiplex PCR for the identification of grouper meals in the restaurant industry. **Food Control**, v. 19, n. 11, p. 1096-1099, 2008.

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

BECKER, S.; HANNER, R.; STEINKE, D. Five years of FISH-BOL: Brief status report. **Mitochondrial DNA**, v. 22(S1), p. 3–9, 2011.

BETANCUR-R, R. et al. The Tree of Life and a New Classification of Bony Fishes. **PLoS currents**, v. 5, 45 p., 2013.

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.

CASIRAGHI, M. et al. Dna barcoding: A six-question tour to improve users' awareness about the method. **Briefings in Bioinformatics**, v. 11, p. 440–453, 2010.

CATANESE, G. et al. A multiplex-PCR assay for the authentication of mackerels of the genus *Scomber* in processed fish products. **Food Chemistry**, v. 122, p. 319–326, 2010.

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

CERVIGÓN, F. et al. **FAO species identification sheets for fishery purpose. Field Guide to the Commercial marine and Brackish-water Resources of the Northern Coast of South America**. Rome: FAO, 1993. p. 513.

CERVIGÓN, F. **Los peces marinhos de Venezuela**. 2. ed. Caracas, Venezuela: Fundacion Científica Los Roques, 1993. v. Ilp. 498.

CÉSPEDES, A. et al. Identification of Sole (*Solea solea*) and Greenland Halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*) by PCR Amplification of the 5S rDNA Gene. **J. Agric. Food Chem.**, v. 47, n. 3, p. 1046-1050, 1999.

CLARO, R.; LINDEMAN, K. C. Biología y manejo de los pargos (Lutjanidae) en el Atlántico occidental. **La Habana: Instituto de Oceanología**, 2008.

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

COHEN, N. J. et al. Public health response to puffer fish (Tetrodotoxin) poisoning from mislabeled product. **Journal of Food Protection**, v. 72, p. 810–817, 2009.

COOKE, G. M.; CHAO, N. L.; BEHEREGARAY, L. B. Marine incursions, cryptic species and ecological diversification in Amazonia: the biogeographic history of the croaker genus *Plagioscion* (Sciaenidae). **Journal of Biogeography**, v. 39, n. 4, p. 724-738, 2012.

CUTARELLI, A. et al. Italian market fish species identification and commercial frauds revealing by DNA sequencing. **Food Control**, v. 37, p. 46-50, 2014.

DE SALLE, R.; BIRSTEIN, V. J. PCR identification of Black caviar. **Nature**, v. 381, p. 197–198, 1996.

DI PINTO, A. et al. DNA barcoding for detecting market substitution in salted cod fillets and battered cod chunks. **Food Chemistry**, v. 141, p. 1757–1762, 2013.

DIAS NETO, J.; DORNELLES, L. D. C. Diagnóstico da pesca marítima do Brasil. **Brasília: IBAMA**, 1996.

DOMINGO, J. L. et al. Benefits and risks of fish consumption Part I. A quantitative analysis of the intake of omega-3 fatty acids and chemical contaminants. **Toxicology**, v. 230, p. 219–226, 2007.

DURAND, J. -D. et al. Multiplex 16S rRNA haplotype-specific PCR, a rapid and convenient method for fish species identification: an application to West African Clupeiform larvae. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, n. 3, p. 568-572, 2010.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture**. Rome, 2014.

- FILONZI, L. et al. Molecular barcoding reveals mislabelling of commercial fish products in Italy. **Food Research International**, v. 43, p. 1386-1388, 2010.
- FROESE, R.; PAULY, D., Eds. FishBase. World Wide Web electronic publication. [www.fishbase.org](http://www.fishbase.org), version (06/2013), 2013.
- GALIMBERTI, A. et al. DNA barcoding as a new tool for food traceability. **Food Research International**, v. 50, p. 55–63, 2013.
- GARBER, A. F.; TRINGALI, M. D.; STUCK, K. C. Population structure and variation in red snapper (*Lutjanus campechanus*) from the Gulf of Mexico and Atlantic coast of Florida as determined from mitochondrial DNA control region sequence. **Marine Biotechnology**, v. 6, n. 2, p. 175-185, 2004.
- GUALLAR, E. et al. Mercury, fish oils, and the risk of myocardial infarction. **The New England Journal of Medicine**, v. 347, p. 1747–1754, 2002.
- GUO, Y. et al. Phylogenetic relationships of South China Sea snappers (genus *Lutjanus*; family Lutjanidae) based on mitochondrial DNA sequences. **Marine Biotechnology**, v. 9, n. 6, p. 682-688, 2007.
- HAYE, P. A. et al. Authentication of commercialized crab-meat in Chile using DNA Barcoding. **Food Control**, v. 25, p. 239-244, 2012.
- HEBERT, P. D. N. et al. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 270, n. 1512, p. 313-321, 2003.
- HELLBERG, R. S.; MORRISEY, M. T. Advances in DNA-based techniques for the detection of seafood species substitution on the commercial market. **Journal of Laboratory Automation**, v. 16, p. 308–321, 2011.
- HEYDEN, S.; LIPINSKI, M. R.; MATTHEE, C. A. Remarkably low mtDNA control region diversity in an abundant demersal fish. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 55, n. 3, p. 1183-1188, 2010.
- HUBERT, N. et al. Identifying Canadian Freshwater Fishes through DNA Barcodes. **PLoS ONE**, v. 3, p. e2490, 2008.
- IBAMA. **Estatística da pesca no Brasil: Grandes regiões e unidades da federação. 2000-2007**. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/documentos-recursos-pesqueiros/estatistica-pesqueira>>. Acesso em: dezembro de 2014.
- JACQUET, J. L.; PAULY, D. Trade secrets: Renaming and mislabeling of seafood. **Marine Policy**, v. 32, p. 309–318, 2008.
- KRIS-ETHERTON, P. M.; HARRIS, W. S.; APPEL, L. J. Fish Consumption, Fish Oil, Omega-3 Fatty Acids, and Cardiovascular Disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**. 2011.
- LOGAN, C. A. et al. An impediment to consumer choice: Overfished species are sold as Pacific *red snapper*. **Biological Conservation**, v.141, p. 1591–1599, 2008.

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**, v, 33, p. 110-125, 2013.

MARKO, P. B. et al. Fisheries: mislabelling of a depleted reef fish. **Nature**, v. 430, n. 6997, p. 309-310, 2004.

MASUDA, H. et al. The fishes of the Japanese archipelago. Tokai University Press. **Tokyo, Japan**, 1984.

MATOS-CARABALLO, D. Overview of Puerto Rico's small scale fisheries statistics: 1994–1997. In: **Proceedings of the Gulf and Caribbean Fisheries Institute**. Gulf and Caribbean Fisheries Institute, 2000. p. 215-231.

MENDOZA, J. J.; LAREZ, A. A biomass dynamics assessment of the southeastern Caribbean snapper–grouper fishery. **Fisheries Research**, v. 66, n. 2-3, p. 129–144, 2004.

MENEZES, N. A.; FIGUEIREDO, J. L. **Manual de Peixes Marinhos do Sudeste do Brasil.IV.Teleostei(3)**. São Paulo: Museu de Zoologia-Universidade de São Paulo. 1980. 96 p.

MOURA, R. L.; LINDEMAN, K. C. A new species of snapper (Perciformes: Lutjanidae) from Brazil, with comments on the distribution of *Lutjanus griseus* and *L. apodus*. **Zootaxa**, v. 1422, p. 31-43, 2007.

MOZAFFARIAN, D.; RIMM, E. B. Fish Intake, Contaminants, and Human Health. Evaluating the Risks and the Benefits. **JAMA**, v. 296, n. 15, p. 1885- 1900, 2006.

MPA. **Boletim estatístico de pesca e aquicultura. 2010-2013**. Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br/index.php/informacoes-e-estatisticas/estatistica-da-pesca-e-aquicultura>>. Acesso em: dezembro de 2014.

MYERS, M. J. Molecular identification of animal species in food: Transition from research laboratories to the regulatory laboratories. **The Veterinary Journal**, v. 190, p. 7-8, 2011.

NANAMI, A; YAMADA, H. Seasonality, lunar periodicity of settlement and microhabitat association of juvenile humpback red snapper *Lutjanus gibbus* (Lutjanidae) in an Okinawan coral reef. **Marine Biology**, v. 156, n. 3, p. 407-414, 2009.

NELSON, J. S. **Fishes of the World**. 4. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2006. 601 p.

OGDEN, R.; DAWNAY, N.; MCEWING, R. Wildlife DNA forensics—bridging the gap between conservation genetics and law enforcement. **Endangered Species Research**, v. 9, n. 3, p. 179-195, 2009.

PAIVA, M. P. **Recursos pesqueiros estuarinos e marinhos do Brasil**. Fortaleza: UFC Edições, 1997. 278p.

- PALMEIRA, C. A. M. et al. Commercialization of a critically endangered species (large tooth sawfish, *Pristis perotteti* in fish markets of northern Brazil: authenticity by DNA analysis. **Food Control**, 2013.
- PINHAL, D. et al. Discrimination of shark species by simple PCR of 5S rDNA repeats. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, p. 361-365, 2008.
- PINHEIRO, L. A.; FRÉDOU, F. L. Caracterização geral da pesca industrial desembarcada no estado do Pará. **Rev Cien UFPA**, v. 4, n. 1, p. 16, 2004.
- POLOVINA, J. J.; RALSTON, S. Tropical snappers and groupers. Biology and fisheries management. **Ocean Resources and Marine Policy Series**. 1987. 659 p.
- PRESCOD, S. D.; OXENFORD, H. A.; TAYLOR, C. **The snapper fishery of Barbados: present status and a preliminary assessment of the potential for expansion**. Proc. Gulf Carib. Fish. Inst., n. 44, p. 159–179, 1996.
- RASMUSSEN, R. S.; MORRISSEY, M. T. Application of DNA-based methods to identify fish and seafood substitution on the commercial market. **Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.**, v. 8, p.118–154, 2008.
- RASMUSSEN, R. S.; MORRISSEY, M. T.; HANNER, R. H. A multiplex PCR method for the identification of commercially important salmon and trout species (*Oncorhynchus* and *Salmo*) in North America. **Journal of food science**, v. 75, n. 7, p. C595-C606, 2010.
- RATNASINGHAM, S.; HEBERT, P. D. N. BOLD: the barcode of life datasytem ([www.barcodinglife.org](http://www.barcodinglife.org)). **Molecular Ecology Notes**, v. 7, p. 355–364, 2007.
- SCHWARTZ, F. J. *Snapper* Fishes (Family Lutjanidae) of North Carolina. **Journal of the North Carolina Academy of Science**, v. 123, n 1, p. 14–21. 2007.
- SOUZA, R. F. C. **Dinâmica Populacional do pargo, *Lutjanus purpureus* Poey, 1875 (Pisces: Lutjanidae) na Plataforma Norte do Brasil**. 2002. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Pará.
- STILES, M. L. et al. Seafood Sticker: Shock Why you may be paying too much for your fish. **Oceana**. 23 p. 2013.
- VAN LEEUWEN, S. P. J. et al. Halogenated contaminants in farmed salmon, trout, tilapia, pangasius, and shrimp. **Environmental science & technology**, v. 43, n. 11, p. 4009-4015, 2009.
- VENEZA, I. et al. A barcode for the authentication of the *snappers* (Lutjanidae) of the western Atlantic: rDNA 5S or mitochondrial COI? **Food Control**, v. 38, p. 116-123, 2014.
- WAINWRIGHT, P. C. et al. The evolution of pharyngognathy: a phylogenetic and functional appraisal of the pharyngeal jaw key innovation in Labroid fishes and beyond. **Systematic Biology**, v. 61, n. 6, p. 1001-1027, 2012.

- WARD, R. D. et al. DNA barcoding Australia's fish species. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 360, n. 1462, p. 1847-1857, 2005.
- WARD, R. D. Genetics in fisheries management. **Hydrobiologia**, v. 420, n. 1, p. 191-201, 2000.
- WARD, R. D.; HANNER, R.; HEBERT, P. D. N. The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. **Journal of Fish Biology**, v. 74, p. 329–356, 2009.
- WARNER, K. et al. Oceana Study Reveals Seafood Fraud Nationwide. **Oceana**. 23 p. 2013. 69p. 2013.
- WONG, E. H.-K.; HANNER, R. H. DNA barcoding detects market substitution in North American seafood. **Food Research International**, v. 41, n. 8, p. 828-837, 2008.
- WONG, L. L. et al. DNA *Barcoding* of Catfish: Species Authentication and Phylogenetic Assessment. **PLoS ONE**, v. 6, p. e17812, 2011.
- YANCY, H. F. et al. The potential use of DNA barcodes in regulatory science: Applications of the regulatory fish encyclopedia. **Journal of Food Protection**, v. 71, p. 210–217, 2008.
- ZHANG, J.; LIU, X. The phylogenetic relationship of the family Lutjanidae based on analyses of AFLP and mitochondrial 12S rRNA sequences. **Chinese Science Bulletin**, v. 51, n. 2, p. 143-148, 2006.

## Capítulo II

---

---

**Substituição em filés de Pargo  
(*Lutjanus purpureus* – Lutjanidae)  
detectada utilizando DNA *barcode*.**

---

---

**Substituição em filés de Pargo (*Lutjanus purpureus* – Lutjanidae) detectada utilizando DNA *barcode*.**

Ivana Veneza<sup>1</sup>, Leilane Freitas<sup>1</sup>, Sâmia Reis<sup>1</sup>, Iracilda Sampaio<sup>2</sup>, Horacio Schneider<sup>2</sup> & Grazielle Gomes<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Laboratório de Genética Aplicada, Instituto de Estudos Costeiros, Universidade Federal do Pará, Campus Universitário de Bragança.

<sup>2</sup> Laboratório de Genética e Biologia Molecular, Instituto de Estudos Costeiros, Universidade Federal do Pará, Campus Universitário de Bragança.

Alameda Leandro Ribeiro, S/N, Aldeia, Bragança-Pará- Brasil

Autor para correspondência:

Grazielle Gomes

091 3425 1593

e-mail: graziellefeg@gmail.com

Artigo a ser submetido ao periódico *Food Research International*.

## RESUMO

A indústria pesqueira, em resposta ao aumento da demanda por pescado, tem lançado produtos diversificados, como por exemplo, filés congelados. Porém, o processamento pode favorecer substituições de espécies no momento da comercialização. No caso dos lutjanídeos, onde inúmeros táxons são bastante similares, a elaboração de produtos processados agrava a problemática de identificação. Tais peixes são importantes recursos pesqueiros mundialmente, e no Brasil a espécie de maior relevância econômica é o Pargo – *Lutjanus purpureus*, que é bastante comercializado na forma de filés. Há uma série de fatores que contribuem para que a substituição do Pargo ocorra, como a semelhança morfológica com espécies próximas, e também o fato de que a rotulagem dos filés não inclui o nome científico da espécie, como ocorre em outros países, mas não no Brasil. No intuito de investigar melhor esta problemática, o presente trabalho aplicou a ferramenta de DNA *barcode* em filés comercializados no Norte do Brasil (Pará – Bragança), rotulados como “Pargo”, para determinar se de fato pertenciam à espécie *Lutjanus purpureus*. Os resultados em conjunto (árvore de Agrupamentos de Vizinhos, divergência nucleotídica e tabela de sítios polimórficos) foram concordantes em mostrar a presença de dois grupos de espécies entre as amostras avaliadas. Com o auxílio do GenBank, foi possível identificar as espécies presentes. Dos 142 filés examinados, 22% não pertenciam à espécie *Lutjanus purpureus* e sim a *Rhomboplites aurorubens*, lutjanídeo de baixo valor comercial no país. A partir desses achados, conclui-se que há a necessidade de uma maior organização de toda a cadeia comercial do Pargo, podendo esses dados subsidiar medidas regulamentares e fiscalizadoras que sejam efetivas, minimizando as práticas de substituição. A técnica molecular de identificação, empregada com êxito neste estudo para autenticação de lutjanídeos pode, inclusive, ser utilizada pelos órgãos de fiscalização no controle de qualidade de produtos derivados de peixes, de forma a garantir os direitos do consumidor.

**Palavras-chave:** filés, Pargo, substituição, DNA *barcode*, autenticação.

## 1. Introdução

O consumo global de peixes tem crescido notavelmente, dirigindo o setor pesqueiro para a oferta de produtos mais variados (FAO, 2014). A evolução tecnológica e a melhoria na logística, aliadas a alteração na preferência dos consumidores estão impulsionando a modernização da indústria pesqueira, convergindo no fornecimento de produtos inovadores, que agregam praticidade ao manuseio, uniformidade e qualidade, como pode ser observado, por exemplo nos enlatados, defumados, fatiados e filés congelados (FAO, 2014).

Durante a elaboração de produtos na indústria pesqueira, ocorre a retirada de porções corporais úteis no reconhecimento morfológico das espécies, fato este que contribui para a prática de substituição de espécies, uma vez que a distinção visual torna-se inviável (WARD, 2000). Isto se agrava quando se trata de um grupo de espécies com um vasto conjunto de caracteres morfológicos similares, como é o caso dos membros da Família Lutjanidae, os vermelhos ou *snappers*, como são conhecidos popularmente (ALLEN, 1985; CERVIGÓN et al., 1993; NELSON, 2006; MOURA; LINDEMAN, 2007). Tais peixes representam importantes recursos pesqueiros ao longo de suas áreas de ocorrência, inclusive na costa brasileira onde inúmeras espécies são alvos de captura da pesca comercial (IBAMA, 2000-2007; MPA, 2010-2013).

Dentre os lutjanídeos consumidos nacionalmente, o Pargo, como a espécie *Lutjanus purpureus* é conhecida, sempre se destacou, sendo o mais valorizado comercialmente, fato refletido nos dados oficiais de captura do país (IBAMA, 2000-2007; MPA, 2010-2013). No entanto, há indícios de que os estoques naturais da espécie estejam sobrepescados (DIAS-NETO; DORNELLES, 1996; PAIVA, 1997; SOUZA, 2002) e assim, espécies que outrora não eram tão visadas ganharam importância nas pescarias e agora representam potenciais candidatos a substituidoras do Pargo verdadeiro, principalmente quando este pescado é processado, originando os filés.

Além da semelhança típica entre esses peixes, outro aspecto ecológico contribui para a prática de substituição: diversas espécies de Lutjanidae se distribuem simpatricamente pela costa brasileira (CERVIGÓN et al., 1993; CLARO; LINDEMAN, 2008), o que torna sua captura conjunta. Há ainda uma série outros problemas, do

registro à comercialização, que tornam iminente a prática de substituição entre os peixes em questão no Brasil.

Em relação aos problemas de registro, os dados oficiais de pesca do país não são confiáveis, apresentando várias imprecisões: i) há espécies sem identificação confirmada, chamadas conjuntamente de *Lutjanus spp*; ii) o mesmo nome vernacular, por vezes, refere-se a mais de uma espécie; como deve acontecer com o pargo iii) muito provavelmente o registro da espécie *L. purpureus* inclui outras que não puderam ser distinguidas (IBAMA, 2000-2007; MPA, 2010- 2013).

Na comercialização em feiras locais, onde os peixes são vendidos frescos, nota-se que a nomenclatura popular é despadronizada, de forma que a mesma espécie possui diferentes nomes dependendo da região. Além disso, a designação “Pargo”, que deveria se referir apenas a *L. purpureus*, é utilizada para categorizar vários lutjanídeos que se assemelham. Tal espécie também pode ser processada em filés, vendidos em supermercados apenas com a designação “Pargo”, não constando no rótulo do produto o nome científico da matéria prima.

Peixes vendidos pós processamento tem apresentado altos índices de substituições de espécies comercialmente mais valorizadas por outras menos visadas. Esses problemas na rotulagem podem trazer prejuízos econômicos (FILONZI et al., 2010; CAWTHORN; STEINMAN; WITTHUHN, 2012; DI PINTO et al., 2013; CUTARELLI et al., 2014), além de riscos à saúde humana (GUALLAR et al., 2002; COHEN et al., 2009; VAN LEEUWEN et al., 2009; MARALIT et al., 2013). Ao mesmo tempo, a identificação incorreta de espécies pode comprometer o monitoramento de estoques pesqueiros, aumentando a vulnerabilidade de espécies ameaçadas (ARDURA et al., 2010; PALMEIRA et al., 2013).

A identificação inequívoca dos táxons é o requisito principal para prevenir/controlar esse tipo de atividade indevida, e abordagens moleculares forenses, utilizando o gene Citocromo Oxidase C subunidade I (COI), têm auxiliado com sucesso questões dessa natureza (HUBERT et al., 2008; FILONZI et al., 2010; HELLBERG; MORRISSEY, 2011; CAWTHORN; STEINMAN; WITTHUHN, 2012).

Apesar dos problemas presentes em toda a cadeia que envolve esse importante recurso pesqueiro que o Pargo representa no Brasil, nenhum estudo investigativo foi realizado até o presente com o intuito de verificar a autenticidade da rotulagem em filés desta espécie, o que é de suma importância para alertar as

autoridades competentes da necessidade de medidas efetivas de organização, padronização e fiscalização do setor pesqueiro, que ajam no combate a práticas de substituição e resguardem os direitos dos consumidores.

Tendo em vista que existem inúmeros relatos de fraudes para lutjanídeos (MARKO et al., 2004; LOGAN et al., 2008; JACQUET; PAULY, 2008; WONG; HANNER, 2008; HELLBERG; MORRISSEY, 2011; WARNER et al., 2013; STILES et al., 2013), e conhecendo-se a comprovada eficiência do DNA *barcode* como ferramenta de bioidentificação, aplicável na autenticação de espécies de Lutjanidae (VENEZA et al., 2014), o presente estudo, investigou se filés rotulados como “Pargo” comercializados no Norte do Brasil (Bragança – estado do Pará), pertenciam a espécie *L. purpureus*.

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Amostragem

As amostras corresponderam a filés rotulados como “Pargo”, teoricamente pertencentes a espécie *L. purpureus*, processados por um único fornecedor, e comercializados na forma de filés congelados com pele, em supermercados no Estado do Pará, Norte do Brasil.

A amostragem se deu no período de março/2013 a outubro/2014, durante o qual foram adquiridas 22 embalagens, contendo um número variável de filés, geralmente de cinco a oito unidades em cada pacote, pesando 500g ou 1 Kg, totalizando 142 amostras, pertencentes a nove lotes diferentes.

De cada peça de filé foi retirada uma amostra de tecido muscular, sendo armazenadas individualmente em tubos do tipo *ependorf*, contendo álcool 90%, e refrigeradas a -20°C. Todas as amostras receberam um código de tombo, representado por um número (referente ao pacote de origem) e uma letra (referente a peça de filé contida na embalagem). Foram consideradas apenas os produtos com embalagem original da empresa fornecedora dos filés.

### 2.2. Extração de DNA

O DNA genômico total foi obtido utilizando o Kit Wizard Genomic® (PROMEGA), seguindo instruções do fabricante. Após o isolamento, as amostras

foram misturadas a uma solução constituída de tampão *blue juice* e corante GelRed (2 $\mu$ L da mistura e 2 $\mu$ L de DNA) e submetidas à eletroforese submarina em gel de agarose (1%) durante 30 minutos/60V. Após a corrida eletroforética as amostras foram visualizadas sob luz ultravioleta para verificar a qualidade do DNA extraído.

### 2.3. Amplificação e Sequenciamento da Região Barcode

O fragmento alvo do gene COI foi amplificado por meio da técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), utilizando-se os iniciadores COIFishF2 e COIFishR2, descritos por WARD et al. (2005). A reação consistiu em 15 $\mu$ L de volume final, com a seguinte composição: 2,4  $\mu$ L de DNTP (1,25 mM); 1,5 $\mu$ L de tampão (10x); 0,6  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> (50mM); 0,6  $\mu$ L de cada iniciador (50ng/ $\mu$ L); aproximadamente 100ng de DNA total; 0,1  $\mu$ L de Taq DNA polimerase (5U/ $\mu$ L) e água purificada para completar o volume final da reação.

As condições de amplificação foram as seguintes: desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, seguida por 35 ciclos com desnaturação a 94°C durante 40 segundos, hibridização a 55°C durante 40 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto; e extensão final de 3 minutos a 72° C.

Após a PCR, as amostras positivas foram submetidas à reação de sequenciamento, utilizando o método didesoxiterminal (SANGER; NICHLEN; COULSON, 1977), com reagentes do Kit *Big Dye* (ABI *PrismTMDyeTerminatorCycleSequencing Reading Reaction – Life Technologies*). O produto precipitado foi submetido à eletroforese no sequenciador automático de capilar ABI 3500 (*Applied Biosystems*).

### 2.4. Análises de dados

Terminado o processo de geração das sequências, foi efetuado o alinhamento e a edição das mesmas, utilizando-se o programa BioEdit (HALL, 1999). Foram realizadas correções em posições das sequências em que existiam erro ou dúvidas com relação ao tipo de nucleotídeo presente.

Após a montagem do banco de sequências de filés, uma lista de haplótipos foi gerada no programa DnaSP5 (LIBRADO & ROZAS, 2009) para orientar o processo de identificação das amostras.

As sequências dos haplótipos listados foram comparadas com fragmentos *barcode* disponíveis no GenBank, utilizando-se a ferramenta BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Foram admitidas para posteriores avaliações apenas as comparações que retornassem da busca no GenBank com valores de similaridade  $\geq 99\%$ . Além disso, as sequências de COI dos filés também foram comparadas a um banco controle composto de sequências de vários lutjanídeos, incluindo *L. purpureus* e outras oito espécies potencialmente substituintes do pargo (*L. synagris*; *L. analis*; *L. jocu*; *L. buccanella*; *L. vivanus*; *L. cyanopterus*; *O. chrysurus*; *R. aurorubens*), exemplares do laboratório (em média quatro indivíduos por espécie) previamente identificados morfologicamente, com auxílio de chaves especializadas (CERVIGÓN et al., 1993).

O banco de dados foi analisado no programa MEGA 6 (TAMURA et al., 2013), onde foi construída uma árvore de Agrupamento de Vizinhos (NJ) utilizando-se o modelo evolucionário Kimura-2-Parâmetros (K2P) (KIMURA, 1980), geralmente adotado nos trabalhos de DNA *barcode* com o gene COI. A significância dos agrupamentos da árvore foi estimada pela análise de *bootstrap*, gerada a partir de 1000 pseudoréplicas. Sequências de *Conodon nobilis* (Haemulidae-Perciformes), retiradas do GenBank (Códigos de acesso: KF633261 e KF633260), foram inseridas no banco para enraizar a presente árvore.

Para avaliar a distância genética intra e interespecífica, foi gerada uma matriz de distância corrigida, utilizando-se o modelo evolutivo K2P, também por meio do programa MEGA6, onde também observou-se os sítios polimórficos, utilizados para a construção de uma tabela para demonstrar as mutações discriminatórias das espécies, a fim de corroborar o padrão de separação encontrado na árvore filogenética e observado nos valores de divergência genética.

### 3. Resultados

Foi sequenciado um fragmento de 600 pb referente a porção *barcode* do gene COI para as 142 amostras de filés. A lista de haplótipos gerada para orientar o processo de identificação, apontou a existência de dois grupos distintos. As comparações realizadas no GenBank e com o banco controle, indicaram divisão em dois haplogrupos, um formado pela maioria das sequências de filés e pelos controles

de *L. purpureus*, e alguns filés agrupando com os controles da espécie *Rhomboplites aurorubens*.

De forma compatível à listagem gerada pelo DNAsp, a árvore de Agrupamento de Vizinhos mostrou claramente a formação de dois grupos, dois clados bem suportados estatisticamente, um deles reunindo a maior parcela das amostras juntamente com sequências conhecidas da espécie *L. purpureus* (EU752118; KF633329), e o outro agrupamento formado por 22% dos filés e sequências controle de *Rhomboplites* (JQ365531; KF633264), além do grupo externo (**Figura 1**). A maioria das embalagens amostradas foi constituída por filés de *L. purpureus*, havendo dois pacotes com substituição de uma ou duas peças de filés e três com seu conteúdo completamente trocado, sendo todas as alterações distribuídas em dois diferentes lotes.

A divergência genética, calculada com base na comparação entre os grupos observados na árvore filogenética, bem como dentro destes, também confirmou a presença de duas espécies dentre os filés. A média da distância interespecífica foi de 8,7%, valor muito superior ao encontrado para a média intraespecífica, de apenas 0,3%.

Dos 600 pb sequenciados, observou-se a presença de 60 sítios variáveis, representando 10% de polimorfismo. A partir disso, gerou-se uma tabela de sítios polimórficos, onde foi possível observar a presença das mutações distintas entre as espécies (**Figura 2**), corroborando o padrão de separação observado na árvore de NJ, bem como nos valores de distância genética.

#### 4. Discussão

De acordo com os resultados, os filés comercializados como Pargo incluem, em algumas embalagens, além de *L. purpureus*, outro lutjanídeo, a espécie *R. aurorubens*. É sabido que inúmeros táxons da família Lutjanidae compartilham traços de sua morfologia (ALLEN, 1985; CERVIGÓN, 1993; MOURA; LINDEMAN, 2007) o que dificulta sua diagnose exclusivamente por caracteres anatômicos. Dentre os peixes desse grupo, vários são alvos da pesca comercial no Norte e Nordeste brasileiros, como é o caso de *L. purpureus*, *L. synagris*, *L. analis* e *Ocyurus chrysurus* (IBAMA 2000-2007; MPA 2010-2013), que são espécies com distribuição simpátrica

em grande parte do Atlântico Ocidental (CERVIGÓN, 1993) sendo portanto, provavelmente capturadas em conjunto. No entanto, o pargo verdadeiro, *L. purpureus*, é o mais apreciado pelos consumidores, possuindo maior relevância econômica e sendo o mais desembarcado, podendo ser comercializado fresco, inteiro eviscerado ou sob a forma de filés congelados. Este último produto, por motivos expressos, agrava os problemas de identificação já presentes no grupo, o que esclarece a ocorrência da substituição aqui encontrada.

Todas essas possíveis causas da substituição ficam ainda mais ilustradas quando nos achados figuram a espécie substituinte – *R. aurorubens*. Embora, esta possua características morfométricas distintas o bastante para compor um gênero monotípico: formato do olho, nadadeira caudal, número de espinhos da dorsal, listras (MOURA; LINDEMAN, 2007), em uma observação superficial, todas essas diferenças se tornam sutis comparando a exemplares de *L. purpureus*, sendo ambas as espécies facilmente confundidas em virtude de semelhanças no padrão de coloração, sobreposição de caracteres morfométricos e habitat (ALLEN, 1985; CERVIGÓN et al., 1993; MOURA; LINDEMAN, 2007). A espécie utilizada na alteração possui pequeno porte, baixo valor comercial no Brasil e é geralmente fauna acompanhante nas frotas pargueiras.

Outros trabalhos também já relataram substituições de espécies entre lutjanídeos. MARKO et al. (2004), utilizando sequências do gene Cyt b, detectaram que cerca de 80% dos peixes vendidos como *L. campechanus* em oito Estados americanos na realidade correspondiam a outras espécies da Família, todas com importância comercial inferior ao *red snapper*. WONG; HANNER (2008), utilizando DNA *barcode*, obtiveram resultados semelhantes ao identificarem frutos do mar provenientes de mercados da América do Norte. Tais autores mostraram que 25% das amostras analisadas estavam erroneamente identificadas, o que incluía substituições dentro de Lutjanidae.

A rotulagem inadequada também é algo que deve ser mencionado. As embalagens examinadas possuíam apenas a denominação popular em seus rótulos, o que camufla ainda mais esse tipo de prática irregular, especialmente no caso dos peixes em questão, visto que os nomes vernaculares variam muito com a região. Além disso, as denominações “pargo” ou “vermelho” são comumente aplicadas como uma categoria, fazendo alusão a um conjunto de lutjanídeos similares.

Nos próprios registros oficiais de pesca do Brasil ocorre que um nome popular é utilizado para várias espécies. A problemática é ainda maior quando percebe-se que nos dados de desembarque há lutjanídeos listados sem taxonomia confirmada que, por isso, são agrupados como *Lutjanus spp*, termo que se refere a pelo menos quatro diferentes nomes vernaculares (Caranha, Caranha-vermelha, Carapitanga e Vermelho) (IBAMA 2000-2007; MPA 2010-2013).

ARDURA et al. (2010) discutem sobre os transtornos causados pela falta de regulamentação dos nomes populares em espécies comercializadas na Amazônia. A partir dos marcadores moleculares 12S e COI, tais autores identificaram peixes adquiridos em mercados locais e chegaram à conclusão que o grupo vendido genericamente como “acará” engloba sete diferentes espécies, o que compromete as estimativas de exploração e a conservação de recursos pesqueiros amazônicos.

Diante de tudo, as substituições aqui reportadas podem ser atribuídas a semelhança entre *L. purpureus* e *R. aurorubens*, a sua ocorrência sobreposta e captura conjunta. Levando em consideração todos os agravantes circunstanciais – nomes comuns sem padronização, registro estatístico impreciso e forma de comercialização – os equívocos são iminentes, e desse ponto de vista superficial pode-se inferir que as substituições podem não ser intencionais. Por outro lado, isso torna-se questionável em virtude de um fato observado na presente análise: muito embora a maioria das alterações tenha sido pouco expressiva, uma ou outra peça de filé dentre o total presente no pacote, houve embalagens com o seu conteúdo integralmente substituído. Além disso, a utilização de *R. aurorubens* na troca traz incentivo financeiro ao fornecedor, já que no Brasil esta é menos valorizada que a indicada no rótulo e que todas as outras espécies do grupo que poderiam estar substituindo o Pargo. Por fim, a ausência do nome científico na rotulagem parece tentar minimizar a irregularidade, visto que, a designação “Pargo”, como já discutido, é aplicada a vários lutjanídeos, o que pode incluir eventualmente *R. aurorubens*.

Intencionais ou não, as substituições de espécies têm implicações negativas aos consumidores, gerando inclusive prejuízos financeiros. Uma rotulagem de acordo com os requisitos legais pode coibir tais transtornos. Segundo o § 6º do art. 18 inserido no Código de Defesa do Consumidor, entre os alimentos considerados impróprios para o consumo estão os alterados, falsificados, fraudados (CDC - Lei Nº 8.078 de 11/09/90). Sobre as disposições de rotulagem do *Codex Alimentarius*, o nome do

alimento deve constar, indicando sua verdadeira natureza, sendo específico e não genérico. Quando houver mais de um nome para aquele alimento, deverá ser utilizado o nome prescrito pela legislação nacional, e na ausência dessa condição, deve-se utilizar o nome comum convencionado pelo uso corrente, de forma que não induza os consumidores ao erro ou engano (FAO/WHO, 1999).

## 5. Considerações Finais

A partir do que foi encontrado na presente análise, é notável que as substituições refletem uma série de problemas vinculados à desorganização do setor, que certamente podem ser amenizados. Um requisito para prevenir todas as possíveis causas da alteração é a identificação inequívoca das espécies em questão, que não deve estar ligada somente à morfologia. Nesse caso, a ferramenta genética mostrou-se extremamente eficiente e necessária para auxiliar na discriminação correta. É possível que a substituição observada tenha sido não intencional, haja vista a similaridade morfológica entre os táxons em questão. No entanto, alguns fatores parecem apontar para uma substituição intencional, principalmente o fato de *R. aurorubens*, ser uma espécie com pouca relevância no cenário pesqueiro brasileiro. Por isso também a surpresa deste resultado, pois o que se esperava encontrar, inicialmente, seriam as espécies de Lutjanidae comercialmente importantes na região e geralmente capturadas em conjunto com o pargo, como *L. synagris* e *O. chrysurus*, o que não foi observado.

Em relação aos problemas de rotulagem, faz-se necessário que haja uma regulamentação oficial do país, tornando obrigatório o uso do nome científico na rotulagem. Atrelado a isso, as imprecisões nos registros estatísticos de pesca também merecem regulamentação.

Dessa forma, os presentes achados representam um alerta sobre esta prática indesejada, e podem subsidiar medidas regulatórias e fiscalizadoras junto aos órgãos competentes, além de apoiarem o emprego da metodologia de DNA *barcode* como um recurso a ser utilizado no controle de qualidade, prevenindo e combatendo tal prática.

## Agradecimentos

Esta pesquisa teve o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, por meio da bolsa de Mestrado de Ivana Veneza, e de auxílio de Taxa de Bancada (Grants 306233/2009-6 to IS, 306233/2009-6 to HS).

## Referências

ALLEN, G. -R. **Snappers of the world. An annotated and illustrated catalogue of Lutjanid species known to date.** Rome: FAO. 1985. 208 p.

ARDURA, A. et al. DNA barcoding for conservation and management of Amazonian commercial fish. **Biological Conservation**, v. 143, n. 6, p. 1438-1443, 2010.

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

CERVIGÓN, F. et al. **FAO species identification sheets for fishery purpose. Field Guide to the Commercial marine and Brackish-water Resources of the Northern Coast of South America.** Rome: FAO, 1993. p. 513.

CERVIGÓN, F. **Los peces marinhos de Venezuela.** 2. ed. Caracas, Venezuela: Fundacion Científica Los Roques, 1993. v. Itp. 498.

CLARO, R.; LINDEMAN, K. C. Biología y manejo de los pargos (Lutjanidae) en el Atlántico occidental. **La Habana: Instituto de Oceanología**, 2008.

CÓDIGO DE DEFESA DO CONSUMIDOR. **Lei N° 8.078 de 11/09/90.** Brasília, Diário Oficial da União, 1990. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/l8078.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l8078.htm)> Acesso em: dezembro de 2014.

COHEN, N. J. et al. Public health response to puffer fish (Tetrodotoxin) poisoning from mislabeled product. **Journal of Food Protection**, v. 72, p. 810–817, 2009.

CUTARELLI, A. et al. Italian market fish species identification and commercial frauds revealing by DNA sequencing. **Food Control**, v. 37, p. 46-50, 2014.

DI PINTO, A. et al. DNA barcoding for detecting market substitution in salted cod fillets and battered cod chunks. **Food Chemistry**, v. 141, p. 1757–1762, 2013.

DIAS NETO, J.; DORNELLES, L. D. C. Diagnóstico da pesca marítima do Brasil. **Brasília: IBAMA**, 1996.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture.** Rome, 2014.

FAO/WHO. **Food Standards Programme. Food Labelling – Complete Texts**. 1999. Disponível em: <[http://www.farmacia.ufrj.br/consumo/legislacao/n\\_cx\\_fl\\_basic%283%29.pdf](http://www.farmacia.ufrj.br/consumo/legislacao/n_cx_fl_basic%283%29.pdf)> Acesso em: dezembro de 2014.

FILONZI, L. et al. Molecular barcoding reveals mislabelling of commercial fish products in Italy. **Food Research International**, v. 43, p. 1386-1388, 2010.

GUALLAR, E. et al. Mercury, fish oils, and the risk of myocardial infarction. **The New England Journal of Medicine**, v. 347, p. 1747–1754, 2002.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic acids symposium series**, v. 41, p. 95-98, 1999).

HELLBERG, R. S.; MORRISEY, M. T. Advances in DNA-based techniques for the detection of seafood species substitution on the commercial market. **Journal of Laboratory Automation**, v. 16, p. 308–321, 2011.

HUBERT, N. et al. Identifying Canadian Freshwater Fishes through DNA Barcodes. **PLoS ONE**, v. 3, p. e2490, 2008.

IBAMA. **Estatística da pesca no Brasil: Grandes regiões e unidades da federação. 2000-2007**. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/documentos-recursos-pesqueiros/estatistica-pesqueira>>. Acesso em: dezembro de 2014.

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

KIMURA, M. A. Simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, p. 111-120, 1980.

LIBRADO, P., ROZAS, J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, p. 1451-1452, 2009.

LOGAN, C. A. et al. An impediment to consumer choice: Overfished species are sold as Pacific *red snapper*. **Biological Conservation**, v.141, p. 1591–1599, 2008.

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**, v, 33, p. 110-125, 2013.

MARKO, P. B. et al. Fisheries: mislabelling of a depleted reef fish. **Nature**, v. 430, n. 6997, p. 309-310, 2004.

MOURA, R. L.; LINDEMAN, K. C. A new species of snapper (Perciformes: Lutjanidae) from Brazil, with comments on the distribution of *Lutjanus griseus* and *L. apodus*. **Zootaxa**, v. 1422, p. 31-43, 2007.

MPA. **Boletim estatístico de pesca e aquicultura. 2010-2013**. Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br/index.php/informacoes-e-estatisticas/estatistica-da-pesca-e-aquicultura>>. Acesso em: dezembro de 2014.

NELSON, J. S. **Fishes of the World**. 4. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2006. 601 p.

PAIVA, M. P. **Recursos pesqueiros estuarinos e marinhos do Brasil**. Fortaleza: UFC Edições, 1997. 278p.

PALMEIRA, C. A. M. et al. Commercialization of a critically endangered species (large tooth sawfish, *Pristis perotteti* in fish markets of northern Brazil: authenticity by DNA analysis. **Food Control**, 2013.

SANGER, F., NICHLEN, S., COULSON, A. R. DNA Sequencing with Chain-Termination Inhibitors. **Proceeding of the National Academy of Science of the USA**, v. 74, p. 5463-5468, 1977.

SOUZA, R. F. C. **Dinâmica Populacional do pargo, *Lutjanus purpureus* Poey, 1875 (Pisces: Lutjanidae) na Plataforma Norte do Brasil**. 2002. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Pará.

STILES, M. L. et al. Seafood Sticker: Shock Why you may be paying too much for your fish. **Oceana**. 23 p. 2013.

TAMURA, K., et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular biology and evolution**, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

VAN LEEUWEN, S. P. J. et al. Halogenated contaminants in farmed salmon, trout, tilapia, pangasius, and shrimp. **Environmental science & technology**, v. 43, n. 11, p. 4009-4015, 2009.

VENEZA, I. et al. A barcode for the authentication of the *snappers* (Lutjanidae) of the western Atlantic: rDNA 5S or mitochondrial COI? **Food Control**, v. 38, p. 116-123, 2014.

WARD, R. D. et al. DNA barcoding Australia's fish species. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 360, n. 1462, p. 1847-1857, 2005.

WARD, R. D. Genetics in fisheries management. **Hydrobiologia**, v. 420, n. 1, p. 191-201, 2000.

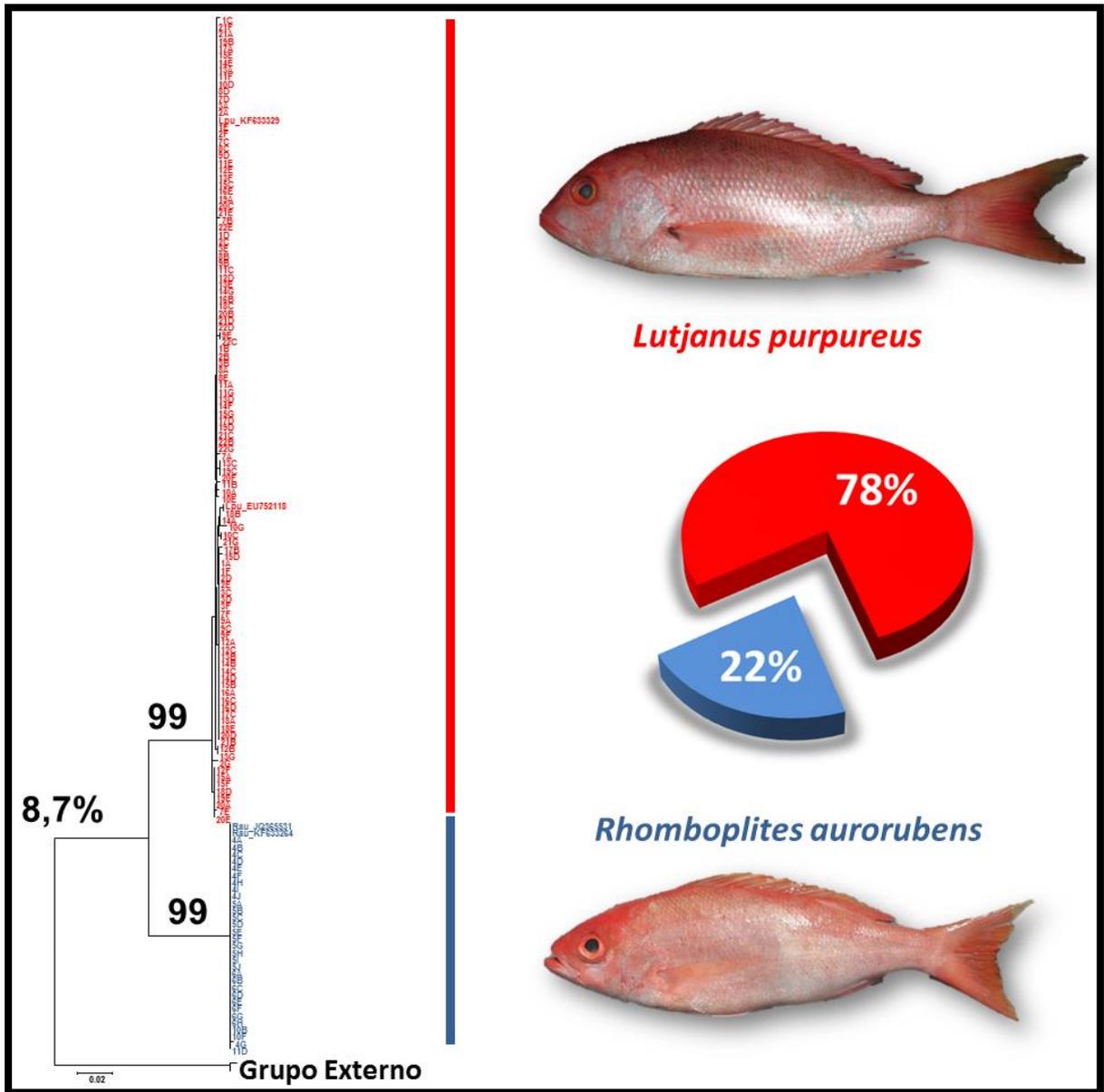
WARNER, K. et al. Oceana Study Reveals Seafood Fraud Nationwide. **Oceana**. 23 p. 2013. 69p. 2013.

WONG, E. H.-K.; HANNER, R. H. DNA barcoding detects market substitution in North American seafood. **Food Research International**, v. 41, n. 8, p. 828-837, 2008.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Árvore filogenética de Agrupamento de Vizinhos (NJ) obtida a partir de 600 pb do gene COI, mostrando dois clados, indicando a presença de duas espécies entre os filés rotulados como “Pargo”, além da divergência nucleotídica entre os clados observados (percentual de 8,7% disposto acima do nó mais externo) e a proporção de substituição presente entre as amostras (gráfico mostrado em frente à topologia).

**Figura 2.** Sítios segregantes presentes nas sequências do DNA *barcode* dos filés analisados, com a presença de mutações espécie-específicas. Lpu: *Lutjanus purpureus*; Rau: *Rhomboplites aurorubens* (sequências referência retiradas do GenBank utilizadas na identificação dos filés).



**Figura 1.** Árvore filogenética de Agrupamento de Vizinhos (NJ) obtida a partir de 600 pb do gene COI, mostrando dois clados, indicando a presença de duas espécies entre os filés rotulados como “Pargo”, além da divergência nucleotídica entre os clados observados (percentual de 8,7% disposto acima do nó mais externo) e a proporção de substituição presente entre as amostras (gráfico mostrado em frente à topologia).



## Capítulo III

---

---

# **Protocolo rápido para autenticação molecular de lutjanídeos (Lutjanidae)**

---

---

## Protocolo rápido para autenticação molecular de lutjanídeos (Lutjanidae)

Ivana Veneza<sup>1</sup>, Raimundo Silva<sup>1</sup>, Iracilda Sampaio<sup>2</sup>, Horacio Schneider<sup>2</sup> & Grazielle Gomes<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Laboratório de Genética Aplicada, Instituto de Estudos Costeiros, Universidade Federal do Pará, Campus Universitário de Bragança.

<sup>2</sup> Laboratório de Genética e Biologia Molecular, Instituto de Estudos Costeiros, Universidade Federal do Pará, Campus Universitário de Bragança.

Alameda Leandro Ribeiro, S/N, Aldeia, Bragança-Pará- Brasil

Autor para correspondência:

Grazielle Gomes

091 3425 1593

e-mail: graziellefeg@gmail.com

Artigo a ser submetido ao periódico *Food Chemistry*.

## RESUMO

Muitos casos de fraudes envolvendo produtos pesqueiros têm sido regularmente apontados, mostrando que essa prática é comum em diversos grupos de peixes, incluindo Lutjanidae. Nesse âmbito, a genética tem apoiado investigações de fraudes em alimentos à base de pescado, sendo o sequenciamento de DNA um dos principais métodos relatados. Contudo, há outras técnicas que vêm se destacando, como reações de PCR multiplex. Protocolos de autenticação para várias espécies de peixes estão disponíveis baseados neste tipo de PCR, todavia, nenhuma abordagem dessa natureza foi proposta para identificação de lutjanídeos, apesar da reconhecida relevância comercial desses peixes globalmente. Portanto, o objetivo desse trabalho foi propor um protocolo prático de autenticação, para três das principais espécies de lutjanídeos comercializadas (*Lutjanus purpureus*, *L. synagris* e *Ocyurus chrysurus*), via PCR, que provesse um padrão de bandeamento discriminante. O protocolo resultou em um bandeamento triplo para *L. purpureus*, enquanto que *L. synagris* e *O. chrysurus* apresentaram bandeamento duplo, sendo as três espécies diferenciadas. O protocolo foi validado por meio da autenticação de filés rotulados como Pargo, previamente identificados via sequenciamento de DNA. Entre os filés, além de *L. purpureus* foi detectada substituição por *Rhomboplites aurorubens*. Quando estes foram submetidos ao protocolo, o padrão de *L. purpureus* foi observado, enquanto que para *R. aurorubens*, apenas a banda controle esteve representada, como esperado. Este protocolo fornece uma alternativa rápida para investigação de substituição envolvendo as espécies em estudo, proporcionando uma ferramenta prática, de uso rotineiro para órgãos competentes, atuando no controle de qualidade e garantindo a segurança do consumo.

**Palavras-chave:** Lutjanídeos, PCR multiplex, substituição de espécies.

## 1. Introdução

A literatura científica vem reportando diversos casos de substituição de espécies em produtos alimentícios derivados de pescado, mostrando que esse tipo de fraude é recorrente em diversas regiões do mundo (CARVALHO et al., 2015; CAWTHORN; STEINMAN; WITTHUHN, 2012; FILONZI et al., 2010). Equívocos podem ser consequentes de problemas de identificação, por exemplo, de táxons com morfologia similar, ou ainda oportunizados pelas transformações que os peixes passam até se tornarem um produto processado, onde espécies tornam-se indistinguíveis em virtude da perda de caracteres diagnósticos. Além disso, grande parcela das substituições é intencional, motivada por questões financeiras, onde a espécie substituída tem maior valor comercial que a substituinte (MARKO et al., 2004; DI PINTO et al., 2013; CUTARELLI et al., 2014).

Substituições de espécies, sejam acidentais ou intencionais, podem ocasionar problemas de saúde, por exemplo, em casos envolvendo espécies com potencial alergênico (COHEN et al., 2009); podem também comprometer a eficiência de programas de conservação, em se tratando de peixes em perigo de extinção (PALMEIRA et al., 2013). Além de tudo, o consumidor é lesado por prejuízos econômicos quando adquire uma espécie com valor inferior ao da espécie pretendida, camuflada por uma rotulagem inadequada (GALAL-KHALLAF et al., 2014; ARMANI et al., 2012; WONG; HANNER, 2008).

Nessa perspectiva, com enfoque forense, a genética tem auxiliado de forma expressiva na identificação de táxons, investigando a ocorrência de substituições de espécies em produtos pesqueiros, e indubitavelmente o sequenciamento de fragmentos de DNA tem sido muito útil na busca por fraudes, por ser um método de eficácia reconhecida e que tem se popularizado com o barateamento da técnica (MARKO et al., 2004; DI PINTO et al., 2013; CARVALHO et al., 2015). No entanto, existem outros métodos que dispensam o sequenciamento e que são também bastante eficientes, além de mais práticos e mais baratos. São protocolos baseados no padrão de bandeamento espécie-específico, observado diretamente em géis concentrados (HELLBERG; MORRISSEY, 2011).

Esses padrões podem ser resultantes de uma Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional, amplificando segmentos de DNA que contenham

intrinsecamente esse padrão específico de bandejamento, como por exemplo do gene rDNA 5S (RODRIGUES-FILHO et al., 2011; SALES et al., 2011); ou resultantes de ensaios multiplex, uma ferramenta em potencial para autenticação de derivados de peixes (CASTIGLIEGO et al., 2015; ARMANI et al., 2012; CATANESE et al., 2010).

A praticidade da PCR multiplex a torna uma excelente alternativa para o uso rotineiro em indústrias pesqueiras e supermercados, bem como por órgãos fiscalizadores, controlando a qualidade e protegendo o consumo (ASENSIO, 2008; CASTIGLIEGO et al., 2015; ARMANI et al., 2012), o que é importante frente ao crescimento da demanda por alimentos de origem pesqueira e a grande diversificação assumida pela indústria alimentícia na oferta de uma variedade de produtos derivados de frutos do mar (FAO, 2014).

Espécies de Lutjanidae possuem grande expressão econômica ao longo de suas distribuições (SCHWARTZ, 2007; CERVIGÓN et al., 1993; MPA 2010-2013), e vários são os relatos de substituição de espécies para este grupo (MARKO et al., 2004; WONG; HANNER, 2008; LOGAN et al., 2008; HELLBERG; MORRISSEY, 2011; STILES et al., 2013). Além disso, a não especificidade do padrão de banda do gene ribossomal 5S para a discriminação de espécies do grupo já fora relatada por VENEZA et al. (2014).

Sendo assim, o presente trabalho objetivou desenvolver um protocolo de autenticação, baseado em PCR multiplex para identificação de três dos principais lutjanídeos capturados na costa atlântica Ocidental, especialmente no Brasil: *Lutjanus purpureus*, *Lutjanus synagris* e *Ocyurus chrysurus* (IBAMA, 2000-2007; MPA, 2010-2013).

## 2. Material e métodos

### 2.1. Amostragem

Foi utilizado um total de 101 amostras de lutjanídeos, das quais 26 foram selecionadas para a montagem de um banco de sequências de DNA de 1.130 pb do gene Citocromo Oxidase C subunidade I (COI). O conjunto das 26 amostras incluíram nove espécies da família Lutjanidae: *L. purpureus*, *L. synagris*, *L. jocu*, *L. bucanella*, *L. vivanus*, *L. cyanopterus*, *L. analis*, *O. chrysurus* e *R. aurorubens* (**Tabela 1**) (VENEZA et al., 2014).

A partir desta base de dados, foram desenvolvidos os iniciadores para *L. purpureus*, *L. synagris* e *O. chrysurus*, para a padronização de uma reação de PCR multiplex. Para os testes de verificação da especificidade dos iniciadores aqui desenvolvidos, foram utilizadas 45 amostras, sendo cinco de cada uma das nove espécies mencionadas. Na avaliação de replicabilidade do padrão de banda das espécies-alvo, 30 amostras foram usadas, sendo 10 de cada espécie a ser autenticada.

Além disso, foram utilizadas 15 amostras de filés rotulados como pargo (*L. purpureus*), comercializadas em um supermercado de Bragança – estado do Pará, norte do Brasil. Essas amostras de filés foram armazenadas em tubos do tipo *ependorf*, contendo álcool 90%, tombadas, e refrigeradas a -20°C. Estes filés foram previamente identificados via sequenciamento, e então utilizados para a validação do protocolo proposto neste estudo.

## 2.2. Isolamento, Amplificação e Sequenciamento de DNA

O DNA genômico total foi extraído com o Kit Wizard Genomic® (PROMEGA), seguindo-se instruções do fabricante. Para verificar a qualidade do DNA isolado, as amostras foram coradas com GelRed e submetidas a eletroforese em gel de agarose (1%), durante 30 minutos/60V, para então serem visualizadas num transiluminador.

Para a identificação dos filés foi usado o sequenciamento de DNA do gene COI. Para o isolamento da região genômica alvo foram empregados os iniciadores COIFishF2 e COIFishR2 (WARD et al., 2005). A reação de PCR consistiu em 15µL de volume final, com a seguinte composição: 2,4 µL de DNTP (1,25 mM); 1,5µL de tampão (10x); 0,6 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM); 0,6 µL de cada iniciador (50ng/µL); aproximadamente 100ng de DNA total; 0,1 µL de Taq DNA polimerase (5U/µL) e água purificada para completar o volume final da reação. As condições de amplificação para esta reação foram as seguintes: desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, seguida por 35 ciclos com desnaturação a 94°C durante 40 segundos, hibridização a 55°C durante 40 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto; e extensão final de 3 minutos a 72° C.

Após a PCR, as amostras positivas foram submetidas à reação de sequenciamento, utilizando-se o método didesoxiterminal (SANGER, NICHLEN, & COULSON, 1977), com reagentes do Kit *Big Dye (ABI Prism™ Dye Terminator Cycle*

*Sequencing Reading Reaction – Life Technologies*). A obtenção das sequências de DNA foi feita no sequenciador automático de capilar ABI 3500 (*Applied Biosystems*).

### 2.3. Análises Computacionais

As sequências de DNA dos filés foram editadas, alinhadas e corrigidas no BioEdit (HALL, 1999) e então adicionadas ao banco utilizado no desenho dos iniciadores de PCR multiplex desenvolvidos nesse estudo. Dessa forma um novo banco foi gerado, com tamanho de de 600 pb, equivalentes a porção *barcode* do gene COI, e consistindo do conjunto das 26 sequências geradas por VENEZA et al. (2014), além das sequências aqui obtidas para os filés.

Para a identificação dos filés amostrados, o novo banco de dados foi analisado no programa MEGA 6 (TAMURA et al., 2013), onde uma árvore filogenética de agrupamento de vizinhos (NJ) foi gerada utilizando-se o modelo evolucionário Kimura-2-Parâmetros (K2P) (KIMURA, 1980), geralmente adotado nos trabalhos de DNA *barcode* com o gene COI. A significância dos agrupamentos da árvore foi estimada pela análise de *bootstrap*, gerada a partir de 1000 pseudoréplicas. Sequências de *Conodon nobilis* (Haemulidae, Perciformes), retiradas do GenBank (Códigos de acesso: KF633261 e KF633260) foram inseridas no banco para enraizar a presente árvore.

### 2.4. Desenho da Reação de PCR multiplex

Como já mencionado, o desenvolvimento dos iniciadores para *L. purpureus*, *L. synagris* e *O. chrysurus* foi feito a partir de um banco com sequências de aproximadamente 1.1 kb de COI, contendo nove espécies de lutjanídeos. A partir da análise visual, os iniciadores diretos foram posicionados em regiões do alinhamento que exibissem o maior número de mutações espécie-específicas, de modo a gerar fragmentos de comprimentos bem distintos para cada espécie. Foram desenvolvidos dois iniciadores para cada espécie e após uma bateria de testes, os que apresentaram maior eficiência foram selecionados. A representação esquemática do posicionamento dos iniciadores aqui desenvolvidos está demonstrada na **Figura 1**.

As PCRs multiplex foram conduzidas com um volume final de 30  $\mu$ L, compostas de: 8 $\mu$ L de DNTP (1,25 mM); 2,5 $\mu$ L de tampão (10x); 1,45  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> (50mM); aproximadamente 100ng de DNA total; 0,5  $\mu$ L de Taq DNA polimerase (5U/ $\mu$ L); e água

purificada para completar o volume final da reação. Os iniciadores utilizados nessa reação estão descritos na **Tabela 2**. Note-se que o iniciador reverso foi comum às espécies estudadas. O gene rDNA 16S também foi amplificado, com a finalidade de gerar uma banda controle. As condições de amplificação adotadas foram as seguintes: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos com desnaturação a 94°C durante 1 minuto, hibridização a 64°C durante 1 minuto e extensão a 72°C por 3 minutos; e extensão final de 7 minutos a 72° C.

#### 2.5. *Especificidade, Replicabilidade e Validação do Protocolo de Autenticação*

Para avaliar a especificidade dos iniciadores, a reação foi feita para cinco amostras de cada uma das nove espécies presentes no banco utilizado para o desenvolvimento dos mesmos. De forma semelhante, para a verificação da replicabilidade, a reação foi repetida em 10 amostras de cada espécie-alvo da autenticação, para a observação de repetição do padrão específico de bandejamento.

Por fim, os filés previamente identificados por sequenciamento de DNA foram submetidos à reação multiplex, como uma forma de validação do protocolo proposto no presente estudo.

#### 2.6. *Avaliação do Padrão de Bandejamento*

A avaliação do padrão de banda foi feita após eletroforese. Corou-se 3 µL de reação com 3 µL de um tampão contendo GelRed, e então aplicou-se em gel de agarose concentrado a 2%. Para estimar o tamanho aproximado das bandas resultantes, 5 µL de uma Ladder (1kb plus) misturada a 5 µL de corante, foram adicionados à corrida. Estes géis foram submetidos à eletroforese durante 90 minutos a 60 V e em seguida observou-se o resultado num transiluminador, onde os géis foram fotodocumentados para análise visual do bandejamento.

### 3. Resultados e Discussão

Um fragmento de 600 pb da porção *barcode* do COI foi sequenciado para os filés amostrados. A comparação destas com o banco montado para o desenho dos iniciadores, revelou que entre os filés rotulados como Pargo, além da espécie *L. purpureus*, também havia *R. aurorubens*, como mostrou a árvore filogenética estimada

para o banco (**Figura 2**). Substituições desse tipo têm sido relatadas amplamente na literatura para vários grupos de peixes (CLINE, 2012; DI PINTO et al., 2013; GALAL-KALLAF et al., 2014; CARVALHO et al., 2015), inclusive entre lutjanídeos (MARKO et al., 2004; WONG; HANNER, 2008).

Passado o desenvolvimento dos iniciadores de PCR multiplex para as espécies *L. purpureus*, *L. synagris* e *O. chrysurus*, se seguiu a fase de testes. A avaliação de especificidade mostrou que, dentro das condições descritas para a reação, os três iniciadores não amplificaram para as demais seis espécies incluídas no banco para o desenvolvimento destes, apenas funcionando a banda referente ao fragmento do rDNA16S, adotada como controle (**Figura 3**).

Os iniciadores COILpu280 e COIOch430 foram específicos para *L. purpureus* e *O. chrysurus*, respectivamente, enquanto COILsy920, além de amplificar para a espécie que foi designado (*L. synagris*), funcionou também para *L. purpureus*. Este fato não ocasionou nenhum problema para autenticação das espécies-alvo do estudo, visto que há um padrão de bandeamento inequívoco para cada uma delas. Para todas as espécies a banda controle (rDNA 16S) foi evidente (~650 pb), sendo que além desta, para *O. chrysurus* observa-se a sua banda específica (~850 pb); *L. synagris* também mostrou bandeamento duplo, porém a banda específica (~300 pb) diferencia estes dois padrões; e para *L. purpureus*, há bandeamento triplo: além da banda controle, e da específica (~1.000 pb), a banda idêntica a de *L. synagris* também é visível, como mostra a **Figura 3**.

A verificação de replicabilidade mostrou haver uma repetição do padrão gerado para cada espécie-alvo, o que está representado na **Figura 4**. Em relação à validação do protocolo proposto, para os filés previamente identificados como *L. purpureus*, quando submetidos a autenticação pelo protocolo aqui desenvolvido, o padrão típico de bandeamento triplo para esta espécie foi observado, enquanto que para os filés oriundos de *R. aurorubens*, apenas a banda controle de 16S foi amplificada, como esperado (**Figura 5**). Dessa forma, exclui-se a possibilidade de substituição pelas outras duas espécies autenticadas. Como *L. purpureus*, *L. synagris* e *O. chrysurus* são as mais amplamente capturadas no Brasil (MPA 2010-2013), infere-se que ou a substituição se dá por espécies de outras Famílias, ou por espécies menos valorizadas do grupo, como é o caso, uma vez que *R. aurorubens* é pouco

mencionado nas estatísticas de desembarque oficiais do país (IBAMA 2000-2007; MPA 2010-2013).

Já se encontram disponíveis diversos protocolos baseados em PCR multiplex para autenticação de pescado, como para espécies de *Lophius* (CASTIGLIEGO et al., 2015) e de salmão e truta (RASMUSSEN; MORRISSEY; HANNER, 2010). Além destes, são relatados protocolos similares para pratos preparados com espécies de *Scomber* (CATANESE et al., 2010); *Sardina pilchardus*, *Aphia minuta* e *Engraulis encrasicolus* (ARMANI et al., 2012); e *Epinephelus marginatus* (ASENSIO, 2008). Entretanto, para espécies de Lutjanidae é a primeira vez que um protocolo de autenticação baseado em padrão de bandeamento é proposto, o que se faz importante frente a já mencionada ocorrência regular de fraudes para esse grupo (MARKO et al., 2004; WONG; HANNER et al., 2008; STILES et al., 2013), e relevância econômica deste em várias partes do mundo (SCHWARTZ, 2007; CERVIGÓN et al., 1993; MPA 2010-2013).

#### 4. Conclusão

O presente trabalho desenvolveu um protocolo de autenticação molecular baseado em PCR multiplex, pioneiro, para três espécies de importância comercial da família Lutjanidae (*L. purpureus*, *L. synagris* e *O. chrysurus*). Esta pode ser uma ferramenta bastante útil no combate à substituição nesse importante grupo de peixes marinhos, proporcionando uma metodologia para identificação rápida, prática, eficiente e barata em relação a outras abordagens.

Essa simplicidade representa uma característica a ser considerada para uso na rotina de supermercados, indústrias processadoras e agentes fiscalizadores, auxiliando o controle de qualidade, prevenindo fraudes e protegendo os direitos do consumidor.

#### Agradecimentos

Esta pesquisa teve o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, por meio da bolsa de Mestrado de Ivana Veneza, e de auxílio de Taxa de Bancada (Grants 306233/2009-6 to IS, 306233/2009-6 to HS).

## Referências

- 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**, v. 133, n. 1, p. 184-192, 2012.
- ASENSIO, L. Application of multiplex PCR for the identification of grouper meals in the restaurant industry. **Food Control**, v. 19, n. 11, p. 1096-1099, 2008.
- 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.
- CASTIGLIEGO, L. et al. Two alternative multiplex PCRs for the identification of the seven species of anglerfish (*Lophius spp.*) using an end-point or a melting curve analysis real-time protocol. **Food Chemistry**, v. 166, p. 1–9, 2015.
- CAWTHORN, D. M.; STEINMAN, H. A.; WITTHUHN, R. C. DNA barcoding reveals a high incidence of fish species misrepresentation and substitution on the South African Market. **Food Research International**, v. 46, p. 30–40, 2012.
- CERVIGÓN, F. et al. **FAO species identification sheets for fishery purpose. Field Guide to the Commercial marine and Brackish-water Resources of the Northern Coast of South America**. Rome: FAO, 1993. p. 513.
- CATANESE, G. et al. A multiplex-PCR assay for the authentication of mackerels of the genus *Scomber* in processed fish products. **Food Chemistry**, v. 122, p. 319–326, 2010.
- CLINE, E. Marketplace substitution of Atlantic salmon for Pacific salmon in Washington State detected by DNA barcoding. **Food Research International**, v. 45, p. 388–393, 2012.
- COHEN, N. J. et al. Public health response to puffer fish (Tetrodotoxin) poisoning from mislabeled product. **Journal of Food Protection**, v. 72, p. 810–817, 2009.
- CUTARELLI, A. et al. Italian market fish species identification and commercial frauds revealing by DNA sequencing. **Food Control**, v. 37, p. 46-50, 2014.
- DI PINTO, A. et al. DNA barcoding for detecting market substitution in salted cod fillets and battered cod chunks. **Food Chemistry**, v. 141, p. 1757–1762, 2013.
- FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture**. Rome, 2014.
- FILONZI, L. et al. Molecular barcoding reveals mislabelling of commercial fish products in Italy. **Food Research International**, v. 43, p. 1386-1388, 2010.
- GALAL-KHALLAF, A. et al. DNA barcoding reveals a high level of mislabeling in Egyptian fish fillets. **Food Control**, v. 46, p. 441-445, 2014.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic acids symposium series**, v. 41, p. 95-98, 1999).

HELLBERG, R. S.; MORRISEY, M. T. Advances in DNA-based techniques for the detection of seafood species substitution on the commercial market. **Journal of Laboratory Automation**, v. 16, p. 308–321, 2011.

IBAMA. **Estatística da pesca no Brasil: Grandes regiões e unidades da federação. 2000-2007**. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/documentos-recursos-pesqueiros/estatistica-pesqueira>>. Acesso em: dezembro de 2014.

KIMURA, M. A. Simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, p. 111-120, 1980.

LOGAN, C. A. et al. An impediment to consumer choice: Overfished species are sold as Pacific *red snapper*. **Biological Conservation**, v.141, p. 1591–1599, 2008.

MARKO, P. B. et al. Fisheries: mislabelling of a depleted reef fish. **Nature**, v. 430, n. 6997, p. 309-310, 2004.

MPA. **Boletim estatístico de pesca e aquicultura. 2010-2013**. Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br/index.php/informacoes-e-estatisticas/estatistica-da-pesca-e-aquicultura>>. Acesso em: dezembro de 2014.

PALMEIRA, C. A. M. et al. Commercialization of a critically endangered species (large tooth sawfish, *Pristis perotteti* in fish markets of northern Brazil: authenticity by DNA analysis. **Food Control**, 2013.

PALUMBI, S. R. et al. **The Simple Fool's Guide to PCR**, Honolulu: Dept. Zoology, 1991, v. 2, 46 p.

PALUMBI, S., BENZIE, J. Large mitochondrial DNA differences between morphologically similar Penaeid shrimp. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, v. 1, p. 27-34, 1991.

RASMUSSEN, R. S.; MORRISSEY, M. T.; HANNER, R. H. A multiplex PCR method for the identification of commercially important salmon and trout species (*Oncorhynchus* and *Salmo*) in North America. **Journal of food science**, v. 75, n. 7, p. C595-C606, 2010.

RODRIGUES-FILHO, L. F. S. et al. Polymerase chain reaction banding patterns of the 5S rDNA gene as a diagnostic tool for the discrimination of South American mullets of the genus *Mugil*. **Aquaculture Research**, v. 42, p. 1117-1122, 2011.

SALES, J. B. L. et al. Molecular differentiation of the species of two squid families (Loliginidae and Ommastrephidae) based on a PCR study of the 5S rDNA gene. **Food Control**, v. 22, p. 96-98, 2011.

SANGER, F.; NICHLEN, S.; COULSON, A. R. DNA Sequencing with Chain-Termination Inhibitors. **Proceeding of the National Academy of Science of the USA**, v. 74, p. 5463-5468, 1977.

SCHWARTZ, F. J. *Snapper* Fishes (Family Lutjanidae) of North Carolina. **Journal of the North Carolina Academy of Science**, v. 123, n 1, p. 14–21. 2007.

STILES, M. L. et al. Seafood Sticker: Shock Why you may be paying too much for your fish. **Oceana**. 23 p. 2013.

TAMURA, K., et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular biology and evolution**, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

VENEZA, I. et al. A barcode for the authentication of the *snappers* (Lutjanidae) of the western Atlantic: rDNA 5S or mitochondrial COI? **Food Control**, v. 38, p. 116-123, 2014.

WARD, R. D. et al. DNA barcoding Australia's fish species. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 360, n. 1462, p. 1847-1857, 2005.

WONG, E. H.-K.; HANNER, R. H. DNA barcoding detects market substitution in North American seafood. **Food Research International**, v. 41, n. 8, p. 828-837, 2008.

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

**Figura 1.** Esquema do gene COI, mostrando o posicionamento dos iniciadores diretos desenvolvidos neste estudo, e o tamanho estimado dos fragmentos amplificados para cada um deles. A reta em cinza representa o fragmento utilizado para o desenho dos iniciadores. (Lpu=*L. purpureus*; Och=*O. chrysurus*; Lsy=*L. synagris*). \*Este é o tamanho do fragmento após a edição, produzido por VENEZA et al. (2014).

**Figura 2.** Árvore NJ construída a partir do fragmento *barcode* (600 pb), mostrando a identificação dos filés sequenciados para posterior validação do protocolo proposto. Cada cor representa uma espécie distinta do grupo. Os números acima dos nós medem a confiança dos agrupamentos. Os filés estão destacados em negrito. (Lpu = *L. purpureus*; Lvi = *L. vivanus*; Rau = *R. aurorubens*; Och = *O. chrysurus*; Lsy=*L. synagris*; Lbu=*L. buccanella*; Lan=*L. analis*; Lcy=*L. cyanopterus*; Ljo=*L. jocu*; Cno=*C. nobilis*=grupo externo).

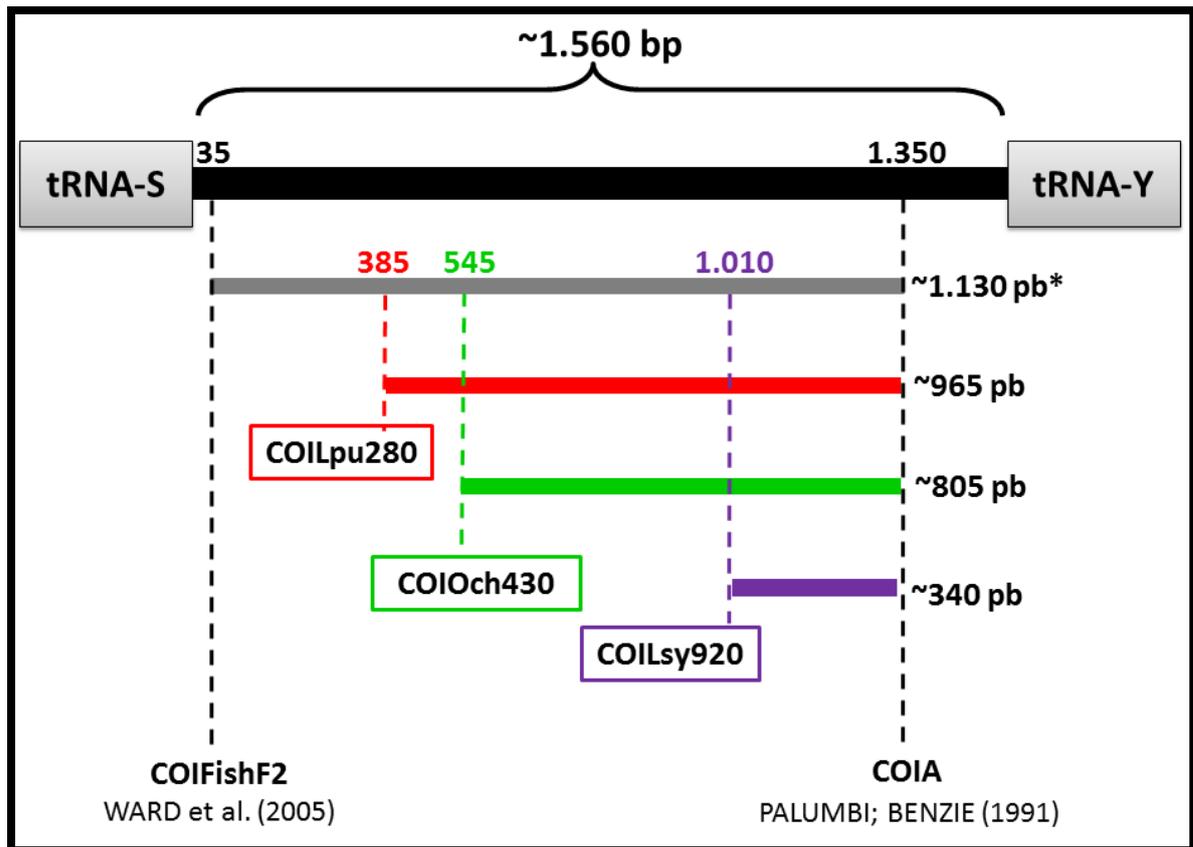
**Figura 3.** Padrão de bandeamento específico resultante da reação multiplex: *L. purpureus* com três bandas (~1.000/~650/~300); Bandeamento duplo para *L. synagris* (~650/~300) e *O. chrysurus* (~850/~650). Para as demais espécies incluídas, apenas a banda controle do rDNA 16 S é visível (~650). (Lpu = *L. purpureus*; Lvi = *L. vivanus*; Rau = *R. aurorubens*; Och = *O. chrysurus*; Lsy=*L. synagris*; Lbu=*L. buccanella*; Lan=*L. analis*; Lcy=*L. cyanopterus*; Ljo=*L. jocu*; L=Ladder).

**Figura 4.** Replicabilidade do padrão de bandeamento para as espécies autenticadas. **A.** *L. purpureus*, com bandeamento triplo: (~1.000/~650/~300); Padrão de banda dupla para **B.** *L. sinagrys* (~650/~300) e; **C.** *O. chrysurus* (~850/~650). (Lpu = *L. purpureus*; Och = *O. chrysurus*; Lsy=*L. synagris*; L=Ladder).

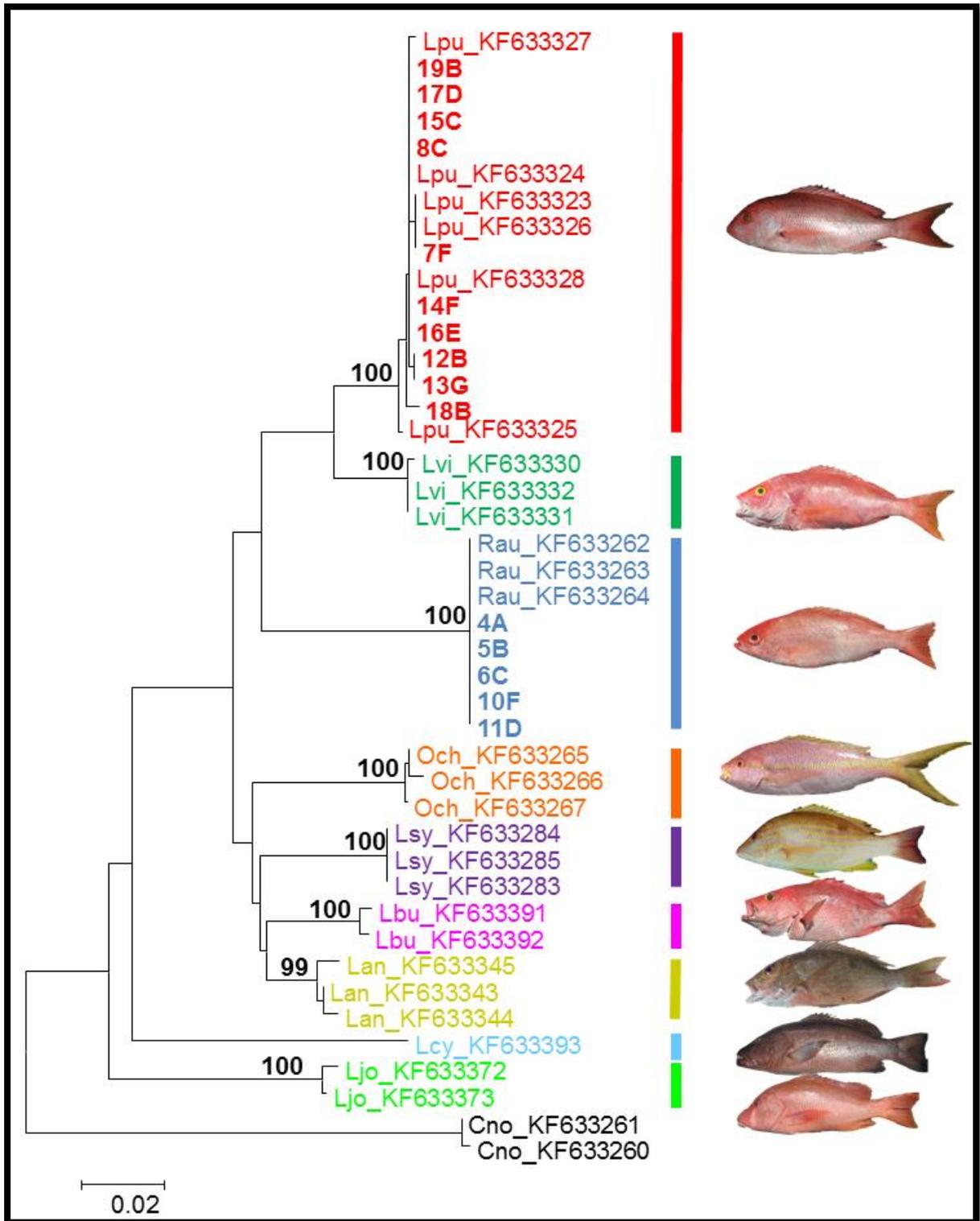
**Figura 5.** O resultado da reação multiplex revelou o padrão designado para *L. purpureus*, com três bandas (~1.000/~650/~300) para os filés que de fato eram de Pargo, e para os filés substituídos, de *R. aurorubens*, houve amplificação apenas da banda controle (~650). (L=Ladder).

**Tabela 1.** Amostragem utilizada no desenho dos iniciadores para autenticação de *L. purpureus*, *L. synagris* e *R. aurorubens*.

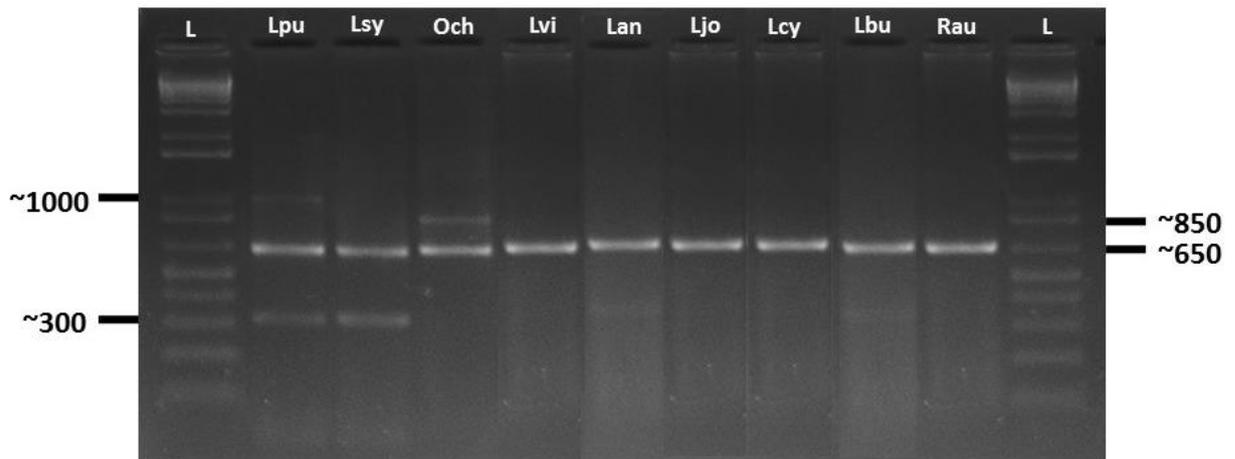
**Tabela 2.** Primers utilizados na reação multiplex e suas características.



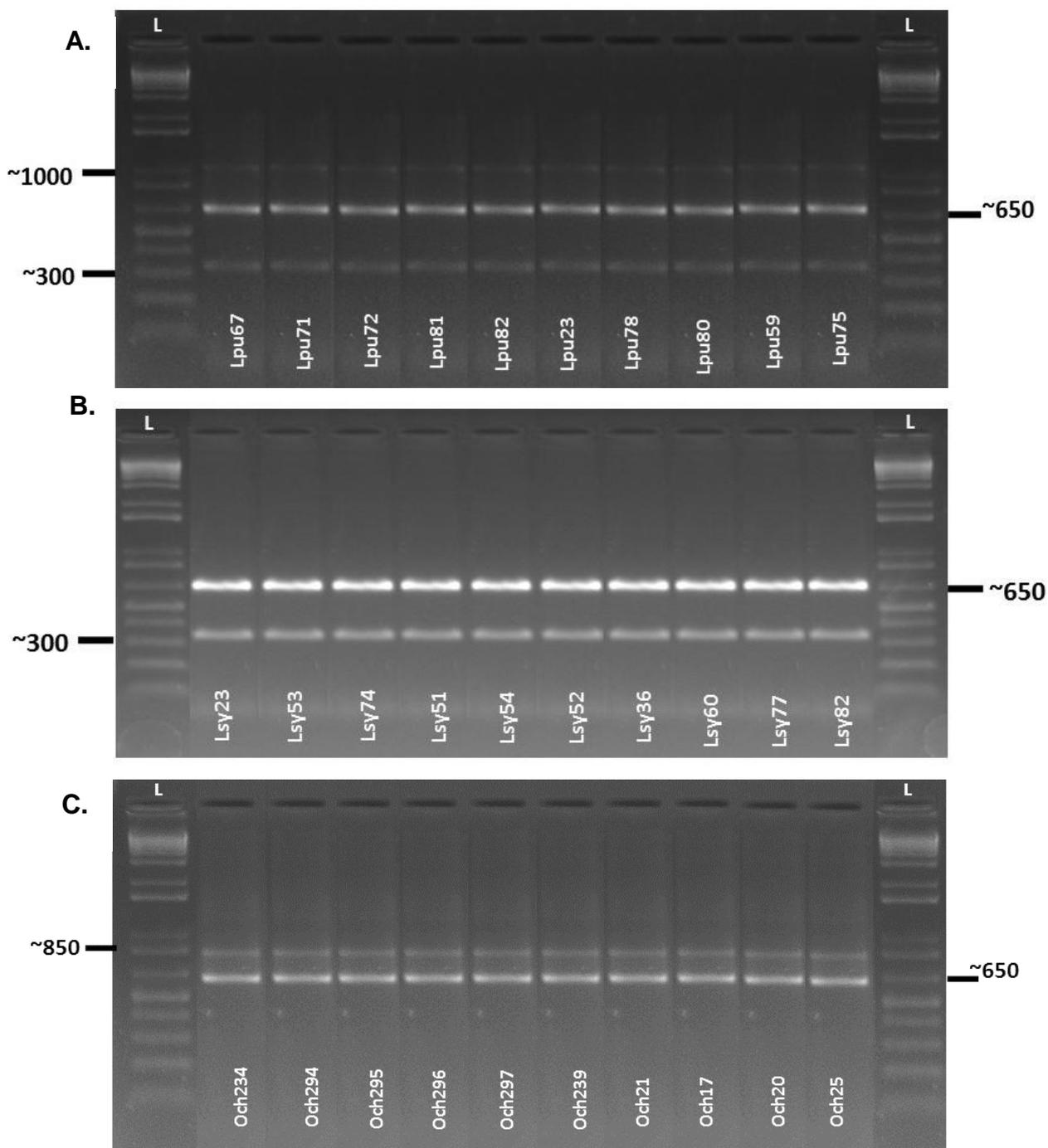
**Figura 1.** Esquema do gene COI, mostrando o posicionamento dos iniciadores diretos desenvolvidos neste estudo, e o tamanho estimado dos fragmentos amplificados para cada um deles. A reta em cinza representa o fragmento utilizado para o desenho dos iniciadores. (Lpu=*L. purpureus*; Och=*O. chrysurus*; Lsy=*L. synagris*). \*Este é o tamanho do fragmento após a edição, produzido por VENEZA et al. (2014).



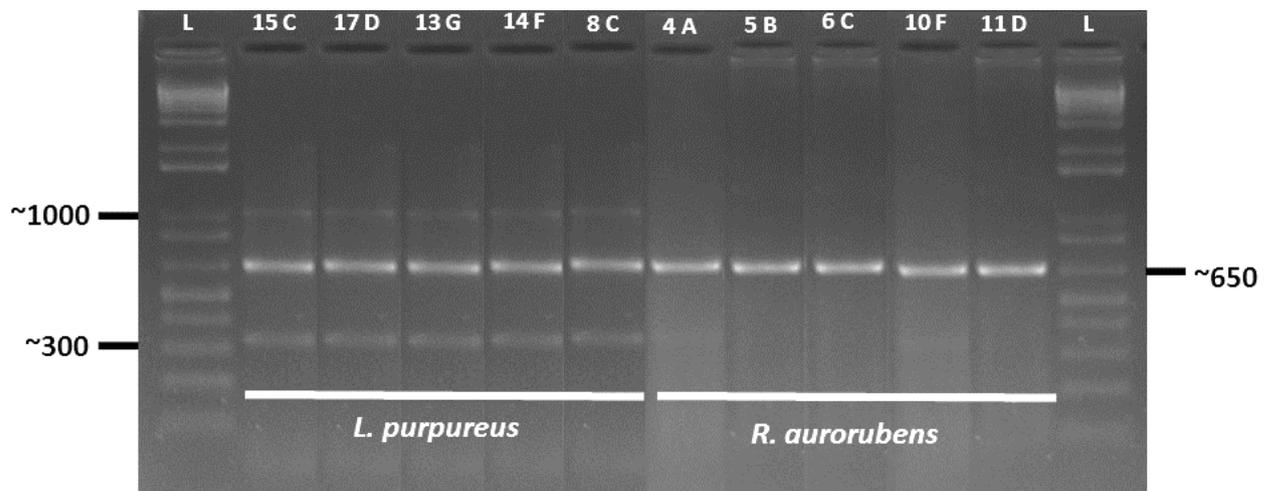
**Figura 2.** Árvore NJ construída a partir do fragmento *barcode* (600 pb), mostrando a identificação dos filés sequenciados para posterior validação do protocolo proposto. Cada cor representa uma espécie distinta do grupo. Os números acima dos nós medem a confiança dos agrupamentos. Os filés estão destacados em negrito. (Lpu = *L. purpureus*; Lvi = *L. vivanus*; Rau = *R. aurorubens*; Och = *O. chrysurus*; Lsy = *L. synagris*; Lbu = *L. buccanella*; Lan = *L. analis*; Lcy = *L. cyanopterus*; Ljo = *L. jocu*; Cno = *C. nobilis* = grupo externo).



**Figura 3.** Padrão de bandejamento específico resultante da reação multiplex: *L. purpureus* com três bandas (~1.000/~650/~300); Bandejamento duplo para *L. synagris* (~650/~300) e *O. chrysurus* (~850/~650). Para as demais espécies incluídas, apenas a banda controle do rDNA 16 S é visível (~650). (Lpu = *L. purpureus*; Lvi = *L. vivanus*; Rau = *R. aurorubens*; Och = *O. chrysurus*; Lsy = *L. synagris*; Lbu = *L. buccanella*; Lan = *L. analis*; Lcy = *L. cyanopterus*; Ljo = *L. jocu*; L = Ladder).



**Figura 4.** Replicabilidade do padrão de bandejamento para as espécies autenticadas. **A.** *L. purpureus*, com bandejamento triplo: (~1.000/~650/~300); Padrão de banda dupla para **B.** *L. sinagrys* (~650/~300) e; **C.** *O. chrysurus* (~850/~650). (Lpu = *L. purpureus*; Och = *O. chrysurus*; Lsy=*L. sinagrys*; L=Ladder).



**Figura 5.** O resultado da reação multiplex revelou o padrão designado para *L. purpureus*, com três bandas (~1.000/~650/~300) para os filés que de fato eram de Pargo, e para os filés substituídos, de *R. aurorubens*, houve amplificação apenas da banda controle (~650). (L=Ladder).

**Tabela 1.** Amostragem utilizada no desenho dos iniciadores para autenticação de *L. purpureus*, *L. synagris* e *R. aurorubens*.

<b>Espécies</b>	<b>Nº de Amostras</b>	<b>Códigos de acesso</b>
<i>L. purpureus</i>	6	KF633328; KF633327; KF633326; KF633325; KF633324; KF633323.
<i>L. synagris</i>	3	KF633285; KF633284; KF633283
<i>L. vivanus</i>	3	KF633332; KF633331; KF633330
<i>L. buccanella</i>	2	KF633392; KF633391
<i>L. analis</i>	3	KF633344; KF633343; KF633345
<i>L. jocu</i>	2	KF633373; KF633372
<i>L. cyanopterus</i>	1	KF633393
<i>O. chrysurus</i>	3	KF633393; KF633266; KF633265
<i>R. aurorubens</i>	3	KF633264; KF633263; KF633262
<b>Total</b>	<b>26</b>	

**Tabela 2.** Iniciadores utilizados na reação multiplex e suas características.

<b>Iniciador</b>	<b>Sequência</b>	<b>Volume (µL)</b>	<b>Concentração (ng/µL)</b>
COILpu280	5' - GGACAGTCTACCCGCCCTAGCAGGC - 3'	1	
COIOch430	5' - GTATCAAACGCCCTATTCGTC - 3'	1,5	
COILsy920	5' - TATCTCCCAATACCAAACACCCCTG - 3'	1	50
COIA <sup>1</sup>	5'- AGTATAAGCGTCTGGGTAGTC - 3'	1	
16SL1987 <sup>2</sup>	5' – GCCTCGCCTGTTTACCAAAAAC -3'	0,5	
16SH2609 <sup>2</sup>	5'- CCGGTCTGAACTCAGATCACGT - 3'	0,5	

<sup>1</sup> Iniciador reverso comum às espécies alvo do presente estudo (PALUMBI; BENZIE, 1991); <sup>2</sup> Iniciadores para amplificação da banda controle (PALUMBI et al., 1991).

---

---

# CONSIDERAÇÕES FINAIS

---

---

Nesta seção estão apresentadas as principais conclusões do documento, exprimindo as contribuições geradas pela dissertação.

A partir da autenticação de filés de Pargo, detectou-se substituição de espécies, o que está ligado a diversos fatores intrínsecos à Família de peixes a qual pertence *L. purpureus*, mas que são favorecidos por problemas em toda a cadeia comercial do pescado no Brasil, a exemplo do Pargo. Tal achado denuncia a desorganização do setor e aponta para um maior comprometimento com a qualidade dos produtos oferecidos pela indústria pesqueira, além subsidiar medidas incisivas de controle de práticas ilícitas como essas, instigando órgãos competentes a atentarem para necessidade de maior regulamentação e fiscalização, no sentido de fazer valer os direitos dos consumidores.

Com a proposição do protocolo rápido de autenticação para lutjanídeos, as indústrias e supermercados que produzem e distribuem derivados desses peixes, têm a possibilidade de assegurar a autenticidade de seus rótulos, uma vez que podem confirmar a identificação do que oferecem, eliminando qualquer risco de trocas entre espécies, o que agora passa a ser algo mais viável economicamente, eficiente e prático, aplicável na rotina de controle de qualidade. Essa é uma ferramenta que também pode ser útil para órgãos fiscalizadores na busca e prevenção de fraudes envolvendo as espécies estudadas, já que é comum haver substituição dentro de Lutjanidae.