

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO UNIVERSITÁRIO NORTE DO ESPÍRITO SANTO  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - BACHARELADO**

**BARCODING E RELAÇÕES DE DISTÂNCIA  
GENÉTICA ENTRE PEIXES DA FAMÍLIA  
ACHIRIDAE (TELEOSTEI:  
PLEURONECTIFORMES) NO LITORAL SUL DA  
BAHIA E NORTE DO ESPÍRITO SANTO**

**GABRIELA BRAZ LIUTH**

**São Mateus/ES  
Setembro/2024**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO UNIVERSITÁRIO NORTE DO ESPÍRITO SANTO  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - BACHARELADO**

**BARCODING E RELAÇÕES DE DISTÂNCIA  
GENÉTICA ENTRE PEIXES DA FAMÍLIA  
ACHIRIDAE (TELEOSTEI:  
PLEURONECTIFORMES) NO LITORAL SUL DA  
BAHIA E NORTE DO ESPÍRITO SANTO**

**GABRIELA BRAZ LIUTH**

Monografia de conclusão de curso apresentada ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de BACHAREL EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS.

Orientador (a): Prof.<sup>a</sup> Dra. Ana Paula Cazerta Farro da Rosa

**São Mateus/ES  
Setembro/2024**




UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO UNIVERSITÁRIO NORTE DO ESPÍRITO SANTO

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: Gabriela Braz Liuth

Título: *Barcoding* e relações de distância genética entre peixes da família Achiridae (Teleostei: Pleuronectiformes) no litoral sul da Bahia e norte do Espírito Santo"

Monografia do Curso de Ciências Biológicas (Bacharelado)  
Defendida e aprovada em 18/09/2024

  
Orientador(a) e presidente da Comissão Examinadora



Documento assinado digitalmente  
LUIZ FERNANDO DUBOC DA SILVA  
Data: 05/10/2024 17:26:34-0300  
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Examinador 1



Documento assinado digitalmente  
LORENA LOPES ALMEIDA  
Data: 05/10/2024 22:00:12-0300  
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Examinador 2

Dedico a minha família que sempre me apoiou e me motivou a alcançar lugares que eu mesma não acreditava ser capaz!

“Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo propósito debaixo do céu.”

Eclesiastes 3:1

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus por estar sempre me dando forças, me sustentando e me guiando em meus desafios. Obrigada, Pai, por estar presente em todos os momentos da minha vida!

Aos meus pais, Céia e Sérgio, agradeço por sempre acreditarem em mim, pela presença constante e por nunca me deixar faltar nada. Sou grata por todas as correções e conselhos que me deram ao longo da caminhada. Hoje sou assim devido a vocês, e todas as minhas conquistas têm o reflexo do carinho e da dedicação que sempre me proporcionaram. Amo vocês!

À minha melhor amiga e irmã, Daniella, obrigada por ser meu porto seguro, por sempre me encorajar e estar ao meu lado em todos os momentos. Te amo, minha publicitária!

Aos meus avós, José e Neuza, e aos meus tios Wanderson e Wesley, obrigada por tudo! Nossa família, mesmo com alguns morando a longa distância, sempre esteve unida em apoio e encorajamento. Amo muito vocês.

À minha Orientadora, Ana Paula, por ter me recebido de braços abertos. Sua orientação, paciência e apoio foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho. Você é uma referência para mim, não só como profissional, mas também como pessoa. Sou grata por cada conselho, pela dedicação e por acreditar no meu potencial. Muito obrigada!

À Vanessa e Mylla, agradeço por me acompanharem em cada procedimento laboratorial, por tirarem minhas dúvidas e pelo tempo dedicado ao longo desta jornada. Sua amizade, paciência e apoio foram fundamentais para o sucesso deste trabalho. Sou imensamente grata por toda a ajuda e por estarem ao meu lado em cada etapa. Gratidão!

As minhas melhores amigas da vida, Gabriela, Aline e Rayelle. Nossa amizade e conexão foram uma fonte inesgotável de alegria, apoio e risadas. Cada encontro, cada momento compartilhado foi especial e ajudou a tornar a minha vida e a jornada acadêmica ainda mais memorável. Obrigada por estarem ao meu lado em cada passo dessa trajetória. Vocês são essenciais na minha vida, e sou imensamente grata por tê-las como amigas.

Aos meus queridos amigos Ana Beatriz, Carlos Eduardo, Gabriela, Lidiane e Nayane, que estiveram ao meu lado desde o primeiro ano da graduação, vocês foram uma fonte constante de apoio, amizade e inspiração ao longo de nossa jornada acadêmica. Obrigada por cada risada, cada conselho e por estarem sempre ao meu lado. Vocês são muito especiais para mim!

Aos amigos desde o ensino médio Rânia, Thiago e Edon. Obrigada por estarem sempre presentes em minha vida. Vocês sempre foram uma parte fundamental da minha jornada. Sou muito grata por continuarmos conectados ao longo dos anos!

Às parceiras de laboratório, Vanessa, Dahi, Mylla, Manu, Dri, Joice e Fe, agradeço, por sempre estarem dispostas a ensinar e compartilhar seus conhecimentos. A colaboração e a disposição de vocês foram essenciais para meu aprendizado.

Aos amigos da UFES, Iza, Mai, Gabriel Linhares, Gabriel Conceição, Rafael, Helô, Rafa e Erick pelas risadas, os almoços no RU e por estarem sempre comigo no dia a dia. Vocês deixaram essa caminhada muito mais divertida e especial. Sou muito grata por ter vocês ao meu lado!

A Isa e o Zoega, por compartilharem comigo o desafio do final de período e estarem sempre disponíveis para esclarecer minhas dúvidas. Sou muito grata pela parceria!

Ao Centro Tamar, que me proporcionou uma experiência incrível de voluntariado, meu muito obrigada! Agradeço especialmente à Kelly, por todo o apoio e dedicação. Sua paixão e comprometimento foram inspiradores e me ensinaram muito. Sou muito grata por tudo!

Ao Laboratório de Ecologia de Peixes Marinhos por disponibilizar os espécimes e esclarecer minhas dúvidas.

Agradeço aos membros da banca, Lorena Lopes Almeida e Luiz Fernando Duboc por aceitarem o convite e por toda a contribuição.

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	6
<b>2.1 Objetivo geral</b> .....	6
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	6
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	7
<b>3.1 Coleta de indivíduos</b> .....	6
<b>3.2 Extração e Quantificação do DNA</b> .....	9
<b>3.3 Amplificação por PCR</b> .....	9
<b>3.4 Purificação e Sequenciamento do DNA</b> .....	10
<b>3.5 Alinhamento, Edição e Análises</b> .....	10
<b>4. RESULTADOS</b> .....	12
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	16
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	19
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	20

## RESUMO

A família Achiridae, composta por 36 espécies distribuídas em seis gêneros, encontradas em ambientes estuarinos, marinhos e de água doce, pertence à ordem Pleuronectiformes, caracterizada pela simetria bilateral e pelos dois olhos localizados em um só lado do corpo. Este trabalho identificou molecularmente espécimes da família Achiridae, detectou incongruências taxonômicas e avaliou a distância genética entre espécimes de peixes do litoral sul da Bahia e norte do Espírito Santo. Foram coletados 37 indivíduos dos rios Barra Nova (n=1), Caravelas (n=5), Doce (n=6), Ipiranga (n=3), Piraquê-Açú (n=1) e São Mateus (n=21), utilizando-se redes de arrasto camaroeira. Após a coleta, os espécimes foram acondicionados em sacos plásticos, etiquetados quanto ao ponto de arrasto, local e a data da coleta. O DNA das amostras foi extraído com solução salina, e as concentrações variaram de 21,7 ng/μL a 554,22 ng/μL, com uma média de 265,09 ng/μL. A amplificação da região COI resultou em fragmentos de 574 bp. As análises BLAST confirmaram a identificação correta das espécies, no entanto, incongruências moleculares foram observadas em sequências de *Achirus declivis*, *Achirus lineatus*, *Achirus achirus*, *Achirus* sp., e *Trinectes paulistanus*, com algumas amostras mostrando alta similaridade com *Achirus mucuri*. Para as relações de Neighbor-Joining foram analisadas 63 sequências, sendo 37 geradas no estudo e 26 obtidas dos bancos de dados BOLD e *GenBank*. Foram revelados 11 agrupamentos de similaridade com alto suporte (bootstrap > 90%) e duas ramificações principais: uma entre espécies do gênero *Catathyridium* e outra entre espécies do gênero *Achirus*. Esse contexto filogenético é ainda mais alarmante considerando o rompimento da barragem de Fundão em 2015, que resultou na liberação de lama de rejeitos no estuário do Rio Doce, impactando a ictiofauna local. A falta de dados sobre a real composição e diversidade dos peixes pode comprometer o monitoramento e a recuperação da região. O resultado evidencia inconsistências taxonômicas na família Achiridae e é sugerida a presença de *Achirus mucuri* nos rios São Mateus e Doce. Recomenda-se a realização de novos estudos com um número maior de amostras para uma compreensão mais completa da distribuição e diversidade de espécies da família Achiridae na região, o que ajudará a identificar as espécies mais afetadas e a priorizar ações de recuperação.

**Palavras-chave:** COI; Espécies Crípticas; Peixes; Taxonomia Molecular.

## ABSTRACT

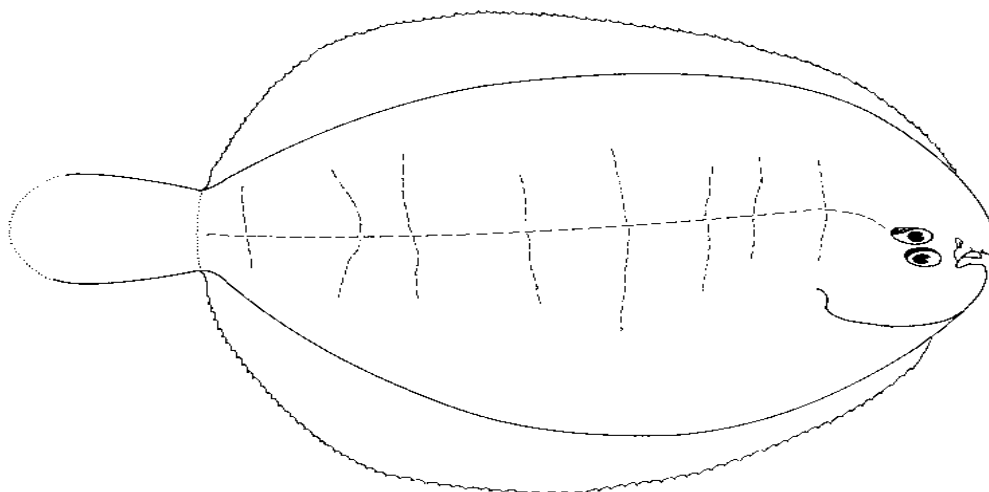
Achiridae family is composed of 36 species distributed across six genera, found in estuarine, marine and freshwater environments, belongs to the Pleuronectiformes order. It is characterized by bilateral symmetry and two eyes located in one side of the body. This molecular study identified specimens of the Achiridae family, detected taxonomic inconsistencies and assessed the genetic distance between fish specimens from the southern coast of Bahia and northern Espírito Santo. Thirty-seven individuals were obtained from Barra Nova (n=1), Caravelas (n=5), Doce (n=6), Ipiranga (n=3), Piraquê-Açú (n=1) and São Mateus (n=21) rivers, using shrimp trawls. The specimens were placed in plastic bags and labeled with some information as the trawl site, location and date of collection. DNA was extracted using saline solution and the concentrations ranged from 21.7 ng/μL to 554.22 ng/μL, with an average of 265.09 ng/μL. Amplification of the COI region resulted in fragments of 574 bp. BLAST analyses confirmed the correct identification of the species, however, molecular incongruences were observed in sequences of *Achirus declivis*, *Achirus lineatus*, *Achirus achirus*, *Achirus sp.*, and *Trinectes paulistanus*, with some samples showing high similarity to *Achirus mucuri*. For Neighbor-Joining relationships, 63 sequences were analyzed, 37 of which were generated in the study and 26 obtained from the BOLD and GenBank databases. A total of 11 similarity clusters with high support (bootstrap > 90%) and two main branches: one grouping species of the genus *Catathyridium* and the other grouping species of the genus *Achirus*. This phylogenetic context is even more alarming considering the failure of the Fundão dam in 2015, which resulted in the release of tailings mud into the Doce River estuary, impacting the local ichthyofauna. The lack of data on the true composition and diversity of the fish can compromise monitoring and recovery in the region. Our results show taxonomic inconsistencies in the Achiridae family and suggest the presence of *Achirus mucuri* in the São Mateus and Doce rivers. It is recommended that further studies be carried out with a larger number of samples to gain a better understanding of the distribution and diversity of the species of the Achiridae family in the region, which can help to identify the most affected species and prioritize recovery actions.

**Keywords:** COI; Cryptic species; Fish; Molecular Taxonomy.

## 1. INTRODUÇÃO

Os peixes correspondem à maior diversidade de espécies de vertebrados conhecidas, sendo encontrados em ambientes marinhos e de água doce (XAVIER, 2002). Esses organismos estão profundamente adaptados ao meio em que habitam (BEMVENUTI & FISHER, 2010) e desempenham um papel crucial no funcionamento e na estruturação dos ecossistemas marinhos (HELFMAN *et al.*, 2009). Além disso, exercem grande influência na harmonia dos ecossistemas, atuando como mediadores na transferência de energia entre os elos das teias alimentares, ao consumirem organismos presentes na base da cadeia alimentar, adquirem energia que é posteriormente transferida para os predadores que os utilizam como fonte de alimento (BASÍLIO, 2020), sendo, nesse contexto, a descrição e a identificação detalhada das espécies fundamentais para a preservação da biodiversidade (GOMES, 2015).

A ordem Pleuronectiformes é composta por cerca de 772 espécies, distribuídas em aproximadamente 129 gêneros e 14 famílias, incluindo espécies de água salgada, salobra e algumas de água doce. É um grupo muito diferenciado que inclui os peixes chatos conhecidos como solhas, solhas-das-pedras, solhas-das-areias, halibutes, peixes-língua, pregados e linguados. Muitas espécies da ordem Pleuronectiformes dispõem de grande valor como fonte de alimento, além de importância na pesca comercial e ecológica, devido à grande quantidade de espécies e à ampla distribuição geográfica. Em relação às características morfológicas, os indivíduos da família Achiridae apresentam um corpo muito achatado, arredondado ou alongado, e os olhos estão posicionados no lado direito do corpo (indivíduos com os olhos no lado esquerdo são extremamente raros) (Figura 1) (FIGUEIREDO & MENEZES, 2000; MENDONÇA & ARAÚJO, 2002; NELSON, 2006; FISCHER, 2011; NELSON, 2016).



**Figura 1** - Características morfológicas de peixes da família Achiridae, apresentando ambos os olhos no lado direito da cabeça. Fonte: Munroe, 2003.

Os peixes da família Achiridae estão distribuídos em seis gêneros (*Achirus*, *Apionichthys*, *Catathyridium*, *Gymnachirus*, *Hypoclinemus* e *Trinectes*) e 36 espécies (RAMOS & LOPES, 2009; NELSON, 2016). Eles ocorrem em todas as Américas (FIGUEIREDO & MENEZES, 2000) e podem ser encontrados em ambientes estuarinos, marinhos, águas continentais, zonas temperadas e tropicais (MUNROE, 2002; GIBSON, 2015; NELSON, 2016) (Figura 2). As espécies dos gêneros *Achirus*, *Trinectes*, *Gymnachirus* e *Catathyridium* são encontradas em ambientes marinhos e estuarinos, enquanto *Hypoclinemus* é exclusivo de água doce. O gênero *Apionichthys* pode ser encontrado tanto em água doce quanto em ambientes de água salobra (FIGUEIREDO & MENEZES, 2000; AZEVEDO, 2005; MUNIZ, 2009; SANTOS, 2009; MARCENIUK *et al.*, 2021). As espécies *Achirus declivis*, *Achirus lineatus*, *Trinectes microphthalmus* e *Trinectes paulistanus* são registradas na bacia do norte do Espírito Santo (DUBOC & INGENITO, 2014). Na costa norte do Brasil, encontram-se as espécies *Achirus achirus*, *Achirus declivis*, *Achirus lineatus*, *Apionichthys dumerilii*, *Gymnachirus nudus*, *Trinectes microphthalmus* e *Trinectes paulistanus* (MARCENIUK *et al.*, 2021). Essas espécies ocorrem em fundos arenosos de ambientes marinhos, áreas estuarinas e rios, onde vivem enterradas ou camufladas pela sua coloração, embora sejam de boa qualidade e não sejam exploradas comercialmente, pois não atingem grandes tamanhos (FIGUEIREDO & MENEZES, 2000). Além disso, algumas espécies são frequentemente capturadas na

pesca de subsistência ou artesanal na América Central e do Sul, enquanto outras fazem parte das capturas acessórias na pesca costeira do camarão (GIBSON, 2015).



**Figura 2** - Mapa da distribuição global da família Achiridae, representada pelos quadrados em vermelho. Fonte: <https://obis.org/taxon/154171> acessado em 19/08/2024.

Por muito tempo, a taxonomia tem sido a principal base de informações para a compreensão da diversidade de espécies (MAYR, 1999). Utilizando técnicas de delimitação de espécies, que oferecem uma abordagem padronizada para a classificação taxonômica, abrangendo também os grupos crípticos, raros ou difíceis de identificar, embora os resultados possam variar conforme o marcador genético e o método analítico utilizado (SERVIS *et al.*, 2020). Assim, a delimitação correta de espécies é essencial para estudos de ecologia, conservação, biogeografia, filogeografia e filogenia (GARCIA-MELO *et al.*, 2019). Por outro lado, a delimitação incorreta ou a falta de espécies identificadas podem afetar significativamente as análises da biodiversidade, o entendimento das relações filogenéticas e a precisão de estudos comparativos (SITES & MARSHALL, 2003). Nas últimas décadas, as árvores filogenéticas baseadas em dados genéticos moleculares têm oferecido comparações independentes para reconstruir a história evolutiva e os

relacionamentos, complementando os dados morfológicos necessários para uma melhor compreensão (MADDISON, 1996; AVISE, 2012).

Dessa forma, os marcadores moleculares podem auxiliar na identificação de espécies, na estimativa do tamanho efetivo das populações, na determinação de populações importantes para a conservação de recursos genéticos e na avaliação do impacto genético da introdução de populações e do cultivo de peixes (STAFFEN *et al.*, 2015). A partir das décadas de 1970 e 1980, o DNA mitocondrial (mtDNA) tornou-se amplamente utilizado em estudos relacionados à estrutura populacional e as relações filogenéticas (DALEBOUT *et al.*, 2002), além de auxiliar na compreensão de diversos aspectos biológicos e evolutivos de uma ampla variedade de organismos (ARIAS *et al.*, 2003). O sequenciamento do mtDNA contém vantagens que o tornam adequado para a marcação molecular, como a presença do genoma em inúmeras cópias, possibilitando a obtenção de quantidades significativas de DNA genômico através de vários métodos de extração (HUBERT *et al.*, 2008). Além disso, a elevada taxa de mutação permite o rastreamento da linhagem materna dos descendentes e a análise dos padrões de migração (FRANKHAM *et al.*, 2008).

Compreender a sistemática e a taxonomia das espécies de peixes é essencial para o controle sustentável dos recursos genéticos (LANDI *et al.*, 2014). O “*DNA barcoding*” ou código de barras de DNA é uma técnica molecular proposta como uma ferramenta universal para a identificação de espécies de animais, utilizando o fragmento padrão do genoma mitocondrial Citocromo Oxidase Subunidade 1 (COI) (HEBERT *et al.*, 2003). Desde que foi proposta em 2003, vários táxons foram analisados, gerando sequências para formar um banco de dados acessível, permitindo a comparação entre espécies conhecidas e desconhecidas. Com o auxílio do *DNA barcoding*, diversos peixes foram identificados (WARD *et al.*, 2005), incluindo peixes de água doce e peixes marinhos (HUBERT *et al.*, 2008; ROCK *et al.*, 2008; MARBRAGANA *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2012; KHOMDRAM, 2018; MUHALA *et al.*, 2024). Além de identificar espécies em diferentes estágios de vida, essa ferramenta também é utilizada para identificar indivíduos descaracterizados ou com apenas partes do corpo, como nadadeiras, filés e outros fragmentos (TRIVEDI *et al.*, 2016).

É crucial ressaltar que, em 5 de novembro de 2015, no município de Mariana-MG, houve o rompimento da barragem de Fundão da Samarco Mineração S.A., que teve impactos devastadores. Os rios afluentes atuaram como vetores,

espalhando os efeitos do desastre e alcançando o rio Doce. A lama com rejeitos afetou os ecossistemas e as comunidades ribeirinhas, resultando na morte de muitos peixes (ESPINDOLA *et al.*, 2019). As barragens podem se romper por uma variedade de motivos, incluindo abalos sísmicos ou falhas no planejamento, na construção e na manutenção. Resultando em uma lama tóxica, que quando é liberada contamina os cursos d'água e se espalha por centenas de quilômetros a partir da área de mineração (CARDOZO *et al.*, 2016). A presença de sedimentos depositados ao longo do leito do rio provoca mudanças significativas no habitat de bentos e peixes, comprometendo aspectos fundamentais para a vida e a reprodução da biota aquática (POLIGNANO & LEMOS, 2020). Os efeitos sobre a ictiofauna são preocupantes, pois as comunidades de peixes são elementos vitais do ecossistema do rio Doce e constituem uma fonte importante de subsistência para as comunidades locais. Além disso, considerando a alta presença de espécies crípticas na bacia do rio Doce, as consequências efetivas para a ictiofauna são pouco conhecidas. Assim, é possível que diversas espécies endêmicas ainda não identificadas tenham sido extintas (FERNANDES *et al.*, 2016).

Dessa forma, a genética da conservação é uma ciência que utiliza princípios e técnicas da genética para auxiliar na conservação de espécies e populações, diminuindo assim o risco de extinção das espécies ameaçadas. Além disso, suas ações incluem a preservação da diversidade genética, a definição de unidades de manejo e a resolução de incertezas taxonômicas. Se o status taxonômico das populações não estiver correto, pode comprometer as decisões na conservação. Incluindo a identificação incorreta de espécies, o que pode permitir que espécies não reconhecidas e em perigo se extingam (FRANKHAM *et al.*, 2008). Essas considerações reforçam a grande importância da correta identificação dos peixes (METCALF *et al.*, 2007; SMITH *et al.*, 2008), pois tal identificação não apenas amplia o conhecimento sobre biodiversidade (MARTINS & CARNEIRO, 2018) e auxilia na preservação de espécies ameaçadas (CARVALHO *et al.*, 2008), mas também contribui na identificação de espécies crípticas (HEBERT *et al.*, 2004), que são aquelas que, embora são geneticamente distintas (BINPENG *et al.*, 2018), mas semelhantes morfológicamente (GUSMÃO *et al.*, 2006), o que potencializa o erro em classificá-las erroneamente sob o mesmo nome (BICKFORD *et al.*, 2007; PFENNINGER & SCHWENK, 2007).

Portanto, o uso de análises moleculares é fundamental para identificar a biodiversidade da região afetada, considerando a possível presença de espécies crípticas que necessitam de uma delimitação precisa. Este estudo foca na avaliação genética das espécies da família Achiridae, que, por serem bentônicas, enfrentam desafios específicos de identificação devido à sua morfologia semelhante. A identificação correta dessas espécies é crucial, considerando os impactos ambientais decorrentes do rompimento da barragem, que podem afetar diretamente a sobrevivência e a saúde das populações bentônicas. Assim, a pesquisa contribui para o aprofundamento de estudos genéticos e um melhor desenvolvimento de ações de conservação para o grupo no sul da Bahia e litoral do Espírito Santo.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Identificar espécies de peixes da família Achiridae, bem como, avaliar relações de distância genética entre elas.

### **2.2 Objetivos Específicos**

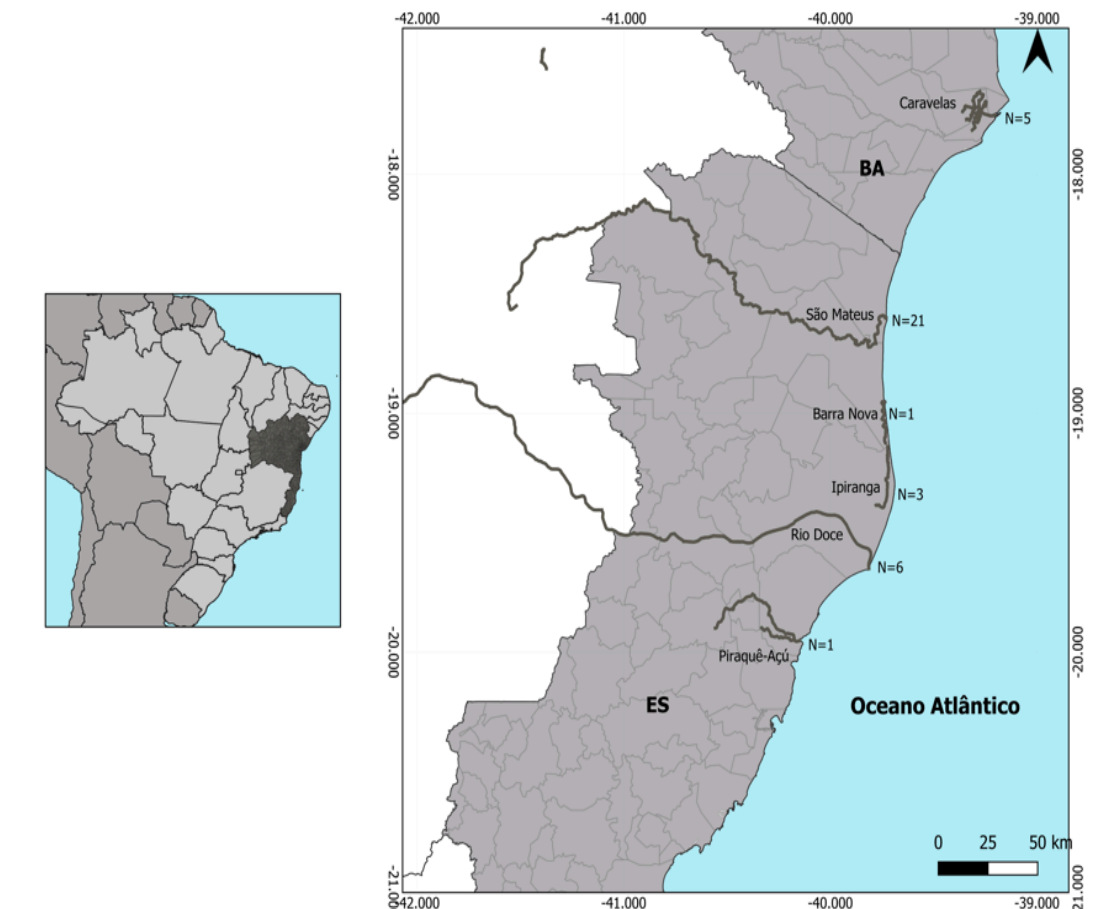
- Identificar molecularmente indivíduos de espécies da família Achiridae, empregando a ferramenta de DNA Barcoding;
- Identificar incongruências taxonômicas entre as identificações morfológicas e moleculares;
- Avaliar relações de similaridade genética das espécies identificadas;
- Subsidiar informações relevantes para o manejo e a conservação das espécies da família Achiridae, contribuindo para a tomada de decisões em estratégias de preservação.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Coleta de indivíduos**

As amostras foram coletadas em conjunto com o Laboratório de Ecologia de Peixes Marinhos (LEPMAR) no Centro Universitário Norte do Espírito Santo (CEUNES/UFES) dentro do Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática (PMBA) no projeto de Ictiofauna Marinha, sob a licença ambiental para a coleta nº 74802-6.

As coletas dos indivíduos ocorreram na região das fozes dos rios Barra Nova, Caravelas, Doce, Ipiranga, Piraquê-Açú e São Mateus, através de redes de arrasto camaroeira, durante os anos de 2018, 2019, 2022 e 2023. No total, foram coletadas 37 amostras, sendo uma no rio Barra Nova, cinco no rio Caravelas, seis no rio Doce, três no estuário do rio Ipiranga, vinte e um no estuário do rio São Mateus e uma no estuário do rio Piraquê-Açú (Figura 3).



**Figura 3** - Pontos de coleta dos indivíduos da família Achiridae na região das fozes dos rios Barra Nova, Caravelas, Doce, Ipiranga, Piraquê-Açu e São Mateus (2018, 2019, 2022 e 2023), BA e ES.

Após coleta, os espécimes foram acondicionados em sacos plásticos, etiquetados quanto ao ponto de arrasto, local e a data da coleta. Os indivíduos foram congelados e identificados até o menor nível taxonômico possível pela observação das características morfológicas no LPMAR, utilizando a chave de identificação de Figueiredo & Menezes (2000); Severiano (2011) e Marceniuk *et al.* (2021).

No Laboratório de Genética e Conservação Animal (LGCA) - Universidade Federal do Espírito Santo realizou-se a coleta de tecido muscular utilizando um bisturi, pinça de metal esterilizado com hipoclorito, álcool 70% e flambados a cada espécime coletado. Os tecidos foram armazenados em microtubos de 1,5 mL, com álcool 99,5%, devidamente etiquetados e acondicionados em freezer a -20°C.

### 3.2 Extração e Quantificação do DNA

Para a extração de DNA foi utilizado o protocolo de extração com solução salina (BRUFORD *et al.*, 1992, adaptado por David Vieites). Um pequeno fragmento de tecido foi picotado sobre um Parafilm apoiado em uma placa de Petri com o auxílio de uma pinça e um bisturi esterilizados. Após o tecido ser picotado este foi transferido para um microtubo de 1,5 mL contendo a solução de lise: 410  $\mu$ L de Buffer de extração, 80  $\mu$ L SDS 10% e 10  $\mu$ L Proteinase K. A solução foi deixada no banho-seco a 55 °C overnight até a completa digestão do tecido. Em seguida, os microtubos foram agitados no vórtex e centrifugados a 13.000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 ml contendo 180  $\mu$ L de NaCl (5M) e invertidos 50 vezes para homogeneizar. Após nova centrifugação, a 13.000 rpm por 5 min, o sobrenadante foi transferido cuidadosamente para um novo tubo nomeado contendo 1.000  $\mu$ L de isopropanol gelado e invertido 50 vezes para a homogeneização. Após centrifugação a 13.000 rpm por 7 min o sobrenadante foi descartado e 250  $\mu$ L de etanol 80% foi adicionado em cada microtubo, o material foi invertido 50 vezes para homogeneizar e em seguida foram centrifugados novamente a 13.000 rpm por 7 min. Logo depois, o sobrenadante foi descartado e 250  $\mu$ L de etanol 80% foi adicionado em cada microtubo. Em seguida, os microtubos foram invertidos 50 vezes e levados novamente para a centrifuga a 13.000 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e os microtubos abertos foram colocados invertidos sobre um pedaço de papel e levados para o banho seco a 55°C por 10 min. Após o álcool ser totalmente removido, o DNA foi ressuspendido com 100  $\mu$ L de água ultrapura e o microtubo foi mantido na geladeira a 4°C durante 24 h para diluir o *pellet*.

As amostras foram quantificadas em um espectrofotômetro *NanoDrop One*, utilizando-se 1  $\mu$ L do DNA extraído. Após realizada a quantificação, as amostras que apresentaram concentração acima de 50 ng/ $\mu$ L foram diluídas para uma concentração final de 20 ng/ $\mu$ L a fim de padronizar o processo de amplificação do DNA.

### 3.3 Amplificação por PCR

As amostras foram amplificadas através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). O fragmento do genoma mitocondrial Citocromo Oxidase Subunidade 1 (COI)

de todos os indivíduos foi amplificado utilizando os *primers* FishF1 5'TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC3' e FishR2 5'ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA3' (WARD *et al.*, 2005).

As reações de amplificação foram realizadas em um volume total de 20 µl contendo: 2,6 µM de cada dNTP (10 mM), 2,6 mM de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0,625 U de *Taq DNA Polimerase* (Platinum) (5uM), 20 ng de DNA, Tampão a 10X (Invitrogen) e 0,104 µM de cada *primer* (10mM). As condições do termociclador foram: desnaturação inicial de 2 min a 95°C; seguido de 35 ciclos de 30s a 94°C, anelamento de 30s a 54°C, extensão da fita de 1 min a 72 °C e por fim uma extensão final de 10 min a 72°C.

Após amplificação, os fragmentos de DNA foram corados com *GelRed*, corridos em eletroforese com gel de agarose 1% e visualizados em um transiluminador de luz ultravioleta (UV).

### 3.4 Purificação e Sequenciamento do DNA

A fim de eliminar potenciais inibidores do sequenciamento, os produtos das reações de PCR foram purificados utilizando 1,8 µl da enzima ExoSap-IT (*USB Corporation*). Os produtos purificados foram encaminhados a empresas terceirizadas para sequenciamento dos fragmentos nos dois sentidos (*forward* e *reverse*).

### 3.5 Alinhamento, Edição e Análises

O programa MEGA 7.0 (KUMAR *et al.*, 2016) foi utilizado para o alinhamento e a edição das 37 sequências, possibilitando a verificação da existência de diferenças nucleotídicas entre os indivíduos. Para a confirmação das espécies, as sequências do gene COI foram comparadas utilizando as ferramentas BLAST e BOLD. Entre suas funções, o programa consiste em realizar o alinhamento entre duas sequências de DNA (a sequência da amostra a ser verificada e a depositada no banco de dados), fornecendo a porcentagem de similaridade entre elas e auxiliando na identificação das espécies. Na ferramenta BLAST, o maior percentual de homologia foi utilizado como critério. Inicialmente, foi considerada a espécie que

aparecia em ambos os bancos de dados, e em casos de divergência entre eles, o maior percentual de homologia foi considerado.

Para a análise de Neighbor-Joining (TAMURA *et al.*, 2004), foram inseridas dos dois bancos de dados as sequências obtidas, bem como sequências adicionais para referência das espécies. Foi escolhida a sequência da espécie *Symphurus ginsburgi*, da família *Cynoglossidae*, publicada no *GenBank* com o código de identificação JX124904.1 como *outgroup*, com *bootstrap* de 10.000 repetições. Essa análise foi utilizada para construir uma árvore de similaridade genética, delimitar as espécies, identificar como estão se agrupando e se as amostras correspondem molecularmente com a identificação morfológica.

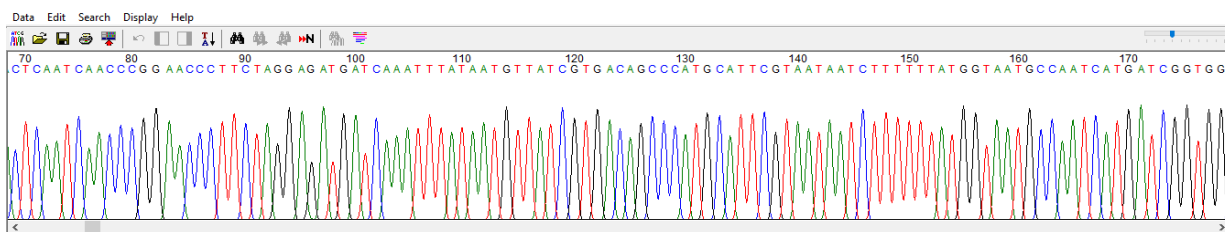
As 25 sequências adicionais de espécies da família Achiridae, publicadas nos bancos genômicos internacionais *GenBank* (*National Center for Biotechnology Information* - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) e BOLD (*Barcode of Life Data Systems* - <https://www.boldsystems.org/>), foram incluídas as análises para auxiliar na confirmação e delimitação das espécies (Tabela 1).

**Tabela 1** - Espécies, localidades, número de sequências (N), acesso e referências das sequências obtidas no *GenBank* e BOLD para o marcador mitocondrial COI da família Achiridae.

Espécies	Localidades	N	Acesso GENBANK	Acesso BOLD	Referências
<i>Achirus lineatus</i>	Sul, norte e centro do litoral do estado de São Paulo	6	KT310052.1; KT310053.1; JX033994.1; JQ365211.1; JX033995.1 e JQ365210.1	-	Ribeiro et al., 2012
<i>Achirus declivis</i>	Alagoas	2	MH898949.1 e MH898950.1	-	-
<i>Achirus achirus</i>	Delta do Rio Parnaíba (PRD) no nordeste do Brasil	2	MH883040.1 e KT310050.1	-	-
<i>Apionichthys finis</i>	-	2	KT310055.1 e KT310056.1	-	-
<i>Catathyridium jenynsii</i>	Na Bacia do Alto Paraná em São Paulo	4	JN988776.1 e JN988777.1	132PEDII; 133PEDII	-
<i>Gymnachirus nudus</i>	-	3	MH898954.1; KT310057.1 e KT310058.1	-	-
<i>Hypoclinemus mentalis</i>	Alagoas	2	KT310061.1 e KT310062	-	-
<i>Trinectes microphthalmus</i>	-	2	KT310063.1 e KT310064.1	-	-
<i>Trinectes paulistanus</i>	-	2	KT310066.1 e KT310067.1	-	-

## 4. RESULTADOS

A quantificação do DNA extraído das amostras coletadas resultou em concentrações de DNA extraído variando entre 21,7 ng/μL e 554,22 ng/μL, com uma média de 265,09 ng/μL. Ao todo, foram analisadas 63 sequências, das quais 37 foram geradas neste estudo (Figura 4), e 26 obtidas dos bancos de dados BOLD e *GenBank* (25 sequências referências e 1 sequência de *outgroup*). A amplificação da região COI gerou um fragmento de aproximadamente 700 bp (pares de bases), mas após o alinhamento e a edição, foram obtidos fragmentos de 574 bp. As sequências foram ajustadas em um tamanho e qualidade para garantir a precisão e a consistência de análises subsequentes.



**Figura 4** – Exemplo de um eletroferograma de parte da sequência do fragmento de COI de um indivíduo de *Achirus declivis* demonstrando os nucleotídeos e a qualidade da sequência.

A análise BLAST revelou os seguintes percentuais de identificação: todas as sequências de *Trinectes microphthalmus*, *Gymnachirus nudus* e *Catathyridium garmani* apresentaram alto percentual de homologia, sendo os valores considerados acima de 99%, confirmando a identificação morfológica das espécies no estudo. De forma semelhante as sequências de *Achirus declivis* (ACHDEC.05), *Achirus lineatus* (ACHLIN.11, ACHLIN.12 e ACHLIN.16) e *Trinectes paulistanus* (TRIPAU.39) também confirmaram a identificação morfológica correta dessas espécies (Tabela 2). Entretanto, as sequências de *Achirus declivis* (ACHDEC.02 e ACHDEC.19) apresentaram um alto percentual de homologia com *Achirus lineatus*, indicando que as amostras não pertencem à mesma espécie na qual foram identificadas morfológicamente. Além disso, sequências de *Achirus achirus*, *Achirus sp.*, *Achirus declivis*, *Achirus lineatus* e *Trinectes paulistanus* (ACHACH.01, ACHSP.01, ACHSP.02, ACHDEC.01, ACHDEC.03, ACHDEC.04, ACHLIN.03, ACHDEC.13, ACHDEC.14, ACHDEC.15, ACHDEC.20, ACHLIN.04, ACHLIN.15, ACHLIN.18 e

TRIPAU.03) apresentaram alto percentual de homologia (acima de 99%) com *Achirus mucuri*. Este alto grau de similaridade sugere uma incongruência entre as identificações morfológicas e moleculares dessas amostras (Tabela 2).

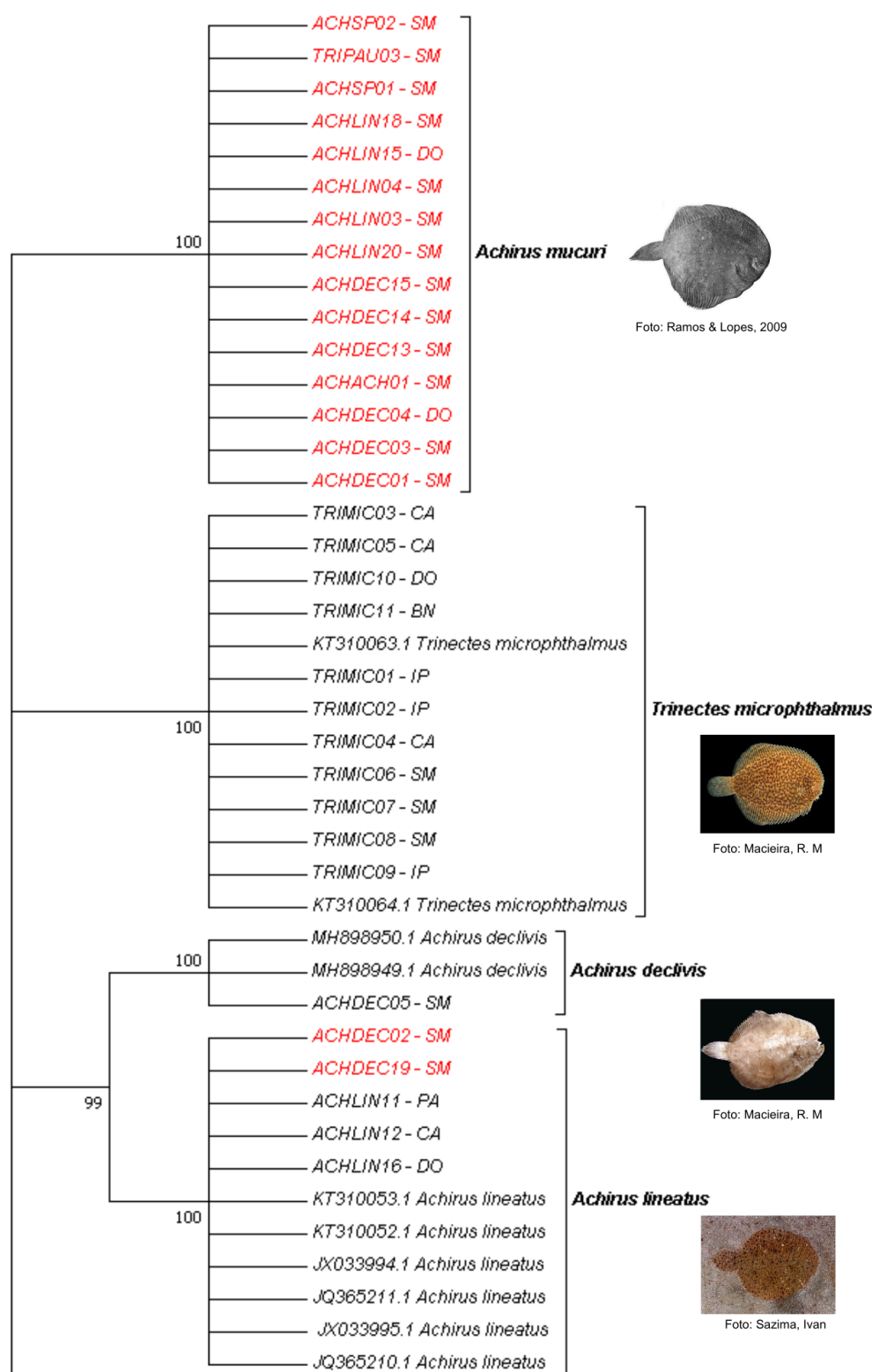
**Tabela 2** - Identificação morfológica e percentual de homologia obtidos utilizando BLAST no *GenBank* e BOLD. A cor vermelha simboliza as sequências incongruentes com as análises morfológicas, que obtiveram alto percentual de identificação com *Achirus mucuri*.

Identificação genética	Identificação morfológica	Percentual de homologia (GEBANK)	Percentual de homologia (BOLD)
ACHACH.01	<i>Achirus achirus</i>	83.42% <i>Apionichthys finis</i>	100% <i>Achirus mucuri</i>
ACHSP.01	<i>Achirus sp.</i>	83.64% <i>Apionichthys finis</i>	100% <i>Achirus mucuri</i>
ACHSP.02	<i>Achirus sp.</i>	83.64% <i>Apionichthys finis</i>	100% <i>Achirus mucuri</i>
ACHDEC.01	<i>Achirus declivis</i>	83.64% <i>Apionichthys finis</i>	100% <i>Achirus mucuri</i>
ACHDEC.02	<i>Achirus declivis</i>	99.85% <i>Achirus lineatus</i>	99.85% <i>Achirus lineatus</i>
ACHDEC.03	<i>Achirus declivis</i>	83.64% <i>Apionichthys finis</i>	100% <i>Achirus mucuri</i>
ACHDEC.04	<i>Achirus declivis</i>	83.22% <i>Apionichthys finis</i>	100% <i>Achirus mucuri</i>
ACHDEC.05	<i>Achirus declivis</i>	89.67% <i>Achirus lineatus</i>	100% <i>Achirus declivis</i>
ACHDEC.13	<i>Achirus declivis</i>	83.48% <i>Apionichthys finis</i>	100% <i>Achirus mucuri</i>
ACHDEC.14	<i>Achirus declivis</i>	83.48% <i>Apionichthys finis</i>	100% <i>Achirus mucuri</i>
ACHDEC.15	<i>Achirus declivis</i>	83.48% <i>Apionichthys finis</i>	100% <i>Achirus mucuri</i>
ACHDEC.19	<i>Achirus declivis</i>	100% <i>Achirus lineatus</i>	100% <i>Achirus lineatus</i>
ACHDEC.20	<i>Achirus declivis</i>	83.48% <i>Apionichthys finis</i>	100% <i>Achirus mucuri</i>
ACHLIN.03	<i>Achirus lineatus</i>	83.64% <i>Apionichthys finis</i>	100% <i>Achirus mucuri</i>
ACHLIN.04	<i>Achirus lineatus</i>	83.67% <i>Apionichthys finis</i>	100% <i>Achirus mucuri</i>
ACHLIN.11	<i>Achirus lineatus</i>	100% <i>Achirus lineatus</i>	100% <i>Achirus lineatus</i>
ACHLIN.12	<i>Achirus lineatus</i>	100% <i>Achirus lineatus</i>	100% <i>Achirus lineatus</i>
ACHLIN.15	<i>Achirus lineatus</i>	83.33% <i>Apionichthys finis</i>	100% <i>Achirus mucuri</i>
ACHLIN.16	<i>Achirus lineatus</i>	100% <i>Achirus lineatus</i>	100% <i>Achirus lineatus</i>
ACHLIN.18	<i>Achirus lineatus</i>	83.64% <i>Apionichthys finis</i>	100% <i>Achirus mucuri</i>
CATGAR.01	<i>Catathyridium garmani</i>	93.08% <i>Catathyridium jenynsii</i>	99.12% <i>Catathyridium garmani</i>
CATGAR.02	<i>Catathyridium garmani</i>	93.08% <i>Catathyridium jenynsii</i>	99.26% <i>Catathyridium garmani</i>
CATGAR.03	<i>Catathyridium garmani</i>	93.23% <i>Catathyridium jenynsii</i>	99.27% <i>Catathyridium garmani</i>
TRIMIC.01	<i>Trinectes microphthalmus</i>	99.84% <i>Trinectes microphthalmus</i>	99.85% <i>Trinectes microphthalmus</i>
TRIMIC.02	<i>Trinectes microphthalmus</i>	100.00% <i>Trinectes microphthalmus</i>	100% <i>Trinectes microphthalmus</i>
TRIMIC.03	<i>Trinectes microphthalmus</i>	100.00% <i>Trinectes microphthalmus</i>	100% <i>Trinectes microphthalmus</i>
TRIMIC.04	<i>Trinectes microphthalmus</i>	100.00% <i>Trinectes microphthalmus</i>	100% <i>Trinectes microphthalmus</i>
TRIMIC.05	<i>Trinectes microphthalmus</i>	100.00% <i>Trinectes microphthalmus</i>	100% <i>Trinectes microphthalmus</i>
TRIMIC.06	<i>Trinectes microphthalmus</i>	100.00% <i>Trinectes microphthalmus</i>	100% <i>Trinectes microphthalmus</i>
TRIMIC.07	<i>Trinectes microphthalmus</i>	100.00% <i>Trinectes microphthalmus</i>	100% <i>Trinectes microphthalmus</i>
TRIMIC.08	<i>Trinectes microphthalmus</i>	99.84% <i>Trinectes microphthalmus</i>	99.84% <i>Trinectes microphthalmus</i>
TRIMIC.09	<i>Trinectes microphthalmus</i>	99.84% <i>Trinectes microphthalmus</i>	99.84% <i>Trinectes microphthalmus</i>
TRIMIC.10	<i>Trinectes microphthalmus</i>	100.00% <i>Trinectes microphthalmus</i>	100% <i>Trinectes microphthalmus</i>
TRIMIC.11	<i>Trinectes microphthalmus</i>	100.00% <i>Trinectes microphthalmus</i>	100% <i>Trinectes microphthalmus</i>
TRIPAU.03	<i>Trinectes paulistanus</i>	83.64% <i>Apionichthys finis</i>	100% <i>Achirus mucuri</i>
TRIPAU.39	<i>Trinectes paulistanus</i>	91.46% <i>Trinectes paulistanus</i>	100.00% <i>Trinectes paulistanus</i>
GYMNUD.01	<i>Gymnachirus nudus</i>	100.00% <i>Gymnachirus nudus</i>	100% <i>Gymnachirus nudus</i>

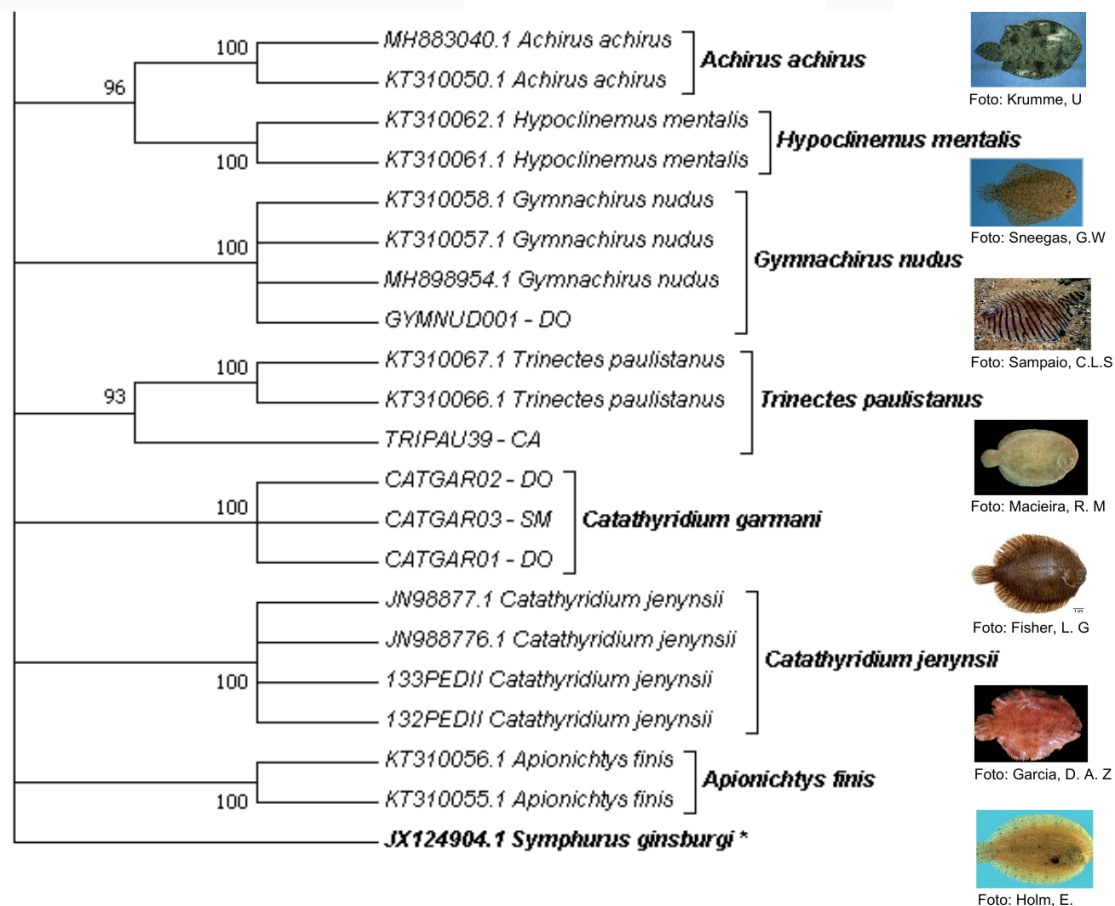
Os resultados de homologia obtidos a partir da análise BLAST foram consistentes com os agrupamentos representados na árvore de *Neighbor-Joining* (Figuras 5 e 6). Na análise de distância genética foi observada a formação de 11

agrupamentos, com valores de *bootstrap* acima de 90% para cada um deles, o que indica um alto nível de confiança nos agrupamentos gerados.

Um dos agrupamentos na árvore de *Neighbor-Joining* (Figuras 5 e 6) mostrou que as espécies identificadas morfológicamente como *Achirus achirus*, *Achirus sp.*, *Achirus declivis*, *Achirus lineatus* e *Trinectes paulistanus* (ACHACH.01, ACHSP.01, ACHSP.02, ACHDEC.01, ACHDEC.03, ACHDEC.04, ACHDEC.13, ACHDEC.14, ACHDEC.15, ACHDEC.20, TRIPAU.03, ACHLIN.03, ACHLIN.04, ACHLIN.15 e ACHLIN.18) foram agrupadas com um grupo distinto de espécies. As sequências desse agrupamento apresentaram um alto percentual de homologia com sequências com registros privados de *Achirus mucuri* na ferramenta BLAST (Tabela 2), sugerindo uma possível incongruência entre a identificação morfológica e a análise do filograma cladograma. Essas sequências estão presentes nas bases de dados, mas o acesso ao público está restrito e ainda não foi liberado para consulta geral. Foram observadas também duas ramificações principais na árvore: uma entre as espécies do gênero *Catathyridium* (*C. jenynsii* e *C. garmani*) e outra entre as espécies do gênero *Achirus* (*A. lineatus* e *A. declivis*) (Figuras 5 e 6).



**Figura 5** - Árvore de *Neighbor-Joining* com as 63 sequências da família Achiridae, com 37 sequências geradas neste estudo, 25 sequências referências e um grupo externo retirado do *GenBank* e *BOLD*, com seus respectivos códigos de referência. Em frente está a identificação molecular do agrupamento. A cor vermelha simboliza as sequências em que se obteve incongruências moleculares.



**Figura 6** - Árvore de *Neighbor-Joining* com as 63 sequências da família Achiridae, com 37 sequências geradas neste estudo, 25 sequências referências e um grupo externo retirado do *GenBank* e *BOLD*, com seus respectivos códigos de referência. Em frente está a identificação molecular do agrupamento. A cor vermelha simboliza as sequências que se obteve incongruências moleculares.

## 5. DISCUSSÃO

Os resultados das sequências que apresentaram alto percentual de homologia com registros de *Achirus mucuri* sugerem a presença dessa espécie no rio São Mateus e no rio Doce, o que complementa a distribuição proposta por Ramos & Lopes (2009). Nesse estudo, os autores identificaram a espécie para o estuário do rio Mucuri, na Bahia. A única área de ocorrência até então relatada.

De acordo com o Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção, esta espécie está classificada como Vulnerável (VU) sob o critério D2 e a área onde

a espécie é encontrada atualmente é impactada pela atividade da indústria de celulose, pela operação de uma usina hidrelétrica e está em contínuo processo de assoreamento. Além disso, a espécie é capturada de forma incidental em pescarias de arrasto (SUBIRÁ, 2018).

O primeiro registro dessa espécie no ES foi no estudo de monitoramento realizado na porção baixa do rio Doce (PMBA, 2019), nas quais três exemplares foram coletados em dois pontos diferentes. Com a identificação molecular foi possível detectar 15 indivíduos da espécie *A. mucuri*, e dos quais treze foram coletados no rio São Mateus e dois no rio Doce (Figuras 5 e 6).

A disparidade no número de amostras entre esses dois rios e as variações nas condições ambientais podem influenciar a abundância das espécies, afetando a diversidade genética observada no rio São Mateus e no rio Doce. Também é possível que barreiras físicas, como a presença de áreas com cadeias de montanhas ou braços de rio, separem populações ancestrais, levando ao isolamento de habitat e impedindo o fluxo gênico entre subpopulações, resultando na divergência genética. Vale destacar que outros tipos de especiação podem ocorrer mesmo sem barreiras físicas (FUTUYMA, 2009). Esses resultados ressaltam a importância de estudos futuros para aprofundar a compreensão da diversidade genética e das relações entre as espécies, sobretudo considerando a influência de condições bióticas e abióticas.

A árvore de *Neighbor-Joining* (Figuras 5 e 6) apresentou valores de *bootstrap*, que variaram de 93% a 100%, indicando alta confiança nos agrupamentos genéticos observados. Os resultados obtidos corroboram os de Bittencourt *et al.* (2023). Esse estudo revelou que os gêneros *Achirus* e *Trinectes* são parafiléticos ou polifiléticos, o que sugere uma complexidade maior nas relações filogenéticas do grupo. Também foi identificado que a espécie *Hypoclinemus mentalis* necessita de uma revisão taxonômica, o que reforça a importância de análises mais detalhadas para a reavaliação das classificações dentro da família. Essas descobertas ressaltam a necessidade de uma revisão taxonômica mais aprofundada e destacam a importância de análises mais detalhadas para uma compreensão mais precisa das relações evolutivas dentro da família Achiridae.

As espécies do gênero *Catathyridium* se ramificaram entre *Catathyridium jenynsii* e *Catathyridium garmani*, enquanto as espécies do gênero *Achirus* se ramificaram entre *Achirus lineatus* e *Achirus declivis*. Em um estudo realizado por

Azevedo (2008), o gênero *Catathyridium* foi observado como um grupo-irmão de *Trinectes*, e o gênero *Hypoclinemus* foi identificado como grupo-irmão de *Achirus*. No entanto, Ramos (1998) considerou *Hypoclinemus* e *Catathyridium* (gêneros de água doce) como grupo-irmão e o mais primitivo de todos os membros da família Achiridae. Além disso, Gibson (2015) destaca que as inter-relações dentro da família Achiridae permanecem não resolvidas, e atualmente não há confirmações sobre a origem e a biogeografia histórica desses peixes. Essa falta de clareza destaca a necessidade de pesquisas adicionais para esclarecer a complexidade das relações filogenéticas e a história evolutiva dos Achiridae.

Todas as espécies da família Achiridae apresentam o lábio inferior hipertrofiado em comparação com outros Pleuronectiformes, e a margem deste lábio possui fímbrias labiais que variam em forma e tamanho entre as diferentes espécies (MUNIZ, 2009). No entanto, a identificação dessas espécies usando chaves taxonômica é desafiadora, pois essas chaves geralmente não contemplam todos os estágios de vida e gêneros, tornando-se dependente de especialistas (HEBERT *et al.*, 2003). Contudo, Bittencourt (2015) destaca que existem poucos estudos evolutivos e filogenéticos sobre a família Achiridae, e a chave de identificação do grupo apresenta uma considerável sobreposição de dados merísticos, o que pode resultar em erros de classificação sem uma revisão adequada por especialistas. Nesse contexto, a utilização da sequência do gene COI para identificação por meio do *DNA barcoding* se torna uma ferramenta valiosa, pois permite a análise da divergência genética entre as espécies, evidenciando a importância dessa técnica na compreensão da biodiversidade e na conservação das espécies (PEREIRA *et al.*, 2013). Dessa forma, o *DNA barcoding* se mostra essencial não apenas para a identificação precisa, mas também para o fortalecimento do conhecimento sobre as relações evolutivas e a conservação dos peixes da família Achiridae.

Os peixes da família Achiridae habitam fundos arenosos de ambientes marinhos, áreas estuarinas e rios (FIGUEIREDO & MENEZES, 2000). O desastre ecológico resultante do rompimento da barragem de Fundão em 2015 teve um impacto devastador sobre esses habitats, pois a pluma de lama de rejeitos liberada na foz do Rio Doce causou a morte de mais de 11 toneladas de peixes por asfixia (FERNANDES *et al.*, 2016; FRANCINI-FILHO *et al.*, 2019; CALDEIRA & AMARAL, 2020). Essa poluição e degradação dos habitats, juntamente com a sobrepesca, são as principais ameaças aos estuários (JOYEUX & WARD, 1999). Além disso, os

metais pesados identificados no rio podem se incorporar à cadeia alimentar, levando à contaminação das espécies de peixes.

Diante das consequências do rompimento criminoso da barragem, é essencial considerar ações como a recuperação, reabilitação e restauração dos ecossistemas afetados (POLIGNANO & LEMOS, 2020). Além disso, o efeito da deposição sobre habitats pelágicos, recifes de corais, bancos de algas e manguezais na costa brasileira é alarmante, especialmente em termos de extensão, magnitude e a possibilidade de recuperação (NEVES *et al.*, 2016; BIANCHINI, 2016). A carência de informações sobre a composição e diversidade da ictiofauna na foz do Rio Doce compromete a eficácia dos esforços para monitorar e mitigar os impactos deste desastre ambiental (CONDINI *et al.*, 2022).

As análises moleculares realizadas no presente estudo podem auxiliar na identificação de espécies afetadas, compreender a composição, a diversidade genética das populações e esses dados são essenciais para avaliar os efeitos do desastre e direcionar ações de recuperação.

O presente estudo é um dos primeiros a trazer informações sobre análises moleculares da família Achiridae no litoral sul da Bahia e norte do Espírito Santo (ES), utilizando *DNA barcoding*, e o primeiro a trazer resultados moleculares mais detalhados que corroboram com a sugestão de ocorrência de *Achirus mucuri* no litoral do ES.

## 6. CONCLUSÕES

Este estudo reforça a filogenia complexa da família Achiridae e a necessidade de novos estudos taxonômicos e moleculares para uma descrição mais precisa dessa família. Além disso, indicou que a distribuição de *Achirus mucuri* é maior do que a conhecida até o momento.

O uso do *DNA barcoding* tem se mostrado fundamental para a detecção da real biodiversidade afetada pelo rejeito de minério no litoral norte capixaba, destacando sua relevância para estudos de conservação.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARIAS, M. C. *et al.* O DNA mitocondrial em estudos populacionais e evolutivos de meliponíneos. **Apoidea Neotropica**. UNESCO, Criciúma, p. 305-309, 2003.

AVISE, John Charles. **Molecular Markers, Natural History and Evolution**. Springer Science & Business Media, 2012. 525 p.

AZEVEDO, M. F. C. *et al.* Chromosome banding and 18S rDNA in situ hybridization analysis of seven species of the family Achiridae (Teleostei: Pleuronectiformes). **Genetica**, v. 125, p. 125-132, 2005.

AZEVEDO, M. F. C. *et al.* Phylogenetic analysis of the order Pleuronectiformes (Teleostei) based on sequences of 12S and 16S mitochondrial genes. **Genet. Mol. Biol.** 31 (1 suppl), 284-292, 2008. Disponível em:  
<https://www.scielo.br/j/gmb/a/BsGJRbxRZnN6K4QTNVpMMGy/?lang=en>.

BASÍLIO, T. H. *et al.* **Biodiversidade e conservação das ilhas costeiras do litoral sul capixaba**. São Paulo: Lura Editorial Gráfica, 2020. 253p.

BEMVENUTI, M. & FISCHER, L. G. Peixes: morfologia e adaptações. **Cadernos de Ecologia Aquática**, v. 5, n. 2, p. 31-54, 2010.

BIANCHINI, A. **Avaliação do impacto da lama/pluma Samarco sobre os ambientes costeiros e marinhos (ES e BA) com ênfase nas Unidades de Conservação**. 1ª Expedição do Navio de Pesquisa Soloncy Moura do CEPsul/ICMBio, 2016.

BICKFORD, D. *et al.* Cryptic species as a window on diversity and conservation. **Trends in ecology & evolution**, v. 22, n. 3, p. 148-155, 2007.

BINGPENG, X. *et al.* DNA barcoding for identification of fish species in the Taiwan Strait. **Plos One**, 13(6):e0198109, 2018. Disponível em:  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198109>.

BITENCOURT, J. D. A. **Análise das relações evolutivas e filogenéticas da família Achiridae (Teleostei: Pleuronectiformes) a partir de marcadores citogenéticos e**

**moleculares**. Bragança, 2015. Tese, Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, da Universidade Federal do Pará, Bragança, 2015.

BITENCOURT, J. A. *et al.* Phylogenetic relationships and the origin of New World soles (Teleostei: Pleuronectiformes: Achiridae): The role of estuarine habitats.

**Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 178, p. 107631, 2023.

BRUFORD, M. W. *et al.* Single-locus and multilocus DNA fingerprinting. *In*:

HOELZEL, A. R. **Molecular genetic analyses of populations: A Practical Approach**. Oxford: IRL Press, p. 225-269, 1992.

CALDEIRA, V. A. & AMARAL, M. Rio Doce: mais que um patrimônio, um ser ancestral. **Emblemas**, v. 17, n. 2, 2020.

CARDOZO, F. A. C.; PIMENTA, M. M.; ZINGANO, A. C. Métodos construtivos de barragens de rejeitos de mineração—uma revisão. *Holos*, v. 8, p.77-85, 2016

CARVALHO, D. C. *et al.* Identificação molecular de peixes: o caso do Surubim (*Pseudoplatystoma spp.*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 32, n. 4, p. 215-219, 2008.

CONDINI, M. V. *et al.* Marine fish assemblages of eastern Brazil: an update after the world's largest mining disaster and suggestions of functional groups for biomonitoring long-lasting effects. **Science of the Total Environment**, v. 807, p. 150987, 2022.

DALEBOUT, M. L. *et al.* A new species of beaked whale *Mesoplodon perrini* sp. N. (Cetacea: Ziphiidae) discovered through phylogenetic analysis of mitochondrial DNA sequences. **Marine Mammal Science**, 18(3): 577-608, 2002.

DUBOC, L.F. & INGENITO, L.F.S. A Divisão ictiológica da Coleção Zoológica Norte Capixaba (CZNZ), Universidade Federal do Espírito Santo, São Mateus. **Boletim da Sociedade Brasileira de ictiologia**. Londrina, p. 23-27. mar. 2014. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/281637914>

ESPINDOLA, H. S. *et al.* Rio Doce: Risks and Uncertainties of the Mariana Disaster (MG). **Revista Brasileira de História**, v. 39, n. 81, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1806-93472019v39n81-07>.

- FERNANDES, G. W. *et al.* Deep into the mud: ecological and socio-economic impacts of the dam breach in Mariana, Brazil. **Natureza & Conservação**, v. 14, p. 35-45, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ncon.2016.10.003>.
- FIGUEIREDO, J. L. & MENEZES, N. A. **Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil**. Museu de Zoologia USP, 2000. 165p.
- FISCHER, Luciano Gomes. *et al.* **Peixes estuarinos e costeiros**, Rio Grande, 2011. 130 p.
- FRANKHAM, Richard. *et al.* **Fundamentos de genética da conservação**. Sociedade Brasileira de Genética, 2008. 263p.
- FRANCINI-FILHO, R. B. *et al.* Remote sensing, isotopic composition and metagenomics analyses revealed Doce River ore plume reached the southern Abrolhos Bank Reefs. **Science of The Total Environment**, v. 697, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134038>.
- FUTUYMA, D. **Biologia Evolutiva**, 3 ed. Funpec, Ribeirão Preto, 2009. 830p.
- GARCÍA-MELO, J. E. *et al.* Species delimitation of neotropical Characins (Stevardiinae): Implications for taxonomy of complex groups. **Plos One**, 14(6): e0216786, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216786>
- GIBSON, Robin. N. *et al.* **Flatfishes: biology and exploitation**. 2nd ed. John Wiley & Sons, 2015, 542p
- GOMES, L. C. *et al.* Iterative taxonomy detects cryptic and overlooked fish species in a neotropical river basin. **Genetica**. v. 143, p. 581–588, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10709-015-9856-z> PMID: 26142058.
- GUSMÃO, J. C. *et al.* Cryptic species and population structuring of the Atlantic and Pacific seabob shrimp species, *Xiphopenaeus kroyeri* and *Xiphopenaeus riveti*. **Marine Biology**, v. 149, p. 491-502, 2006.
- 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.

HEBERT, P.D.N. *et al.* Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrartes fulgerator*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. USA 101: 14812-14817, 2004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0406166101>

HELFMAN, Gene S. *et al.* **The diversity of fishes: biology, evolution, and ecology**. John Wiley & Sons, 2009. 720p.

HUBERT, N. *et al.* Identifying Canadian freshwater fishes through DNA barcodes. **Plos One** 3(6):e2490, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002490> PMID: 22423312

JOYEUX, J. C; WARD, A. B. Constraints on coastal lagoon fisheries. **Advances in Marine Biology**, p. 73-199, 1998.

KHOMDRAM, B.D. A small leap toward DNA barcode library creation of ornamental fishes: development of 17 DNA barcodes from Manipur, India. **Journal of Asia-Pacific Biodiversity**, v. 11, n. 3, p. 452-458, 2018.

KUMAR, S., STECHER, G., & TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular Biology and Evolution**, n. 33, p. 1870–1874, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>

LANDI, M. *et al.* DNA barcoding for species assignment: The case of Mediterranean marine fishes. **Plos One** 9:e106135, 2014. Disponível em: [doi:10.1371/journal.pone.0106135](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106135).

MADDISON, Wayne P. **Molecular approaches and the growth of phylogenetic biology. Molecular zoology: Advances, strategies, and protocols** (JD Ferraris and SR Palumbi, eds.). Wiley-Liss, 1996. 620 p.

MARCENIUK, Alexandre Pires *et al.* **Peixes teleósteos da costa norte do Brasil**. Museu Paraense Emílio Goeldi, 2021. 775 p.

MABRAGANA, E. *et al.* DNA barcoding identifies Argentine fishes from marine and brackish waters. **PLoS One**, v. 6, n. 12, p. e28655, 2011.

- MARTINS, Rogélia & CARNEIRO, Miguel. **Manual de identificação de peixes ósseos da costa continental portuguesa: Principais características diagnosticantes**, Lisboa: Instituto Português do Mar e da Atmosfera, 2018.
- MAYR, Ernst. **Systematics and the origin of species, from the viewpoint of a zoologist**. Harvard University Press, 1999. 372 p.
- MENDONÇA, P. & ARAÚJO, F. G. Composição das populações de linguados (Osteichthyes, Pleuronectiformes) da Baía de Sepetiba, Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 19, p. 339-347, 2002.
- METCALF, J.L. *et al.* Across the great divide: genetic forensics reveals misidentification of endangered cutthroat trout populations. **Molecular Ecology**, v.16, n.21, p.4445-4454, 2007.
- MUHALA, V. *et al.* DNA barcoding for the assessment of marine and coastal fish diversity from the Coast of Mozambique. **Plos one**, v. 19, n. 2, p. e0293345, 2024.
- MUNIZ, C. C. **Revisão sistemática das espécies do gênero *Achirus* Lacépède, 1802 (Pleuronectiformes: Achiridae) do Atlântico Ocidental**. Paraíba, 2009. Dissertação, Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biociências, da Universidade Federal da Paraíba, Paraíba, 2009.
- MUNROE, Thomas A. **The living marine resources of Western Central Atlantic**. Volume 2: Bony fishes part 1. FAO Species guide for fishery purposes. American Society of Ichthyologists and Herpetologists Special Publication No 5, 2002. 773 p.
- NELSON, Joseph S. **Fishes of the World**, fourth ed. John Wiley & Sons, 2006. 624 p.
- NELSON, Joseph S.; GRANDE, Terry C.; WILSON, Mark VH. **Fishes of the World**, fifth ed. John Wiley & Sons, 2016. 707 p.
- NEVES, A.C.O. *et al.* Neglect of ecosystems services by mining, and the worst environmental disaster in Brazil. **Natureza & Conservação**. 14, 24–27. 2016.
- PEREIRA, L.H.G. *et al.* Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna?. **BMC Genetics**, v.14, n.20, p.1-14. 2013

PFENNINGER, M & SCHWENK, K. Cryptic animal species are homogeneously distributed among taxa and biogeographical regions. **BMC evolutionary biology**, v. 7, p. 1-6, 2007.

PMBA, 2019. Disponível em. In: Relatório Anual 2019 PMBA/ Fest-RRDM - **Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática da Área Ambiental I – Porção Capixaba do Rio Doce e Região Marinha e Costeira Adjacente** - RT-24 RRDM/NOV19. Fundação Espírito-santense de Tecnologia (FEST)/ Rede Rio Doce Mar (RRDM), Vitória, ES, Brasil, 232p.

POLIGNANO, M. V & LEMOS, R. S. Rompimento da barragem da Vale em Brumadinho: impactos socioambientais na Bacia do Rio Paraopeba. **Ciência e Cultura**, v. 72, n. 2, p. 37-43, 2020.

RAMOS, R. T. C & MENEZES, N. A. **Estudo filogenético da família Achiridae (Teleostei: Pleuronectiformes: Pleuronectoidei), com a revisão das formas de água doce da América do Sul Cis-Andina e a reavaliação do monofiletismo de soleomorpha (Soleoidei)**. São Paulo. Tese, Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998

RAMOS, R. T. C; RAMOS, T. P.A; LOPES, P. R. D. New species of *Achirus* (Pleuronectiformes: Achiridae) from Northeastern Brazil. **Zootaxa**, v. 2113, n. 1, p. 55–62-55–62, 2009.

ROCK J, C.F.O. *et al.* DNA barcodes of fish of the Scotia Sea, Antarctica indicate priority groups for taxonomic and systematics focus. **Antarctic Science** 20: 253–262, 2008.

SANTOS, A. C. Alcântara *et al.* Ampliação do limite norte de distribuição geográfica de *Catathyridium garmani* (Jordan & Goss 1889)(Actinopterygii: Achiridae). **Biota Neotropica**, v. 9, p. 275-277, 2009.

SERVIS, J. A. *et al.* Characterizing coral reef biodiversity: genetic species delimitation in *brachyuran crabs* of Palmyra Atoll, Central Pacific. **Mitochondrial DNA Part A**, v. 31, n. 5, p. 178-189, 2020.

- SEVERIANO, K. M. C. **Revisão taxonômica do gênero *Achirus* Pleuronectiformes: Achiridae) e a descrição anatômica das espécies *Achirus declivis* e *Achirus lineatus* da região sudeste do Brasil.** Rio de Janeiro, 2011. Dissertação, Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.
- SITES, J. W. & MARSHALL, J. C. Delimiting species: a Renaissance issue in systematic biology. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 18, n. 9, p. 462-470, 2003.
- SMITH, P. J., MCVEAGH, S. M., & STEINKE, D. DNA barcoding for the identification of smoked fish products. **Journal of Fish Biology**, 72(2), 464–471, 2008.
- STAFFEN, C. F. *et al.* **Identificação biológica e adulteração de pescados comercializados em peixarias de Florianópolis/SC através de DNA barcoding.** Santa Catarina, 2015. TCC, Trabalho de Conclusão de Curso, da Universidade Federal de Santa Catarina, 2015
- SUBIRÁ, Rosana Junqueira *et al.* **Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção**, V. 6, 2018. 492 p.
- TAMURA, K. *et al.* Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 101(30), 11030–11035, 2004.
- TRIVEDI, S. *et al.* Role of DNA barcoding in marine biodiversity assessment and conservation: an update. **Saudi Journal of Biological Sciences** 23:161–171, 2016. Disponível em:<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.01.001>.
- WANG, Z. D. *et al.* DNA barcoding South China Sea fishes. **Mitochondrial Dna**, v. 23, n. 5, p. 405-410, 2012.
- WARD, R.D. *et al.* DNA barcoding Australia's fish species. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, v. 360, p. 1847–1857, 2005. Disponível em: <http://doi:10.1098/rstb.2005.1716>.
- XAVIER, Vinícius. **Técnicas de coleta e preparação de vertebrados para fins científicos e didáticos.** Phyllomedusa: Journal of Herpetology, v. 1, n. 2, 2002. 116p.