

# IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES DE PEIXES COMERCIALIZADAS EM MERCADO POPULAR DE BELO HORIZONTE

Adão Jr. Viana de Paula<sup>1</sup>  
Greicielly Barbosa Santos<sup>2</sup>  
Daniela Veiga Costa<sup>3</sup>  
Lívia das Graças Amaral Avelar<sup>4</sup>  
Antônio Augusto Fonseca Jr.<sup>5</sup>

**Resumo:** A técnica de DNA barcoding é uma importante ferramenta que auxilia a identificação de gêneros e espécies em nível molecular, baseada em genes ribossomais e mitocondriais. A metodologia pode ser importante na análise de peixes comercializados que podem apresentar classificação morfológica incorreta ou ocorrer substituição por fraude. O presente trabalho teve como objetivo analisar e verificar a correta identificação de peixes vendidos no comércio de Belo Horizonte. Os peixes foram adquiridos em mercado popular de Belo Horizonte e devidamente identificados de acordo com o comerciante. Foi realizada a extração de DNA de cada amostra e utilizou-se o método de PCR para a amplificação do gene da subunidade I da enzima citocromo c oxidase (COI), localizado no DNA mitocondrial. Este gene tem várias vantagens, como os iniciadores universais que são fortes, restauráveis, ou seja, são bem estabelecidos em múltiplos filós de animais e também apresenta uma vasta variação de sinal filogenético. O sequenciamento de cada amostra foi realizado pelo método de Sanger, alinhado e analisado junto ao programa de bioinformática BLAST, comparando sequências depositadas nos bancos de dados GenBank e BOLD (*Barcode of Life Data Systems*). Foram realizadas análises filogenéticas, o que possibilitou a determinação do gênero e espécie das amostras em análise. A metodologia foi eficaz, apresentando algumas adaptações. Ao final dos resultados, não houve a detecção da substituição do peixe vendido no mercado de Belo Horizonte, sendo assim, não houve fraude.

**Palavras-Chave:** Peixes. DNA barcoding. Identificação incorreta.

**Abstract:** The DNA barcoding technique is an important tool that helps the identification of gender and species at the molecular level, based on ribosomal and mitochondrial genes. The method might be useful in the analysis of commercialized fish that may present incorrect morphological classification or even substitution for fraud. The present work sought to analyze and verify the correct identification of fish sold in the markets of Belo Horizonte city. The fish were purchased in popular market of Belo Horizonte and properly identified according to the seller. DNA extraction from each sample was performed and the PCR method was used for the amplification of the cytochrome c oxidase subunit I gene (COI) located in the mitochondrial DNA. This gene has several advantages, such as universal primers that are strong, restorable, well established in multiple phyla of animals and also exhibits a wide variation of phylogenetic signal. The sequencing of each sample was performed by the Sanger method, aligned and analyzed with the BLAST bioinformatics program, comparing sequences deposited in the GenBank and BOLD (*Barcode of Life Data*

Systems) databases. Phylogenetic analyzes were performed, which allowed the determination of the gender and species of the samples under analysis. The method was effective, with some adaptations. The results detected no replacement of the fish sold in the market of Belo Horizonte, thus, it was concluded that there was no fraud.

**Key Words:** Fish. DNA barcoding. Incorrect identification.

## INTRODUÇÃO

A venda de pescado faz parte do grupo de atividades importantes para a alimentação no Brasil. Apesar de o país ser conhecido pela pecuária, a pesca é suficientemente relevante para ter seu próprio ministério criado com a intenção de desenvolver ainda mais a produção do país. O processo, desde a captura dos peixes até a aquisição por parte do consumidor, é longo e com possibilidade de interferência de muitos intermediários. Durante essas etapas, existe o risco de substituição de espécies se não ocorrer a devida fiscalização.

A substituição das espécies de peixes comercializadas pode ocorrer por fraude ou simplesmente por erro de identificação do espécime, o que pode impactar em diversas áreas desde a venda incorreta e por preços divergentes para o consumidor até a ameaça a espécies já ameaçadas (Rasmussen e Morrisey, 2008). Agências regulatórias foram criadas nos Estados Unidos e Europa para estabelecer marcos regulatórios para a pesca e a correta identificação (Martinez *et al.*, 2005).

Os cardumes estão diminuindo dramaticamente, a despeito de esforços para a produção em cativeiro, e parte do motivo é a pesca predatória visando ao comércio nacional ou internacional (Pauly *et al.*, 2002). A comercialização de espécies ameaçadas é, portanto, outro problema importante na indústria pesqueira.

Os métodos moleculares são uma tecnologia eficiente para a correta identificação de espécies animais. Técnicas como cromatografia líquida de alta eficiência, focalização isoeletrica e eletroforese em gel de poliacrilamida já foram utilizadas para tal fim (Rasmussen *et al.*, 2008), no entanto a utilização do DNA tem vantagens como estabilidade da molécula alvo, uso em diferentes estágios da vida do animal (ovos, larvas e adultos) ou em produtos já processados como filés (Carvalho *et al.*, 2011).

A identificação molecular pela técnica de DNA *barcoding* é uma importante ferramenta de apoio à sistemática. Hebert *et al.* (2003) propuseram, então, uma única sequência genética capaz de diferenciar em sua totalidade ou a maioria das espécies animais. Essa técnica baseia-se na sequência do gene COI, este localizado no

DNA mitocondrial. A sequência genética foi então comparada ao sistema de código de barras. A identificação por *barcode* utilizando a sequência do COI é capaz de fornecer a distribuição da divergência genética das espécies (Pereira *et al.*, 2013).

A técnica molecular de análise de DNA mitocondrial (mtDNA) já foi utilizada no Brasil para identificação de surubim vendido em Belo Horizonte (*Pseudoplatystoma corruscan e Pseudoplatystoma reticulatum*) (Carvalho *et al.*, 2011). Os resultados indicaram que a identificação incorreta do pescado ocorre em baixos índices quando o próprio peixe é vendido, no entanto, até 58% dos filés comercializados estavam incorretamente identificados.

## METODOLOGIA

A metodologia se baseia no uso da técnica de PCR para amplificar o gene da subunidade I da enzima citocromo c oxidase (COI) seguida de sequenciamento de comparação com sequências de referência (Espineira *et al.*, 2008). As análises das seqüências, obtidas ao fim dos testes *in vitro*, são realizadas por bioinformática com inserção dos dados em programas que os compararão com bancos de dados. Dentre as fontes de referência estão o GenBank, banco de dados público e voltado para diversos fins mantido pelo governo dos Estados Unidos, e o *Barcode of Life Data Systems* (BOLD), produto de um esforço global para sequenciar o COI de diversas espécies para criar uma ferramenta de referência para estudos de identificação (Ward *et al.*, 2009).

As amostras foram adquiridas no mercado popular de Belo Horizonte (Tabela 1). Foram comprados filés de Surubim (*Pseudoplatystoma sp.*), Tilápia (*Oreochromis sp.*), Salmão (*Salmo salar*), Merluza (*Merluccius sp.*), Congrio rosa (*Genypterus sp.*), Linguado (*Paralichthys sp.*), Sardinha (*Sardinella sp.*), Cação (*Carcharhinus sp.*), *Squalus sp.*, *Squatina sp.*, *Prionace glauca*, *Negaprion brevirostris*, *Galeocerdo curvier*, *Isogomphodon oxyrinchus*, Panga (*Pangasianodon sp.*) e Pescada (*Cynoscion sp.*, *Lonchurus lanceolatus*, *Macrodon ancylodon*, *Nebrius micros*, *Odontoscion dentex*, *Isopisthus parvipinnis*, *Ophioscion audustus*) de cada estabelecimento relacionado com a venda de pescado. Todas as amostras foram

devidamente identificadas e separadas segundo o vendedor de cada estabelecimento.

O DNA das amostras foi extraído pelo kit *DNeasy Blood and Tissue* conforme orientação do fabricante e estocado a -20°C até o momento do uso. A amplificação pelo método de PCR do gene COI ocorreu de acordo com Ward *et al.* (2005), seguida de purificação dos produtos para sequenciamento pelo método de Sanger no equipamento 3500 (Life Technologies, Estados Unidos). As sequências foram editadas no programa BioEdit (Hall *et al.*, 1999).

Os resultados foram analisados a partir do Blast (NCBI) para comparação de sequências do GenBank e pelo BOLD (<http://www.boldsystems.com>). Após análise e alinhamento das sequências de referência, foram realizadas análises filogenéticas a partir de árvores geradas pelo programa MEGA 6.0, pelo método de máxima verossimilhança (MaximumLikelihood) e corrigidas pelo modelo de Hasegawa-Kishino-Yano com 1000 réplicas de Bootstrap (Tamura *et al.*, 2013).

**Tabela 1 - Tabela de identificação - Apresenta o número de amostras coletadas e os nomes populares que estes peixes recebem no mercado. As amostras foram marcadas com (\*), os iniciadores utilizados no trabalho não amplificaram o DNA dessas amostras.**

Nº da amostra	Nome popular no mercado	Nº da amostra	Nome popular no mercado
01	Salmão rosa	09	Cação*
02	Merluza	10	Congrio rosa
03	Tilápia	11	Salmão rosa
04	Panga*	12	Merluza
05	Linguado	13	Cação*
06	Pescada	14	Linguado
07	Surubim	15	Sardinha
08	Tilápia	16	Panga*

Fonte: Desenvolvido pelos integrantes do grupo.

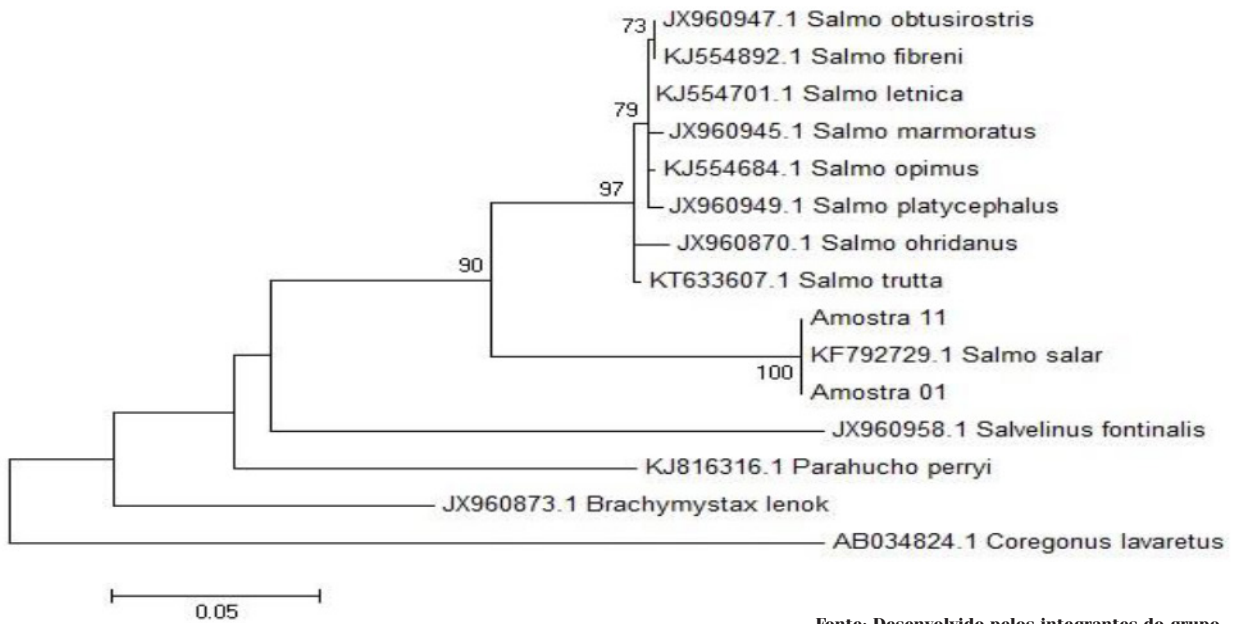
## RESULTADOS

As amostras adquiridas no mercado de Belo Horizonte totalizaram dezesseis amostras de filés de peixes, sendo estas de dez espécies (Tabela 1). Das dezesseis amostras, somente doze tiveram o alvo de interesse amplificado e sequenciado. Possivelmente houve degradação do DNA das demais amostras, não obtendo sucesso na metodologia da técnica de extração de DNA (Amostras: 04,09,13 e 16). A amostra de filé de Pescada (06) não obteve sucesso no processo de sequenciamento.

Após o sequenciamento e edição, obtiveram-se doze sequências com a matriz contendo em média 640 bp. Com

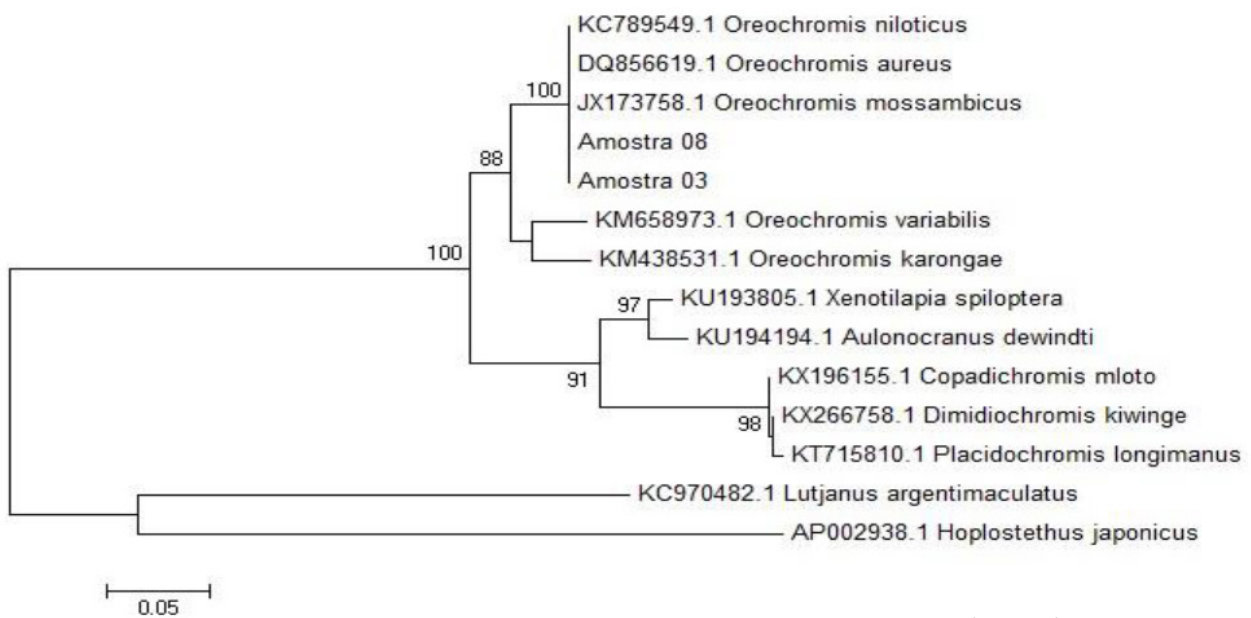
as sequências obtidas, foi realizado o alinhamento e análises junto aos bancos de dados NCBI (Blastn), GenBank e BOLD. Após análise, com o auxílio dos programas de bioinformática, BioEdit e MEGA 7.0, foram geradas árvores filogenéticas de agrupamento por máxima verossimilhança e corrigidas pelo modelo de Hasegawa-Kishino-Yano.

Na árvore obtida com as sequências referentes às amostras 01 e 11 (Figura 1), observou-se que estas se agruparam com o valor de bootstrap de 100% no ramo da espécie *Salmo salar* (Salmão). Portanto, como não há nenhuma distância genética que separe estas três sequências é possível afirmar que as amostras são pertencentes a exemplares de *Salmo salar*.



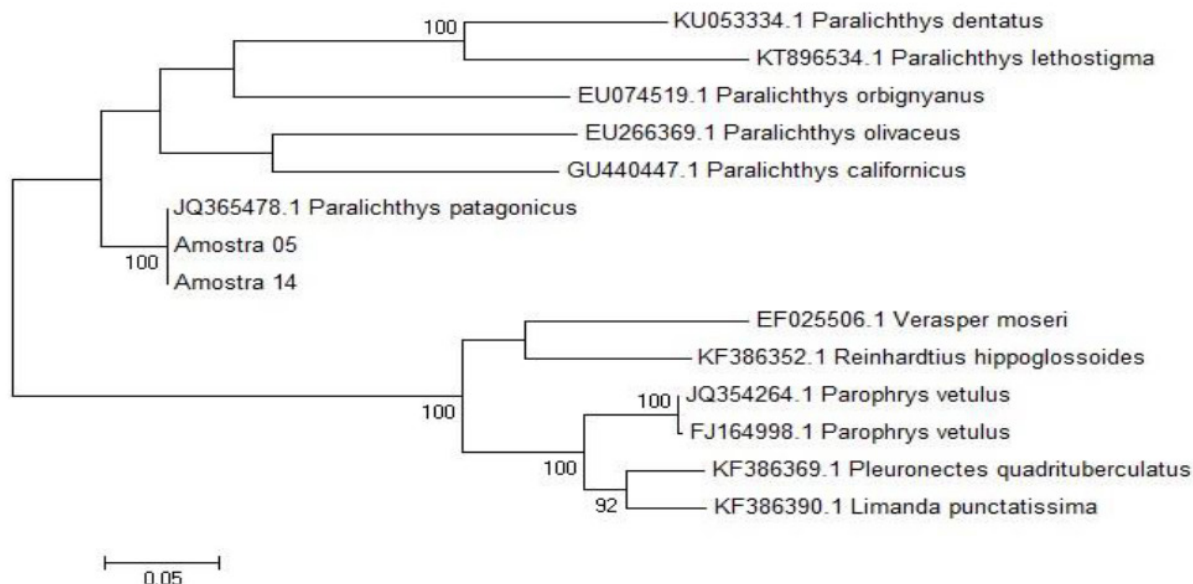
**Figura 1 - Análise filogenética pelo método da máxima verossimilhança a partir de sequências obtidas no GenBank. As amostras 01 e 11 se agruparam no mesmo clado que as sequências de *Salmo salar* com alto grau de confiança.**

A árvore filogenética, gerada pelas análises das amostras 03 e 08 (Figura 2), demonstrou que estas ficaram agrupadas no ramo junto ao gênero *Oreochromis* com valor de bootstrap 100%; ainda assim, não é possível determinar ao certo a qual espécie pertencem as amostras, pois não há sinal filogenético que possibilite diferenciação além do gênero.



**Figura 2 - Análise filogenética pelo método da máxima verossimilhança a partir de sequências obtidas no GenBank. As amostras 03 e 08 se agruparam no mesmo clado que as sequências de *Oreochromis niloticus*, *O. aureus* e *O. mossambicus* com alto grau de confiança.**

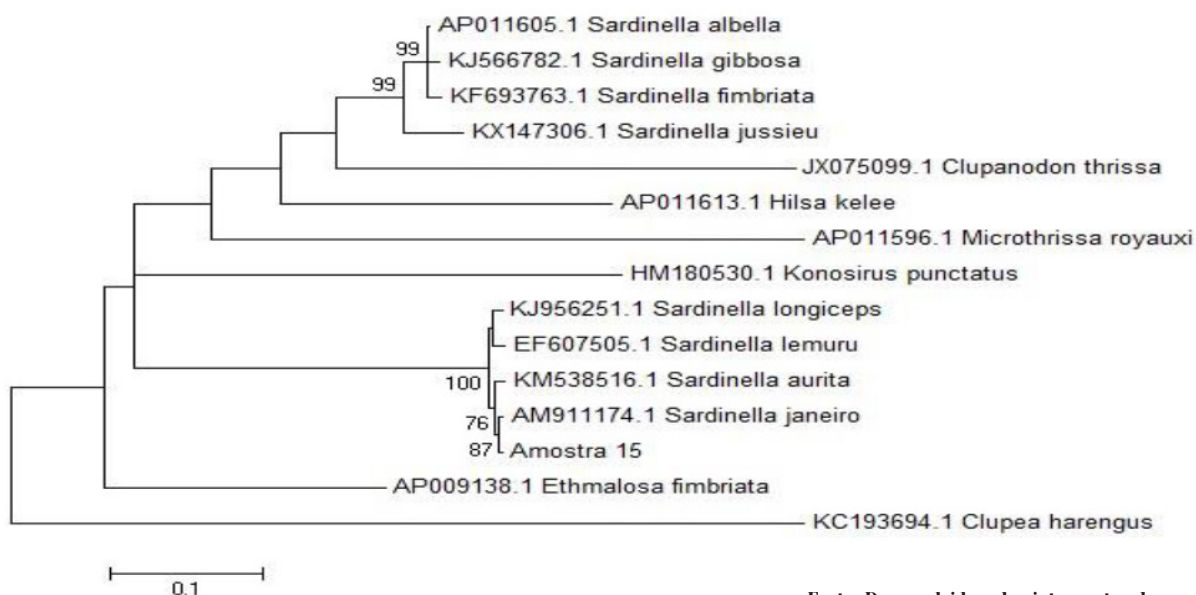
As amostras 05 e 14 foram agrupadas no mesmo ramo da árvore que a espécie *Paralichthys patagonicus* (Figura 3) com valor de bootstrap de 100%. Sendo assim, as respectivas amostras são da espécie *P. patagonicus*, confirmando com a espécie adquirida no mercado.



Fonte: Desenvolvido pelos integrantes do grupo.

**Figura 3 - Análise filogenética pelo método da máxima verossimilhança a partir de sequências obtidas no GenBank. As amostras 05 e 14 se agruparam no mesmo clado que as sequências de *Paralichthys patagonicus* com alto grau de confiança.**

A amostra 15 foi agrupada próximo ao ramo da árvore onde se encontra a espécie *Sardinella janeiro* (Figura 4), o valor de apoio deste agrupamento é de 87%. É possível observar que existe baixa distância filogenética entre *S. janeiro* e *S. aurita*, mas mesmo assim é possível visualizar que a amostra pertence à espécie *S. janeiro*, o que confirma o resultado do alinhamento em 87% de identidade.

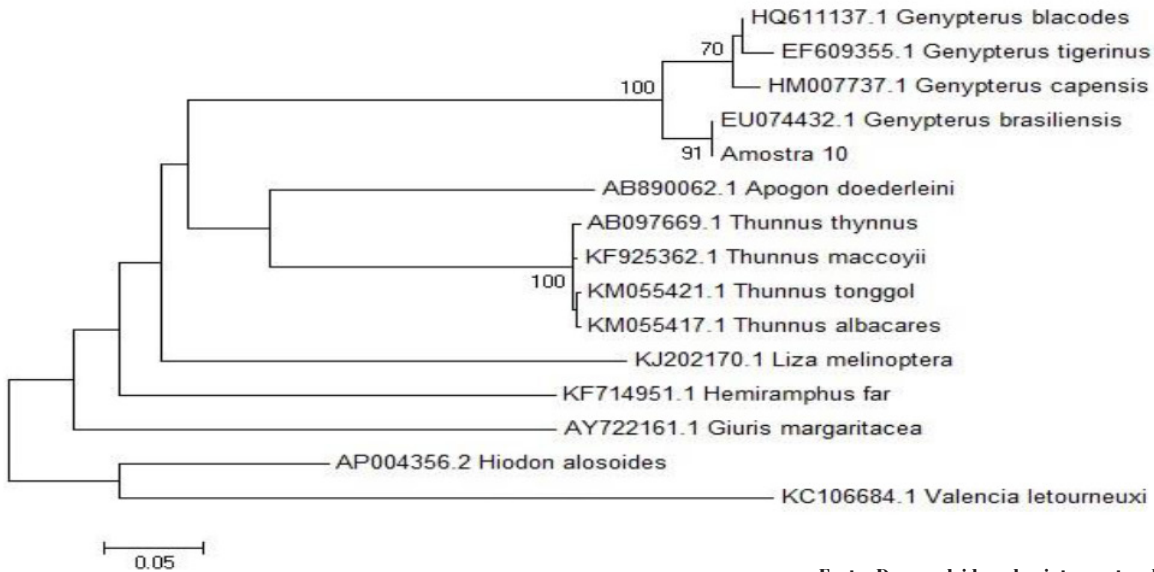


Fonte: Desenvolvido pelos integrantes do grupo.

**Figura 4 - Análise filogenética pelo método da máxima verossimilhança a partir de sequências obtidas no GenBank. A amostra 15 se agrupou no mesmo clado que a sequência de *Sardinella janeiro* com alto grau de confiança.**



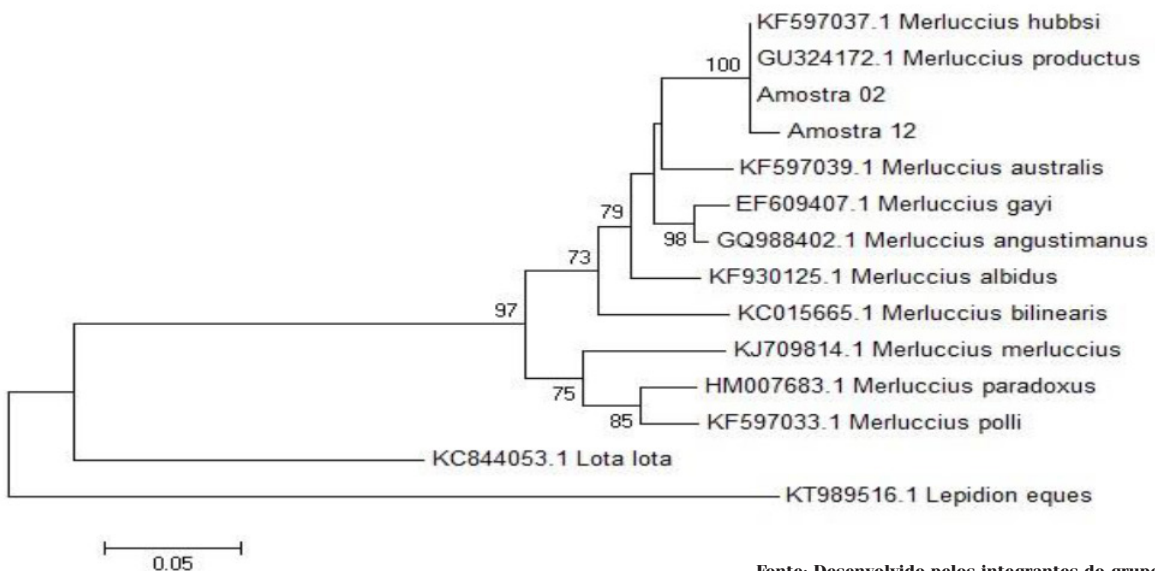
É possível visualizar, na árvore gerada com a sequência obtida da amostra 10, a formação de um clado monofilético do gênero *Genypterus*. Os valores de apoio para a separação das espécies desse gênero variam entre 70% e 100%, e o posicionamento específico da amostra tem o bootstrap de 91%, classificando-a como *Genypterus brasiliensis* (Figura 5).



Fonte: Desenvolvido pelos integrantes do grupo.

**Figura 5 - Análise filogenética pelo método da máxima verossimilhança a partir de sequências obtidas no GenBank. A amostra 10 se agrupou no mesmo clado que a sequência de *Genypterus brasiliensis* com alto grau de confiança.**

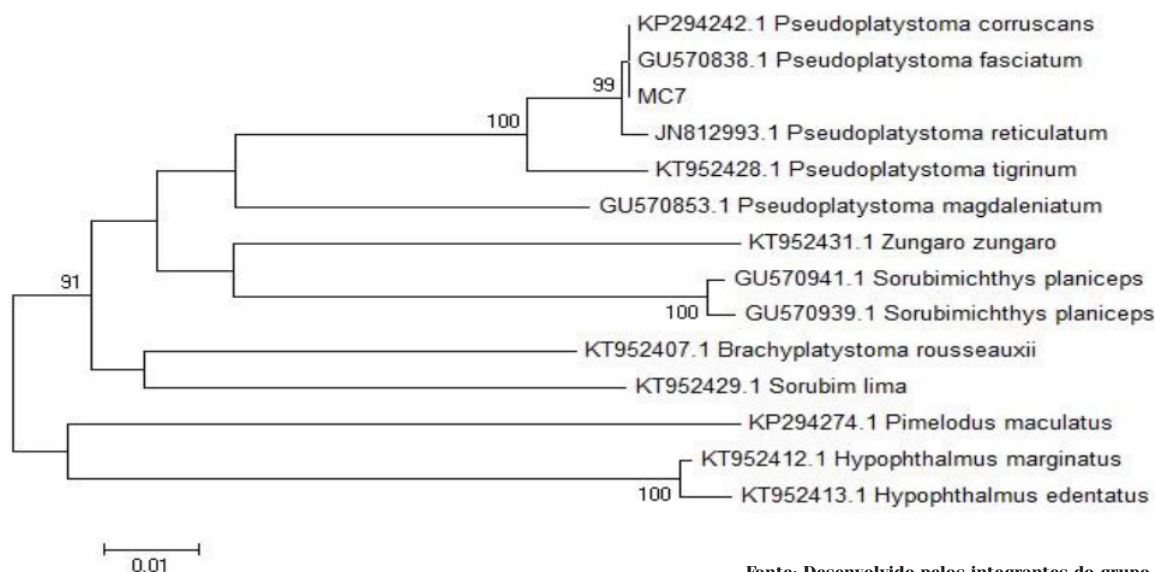
A árvore, gerada com as sequências 02 e 12, classificou as amostras para o gênero *Merluccius* (Figura 6). Não é possível determinar a espécie das amostras, pois no mesmo ramo ficaram alocadas duas espécies diferentes, *M. hubbsi* e *M. productus*. Este agrupamento é amparado por um bootstrap de 100%, porém em seu resultado de alinhamento, as amostras apresentaram 100% de identidade, 100% de Query cover e E-value 0.0 para a espécie *M. hubbsi*.



Fonte: Desenvolvido pelos integrantes do grupo.

**Figura 6 - Análise filogenética pelo método da máxima verossimilhança, a partir de sequências obtidas no GenBank. As amostras 02 e 12 se agruparam no mesmo clado que as sequências de *Merluccius hubbsi* e *M. productus* com alto grau de confiança.**

A amostra 07 ficou agrupada no ramo junto às espécies *Pseudoplatystoma carruscans* e *Pseudoplatystoma fasciatum* (Figura 7) amparada por um valor de bootstrap de 99%. Com isso é possível atribuir somente o gênero *Pseudoplatystoma* à amostra. Dentre as três sequências do ramo, não houve sinal filogenético suficiente capaz de distingui-las.



Fonte: Desenvolvido pelos integrantes do grupo.

**Figura 7 - Análise filogenética pelo método da máxima verossimilhança a partir de sequências obtidas no GenBank. A amostra 07 se agrupou no mesmo clado que a sequência de *Pseudoplatystoma fasciatum* com alto grau de confiança.**

## DISCUSSÃO

Em estudos envolvendo a técnica de *Barcode*, são observados resultados principalmente em casos de gêneros cuja taxonomia pode ser duvidosa (Pereira *et al.*, 2013). A metodologia de código de barras, no presente estudo, teve bastante eficácia para a discriminação dos gêneros e, em algumas amostras, para as espécies. Das doze amostras analisadas, em todas foi possível a determinação do gênero, e destas, apenas em seis foi possível determinar a espécie.

A PCR foi adaptada em diversos casos para melhor amplificação das amostras. Certas espécies não apresentaram resultados positivos no preparo do gel após o uso do protocolo descrito na publicação original, provavelmente devido a polimorfismos presentes na região de ligação dos iniciadores. Alterações de protocolo, como diminuição da temperatura de anelamento, permitiram amplificação.

Para as amostras positivas, após o sequenciamento e análise filogenética, os resultados apontaram que 100% dos gêneros determinados eram respectivos aos vendidos no mercado popular de Belo Horizonte, confirmando a não substituição das espécies. O resultado difere de outros trabalhos realizados na capital de Minas Gerais,

onde taxas de até 80% de identificação incorreta de pescado foram encontradas (Carvalho *et al.*, 2011).

Essa metodologia de identificação é de grande importância para a confirmação taxonômica de cada organismo morfológicamente parecido ou para aqueles que também não apresentam morfologia determinada, como no caso dos filés de peixes. Apesar de uma parte das espécies ter sido bem identificada, em outros casos, a região analisada não teve divergência suficiente para a identificação precisa além de gênero. O gênero *Merluccius* apresenta espécies crípticas que necessitam de outras metodologias ou fragmentos maiores para discriminação adequada à separação dentro do clado (Deli *et al.*, 2015).

A identificação além do gênero pode não ser essencial em alguns casos quando o produto vendido não necessita corresponder a uma espécie, apenas como no caso da pescada e do surubim. No caso desse último, por exemplo, o vernáculo pode ser utilizado para *P. carruscans* e *P. reticulatum* (Froese and Pauly 2011). Em casos de espécies ameaçadas ou sob proibição, pode ser necessário o uso de novas estratégias ou aumento da região sequenciada. Firmat *et al.* (2013) utilizaram 423 loci de AFLP e genes mitocondriais para diferenciar espécies do gênero *Oreochromis* na tentativa de identificar

híbridos e analisar espécies invasoras que ameaçavam a diversidades de grupos ameaçados de extinção.

Os resultados confirmaram a eficácia da metodologia aplicada mesmo não sendo possível a discriminação de 100% das espécies analisadas. A correta identificação precisa e inequívoca de quantidade de peixes, produtos de peixes, ovos para adultos têm importância em diversas áreas. A detecção de substituições de espécies ajuda a gerir as pescarias para uma sustentabilidade em longo prazo e melhora a pesquisa e a conservação dos ecossistemas (Ward, 2005).

## REFERÊNCIAS

Carvalho, Daniel C. et al. DNA barcoding unveils a high rate of mislabeling in a commercial freshwater catfish from Brazil. *Mitochondrial DNA*, v. 22, n. sup1, p. 97-105, 2011.

Dawnay N, Ogden R, McEwing R, Carvalho GR, Thorpe RS. 2007. Validation of the barcoding gene COI for use in forensic genetic species identification. *Forensic Sci Int* 173:1–6.

Deli Antoni MY, González-Castro M, Díaz de Astarloa JM. New tools (DNA barcoding), old hypothesis: the case of the taxonomic identity of the Argentine hakes (Actinopterygii: Merluccius). *J Fish Biol.* 2015 Sep;87(3):783-93. editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids electronic publication.* www.fishbase.org, version (02/2011). endangered cichlid *Oreochromis mossambicus*. *PLoS One.* 2013 May 9;8(5):e63880.

Espineira M, Gonzalez-Lavin N, Vieites JM, Santaclara FJ. 2008. Development of a method for the genetic identification of flatfish species on the basis of mitochondrial DNA sequences. *J Agric Food Chem* 56:8954–8961.

Firmat C, Alibert P, Losseau M, Baroiller JF, Schliewen UK. Successive.

Froese R, Pauly D, Editors. 2011. FishBase. World Wide Web.

Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment.

Hebert, P. D., Cywinska, A., & Ball, S. L. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270(1512), 313-321.

Hebert, P. D., Ratnasingham, S., & de Waard, J. R. (2003). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270(Suppl 1), S96-S99. invasion-mediated interspecific hybridizations and population structure in the

Martinez I, James D, Lore'al H. 2005. Application of modern analytical techniques to ensure seafood safety and authenticity. *FAO Fisheries Technical Paper.* Rome: Food and Agriculture Organization of United Nations.

Pauly, D., Christensen, V., Guénette, S., Pitcher, T. J., Sumaila, U. R., Walters, C. J., & Zeller, D. (2002). Towards sustainability in world fisheries. *Nature*, 418(6898), 689-695.

Pereira, L. H., Hanner, R., Foresti, F., & Oliveira, C. (2013). Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna?. *BMC genetics*, 14(1), 1.

Rasmussen RS, Morrissey MT. 2008. DNA-based methods for the identification of commercial fish and seafood species. *Compr Rev Food Sci F* 7:280–295. Symp. Ser. 41, 95–98.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, 30(12), 2725-2729.

Toffoli, D., Hrbek, T., Araújo, M. L. G. D., Almeida, M. P. D., Charvet-Almeida, P., & Farias, I. P. (2008). A test of the utility of DNA barcoding in the radiation of the freshwater stingray genus *Potamotrygon* (Potamotrygonidae, Myliobatiformes). *Genetics and Molecular Biology*, 31(1), 324-336.

Tresbach, R. H., Cerqueira, N. M., Medeiros, S. R., Gutierrez, H. J. P., Hernández, N. O., & Rodrigues, M. D. N. DNA barcoding: uma ferramenta de apoio molecular para identificação de espécies de peixes. *CEP*, 85960, 000.

Ward RD, Hanner R, Hebert PDN. 2009. The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. *J Fish Biol* 74:329–356.

Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philos Trans R Soc B* 360:1847–1857.

## NOTAS

<sup>1</sup> Graduando em Ciências Biológicas, Centro Universitário Newton Paiva. E-mail: adao93bh@hotmail.com

<sup>2</sup> Graduando em Ciências Biológicas, Centro Universitário Newton Paiva. E-mail: greicyguartinelli@hotmail.com

<sup>3</sup> Graduando em Ciências Biológicas, Centro Universitário Newton Paiva. E-mail: dani.veiga@live.com

<sup>4</sup> Coordenadora do curso de Ciências Biológicas e professora titular no Centro Universitário Newton Paiva. E-mail: livia.avelar@newtonpaiva.br

<sup>5</sup> Professor no Centro Universitário Newton Paiva, Fiscal Federal Agropecuário no Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais, LANAGRO/MG, Brasil. E-mail: antonio.biotec@gmail.com