



UNIVERSIDADE  
DO BRASIL

UFRJ

INSTITUTO DE BIOLOGIA – CEDERJ



**ANÁLISE MOLECULAR PARA O CONTROLE DA FRAUDE DE  
PANGAS E LINGUADOS**

WEIDY ROZENDO CLEMENTE

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
PÓLO UNIVERSITÁRIO DE NOVA IGUAÇU

2016



UNIVERSIDADE  
DO BRASIL

UF RJ

INSTITUTO DE BIOLOGIA – CEDERJ



## ANÁLISE MOLECULAR PARA O CONTROLE DA FRAUDE DE PANGAS E LINGUADOS

WEIDY ROZENDO CLEMENTE

Monografia apresentada como atividade obrigatória à integralização de créditos para conclusão do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas - Modalidade EAD.

Orientador: Antonio Mateo Solé- Cava

ORIENTADOR: Antonio Mateo Solé-Cava

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
PÓLO UNIVERSITÁRIO DE NOVA IGUAÇU

2016

**FICHA CATALOGRÁFICA**

Clemente, Weidy Rozendo

Título. Nova Iguaçu, 2016. 44 f. il: 31 cm

Orientador: Antonio Mateo Solé-Cava

Monografia apresentada à Universidade Federal do Rio de Janeiro para obtenção do grau de Licenciada no Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas – Modalidade EAD. 2016.

Referencias bibliográfica: f.40-41

1. Palavras Chaves

I. Solé-Cava, Antonio Mateo

II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Licenciatura em Ciências Biológicas – Modalidade

EAD

III. Título

## Agradecimentos

Quero agradecer primeiramente à Deus, criador dessa bela obra chamada natureza, a qual escolhi dedicar o pouco do meu ser para seu estudo e análise. Agradeço aos meus pais (Valdenice Clemente e Stênio Clemente) pelo apoio e dedicação em toda minha trajetória escolar e acadêmica e a contínua participação em minhas escolhas. Agradeço ao meu orientador Antônio Solé, que também se tornou um grande amigo. Agradeço pela oportunidade de fazer parte da equipe LBDM, pela orientação e apoio. Agradeço ao meu amigo, Wesley, que representa todos os amigos que de alguma forma me ajudaram na trajetória acadêmica, pelas dicas e o pelo apoio em geral. Agradeço ao Anderson e ao Pedro, por compartilharem seus conhecimentos de forma atenciosa e generosa.

Agradecimentos .....	3
Resumo .....	6
Abstract.....	7
<b>1 Introdução.....</b>	<b>8</b>
1.1 O problema da fraude pesqueira no mundo.....	8
1.1.1 Pesca de Linguados no Brasil.....	10
1.2 Problema da fraude com pangas no mundo e valor .....	11
1.3 O pangas no Brasil –Início da importação e seus problemas.....	13
1.4 A importância do controle por DNA .....	13
1.5 A RENIMP.....	15
<b>2 Objetivos.....</b>	<b>16</b>
<b>3 Material e métodos.....</b>	<b>17</b>
3.1 Amostras .....	17
3.2 Etapas de laboratório .....	19
3.2.1 Extração de DNA .....	19
3.2.2 Amplificação do gene citocromo b por Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	20
3.2.3 Purificação do produto de PCR.....	21
3.2.4 Sequenciamento de DNA.....	21
3.3 Análises de dados.....	22
3.3.1 Edição de sequências .....	22
3.3.2 Alinhamento .....	22
3.3.3 Desenho de um método rápido de identificação, via PCR/RFLP.....	22
3.3.4 Filogenética.....	25
<b>4 Resultados .....</b>	<b>25</b>
4.1 Amostras .....	25
4.2 Análises.....	25
4.2.1 Análises moleculares.....	25
4.2.2 Análises filogenéticas.....	29
<b>5 Discussão.....</b>	<b>33</b>
5.1 Comparação de resultados.....	35
5.2. Como o método será útil?.....	36
<b>6 Conclusão .....</b>	<b>37</b>
<b>7 Referências.....</b>	<b>37</b>

## Resumo

Algumas espécies de pescados são comumente envolvidas com processos de fraudes. A substituição de peixes mais nobres, como é o caso do linguado, por peixes com menor valor comercial, como o panga, é um exemplo relevante desse tipo de fraude. Garoupa, salmão, bacalhau e perca amarela são exemplos de outras espécies que também passam por fraudes. Após processos industriais, alguns peixes podem não mais ser distinguidos morfológicamente, pois vendidos em filés, fatias ou postas, ficam mais semelhantes, o que dificulta o reconhecimento a olho nu e facilita a substituição de diferentes espécies de pescados. Intencionalmente ou não, a substituição, além de um problema comercial/financeiro, pode ser um problema para a saúde pública, em casos de alergias, e até para conservação de outras espécies, em caso de uso como iscas.

A preocupação com a fraude pesqueira tem crescido e o interesse do consumidor em relação à rotulagem correta do produto adquirido tem sido cada vez mais apresentada, fazendo assim com que comerciantes fiquem mais atentos e pesquisadores se manifestem com estudos de análises dessas rotulagens e desenvolvimentos de métodos que possibilitem uma identificação correta da amostra de pescado.

Uma metodologia que tem sido utilizada para a detecção de fraudes pesqueiras é a análise molecular por sequência de DNA. Nesse caso, processos industriais, amostragem em pequena quantidade e até amostras desgastadas podem ser utilizadas normalmente, e ceder uma identificação fiel do pescado.

No presente trabalho, busquei desenvolver um método que conseguisse distinguir linguados de pangas. Realizei todo procedimento molecular até o sequenciamento, depois as sequências de citocromo b foram alinhadas e após essa última análise, foi escolhida uma enzima de restrição que pudesse distinguir as espécies de linguado do panga de maneira rápida e eficaz. Ao fim da presente pesquisa, foi desenvolvido um kit de identificação molecular através de PCR/RFLP. O método ainda possibilita a diferenciação de espécies distintas de linguados, o que pode ser de grande utilidade comercial e de investigação.

## Abstract

Some species of fish are commonly involved in fraud cases. The substitution of noble fish, such as sole, by fish with lower commercial value, such as pangas, has been often observed. Grouper, salmon, cod and yellow perch are examples of species that also go through fraud. After industrial processes, some fish species cannot be distinguished morphologically. When sold as filets, or slices, they are difficult to identify. This facilitates the replacement of different species of fish. The problem with fraud goes beyond financial questions. It can also be a problem for public health in cases of allergies, and even conservation of other species, in case of their use as bait.

Concern about fishing fraud has grown and consumer interest in relation to the correct labeling of the product purchased has been increasingly presented, thus making traders become more attentive so that new analyzes for the labeling of fish samples are continuously being developed. One method that has been increasingly used is the molecular analysis of DNA sequences, which allows the identification of small quantities of industrially processed samples.

In this study, we developed a method that could distinguish soles from pangas. Each sample had its DNA extracted and sequenced for the cytochrome b gene. After that, sequences were edited and aligned. After that, a restriction enzyme was chosen that best fit the purpose of the work. At the end of this research, we developed a molecular identification kit through PCR / RFLP.

## 1 Introdução

### 1.1 O problema da fraude pesqueira no mundo

A fraude pesqueira tem afetado consumidores e crescido em todo o mundo. Nos deparamos com esses problemas quando ocorre comercialização/identificação de uma determinada espécie por outra, implicando, assim, em uma rotulagem/etiquetagem equivocada que pode, por sua vez, ter como objetivo aumentar o lucro do vendedor (Clark, 2015), em geral com prejuízo ao consumidor.

Casos de rotulagens erradas e fraudes intencionais estão sendo registrados com frequência (Cawthorn *et al.*, 2012), e tem evoluído junto com a manifestação de um maior interesse comercial, onde, entre espécies similares, a de menor valor no mercado é vendida como uma espécie mais nobre (Di Pinto *et al.*, 2015).

A identificação correta do material comercializado é primordial, inicialmente porque o consumidor precisa saber o que realmente está obtendo e seu real valor comercial. Além disso, tem importância na conservação e preservação de algumas espécies: por exemplo, um grave problema já observado, é a caça exacerbada de outras espécies, como de golfinhos e jacarés, para uso como isca de peixes que serão comercializados através de esquemas de fraudes, desde substituições, até nomes novos, o que propõe a ideia de uma fraude comercial intencional (Cunha *et al.*, 2015).

Existem ainda outras questões importantes, como a saúde pública, pois algumas pessoas são alérgicas a alguns tipos de peixes (panga e tilápia, por exemplo), podendo apresentar sérias reações ao ingeri-los (Ebo *et al.*, 2009). Além disso, alguns peixes provenientes da aquicultura podem apresentar contaminações eventuais, como é o caso da Perca-do-Nilo, que é cultivada em locais contaminados que não possuem um controle sanitário, podendo acumular metais pesados, como o metil-mercúrio, que pode elevar a probabilidade de infartos (Filonzi *et al.*, 2010). O bloqueio da venda de produtos potencialmente contaminados pelos órgãos de controle da saúde pública pode ser prejudicado se forem vendidos sob outras denominações, o que representa também uma tática algumas vezes utilizada para comercialização de espécies que estão ameaçadas de extinção ou em períodos de pesca proibida (Cunha *et al.*, 2015).

Algo que facilita a fraude pesqueira é a comercialização de pescados em formas processadas em filés/fatias, que perdem as características morfológicas necessárias para sua identificação



zoológica por critérios convencionais (Brito *et al.*, 2015). Espécies como tilápias, garoupa, bacalhau e linguados são facilmente e continuamente envolvidas em fraudes.

Com a vantagem do lucro e possibilidade de comercialização fraudulenta, esse processo de falsa rotulagem é encontrado em um grande grupo de pescados, como visto na tabela 1:

**Tabela 1: Espécies que são envolvidas m casos de fraudes.**

Adaptada/traduzida de (Galal-Khallaf *et al.*, 2014)

<b>Espécies apresentada no rótulo</b>	<b>Espécie substituída</b>	<b>Referência</b>
Cioba	Outras espécies da família Lutjanidae (carangas)	FoodandDrugAdministration(2013)
Cioba	Bodião	FoodandDrugAdministration (2013)
Dourado	Savelha	FoodandDrugAdministration(2013)
Peixe-espada	Tubarão de Mako	FoodandDrugAdministration(2013)
Peixe-relógio	Peixe galo da Nova Zelandia	FoodandDrugAdministration(2013)
Bacalhau	Badejo do Alasca	FoodandDrugAdministration(2013)
Linguado	Badejo	FoodandDrugAdministration(2013)
Doversole (refere-se a duas espécies de peixes chatos: O linguado, <i>Solea solea</i> e <i>Pacificus microstomus</i> )	<i>Arrowtooth</i> solha	FoodandDrugAdministration(2013)
Cilindro vermelho ( <i>Sciaenops ocellatus</i> )	Tambor preto ( <i>Pogonias cromis</i> )	FoodandDrugAdministration(2013)
Perca amarela	Poleiro- ou perca- branco	FoodandDrugAdministration(2013)
Perca amarela	Peixe Zamber	FoodandDrugAdministration(2013)
Caviar de esturjão	Peixe-espátula do Mississipi e Peixe-espátula chinês	FoodandDrugAdministration(2013)
Picão verde	Sauger	FoodandDrugAdministration(2013)
Salmão do Atlântico	Salmão do Pacífico	FoodandDrugAdministration(2013)
Chum Salmon	Salmão rosa	FoodandDrugAdministration(2013)
Vieira	barbatanas de raias	FoodandDrugAdministration(2013)
Picão verde	Badejo do Alasca- bacalhau	FoodandDrugAdministration(2013)
Salmão	Truta-arco-íris	FoodandDrugAdministration(2013)
Salmão selvagem	Salmão de cultivo	FoodandDrugAdministration(2013)
Tamboril	Baiacu	Cohen <i>et al.</i> (2009)
Atum-do-Índico	Atum-rabilho	Maralit <i>et al.</i> (2013)
Garoupa do mar Mediterrâneo	Tilápia-do-nilo	Filonzi <i>et al.</i> (2010)
Peixe-borboleta	Perca do Nilo	Filonzi <i>et al.</i> (2010)
Linguado	Panda	van Leeuwen <i>et al.</i> (2009)
Garoupa	Perca do Nilo	Asensio <i>et al.</i> (2009)

<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/RFE/ucm071528.htm>

### 1.1.1 Pesca de Linguados no Brasil

Os linguados, juntamente com línguas-de-mulata, solhas ou tapas fazem parte de um grupo com características bem diferenciadas e particulares (Mendonça *et al.*, 2002) pertencente ao gênero *Paralichthys*, família Paralichthyidae, ordem Pleuronectiformes, classe Actinopterygii, Filo Chordata, Reino Animalia.



<http://www.fishbase.org/identification/SpeciesList.php?genus=Paralichthys> (Acessado em 12/12/2016- 11:37)

Os trabalhos de taxonomia mais recentes relacionados aos linguados retratam que, em relação à Ordem Pleuronectiformes existem atualmente aproximadamente 678 espécies catalogadas, reunidas em 134 gêneros, agrupadas em 14 famílias (Nelson, 2006).

A pesca do linguado nacional é pequena, com cerca de 2.600 toneladas anuais.

#### **Tabela 2: Produção nacional de linguados.**

Ano	Produção
2007:	2.566
2008:	2.550
2009:	2.812
2010:	2.657
2011:	2.682

Adaptado do Boletim estatístico da pesca e aquicultura-Brasil 2008-2009 e Boletim estatístico da pesca e aquicultura-Brasil 2011.

Dentre os linguados de maior importância econômica, a espécie *Paralichthys patagonicus* e *Paralichthys brasiliensis*, estão como as mais importantes nas regiões Sul e Sudeste do Brasil. (<http://www.aprendendoaexportar.gov.br/pescados/sitio/o-setor-de-pescados/perfil-do-setor/o-mar-brasileiro/pp-linguado.php>, acessado em 10/10/2016 23:16). No Rio de Janeiro, duas denominações genéricas são usadas para as estatísticas de desembarque: “Linguado” e “Linguado areia” (*Paralichthys isosceles*), sendo o município de Angra dos Reis a região com maior desembarque (Tabela 3)

**Tabela 3: Listagem de linguados desembarcados por município e sua produção em 2014 (em kg).** Baseado no Relatório FIPERJ 2014

Espécie / Município	Angra dos Reis	Cabo Frio	Campos dos Goytacazes	Macaé
<b>Linguado</b>	8.221	880	95	800
<b>Linguado-areia</b>	2.768			

### 1.2 Problema da fraude com panga no mundo e valor

*Pangasius* e tilápia do Nilo representam uma considerável quota do mercado mundial de pescados. Por conta do seu baixo custo, a demanda por essas espécies tem sofrido um considerável aumento (Ebo *et al.*, 2009). Os chamados “pangas” são peixes da ordem Siluriformes, família Pangasiidae, gênero *Pangasius* (Nelson, 2006), e representam um grupo frequentemente envolvido com a questão da fraude pesqueira (Ebo *et al.*, 2009).



<http://www.ocu.org/alimentacion/seguridad-alimentaria/noticias/pescado-tilapia-panga> (Acessado em 26/03/2016- 00:59)

Devido ao seu baixo valor comercial, pangas estão sendo comercializados como peixes de outras espécies mais nobres com valores comerciais mais altos. Uma troca que trouxe grande interesse de estudos para especialistas da área, seria a substituição de linguados, peixes pleuronectiformes de alto preço de mercado, por *Pangasius*. Como esses peixes são comumente encontrados/vendidos em filés, o consumidor não consegue, apenas observando, diferenciar os pescados, o que facilita grandemente a popularização de fraudes entre essas espécies.

O bagre cultivado no Delta do Rio Mekong, no Vietnã, tem penetrado nos mercados brasileiros, mesmo deixando algumas dúvidas ao consumidor, devido ao histórico de suspensão de sua comercialização. O baixo custo é algo que tem tomado a atenção do consumidor, chegando à cerca de US\$ 1,98 o quilo.

“As importações saltaram de 3,2 mil toneladas em 2009 para 54,7 mil toneladas em 2013”, diz estudo <http://canaldopiscicultor.com/noticia/240/panga-o-milagre-da-multiplificacao> (Acessado em: 29/07/2016- 19:22).

**Tabela 4: Importações de pescado do Vietnã pelo Brasil**

Ano	Toneladas	%
2011	29.535	8,57
2012	34.382	9,71
2013	54.700	11,71
2014/JUN	36.203	37,07 *

(\*) Em relação a junho de 2013

Fonte: Conepe/Aliceweb

Em 2014, a importação do panga vietnamita foi proibida por questões de saúde pública e de forma de comercialização (excesso de gelo nas embalagens), mas em março de 2015, após um termo de ajuste de conduta (normas e a rotulagem do produto, que precisará apresentar o percentual de glazing, que consiste em um processo onde o pescado é recoberto com camada de gelo que ajuda na preservação da carne, não ocorrendo perdas de nutrientes e água (Gonçalves, *et al.*, 2013), peso líquido, e nome de aditivos químicos, caso tenham sido utilizados) pelas autoridades vietnamitas, o Ministério da Pesca e Aquicultura voltou a liberar as importações <http://seafoodbrasil.com.br/vietna-muda-lei-e-promete-melhorar-exportacoes-de-panga/>(Acessado em: 29/07/15- 19:45).

Um outro problema em relação ao panga é a reação alérgica que algumas pessoas apresentam, em relação à espécie (Ebo *et al.*, 2009). Em geral, as reações alérgicas com pescados, ocorrem com proteínas evolutivamente muito conservadas entre peixes, de modo que as alergias, quando

apresentadas, geralmente são relacionadas à um grande número de espécies. Entretanto, constatou-se uma alergia específica ao pangá e à tilápia do Nilo, com a apresentação de imunoglobulina E (IgE) especificamente a proteínas de 18 KDa e 45 KDa em pesquisas de imunotransferência, o que leva a uma intolerância específica (Ebo *et al.*, 2009). Nesse caso, o consumidor tem o direito de saber se o peixe que consome é o pangá, para que possa se prevenir e evitar as reações alérgicas relacionadas. Fraudes de substituição de linguado por pangá, portanto, não são apenas uma questão financeira, mas também de saúde pública.

### 1.3 O pangá no Brasil –Início da importação e seus problemas.

A liberação e suspensão da importação do peixe pangá, originado do Vietnã, já foram algumas vezes discutidas pelo Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA). Em 2014, devido a um não acordo entre Brasil e Vietnã, a importação do peixe pangá foi suspensa <http://seafoodbrasil.com.br/suspensa-importacao-de-pescados-vietna/> (Acessado em 11 10 2016- 02:04). A liberação para importação do pangá só foi feita pelo MPA em março de 2015, após um acordo de comprometimento do Vietnã <http://seafoodbrasil.com.br/vem-ai-enxurrada-de-panga-vietna-assume-compromisso-e-e-liberado-pelo-mpa/> (Acessado em 11 10 2016- 02:12).

### 1.4 A importância do controle por DNA

Devido ao grande crescimento de fraudes pesqueiras em todo o mundo, e o apoio ao consumo de pescados, o estudo e uso de técnicas baseadas no DNA tem se mostrado, cada vez mais, essencial (Cawthorn *et al.*, 2012). Logo, tem-se investido no controle dessas ações por meio de testes baseados em sequências de DNA (Dawnay *et al.*, 2006). Nessa abordagem, são produzidos inicialmente bancos de dados de sequências de DNA das espécies comercializadas, que são posteriormente interrogadas com as sequências obtidas dos exemplares que precisam ser identificados.

Além da questão de fraudes com frutos do mar, foco desse trabalho, o controle por DNA tem auxiliado em outras questões importantes como a verificação de compra e venda de animais em período de comercialização proibida, e comercialização ilegal de animais protegidos (ameaçados de extinção) (Cunha *et al.*, 2016). Genes mitocondriais como Citocromo b e Citocromo Oxidase I, têm-se mostrado ótimos aliados no trabalho de identificação e controle por DNA, por serem mais variáveis entre espécies, e acabam ainda por possibilitar um trabalho maior e/ou mais completo, devido ao seu grande número de cópias por célula, permitindo trabalhar com tecidos muito degradados ou processados.

Um dos pontos mais interessantes nas técnicas baseadas em análises de DNA é que o material pode estar em pequena quantidade, ter passado por processos industriais, ou mesmo ser também

(dentro de um limite) um material antigo. Além disso, não há necessidade de analisar a amostra inteira, no caso, o pescado inteiro, podendo o mesmo estar em fatias, filés ou postas. Isso facilita estudos com espécies de fato comuns à população e mais comercializadas. Ou seja, o controle por DNA possibilita a análise mesmo com a amostra morfológicamente comprometida, o que poderia impossibilitar uma identificação a olho nu. Tem-se buscado meios cada vez mais baratos e rápidos para realizar trabalhos forenses, e as análises de DNA representam um grande avanço. De uma maneira geral a técnica mais usada é o sequenciamento de DNA, mas outras técnicas, como o caso do QuadPyre handheld RT-NASBA sensor, que foi desenvolvido para possibilitar a análise sequencial de DNA de forma rápida, confiável e no local da coleta mostram possíveis caminhos futuros nesse campo. No caso do QuadPyre, os trabalhos visaram um aparelho que possibilitasse o controle de fraude especificamente com garoupas (Ulrich *et al.*, 2015).

Algumas espécies acabam por sofrer mais com a questão da fraude, como é o exemplo da garoupa, que, como apresenta uma grande procura no mercado, tem como consequência identificações/rotulagens fraudulentas, que são ainda mais facilitadas devido a existência do grande número de espécies, e da possibilidade de comercialização de algumas e proibição de outras, ou seja, são muitos exemplares, dentro os quais, alguns podem ser comercializados e outros não. Isso resulta em uma facilidade na passagem de fraudes por reguladores, dificultando que o mesmo consiga discernir a espécie (Ulrich *et al.*, 2015).

Técnicas que utilizam sequencia de DNA para identificar fraudes têm sido empregadas em trabalhos com diversas espécies, como é o caso da análise feita com amostras de salmão, no estado de Washington, que verificou que grande parte das amostras estavam erroneamente identificadas (Cline, 2012).

Outro exemplo de fraude ocorreu em Florianópolis-SC onde, após algumas denúncias relacionadas a fraudes pesqueiras, o município foi sujeito a uma vistoria realizada pelo Programa de Proteção e Defesa do Consumidor (Procon) e o Instituto de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Imetro). Alguns consumidores do local citado reclamaram de substituições de espécies de peixes, como o de cação sendo servido no lugar da garoupa e o peixe-panga sendo vendido no lugar do linguado. Na vistoria, as entidades colheram amostras para realização de análises de DNA dos peixes para fiscalização, com a intenção de verificar se a espécie vendida ao consumidor era a mesma anunciada pelos comerciantes. <http://www.pesca.sp.gov.br/noticia.php> (Acessado em: 27/09/2016- 16:40).

Através da substituição de peixes mais baratos por mais caros, empresas lucrariam até três vezes mais que o valor real. A Polícia Federal realizou em Itajaí, Itapema e Navegantes, uma operação chamada Poseidon, onde empresas de comercialização de pescados foram investigadas, e por fim,

sete delas foram multadas por conta de fraudes realizadas também de forma proposital. As empresas foram acusadas de realizar rotulagens erradas entre peixes como alabote e panga, no lugar de linguado, além de comercializar espécies protegidas de vendas/compras. “Conforme o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa), o alabote é um peixe da China que tem baixo valor de mercado na região e inclusive se desmancha durante o preparo. O preço médio é de R\$ 9,00 o quilo do filé, enquanto o linguado custa cerca de R\$ 27,00” diz a reportagem. <http://osoldiario.clicrbs.com.br/sc/seguranca/noticia/2014/04/investigacao-aponta-que-empresas-lucrariam-ate-tres-vezes-mais-que-valor-real-com-fraudes-em-pescados-4471019.html>. (Acessado em: 27/09/2016- 16:47). Essas fraudes estão se tornando cada vez mais comuns, e aumentando o número de espécies onde esses atos se realizam, como foram observadas fraudes também com savelha sendo identificada como sardinha, polaca do Alasca como merluza, abrótea como pescado e cherne polveiro (ameaçado de extinção) como garoupa. Vale lembrar que algumas dessas espécies ainda podem ser normalmente compradas e vendidas, desde que sua identificação esteja correta (<http://osoldiario.clicrbs.com.br/sc/seguranca/noticia/2014/04/investigacao-aponta-que-empresas-lucrariam-ate-tres-vezes-mais-que-valor-real-com-fraudes-em-pescados-4471019.html>) (Acessado em: 27/09/2016- 16:47).

Mediante esses inúmeros enganos, é indiscutível a importância da identificação de pescados baseada em DNA, tendo em vista todas as vantagens que os métodos atuais concedem.

Os genes mitocondriais são em geral mais utilizados por apresentarem-se em uma maior quantidade por célula, o que possibilita o trabalho com amostras pequenas ou altamente processadas, caso seja necessário. Nesses trabalhos, também são comumente utilizadas sequências de amostras do estudo em questão, para alinhar/comparar com sequências já obtidas e estudadas anteriormente, que ficam servindo de padrão.

## 1.5 A RENIMP

A RENIMP- Rede Nacional de Identificação Molecular de Pescados é um projeto criado em 2009 pelo Laboratório de Biodiversidade Molecular, do Departamento de Genética, do Instituto de Biologia pertencente à Universidade Federal do Rio de Janeiro, e financiado com auxílios do Ministérios da Pesca e da Agricultura. Devido ao crescimento do número de fraudes pesqueiras no Brasil e no mundo, e à importância em se controlar e combater essas ações, o projeto RENIMP foi criado, com a proposta de analisar por sequenciamento de DNA amostras de mais de 165 espécies, representando 95% dos pescados mais comercializados no Brasil. A análise por sequenciamento permite que sejam analisadas mesmo com amostras que já sofreram



processamentos industriais. <https://ufri.br/noticia/2015/10/22/mapeamento-de-peixes-contra-fraudes>; (Acessado em: 27/09/2016- 16:55)

Nesta monografia usei como base para as análises o banco de dados da RENIMP, para verificar um caso de fraude comumente encontrado, que é a fraude com o peixe panga, nesse caso, focando nas substituições do linguado.

O presente trabalho simboliza uma busca de construção de mais um instrumento contra a fraude pesqueira, buscamos aqui criar um sistema rápido, seguro e o mais barato possível, que possibilitasse uma análise com amostras suspeitas de fraudes entre pangas e linguados. Nesse contexto, foram analisadas amostras já presentes no laboratório, e outras obtidas de supermercados e mercados de peixes. As amostras analisadas eram aquelas vendidas e rotuladas como linguados, e com o auxílio das informações das sequências de DNA já armazenadas na RENIMP, foram realizadas comparações entre o DNA amostral, e o de linguados já conhecidos e estudados anteriormente. As comparações foram realizadas com base em alinhamentos de sequência e construção de árvores filogenéticas– que serão explicados mais adiante. Assim, o projeto apresentado espera colaborar com análises moleculares de amostras processadas industrialmente, possibilitar avaliações de possíveis fraudes, visando tanto a parte comercial, como a do consumidor.

Após obter as amostras, passar pelos processos de extração, PCR e sequenciamento, as sequências de DNA foram alinhadas, e estudadas as enzimas de restrição mais eficientes para discriminar as várias espécies. Já possuindo esse conhecimento, foi possível realizar o processo de forma mais rápida e direta, seguindo diretamente para as últimas etapas, não necessitando um estudo dos alinhamentos ou o sequenciamento de DNA. Os processos citados acima, serão explicados mais detalhadamente na parte de material e métodos.

## 2 Objetivos

### Objetivo principal

- Construir um mecanismo simples, de conclusão rápida e econômica, com base em sequências de DNA, que auxilie na identificação molecular de linguados, para ajuda no controle de fraudes.

### Objetivos específicos

- Analisar amostras obtidas de supermercados e peixarias, com ênfase em substituição de linguados por pangas, identificando as espécies mais comercializadas e que sofrem mais com essa questão da fraude.



- Construir um mecanismo de teste molecular, onde se possa obter uma diferenciação entre pangas e linguados, pois mesmo sendo distantes evolutivamente e fisicamente diferentes, têm-se identificado casos de fraudes com essas espécies.

### 3 Material e métodos

#### 3.1 Amostras

As amostras estudadas para o sequenciamento inicial e para o desenvolvimento do sistema de identificação foram coletadas entre 2012 e 2015, por constituintes do grupo responsável pela RENIMP. As amostras usadas para testar o sistema foram coletadas de supermercados e peixarias do Estado do Rio de Janeiro, encaminhadas ao laboratório, preservadas em etanol e armazenadas a -20°C. Nesta etapa, foram analisadas 67 amostras (Tabela 1)

**Tabela 5 – amostras analisadas**

<b>Amostra</b>	<b>Codigo</b>	<b>suposta ESPÉCIE</b>	<b>Nome vulgar</b>	<b>local de coleta</b>
RENIMP	AC46	<i>Paralichthys brasiliensis</i>	Linguado	Barra de Rio Grande
RENIMP	AC48	<i>Paralichthys brasiliensis</i>	Linguado	Barra de Rio Grande
RENIMP	AC49	<i>Paralichthys brasiliensis</i>	Linguado	Barra de Rio Grande
RENIMP	AC50	<i>Paralichthys brasiliensis</i>	Linguado	Barra de Rio Grande
RENIMP	AC53	<i>Paralichthys brasiliensis</i>	Linguado	Barra de Rio Grande
RENIMP	AH27	<i>Paralichthys sp.</i>	Linguado	Porto Itajaí, SC (Arvoredo, SC, até Solidão, RS)
RENIMP	AH28	<i>Paralichthys sp.</i>	Linguado	Porto Itajaí, SC (Arvoredo, SC, até Solidão, RS)
RENIMP	AH29	<i>Paralichthys sp.</i>	Linguado	Porto Itajaí, SC (Arvoredo, SC, até Solidão, RS)
RENIMP	AH30	<i>Paralichthys sp.</i>	Linguado	Porto Itajaí, SC (Arvoredo, SC, até Solidão, RS)
RENIMP	AH31	<i>Paralichthys sp.</i>	Linguado	Porto Itajaí, SC (Arvoredo, SC, até Solidão, RS)
RENIMP	AH32	<i>Paralichthys sp.</i>	Linguado	Porto Itajaí, SC (Arvoredo, SC, até Solidão, RS)
RENIMP	AH33	<i>Paralichthys sp.</i>	Linguado	Porto Itajaí, SC (Arvoredo, SC, até Solidão, RS)
RENIMP	AH34	<i>Paralichthys sp.</i>	Linguado	Porto Itajaí, SC (Arvoredo, SC, até Solidão, RS)
RENIMP	AH35	<i>Paralichthys sp.</i>	Linguado	Porto Itajaí, SC (Arvoredo, SC, até Solidão, RS)
RENIMP	AH36	<i>Paralichthys sp.</i>	Linguado	Porto Itajaí, SC (Arvoredo, SC, até Solidão, RS)
RENIMP	AK66	<i>Paralichthys isosceles</i>	Linguado	Mercado de peixe São Pedro, Niterói, box 125
RENIMP	AK67	<i>Paralichthys isosceles</i>	Linguado	Mercado de peixe São Pedro, Niterói, box 126
RENIMP	AK69	<i>Paralichthys isosceles</i>	Linguado	Mercado de peixe São Pedro, Niterói, box 128
RENIMP	AK70	<i>Paralichthys isosceles</i>	Linguado	Mercado de peixe São Pedro, Niterói, box 129
RENIMP	AK71	<i>Paralichthys isosceles</i>	Linguado	Mercado de peixe São Pedro, Niterói, box 130
RENIMP	AK72	<i>Paralichthys isosceles</i>	Linguado	Mercado de peixe São Pedro, Niterói, box 131
RENIMP	AK73	<i>Paralichthys isosceles</i>	Linguado	Mercado de peixe São Pedro, Niterói, box 132
RENIMP	AK74	<i>Paralichthys isosceles</i>	Linguado	Mercado de peixe São Pedro, Niterói, box 133
RENIMP	AK75	<i>Paralichthys isosceles</i>	Linguado	Mercado de peixe São Pedro, Niterói, box 134
RENIMP	AK76	<i>Paralichthys isosceles</i>	Linguado	Mercado de peixe São Pedro, Niterói, box 135
RENIMP	AK77	<i>Paralichthys orbignyanus</i>	Linguado	Mercado de peixe São Pedro, Niterói, box 107

Tabela 1 – amostras analisadas (cont)

<b>Amostra</b>	<b>Codigo</b>	<b>suposta ESPÉCIE</b>	<b>Nome vulgar</b>	<b>local de coleta</b>
RENIMP	AK86	<i>Paralichthys orbignyanus</i>	Linguado	Mercado de peixes em Angra dos Reis, RJ.
RENIMP	AL05	<i>Paralichthys orbignyanus</i>	Linguado	Copacabana, RJ, comunidade pesqueira local
RENIMP	AU88	<i>Paralichthys patagonicus</i>	Linguado	
RF11	A059	<i>Pangasionodon microphthalmus</i>	Panga	supermercado
RF11	A060	<i>Pangasionodon microphthalmus</i>	Panga	supermercado
RF11	C006		Linguado	supermercado
RF11	C007		Linguado	supermercado
RF12	A016		linguado	Supermercado em Florianópolis
RF12	A017		linguado	Supermercado em Florianópolis
RF12	A020		filé de linguado	Supermercado Mundial
RF12	A021		filé de linguado	Supermercado Mundial
RF12	A026	<i>Limanda aspera</i>	Linguado (Limanda aspera)	Supermercado Mundial
RF12	A027	<i>Limanda aspera</i>	Linguado (Limanda aspera)	Supermercado Mundial
RF12	A035		Linguado	restaurante
RF12	A056		Linguado	Hirota (supermercado em SP)
RF12	A063		Linguado	Extra Tijuca
RF12	A064		Linguado	Extra Tijuca
RF13	A048		Filé de Linguado Graudo	Mercado de paixes Barra da Tijuca, RJ
RF13	A050		File de Linguado	Mercado de paixes Barra da Tijuca, RJ
RF13	A056		Filé de Linguado Graudo	Mercado de paixes Barra da Tijuca, RJ
RF13	A062		File de linguado especial	Mercado São Pedro, Niterói-RJ
RF13	A064		Filé de linguado	Mercado São Pedro, Niterói-RJ
RF13	A065		Filé de linguado	Mercado São Pedro, Niterói-RJ
RF13	B010		Linguado	Mercado São Pedro, Niterói-RJ
RF13	C006		Linguado	Costa Sul
RF13	C012		Linguado alabote	Dahuachem international economic and trade co

Amostra	Codigo	suposta ESPÉCIE	Nome vulgar	local de coleta
RF13	C037	<i>Limanda aspera</i>	Limanda aspera (Linguado)	lote: não informado; f: agosto 2013; v: agosto 2015
RENIMP	AC47	<i>Paralichthys brasiliensis</i>	Linguado	Barra de Rio Grande
RENIMP	AC51	<i>Paralichthys brasiliensis</i>	Linguado	Barra de Rio Grande
RENIMP	AC52	<i>Paralichthys brasiliensis</i>	Linguado	Barra de Rio Grande
RENIMP	AC54	<i>Paralichthys brasiliensis</i>	Linguado	Barra de Rio Grande
RENIMP	AC55	<i>Paralichthys brasiliensis</i>	Linguado	Barra de Rio Grande
RENIMP	RNP02	<i>Paralichthys brasiliensis</i>	Linguado	Mercado São Pedro, Niterói, RJ
RF12	A034		Linguado	restaurante
RF12	A049		linguado	Extra Ilha do Governador
RF12	A050		linguado	Extra Ilha do Governador
RF13	A047		Filé de Linguado	Mercado de paixes Barra da Tijuca, RJ
RF13	B012		Linguado	Mercado de paixes Barra da Tijuca, RJ
RF13	C007		Linguado	Costa Sul
RF13	C013		Linguado alabote	Dahuachem international economic and trade corp. [s
RF13	C036	<i>Limanda aspera</i>	Limanda aspera (Linguado)	lote: não informado; f: agosto 2013; v: agosto 2015

Durante a análise filogenética das amostras (veja abaixo), usamos também 5 amostras de supermercado de identidade desconhecida, para demonstrar a capacidade da técnica em identificá-las.

### 3.2 Etapas de laboratório

#### 3.2.1 Extração de DNA

A extração de DNA das amostras foi feita segundo o protocolo de “extração salina”, com os seguintes passos:

- 1) Lisar 20 mg de tecido de cada amostra em 500µl de tampão de lise (Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 1%; ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) 250 mM; Tris HCl 50 mM; pH 8.0), para a lise das células estudadas;
- (2) Adicionar 1 µl de RNase (=5 unidades) e incubar a 55°C, por 15 minutos, para degradação de RNA presente na amostra;
- (3) Adicionar 6µl de proteinase K (10 mg/ml), incubando a 55°C por 45 minutos para degradação de proteínas presentes na amostra;
- (4) Macerar o tecido com bastões plásticos, incubando a 55°C por 1 hora;
- (5) Centrifugar a 14.000 rpm por 15 minutos para retirada de restos celulares;
- (6) Transferir 500µl do sobrenadante para outro tubo e adicionar 300µl de NaCl 5M para precipitação de proteínas remanescentes;
- (7) Centrifugar novamente a 14.000 rpm por 15 minutos;

- (8) Transferir 500  $\mu$ l do sobrenadante para outro tubo e adicionar 500  $\mu$ l de isopropanol gelado, homogeneizando-se repetidas vezes e incubando a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 2 horas para precipitar o DNA;
- (9) Centrifugar novamente a 14.000 rpm por 15 minutos para que o DNA precipite;
- (10) Descartar o sobrenadante e adicionar 500  $\mu$ l de etanol 70% (gelado) para retirada de possíveis sobras de materiais celulares e de sal;
- (11) Centrifugar novamente a 14.000 rpm por 15 minutos e descartar o sobrenadante;
- (12) Deixar o tubo aberto em temperatura ambiente entre 4-8hs até secagem do DNA;
- (13) Diluir o DNA em 50  $\mu$ l de água ultra pura.

### 3.2.2 Amplificação do gene citocromo b por Reação em cadeia da polimerase (PCR)

As reações de PCR eram constituídas de 1 microlitro (20-50 nanomoles) de DNA amostral, 0,2 mM de primers (que são fragmentos de DNA que se ligam especificamente em uma determinada área do DNA, como iniciadores), 200mM de dNTP (que são nucleotídeos “livres”, que se ligarão à fita nascente de DNA), 2,5 mM de  $\text{MgCl}_2$  (o magnésio, que é co-fator da Taq-DNA polimerase), e 1 Unidade de Taq-DNA polimerase, em tampão de PCR fornecido pela fabricante (Promega) da Taq-polimerase. Esse mix é levado para o termociclador, onde são desenvolvidas as 3 etapas essenciais para a obtenção das cópias das fitas de DNA. Primeiramente, ocorre uma fase de desnaturação do DNA, onde a temperatura é elevada entre  $90-95^{\circ}\text{C}$ , paralisando qualquer reação natural e ocasionando a abertura das fitas do DNA, dispondo assim de fitas simples. Em uma segunda etapa, chamada de anelamento, os primers se ligam à fita de DNA formando uma marcação inicial. Nesse período, a temperatura precisa ser diminuída para aquela na qual os primers se anelam ao DNA de maneira específica. Se essa temperatura for alta demais, a eficiência da PCR será fraca; se for baixa demais haverá o anelamento dos primers em vários locais do DNA indesejados, resultando em bandas não específicas. Portanto, essa temperatura é crítica e específica para cada par de primers. Por último, temos a fase de polimerização, onde os nucleotídeos presentes no meio serão ligados pela Taq-DNA polimerase à fita de DNA simples, duplicando-a. O processo é repetido de 25-35 vezes, obtendo-se de  $2^{25}$  a  $2^{35}$  cópias das moléculas iniciais.

Foi amplificado por PCR o gene mitocondrial citocromo b (CitB), utilizando primers que foram desenhados especificamente para linguados, H15193 e L14778 (Sotelo et al 2001). As condições de termociclagem foram:  $95^{\circ}\text{C}$  por 3 minutos, 38 ciclos de  $94^{\circ}\text{C}$  por 45 segundos,  $53^{\circ}\text{C}$  por 30 segundos e  $72^{\circ}\text{C}$  por 40 segundos, seguidos de um ciclo de  $72^{\circ}\text{C}$  por 8 minutos, para extensão

final das cadeias (para garantir que todas estivessem do mesmo tamanho). Em todos os experimentos foram utilizados controles negativos (reações com todos os reagentes de PCR, mas sem o DNA inicial). Em seguida, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1% (100 mL de tampão TBE 0,5X (diluído), 1g de agarose e 2,5 µl de brometo de etídio), no qual foram depositadas as amostras, para a verificação dos produtos de PCR. Foi inoculado em cada poço do gel 2µl do produto de PCR e 3µl de tampão de carga (“*loading buffer*”). Também foi corrida, no mesmo gel, uma escada de massas moleculares de 1Kb (Promega). Após a carga do gel, ele foi submetido a eletroforese em tampão TBE 0,5X, durante 50 minutos, em 80V e 100mA (8W).

### 3.2.3 Purificação do produto de PCR

Para que seja possível fazer o sequenciamento direto dos produtos de PCR, é preciso realizar a etapa de purificação, para retirada dos reagentes usados, como dNTPs e primers. Para isso, 10 microlitros de cada produto do PCR foram misturados com 36 microlitros de bolinhas magnéticas recobertas com um suporte de alta afinidade ao DNA (Beckman Coulter, Agencourt). Os produtos de PCR se fixam às bolinhas, que são lavadas duas vezes com 0,145 ml de etanol 70%. Esse procedimento é realizado com o auxílio de um robô EpMotion 5075 da Eppendorf. O produto final, após as lavagens, é seco em um termocicladora 85°C, durante 5 minutos, e logo após, misturado a 40ml de água MiliQ, onde 35 microlitros são separados para a reação de sequenciamento pelo método do di-deóxido (Sanger).

### 3.2.4 Sequenciamento de DNA

Para reação de sequenciamento, adiciona-se 2 microlitros de primer e 4 µl de reação de Big Dye (composta por 25% de reagente Big Dye (Applied Biosystems); 37,5% de água MiliQ e 37,5% de tampão), para cada 4 microlitros de produto de PCR purificado. Leva-se o mix para um termociclador, com o seguinte programa: (que passará por 25 ciclos)

**Tabela 6: Ciclos para o mix de reação para sequenciamento.**

	Estadio 1	Estadio 2	Estadio 3
Temperatura	96 °C	53°C	60 °C
Tempo	10’’	30’’	4'

Para a purificação da reação de sequenciamento, são adicionados 80 microlitros de Isopropanol p.a. 65% em cada reação de sequenciamento. Deixa-se a reação descansar por 30 minutos, antes



de levar para centrífuga, por 40 minutos/ 4°C e 4500 g. Descarta-se o sobrenadante e adiciona-se 200 microlitros de etanol 60 %, levando para centrífuga novamente, durante 20 minutos / 4°C e 4500 g. Retira-se as amostras da centrífuga, descarta-se o sobrenadante, e centrifugam-se as amostras por 1 minuto / 4°C e 600 g. Seca-se o produto final no termociclador, a 85°C, durante 5 minutos. Segue-se com a etapa de desnaturação com 10 microlitros formamida Hi-Di (Applied Biosystems) e é dado um choque térmico, levando-se ao termociclador a 95°C, por 5 minutos e transferindo imediatamente as amostras para uma cuba congelada, durante 2 minutos, para manter as fitas de DNA simples. Utilizando-se um sequenciador 3500 Hitachi e o polímero Pop7, os fragmentos gerados durante o sequenciamento são separados por eletroforese capilar de alta resolução com detecção por fluorescência.

### 3.3 Análises de dados

#### 3.3.1 Edição de sequencias

Cada sequenciamento foi feito nos sentidos forward e reverso (ou seja, as duas fitas do DNA foram sequenciadas, permitindo uma maior precisão), gerando arquivos com curvas de picos de cada nucleotídeo (“eletroferogramas” ou “cromatogramas”). Com esses arquivos, realizaram-se observações pelo programa SeqMan, onde as extremidades não-identificáveis, picos duplos e ambiguidades foram vistas com mais atenção e quando necessário, alteradas. A edição, alinhamento e sobreposição das duas sequencias gera uma sequencia consenso chamada contig. Todas as amostras passaram por essa ação, sendo que algumas poucas amostras foram editadas diretamente no MEGA 6.0.

#### 3.3.2 Alinhamento

Todos os alinhamentos foram realizados no programa MEGA6 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0), um programa de análise molecular que visa estudar filogenia/história evolutiva. Foram feitos alinhamentos múltiplos (usando as condições padrão do programa: Alinhamento dos nucleotídeos e alinhamento múltiplo: penalidade de abertura de gaps=15, penalidade de extensão de gap=6,66; Peso da matriz de DNA=IUB e peso de transição=0,5; sem uso de Matriz negativa e máximo de divergência aceitável de 30%)

#### 3.3.3 Desenho de um método rápido de identificação, via PCR/RFLP

Após o alinhamento, as sequências foram analisadas no programa Geneious, onde foram buscadas enzimas de restrição, que fragmentassem o DNA do maior número de espécies de linguagens possível e de pangas em formas distintas, possibilitando uma separação entre amostras de espécies diferentes. No Geneious, foram feitos novos alinhamentos, bem como sítios de restrição e dois gaps de aminoácidos. A enzima de restrição que melhor gerou fragmentos diagnósticos entre as espécies estudadas foi a Taq1, com a qual conseguimos diferenciar espécies

como *Paralichthys brasiliensis*, *P. patagonicus*, *P. isosceles*, *P. orbignianus*, *Pangasius*, *Hippoglossus stenolepis*, *Urophycis tenuis*, *U. stellatus*, *P. olivaceus*, *Atheresthes stomias* e *Limanda aspera*.

### **Pontos de corte (gel virtual)**

#### **Taq1**

**97, 353** = *P. brasiliensis*, *P. patagonicus*

**97, 152, 199** = *P. isosceles* e *P. orbignianus*

**209, 243** = pangasius

**93, 170, 156** = *Hippoglossus stenolepis*

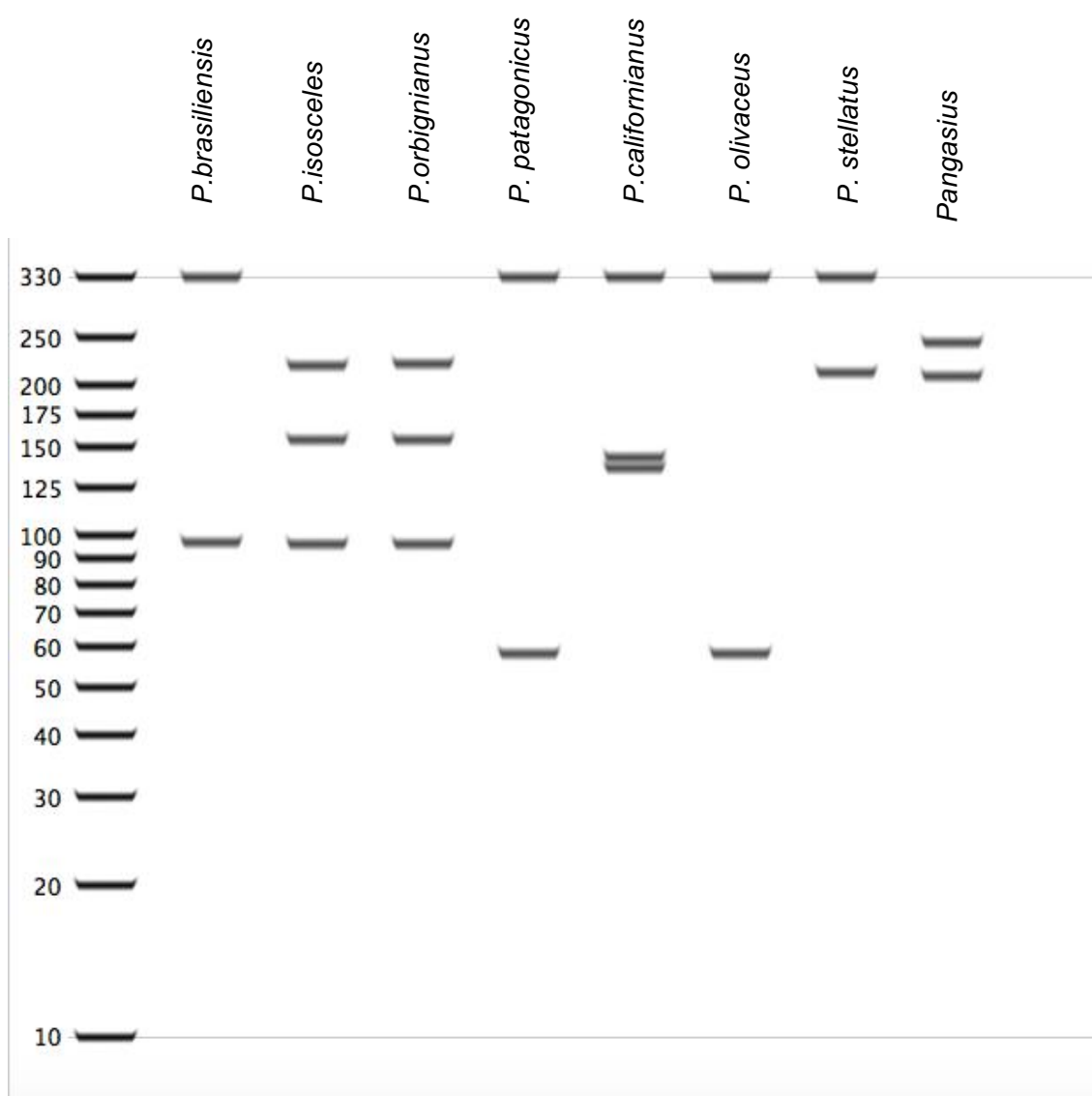
**206, 215** = *Urophycis tenuis*

**212, 331** = *P. stellatus*

**58, 390** = *P. olivaceus*

**126, 323** = *Atheresthes stomias*

Não corta = *Limanda aspera*



Gel Virtual de digestão com TaqI de linguados do gênero *Paralichthys* e bagres do gênero *Pangasius*



### 3.3.4 Filogenética

Foi montada uma árvore filogenética com sequências obtidas durante o presente trabalho além de algumas que foram retiradas do banco de dados GENBANK, com as quais foram comparadas empregando metodologia padrão em análises forenses. Essa metodologia inclui a comparação das sequências através de distâncias gênicas Kimura 2 parâmetros, e uso da matriz de distâncias para a construção da árvore através do algoritmo Neighbor Joining.

## 4 Resultados

### 4.1 Amostras

Todas as amostras tiveram seu DNA extraído e foram amplificadas por PCR como descrito em M&M. Das 67 amostras analisadas, foram obtidas sequências para 56 das seguintes espécies de linguado: *Paralichthys brasiliensis*, *P. patagonicus*, *P. isosceles*, *P. orbignianus*, *Pangasius hypophthalmus*, *Hippoglossus stenolepis*, *Urophycis tenuis*, *U. stellatus*, *U. olivaceus*, *Atheresthes stomias* e *Limanda aspera*.

### 4.2 Análises

#### 4.2.1 Análises moleculares

Após o sequenciamento das amostras, foi realizado, no programa MEGA06, o alinhamento das sequências. Foram acrescentadas sequências conhecidas de *Pangasius*, para uma melhor observação das diferenças entre as espécies (figuras 1A-1C).

Figura 1a: Alinhamento de sequências de citocromo b, mostrando diferença entre as diferentes espécies de linguados (*Paralichthys brasiliensis*, *P. isosceles* e *P. orbignianus*) e panga (*Pangasius*).

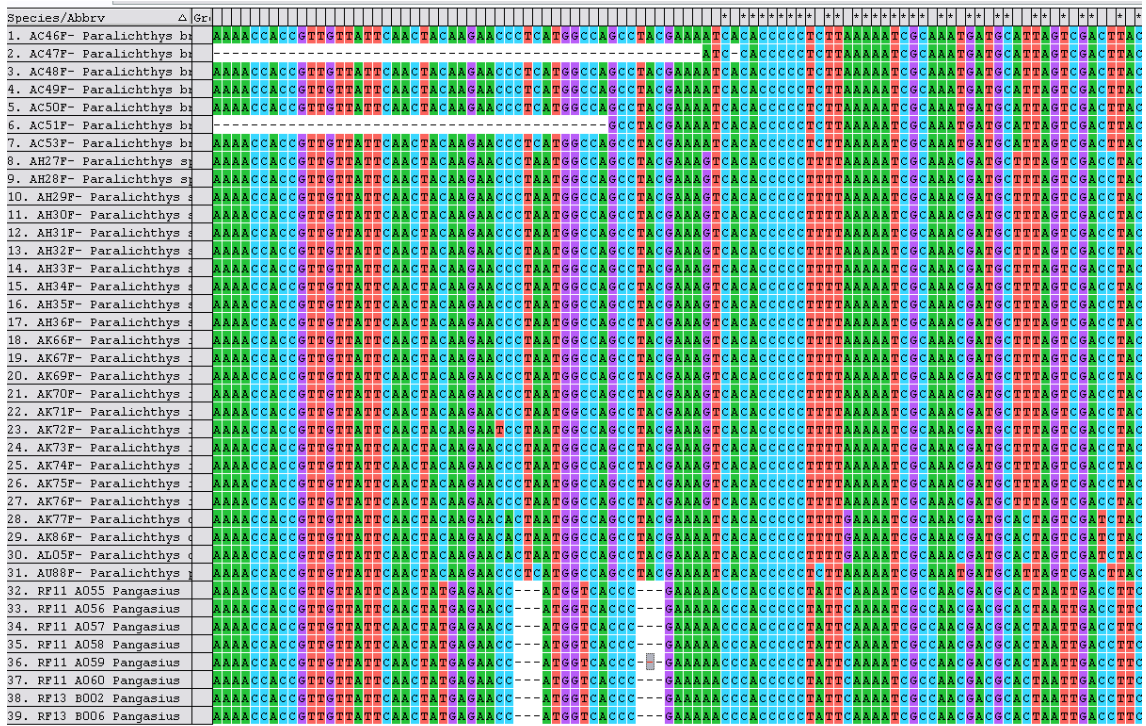
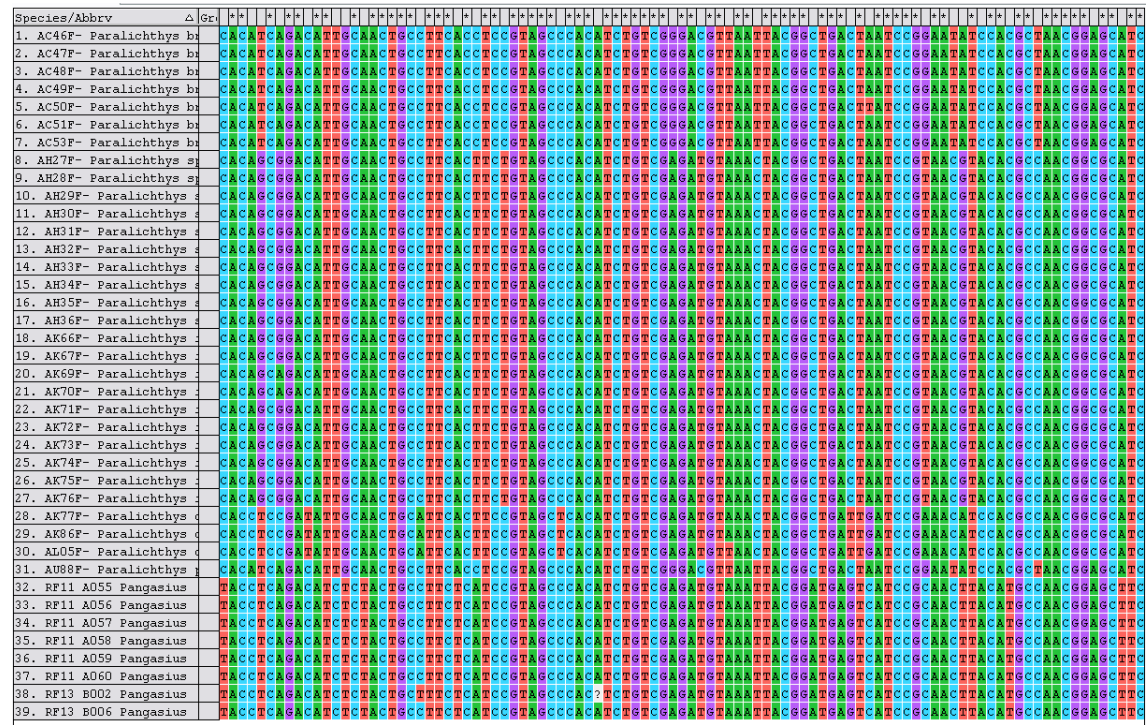


Figura1b: Outra parte do alinhamento de sequencias de citocromo b.





<b>Amostra</b>	<b>Codigo</b>	<b>Nome vulgar</b>	<b>Especie molecular</b>
Ling01	Ling01	Linguado "Mania de Pescados"	<i>Atheresthes stomias</i>
Ling02	Ling02	"Linguado"	<i>Paralichthys patagonicus</i>
Ling03	Ling03	"Filé de alabote" Boa Pesca	<i>Atheresthes stomias</i>
Ling04	Ling04	"Linguado"	<i>Hippoglossus stenolepis</i>
Ling06	Ling06	"Filé de Linguado" Frescato	<i>Atheresthes stomias</i>
RENIMP	AC46	Linguado	<i>Paralichthys brasiliensis</i>
RENIMP	AC48	Linguado	<i>Paralichthys brasiliensis</i>
RENIMP	AC49	Linguado	<i>Paralichthys brasiliensis</i>
RENIMP	AC50	Linguado	<i>Paralichthys brasiliensis</i>
RENIMP	AC53	Linguado	<i>Paralichthys brasiliensis</i>
RENIMP	AH27	Linguado	<i>Paralichthys isosceles</i>
RENIMP	AH28	Linguado	<i>Paralichthys isosceles</i>
RENIMP	AH29	Linguado	<i>Paralichthys isosceles</i>
RENIMP	AH30	Linguado	<i>Paralichthys isosceles</i>
RENIMP	AH31	Linguado	<i>Paralichthys isosceles</i>
RENIMP	AH32	Linguado	<i>Paralichthys isosceles</i>
RENIMP	AH33	Linguado	<i>Paralichthys isosceles</i>
RENIMP	AH34	Linguado	<i>Paralichthys isosceles</i>
RENIMP	AH35	Linguado	<i>Paralichthys isosceles</i>
RENIMP	AH36	Linguado	<i>Paralichthys isosceles</i>
RENIMP	AK66	Linguado	<i>Paralichthys isosceles</i>
RENIMP	AK67	Linguado	<i>Paralichthys isosceles</i>
RENIMP	AK69	Linguado	<i>Paralichthys isosceles</i>
RENIMP	AK70	Linguado	<i>Paralichthys isosceles</i>
RENIMP	AK71	Linguado	<i>Paralichthys isosceles</i>
RENIMP	AK72	Linguado	<i>Paralichthys isosceles</i>
RENIMP	AK73	Linguado	<i>Paralichthys isosceles</i>
RENIMP	AK74	Linguado	<i>Paralichthys isosceles</i>
RENIMP	AK75	Linguado	<i>Paralichthys isosceles</i>
RENIMP	AK76	Linguado	<i>Paralichthys isosceles</i>
RENIMP	AK77	Linguado	<i>Paralichthys orbignyana</i>
RENIMP	AK86	Linguado	<i>Paralichthys orbignyana</i>
RENIMP	AL05	Linguado	<i>Paralichthys olivaceus</i>
RENIMP	AU88	Linguado	<i>Paralichthys orbignyana</i>

Tabela 7. Nomes vulgares e identificações obtidas a partir dos sequenciamentos do gene do citocromo b das amostras analisadas (Cont)



<b>Amostra</b>	<b>Código</b>	<b>Nome vulgar</b>	<b>Especie molecular</b>
RF11	A059	Panga	<i>Pangasionodon microphthalmus</i>
RF11	A060	Panga	<i>Pangasionodon microphthalmus</i>
RF11	C006	Linguado	<i>Pleuronectes platessa</i>
RF12	A016	linguado	<i>Paralichthys olivaceus</i>
RF12	A017	linguado	<i>Paralichthys olivaceus</i>
RF12	A020	filé de linguado	<i>Atheresthes stomias (alabote dente curvo)</i>
RF12	A021	filé de linguado	<i>Atheresthes stomias (alabote dente curvo)</i>
RF12	A056	Linguado	<i>Aluterus monoceros (baiacú)</i>
RF12	A063	Linguado	<i>Hippoglossus stenolepis (Alabote do Pacífico)</i>
RF12	A064	Linguado	<i>Rhinecanthus aculeatus (baiacú)</i>
RF13	A048	Filé de Linguado Graudo	<i>Paralichthys patagonicus</i>
RF13	A050	File de Linguado	<i>Urophycis tenuis (Merluza branca)</i>
RF13	A056	Filé de Linguado Graudo	<i>Hippoglossus stenolepis (Alabote do Pacífico)</i>
RF13	A062	File de linguado especial	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>
RF13	A064	Filé de linguado	<i>Hippoglossus stenolepis (Alabote do Pacífico)</i>
RF13	A065	Filé de linguado	<i>Paralichthys patagonicus</i>
RF13	B010	Linguado	<i>Hippoglossus stenolepis (Alabote do Pacífico)</i>
RF13	C006	Linguado	<i>Paralichthys patagonicus</i>
RF13	C037	Limanda aspera	<i>Limanda aspera</i>
RENIMP	AC47	Linguado	<i>Paralichthys brasiliensis</i>
RENIMP	AC51	Linguado	<i>Paralichthys brasiliensis</i>
RENIMP	AC54	Linguado	<i>Paralichthys patagonicus</i>

O resultado do alinhamento de DNA mostra uma pequena diferença entre as diversas espécies de linguados, e uma diferença bem mais marcante entre os linguados e *Pangasius*. Essa parte do processo mostra que é possível diferenciar linguados e pangas através do sequenciamento de DNA, que é o ponto de partida para o desenvolvimento de métodos mais rápidos e econômicos. Apesar da necessidade de realizar um sequenciamento inicial, onde serão armazenadas as sequências estudadas, para a possibilidade de uma possível comparação futura, com o método desenvolvido, após obter as sequências, pode-se realizar apenas uma digestão com enzimas de restrição (RFLP), processo bem mais rápido e barato que o sequenciamento.

#### 4.2.2 Análises filogenéticas

Após a realização da eletroforese, com a intenção de testar a eficácia do método criado, as sequências foram reanalisadas, agora no programa de análise molecular Geneious. A árvore filogenética obtida abrange várias espécies de linguados, onde conseguimos observar a separação de diferentes táxons (Figura 2), mostrando que a abordagem por sequenciamento funcionava bem para identificar essas espécies.

Uma vez ficou clara a capacidade da metodologia para separar as espécies, foi feita uma segunda árvore, onde foram acrescentadas 5 amostras obtidas na forma de filés em super-mercados. Nela, pode-se observar a forma como as amostras se ligaram a diferentes grupos de linguados, indicando sua identidade taxonômica (Figura 3).

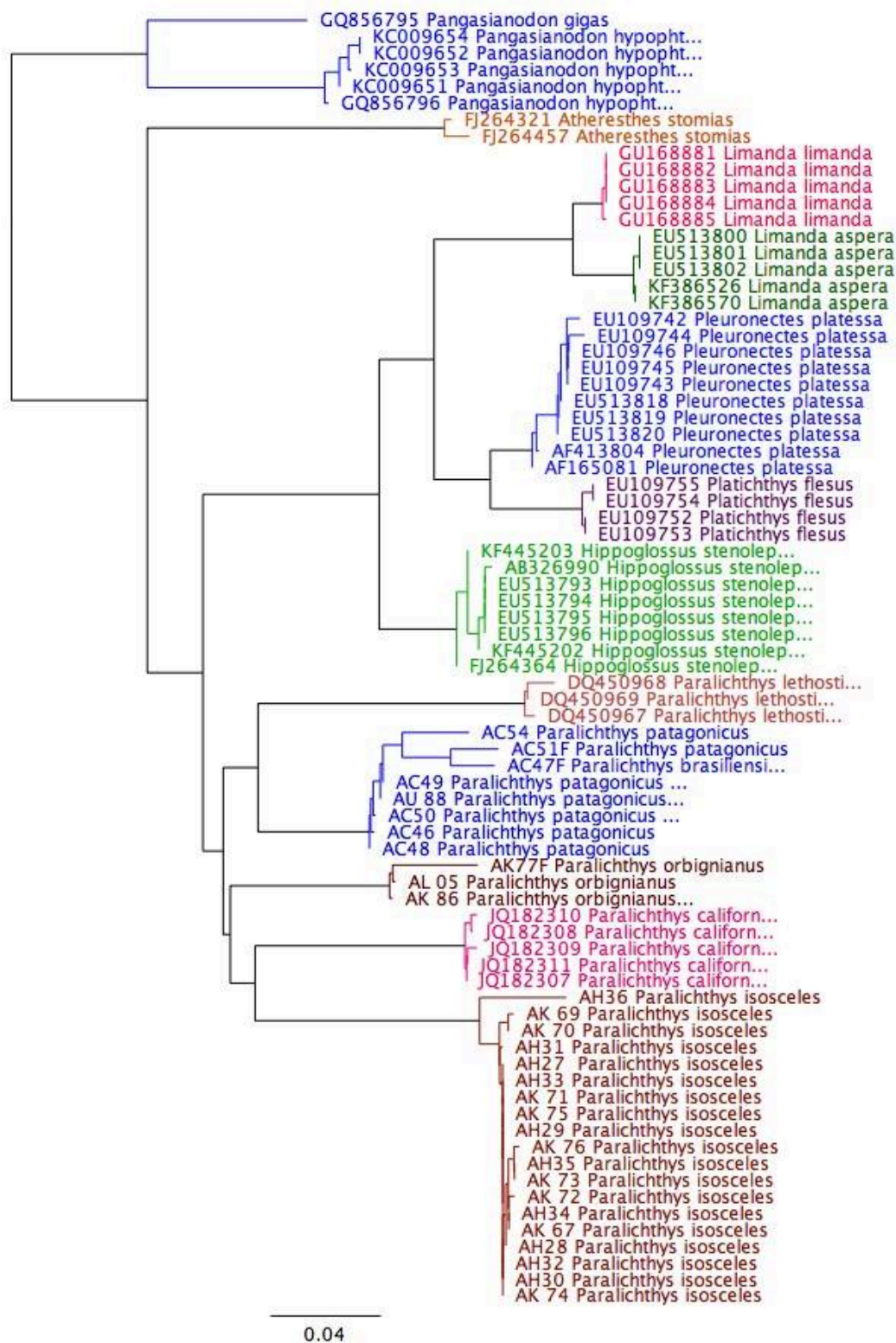


Figura 2. Árvore filogenética baseada em sequencias de citocromo b de linguados e pangas. Amostras com códigos iniciados com duas letras e dois números são sequencias produzidas nesta monografia. As demais foram obtidas do banco de dados GenBank.

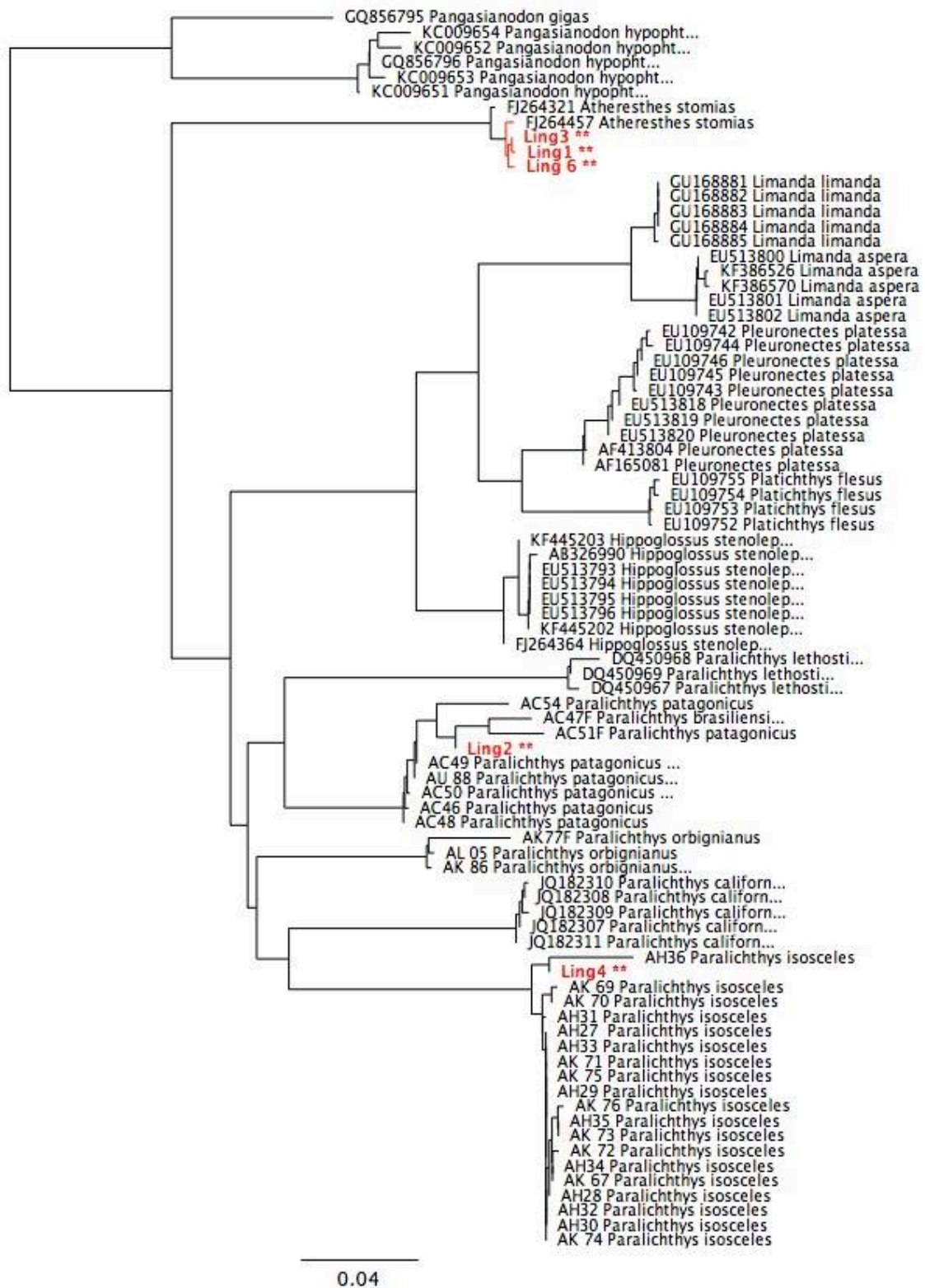


Figura 3. Árvore filogenética semelhante à anterior (fig. 2), com a adição de sequências de espécimes de supermercados (codificadas como LingNN e marcadas em vermelho).



A partir da observação de que as espécies se diferenciavam facilmente com as sequencias estudadas, procuramos desenvolver um sistema diagnóstico que permitisse identificar as espécies, em particular em relação ao panga, de maneira mais rápida e barata. Para isso, foi escolhida a enzima de restrição que melhor se adaptaria com o objetivo do trabalho, ou seja, aquela que cortasse de modo discriminante entre as várias espécies. A enzima que se mostrou mais eficiente foi a TaqI com os padrões de corte apresentados na sessão de M&M.

Apesar da enzima escolhida realizar um corte semelhante entre algumas espécies de linguados, o objetivo principal, que seria a distinção entre linguados e pangas, foi realizado.

Após a escolha da enzima, foram escolhidas duas amostras de cada uma de quatro espécies de *Paralichthys*, duas amostras de panga e da espécie exótica *Hippoglossus stenolepis*, para se realizar um teste inicial do funcionamento da metodologia.

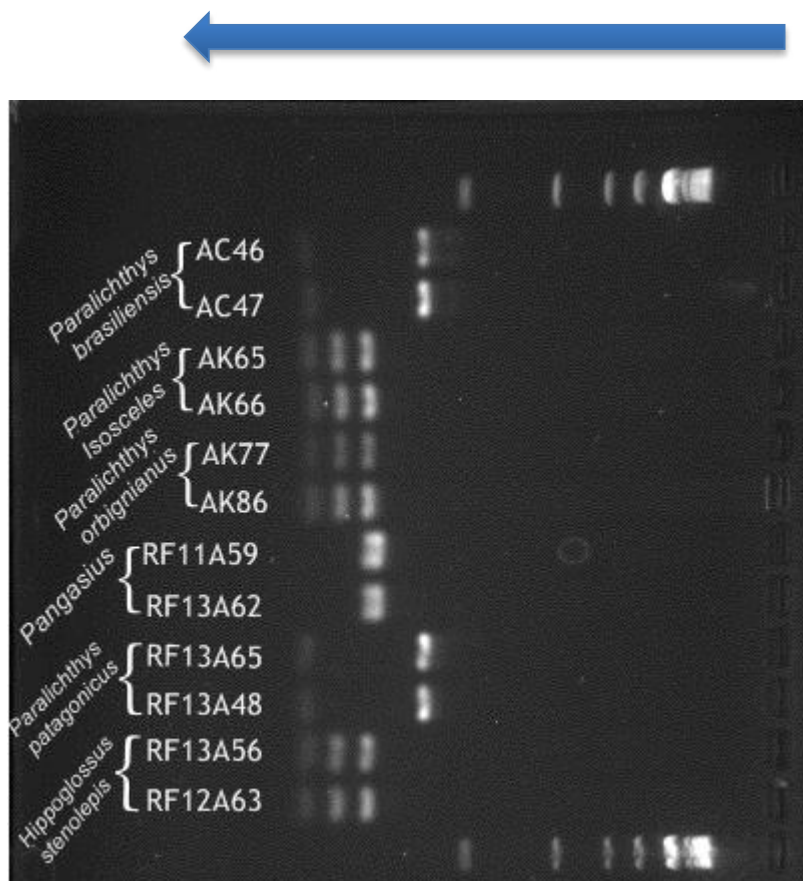


Figura 4. Gel- RFLP teste de 12 amostras de linguados. A seta indica o sentido da corrida eletroforética.

A partir da Figura 4, podemos concluir que o padrão de cortes com a enzima de restrição TaqI consegue separar diferentes espécies de linguados, assim como já era o esperado pela análise de suas sequencias.



Podemos observar, seguindo o padrão de cortes de cada espécie, que as duas primeiras amostras (AC46 e AC47) seriam exemplares de *Paralichthys brasiliensis*, devido à apresentação de duas bandas, uma de cerca de 353pb, e outra de aproximadamente 97 pb. Já as duas próximas (AK65 e AK66), seriam *Paralichthys isosceles*, com 3 bandas, uma de 199 pb, outra de 102 pb e a última com 97 pb. A quinta e a sexta amostras (AK77 e AK86), também apresentaram 3 bandas, uma de 199 pb, outra de 102 pb e a última com 97 pb, da mesma forma que *P. isosceles*, porém provinham de exemplares de *Paralichthys orbignianus*. A sétima e a oitava amostras (RF11 A59 e RF13 A62) apresentam duas bandas, uma de 243 e outra de 209 pb, caracterizando um exemplar de *Pangasius*. As amostras seguintes (RF13 A65 e RF13 A48), com duas bandas, uma de aproximadamente 353 pb e outra de 97 pb, se mostraram *Paralichthys patagonicus*. E as duas últimas amostras (RF13 A56 e RF13 A63), com 3 bandas, uma de 170, outra de 156 e uma última com 93, se caracterizaram *Hippoglossus stenolepis*.

## 5 Discussão

Os resultados desta monografia demonstram ser possível fazer a identificação molecular de filés de linguado não só pelo sequenciamento de DNA, mas também, de uma maneira mais rápida e barata pelo uso de enzima de restrição. O kit de identificação aqui desenvolvido, baseado na digestão por enzimas de restrição do DNA amplificado por PCR, será útil e poderá ser aplicado por outros laboratórios em outros locais do Brasil para o controle de qualidade do pescado comercializado.

A fraude com frutos do mar é uma realidade cada vez mais presente, e métodos de identificação molecular, como o desenvolvido pelo presente trabalho, que usam metodologias baseadas na análise do DNA podem ser de grande importância comercial. Esses métodos buscam realizar uma identificação correta, da forma mais rápida e econômica possível, diminuindo assim casos defraudes com pescados. Muitas vezes, após um processo de industrialização, pescados de espécies diferentes podem não mais serem distinguidos morfologicamente, mesmo que possuam características físicas totalmente distintas (Figura 5).

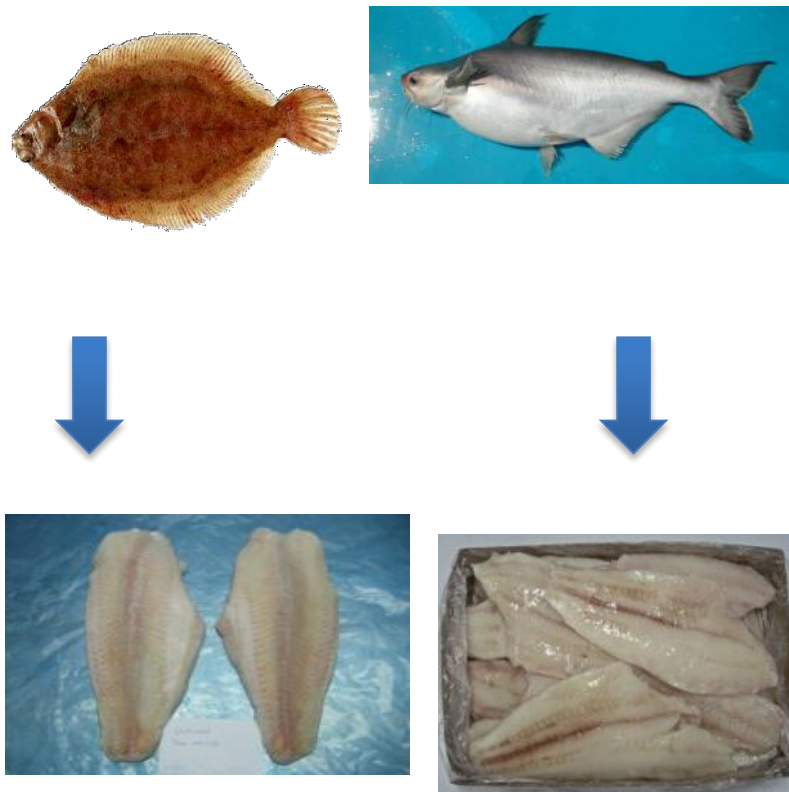


Figura 5. Peixes muito diferentes, como o linguado e o panga, podem apresentar semelhanças quando em formas processadas industrialmente.

No levantamento de identificação das amostras de linguados já contidas no banco de dados da RENIMP, amostras obtidas em supermercados e peixarias, observamos que, além das fraudes com *Pangasius*, outras espécies também foram encontradas, erroneamente rotuladas como linguados (*Paralichthys*).

<b>Suposta espécie</b>	<b>Identificação molecular</b>
Linguado (x2)	<i>Paralichthys olivaceus</i>
Filé de linguado (x2)	<i>Atheresthes stomias</i> (alabote dente curvo)
Filé de Linguado Graúdo (x4)	<i>Hippoglossus stenolepis</i> (alabote do Pacifico)
File de linguado <b><u>Especial (x1)</u></b>	<b><u><i>Pangasianodon hypophthalmus</i> (Panga)</u></b>
Filé de Linguado Graúdo (x3)	<i>Paralichthys patagonicus</i>
File de Linguado (x1)	<b><u><i>Urophycis tenuis</i> (Merluza branca)</u></b>
Linguado (x1)	<b><u><i>Aluterus monoceros</i> (Peixe porco)</u></b>
Linguado (x1)	<b><u><i>Rhinecanthus</i> sp</u></b>

### 5.1 Comparação de resultados

A análise filogenética das sequências das amostras mostrou que elas podiam ser facilmente separadas, permitindo a identificação não-ambígua de amostras desconhecidas. Das amostras analisadas, cerca de 24% apresentaram diferenças entre a denominação do rótulo e a identificação molecular (tabela 2), constituindo-se, portanto, rotulagens equivocadas ou fraudulentas na sua comercialização. Essa taxa de erro é semelhante àquela observada por Wong e colaboradores (2008) com amostras de pescado nos EUA e Canadá, onde foram analisadas 91 amostras das quais

23 (25%) ficaram em suspeita de fraude. O estudo apontou que o peixe ameaçado pargo vermelho (*Lutjanus campechanus*) como a espécie que mais sofria rotulagem errada, em Nova Iorque, de nove amostras estudadas, sete estavam identificadas erroneamente. Em relação à substituição, o estudo observou o aparecimento de cinco espécies diferentes que eram intencionalmente ou não, rotuladas de forma equivocada (Wong *et al.*, 2008).

No estado do Pará, onde foram analisadas amostras comercializadas como "pescada branca", foi observada uma alta taxa de fraude. O estudo utilizou dois critérios para avaliação. No primeiro comparavam-se as amostras com a identificação normalmente associada ao nome "pescada branca" *Cynoscion leiarchus*, e no segundo considerou-se a possibilidade de que o nome designasse o peixe normalmente denominado "corvina de água doce" *Plagioscion squamosissimus*. No primeiro caso, a fraude seria de 100%, e usando-se o segundo critério a fraude seria de 76,6%. O trabalho apontou ainda que em análise de 17 lotes, cerca de 82% apresentavam misturas de espécies na embalagem e ainda em 53% do total dessa análise, não apresentavam "pescada branca" (De Brito *et al.*, 2015).

Outro estudo realizado com amostras de mercados italianos, analisou tecidos de tubarões identificados como "Palombo". Obteve-se como resultado a presença de fraude com pescados, onde de 45 amostras analisadas e identificadas comercialmente como "Palombo", apenas 3 poderiam ser assim consideradas de forma correta. De modo geral, o estudo identificou 35 (78%) casos de rotulagem errada (Barbuto *et al.*, 2010).

## 5.2. Como o método será útil?

A abordagem molecular para identificação, portanto, é muito eficaz e cada vez mais usada no mundo todo. Através desse tipo de metodologia será possível uma fiscalização contínua e eficaz, para evitar fraudes pesqueiras. Como foi anteriormente citado, os problemas com uma identificação errada vão além da questão financeira: englobam saúde pública e até prejuízo em outras espécies, uma vez que essas são por vezes, usadas como iscas, por exemplo, ou durante períodos de defeso, comercializadas como se fossem espécies permitidas.

Como abordagem foco do presente trabalho, a metodologia desenvolvida poderá auxiliar em análises que busquem identificar através de métodos moleculares, amostras de peixes linguados, diferenciando do peixe tipo panga, e ainda possibilitando a distinção entre espécies diferentes de linguados.

## 6 Conclusão

O método desenvolvido nesta monografia se mostrou eficaz na separação das espécies de linguados e na separação em relação aos pangas. O sistema diagnóstico por PCR-RFLP, usando a enzima de restrição TAQ 1, conseguiu diferenciar linguados e pangas. Isso concede ao governo/comércio uma alternativa de identificação molecular, auxiliando assim qualquer tipo de monitoramento contra fraude.

Pretende-se realizar experimentos futuros com um número maior de espécies, além de realizar mais testes com amostragens de mercados. Nesse caso, seriam feitos testes cegos, onde mais uma vez o sistema aqui desenvolvido seria testado.

## 7 Referências

APRENDENDO A EXPORTAR. Disponível em: <http://www.aprendendoaexportar.gov.br/pescados/sitio/o-setor-de-pescados/perfil-do-setor/o-mar-brasileiro/pp-linguado.php>. Acessado em: Outubro. 2016. XIII

BARBUTO, M.; GALIMBERTI, A.; FERRI, E.; LABRA, M; MALANDRA, R.; GALLI, P.; CASIRAGHI M. DNA barcoding reveals fraudulent substitutions in shark seafood products: The Italian case of “palombo” (*Mustelus* spp.). *Food Research International* 43 (2010) 376–381.

CANAL DO PISCICULTOR. Disponível em: <http://canaldopiscicultor.com/noticia/240/panga-o-milagre-da-multiplicacao>. Acessado em: Julho. 2015. XXIX **19:22**

CAWTHORN, Donna-Mareè; STEINMAN, Harris Andrew; WITTHUHN, R. Corli. DNA barcoding reveals a high incidence of fish species misrepresentation and substitution on the South African market. *Food Research International* 46 (2012) 30–40.

CLARK, Lisa F. The current status of DNA barcoding technology for species identification in fish value chains. *Food Policy* 54 (2015) 85–94.

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

CUNHA, Haydèe A.; SILVA, Vera M. F.; SANTOS, Teresa E. C.; MOREIRA, Stella M.; CARMO, Nívia A. S. do; SOLE-CAVA, Antonio M. When you get what you haven't

paid for: Molecular identification of “Douradinha” fish fillets can help end the illegal use of River Dolphins as bait in Brazil. *Journal of Heredity*, 106 (2016): 565-572.

DAWNAY, Nick; OGDEN, Rob; MCEWING, Ross; CARVALHO, Gary R; THORPE, Roger. Validation of the barcoding gene COI for use in forensic genetic species identification. *Forensic Science International* 173 (2007) 1–6.

DE BRITO, Mayara Alves; SCHNEIDER, Horacio; SAMPAIO, Iracilda; SANTOS, Simoni. DNA barcoding reveals high substitution rate and mislabeling in croaker fillets (*Sciaenidae*) marketed in Brazil: The case of “pescada branca” (*Cynoscion leiarchus* and *Plagioscion squamosissimus*). *Food Research International* 70 (2015) 40–46.

DI PINTO, Angela; MARCHETTI, Patrizia; MOTTOLA, Anna; BOZZO, Giancarlo; BONERBA, Elisabetta; CECI, Edmondo; BOTTARO, Marilisa; TANTILLO, Giuseppina. Species identification in fish fillet products using DNA barcoding. *Fisheries Research* 170 (2015) 9–13.

EBO, DG; KUEHN, A; BRIDTS, CH; HILGER, C; Hentges, F; STEVENS, WJ. Monosensitivity to *Pangasius* and *Tilapia* Caused by Allergens Other Than Parvalbumin. *J Investig Allergol Clin Immunol* 20(2010) 84-88.

FILONZI, Laura; CHIESA, Sthefania; VAGHI, Marina; MARZANO, Francesco Nonnis. Molecular barcoding reveals mislabelling of commercial fish products in Italy. *Food Research International* 43 (2010) 1383–1388.

FIPERJ. Relatório Final 2014. FUNDAÇÃO INSTITUTO DE PESCA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO. Rio de Janeiro, Brasil. 2014.

GALAL-KHALLAF, Asmaa; ARDURA, Alba; MOHAMMED-GEBA, Khaled; BORREL, Yaisel J.; GARCIA-VAZQUEZ, Eva. DNA barcoding reveals a high level of mislabeling in Egyptian fishfillets. *Food Control* 46 (2014) 441-445.

GONÇALVES, Julia Gomes; CRUZ, Anete Lira; BRYANT, Maia M. Martinez; KUHLMANN, Melissa; ANDRADE, Stelamares Boyda. Avaliação do percentual de congelamento de pescados comercializados em Lauro de Freitas – BA. *Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2013, V. 11, n. 3, p. 57, 2013.

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO. Disponível em: [http://www.pesca.sp.gov.br/noticia.php?id\\_not=13804](http://www.pesca.sp.gov.br/noticia.php?id_not=13804). Acessado em: Setembro. 2016. XXVII(16:40)

FISHBASE. Disponível em: <http://www.fishbase.org/identification/SpeciesList.php?genus=Paralichthys>. Acessado em: Dezembro. 2016. XII

MENDONÇA, Pablo; ARAUJO, Francisco Gerson. Composição das populações de linguados (Osteichthyes, Pleuronectiformes) da Baía de Sepetiba, Rio de Janeiro, Brasil. Laboratório de Ecologia de Peixes, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Revista Brasileira de Zoologia 19 (2002) 339 - 347.

MPA. Boletim estatístico da pesca e aquicultura, Brasil 2008-2009. Ministério da Pesca e Aquicultura, Brasil. 2009.

MPA. Boletim estatístico da pesca e aquicultura, Brasil 2011. Ministério da Pesca e Aquicultura, Brasil. 2011.

NELSON, J. S. Fishes of the world, 4 edition. Hoboken, New Jersey. John Wiley & Sons, Inc. 2006

ORGANIZAÇÃO DE CONSUMIDORES E USUÁRIOS. Disponível em: <http://www.ocu.org/alimentacion/seguridad-alimentaria/noticias/pescado-tilapia-panga>. Acessado em: Março. 2016. XXVI (26/03/2016- 00:59)

O SOL DIÁRIO. Disponível em: <http://osoldiario.clicrbs.com.br/sc/seguranca/noticia/2014/04/investigacao-aponta-que-empresas-lucrariam-ate-tres-vezes-mais-que-valor-real-com-fraudes-em-pescados-4471019.html>. Acessado em: Setembro. 2016. XXVII (16:47)

SEAFOOD BRASIL HOME. Disponível em: <http://seafoodbrasil.com.br/vietna-muda-lei-e-promete-melhorar-exportacoes-de-panga/>. Acessado em: julho. 2015. XXIX 29/07/15, 19:45

SEAFOOD BRASIL HOME. Disponível em: <http://seafoodbrasil.com.br/suspensa-importacao-de-pescados-vietna/>. Acessado em: Outubro. 2016. XI 11 10 2016- 02:04

SEAFOOD BRASIL HOME. Disponível em: <http://seafoodbrasil.com.br/vem-ai-enxurrada-de-panga-vietna-assume-compromisso-e-e-liberado-pelo-mpa/>. Acessado em: Outubro. 2016. XI 11 10 2016- 02:12

SOTELO,CG1, Calo-Mata P, Chapela MJ, Pérez-Martín RI, Rehbein H, Hold GL, Russell VJ, Pryde S, Quinteiro J, Izquierdo M, Rey-Méndez M, Rosa C, Santos AT. Identification of fish (*Pleuronectiformes*) species using DNA-Based techniques. Food Chen 49 (2011) 4562-4569.

ULRICH, Robert M.; JOHN, David E.; BARTON, Geran W.; HENDRICK, Gary S.; FRIES, David P.; PAUL, John H. A handheld sensor assay for the identification of grouper as asafeguard against seafood mislabeling fraud. *Food Control* 53 (2015) 81-90.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO. Disponível em: <https://ufrj.br/noticia/2015/10/22/mapeamento-de-peixes-contrafraudes>. Acessado em: Setembro. 2016. XXVII (16:55)

WONG, Eugene H.-K. & HANNER, Robert H. DNA barcoding detects market substitution in North American seafood. *Food Research International* 41 (2008) 828–837.