



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS - UFAL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - ICBS  
PROGRAMA DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS BACHARELADO

VANESSA LESSA PEREIRA

**VERIFICAÇÃO DA AUTENTICIDADE DA IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE  
PESCADOS COMERCIALIZADOS COM DIFERENTES FORMAS DE  
PROCESSOS EM SUPERMERCADOS E MERCADOS DE MACEIÓ POR MEIO DA  
TÉCNICA DE *DNA BARCODING***

Maceió/AL

2020

VANESSA LESSA PEREIRA

**VERIFICAÇÃO DA AUTENTICIDADE DA IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE  
PESCADOS COMERCIALIZADOS COM DIFERENTES FORMAS DE  
PROCESSOS EM SUPERMERCADOS E MERCADOS DE MACEIÓ POR MEIO DA  
TÉCNICA DE *DNA BARCODING***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Programa de Graduação em Ciências Biológicas bacharelado da Universidade Federal de Alagoas como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Dalmo Almeida de Azevedo.

Maceió/AL

2020

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

P436v Pereira, Vanessa Lessa.

Verificação da autenticidade da identificação de espécies de pescados comercializados com diferentes formas de processos em supermercados e mercados de Maceió por meio da técnica de *DNA barcoding* / Vanessa Lessa Pereira. – Maceió, 2020.

57 f. : il. color.

Orientador: Dalmo Almeida de Azevedo.

Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2020.

Bibliografia: f. 47-57.

1. Código de barras de DNA taxonômico. 2. Peixes - Identificação. 3. Pescados - Comércio - Fraude. I. Título.

CDU:577.213.3:351.823.1(813.5)

## Folha de Aprovação

AUTORA: VANESSA LESSA PEREIRA

Verificação da autenticidade da identificação de espécies de pescados comercializados com diferentes formas de processos em supermercados e mercados de Maceió por meio da técnica de *DNA barcoding*

Trabalho de Conclusão de Curso – TCC, submetido ao corpo docente do Programa de Graduação em Ciências Biológicas bacharelado da Universidade Federal de Alagoas e aprovado em 10 (dez) de novembro de 2020.



---

(Prof. Dr. Dalmo Almeida de Azevedo, Universidade Federal de Alagoas - UFAL)

(Orientador)

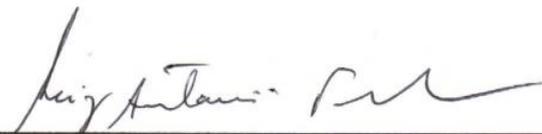
**Banca examinadora:**



---

(Prof. Dr. Francisco Javier Toyar, Universidade Federal de Alagoas - UFAL)

(Examinador Interno)



---

(Prof. Dr. Luiz Antonio Ferreira da Silva, Universidade Federal de Alagoas - UFAL)

(Examinador Interno)

## DEDICATÓRIA

*A minha mãe, Rosália, por ser o meu maior exemplo de mulher guerreira, mas que por circunstâncias da vida, deixou de realizar muitos dos seus sonhos e por isso, me ensinou a não desistir dos horizontes que eu quero alcançar. Ao meu irmão mais novo, Thiago, por ter sido, diariamente, meu ponto de paz e motivação para conclusão dessa jornada. Ao meu pai, Silóé, por toda estrutura provida e por todo esforço por mim realizado. E a minha tia-madrinha, Rosilda, por todo apoio e força depositados, dedico.*

## AGRADECIMENTOS

Ao meu irmão mais novo, Thiago, por todos os sorrisos e abraços calorosos que instantaneamente transformava em leveza e paz todo o peso vivido diariamente. Por ter sido e ser meu porto seguro e ser aquele, também, que me motiva a dar o meu melhor sempre. Obrigada, irmão.

Ao meu pai, Siloé, que com suas palavras duras, apesar de muitas vezes dolorosas, me impulsionou para que eu chegasse onde eu cheguei, assim como me incentiva para que eu alcance muito mais. A minha mãe, Rosália, apesar da incompreensão em alguns momentos, por todo cuidado, dedicação e preocupação. Aos dois de forma conjunta, agradeço por toda estrutura que me proporcionaram e que ainda me proporcionam, dentro das suas condições, mas que foi de grande ajuda para que eu administrasse esse ciclo que fecho agora.

A minha tia-madrinha Rosilda, por ter sido a primeira familiar que me forneceu apoio para começar, continuar e concluir o curso de Ciências Biológicas, sempre me motivando a ver novos horizontes e possibilidades.

A minha amiga Jamilli, que sempre esteve presente da forma que podia, tanto nos meus melhores quanto nos meus piores momentos. As conversas “jogadas”, assim como os desabafos nos momentos de angústia foram essenciais para permanência nesse caminho. De coração, meu muito obrigada, amiga.

A minha amiga de curso, Janyne, por ter sido a melhor dupla que eu poderia ter, que com seu jeito leve, seguro e espontâneo, foi âncora, e por consequência, me ajudou a manter a melhor firmeza possível nos momentos através de suas palavras e atitudes, tanto em situações acadêmicas como em situações fora do curso. A ela, Elisa, Myrna e Dandara, também colegas de curso, meu muito obrigada por toda experiência, risadas e desabafos compartilhados.

Ao meu orientador, Dalmo, por toda paciência, compreensão e ensinamentos compartilhados, além da constante disposição em ajudar. Obrigada de coração, professor! E a toda equipe do Laboratório de DNA Forense, em especial o Gustavo, por todo apoio e ajuda nas dificuldades ocorridas com os experimentos.

A minha supervisora de estágio, Talita, e ao meu gerente, Epitácio, não só por toda compreensão nos meus momentos de ausência motivados pela necessidade da realização de alguma atividade vinculada ao TCC, como também, por todo apoio e confiança depositados.

*“Ver cores nas cinzas  
E a vida reinventar.”*

**(Francisco, el Hombre; Helena Maria; Larissa Baq; Renata Éssis e Salma Jô)**

## RESUMO

Os pescados possuem uma enorme importância como fonte nutricional para milhões de pessoas ao redor do mundo, correspondendo, em 2015, a 17% da proteína animal ingerida. Mais da metade da produção mundial de peixe é vendida com algum tipo de processamento. Esse fato pode facilitar a realização de fraudes na identificação de espécies de pescado, através da substituição de espécies que possuem um alto valor comercial por outras que possuem um valor comercial mais baixo, por parte dos componentes da cadeia produtiva do pescado ou pelos comerciantes. Isso acontece, pois dependendo da forma de processo, há a possibilidade da retirada de caracteres morfológicos que podem promover a identificação física do pescado, dificultando ou impossibilitando a sua identificação morfológica. Não só no Brasil, como em diversos outros países, a fraude em pescados se faz presente. Essa prática pode ocasionar diversos impactos em algumas áreas, como: economia, conservação e saúde humana, além de ferir diretamente direitos do consumidor. Para identificação das fraudes em pescados, existe um recurso extremamente eficaz: a identificação genética da espécie, através da técnica de DNA *barcoding*, que consiste no sequenciamento de uma região de aproximadamente 655 pb da subunidade I do gene mitocondrial citocromo oxidase (COI). O presente estudo teve como objetivos fazer a identificação genética de espécies de peixe comercializadas com alguma forma de processamento em estabelecimentos comerciais de Maceió/AL e realizar a verificação da autenticidade da espécie informada pelo vendedor ou na embalagem. Foram obtidas 42 amostras de pescado provenientes de 17 supermercados e mercados de Maceió/AL, estes espalhados em 11 bairros da cidade. As amostras obtidas passaram por: (1) processo de extração orgânica do DNA com fenol-clorofórmio ou pelo método com *Chelex*; (2) amplificação do DNA (PCR); (3) purificação com isopropanol e etanol; (4) sequenciamento com o *Kit BigDye Terminator*; (5) identificação genética da espécie por comparação da sequência obtida com sequências depositadas no banco de dados *GenBank* do NCBI e (6) caracterização ou não da fraude com base em documentos oficiais brasileiros que são usados para fiscalização de pescados. Das 42 amostras obtidas, 37 apresentaram sucesso em todas as etapas metodológicas do trabalho. Das 37 amostras bem sucedidas, 25 amostras demonstraram concordância entre espécie informada e espécie identificada. 11 das 37 amostras não apresentaram concordância entre espécie informada e nome científico identificado. Das 11 amostras caracterizadas como fraude, 10 delas foram compradas como “Bacalhau” e foram identificadas como *Gadus chalcogrammus* (“Polaca do Alasca”) e *Pollachius virens* (“Saithe”). De acordo com os resultados obtidos, de forma geral, a porcentagem de adulteração na venda de pescados encontradas nos estabelecimentos comerciais de Maceió/AL, apresentou semelhança quando comparada a maioria dos estudos no Brasil. Porém, quando comparada com grande parte dos resultados obtidos em outros países, a porcentagem aqui obtida foi maior. Ao analisar o “Bacalhau” de forma específica, sua porcentagem de adulteração foi muito alta, superior aos estudos publicados em diversos países, incluindo o Brasil.

**Palavras-chave:** DNA *barcoding*. Identificação incorreta de peixes. Fraude em pescados. Nordeste. Brasil.

## ABSTRACT

The seafood has a huge importance as a nutritional source for millions of people around the world, corresponding, in 2015, to 17% of the animal protein ingested. Over half of the global production of fish is sold with some kind of processing. This fact can facilitate frauds in the identification of seafood species, through substitution of species that have a high commercial value by species that have lower commercial value, on the part of the fish productive chain components or by merchants. That happens because depending on the kind of process, there's a possibility of removing morphological characters that can promote the physical identification of the seafood, making it difficult or impossible to identify it morphologically. As many other countries, in Brazil, the fraud in seafood is present too. This practice can cause several impacts in some areas, such as: economy, conservation and human health, in addition to directly affecting consumer rights. To identify frauds, exists a extremely efficient resource: the genetic identification of species, through DNA barcoding technique, which consists on sequencing a region of approximately 655 pb of mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (COI) gene. The present study had as aims make the genetic identification of fish species sold with some kind of processing in commercial establishments of Maceió, city of Alagoas state, and carry out the verification of the authenticity of the species informed by the seller or on the packaging. 42 samples was obtained from 17 supermarkets and markets of 11 neighborhoods of Maceió/AL city. The analysis of the samples obtained involved: (1) organic extraction of DNA process with phenol-chloroform or through Chelex method; (2) DNA amplification (PCR); (3) purification with isopropanol and ethanol; (4) sequencing with the Kit BigDye Terminator; (5) genetic identification of specie by comparison of obtained sequence with sequences deposited in NCBI GenBank database and (6) characterization or not of frauds according to official Brazilian documents that are used for seafood inspections. 37 samples of the 42 obtained samples were successful in all methodological stages of the present work. Of the 37 successful samples, 25 samples demonstrated agreement between informed specie and identified specie, but 11 of the 37 samples didn't show agreement between labelled specie and identified scientific name. Of the 11 samples characterized as fraud, 10 of them were labeled as "Bacalhau" and were identified as *Gadus chalcogrammus* ("Alaska pollock") and *Pollachius virens* ("Saithe"). According to the obtained results, in general, the fish mislabeling percentage on seafood sales found on commercial establishments of Maceió/AL city, demonstrate similarity when compared to majority studies in Brazil. However, when the obtained fish mislabeling percentage are compared with the most part of the results obtained for other countries, the value obtained in the present study was bigger. Analyzing specifically the "Bacalhau", its mislabeling percentage was very high, upper the value obtained on published studies carried in several countries, including Brazil.

**Key Word:** DNA *barcoding*. Fish mislabeling. Seafood fraud. Northeast. Brazil.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Mapa demonstrando as 17 localidades onde as amostras utilizadas no presente estudo foram obtidas. Percebe-se que elas são provenientes de diversos bairros da cidade de Maceió/AL, tanto da parte baixa quanto da parte alta do município citado.....27
- Figura 2** – Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio objetivando conferir o sucesso ou não da amplificação do gene COI, que possui aproximadamente 655 pb, das amostras identificadas em branco (produtos da PCR).....33
- Figura 3** – Resumo gráfico dos resultados obtidos na presente pesquisa .....36
- Figura 4** – Representação dos resultados obtidos através de mapa. Os pontos brancos representam estabelecimentos comerciais que não apresentaram fraude. Os pontos laranjas representam os estabelecimentos comerciais que apresentaram fraudes relacionadas ao “Bacalhau”. O ponto vermelho também representa uma das fraudes encontradas, relacionada ao peixe “Espada”. O ponto verde representa o único local analisado que não apresentou fraude relacionada ao “Bacalhau” .....39

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> (Ferramenta básica de busca do alinhamento local)
C	Citosina
COI	<i>Mitochondrial cytochrome oxidase subunit I gene</i> (Subunidade I do gene mitocondrial citocromo oxidase)
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of The United Nations</i> (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura)
FDA	<i>U.S Food and Drug Administration</i> (Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos da América)
FALCPA	<i>U.S Food Allergen Labeling and Consumer Protection Act of 2004</i> (Lei de Rotulagem de Alimentos Alergênicos e Proteção ao Consumidor de 2004 dos Estados Unidos da América)
G	Guanina
IN	Instrução Normativa
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> (Centro Nacional de Informações Biotecnológicas)
pb	Pares de base
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
Séc.	Século
T	Timina
°C	Graus Celsius

μ

Micro

%

Porcentagem

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	15
2.1 Panorama e conceitos básicos da Genética aplicados ao presente estudo ....	15
2.2 Sistemas taxonômicos e principais metodologias existentes para descrever a diversidade biológica.....	17
2.3 <i>DNA barcoding</i> e gene COI.....	19
2.3.1 DNA barcoding como ferramenta auxiliar para fiscalização de produtos comercializados .....	20
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	26
3.1 Extração do DNA das amostras obtidas .....	27
3.1.1 Extração com Chelex.....	28
3.1.2 Extração orgânica com fenol-clorofórmio seguida precipitação com isopropanol/etanol.....	28
3.1.3 Verificação do sucesso da extração do material genético .....	29
3.2 Amplificação do DNA .....	29
3.3 Purificação do DNA.....	30
3.4 Sequenciamento do fragmento COI.....	31
3.5 Identificação da fraude.....	31
<b>4 RESULTADOS</b> .....	33
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	40
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	45
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	47

## 1 INTRODUÇÃO

Conforme apresentado pela *Food and Agriculture Organization of The United Nations* - FAO (2016), os pescados continuam oferecendo uma enorme importância como fonte de alimento ou nutricional para milhões de pessoas ao redor de todo o mundo. Para se ter uma ideia, em 2015, o consumo de peixe correspondeu a cerca de 17% da proteína animal ingerida pela população mundial (FAO, 2018).

De forma complementar, FAO (2018) apresentou que aproximadamente 151 milhões de toneladas, o que corresponde a 88% da produção mundial de peixes, foram destinadas para consumo humano. Desse total, em 2016, cerca de 45% foi comercializado em forma viva, fresca ou refrigerada, o que de forma geral, eleva o preço do produto. O restante da produção destinada para o consumo humano, conforme apresentado por FAO (2016), geralmente é vendida com alguma forma de processo, como por exemplo: congelado, salgado, seco, em conserva, defumado, entre outros tipos de processo.

A depender da forma de processamento que o peixe é submetido, a identificação por parte do consumidor pode ser dificultada ou até impossibilitada, pois de acordo com Moore et al. (2012), algumas formas de processamento retiram características morfológicas que permitiriam a identificação, dificultando, assim, a verificação da autenticidade da espécie por parte do consumidor e ao mesmo tempo, facilitando a substituição de espécies por parte dos comerciantes.

Segundo Pimenta Neto (2013) baseando-se na ideia apresentada por Almeida (2005), a fraude de pescados consiste em substituições intencionais de um produto de alto valor comercial por outro que tem um menor valor comercial e geralmente também possui uma maior disponibilidade, atitude essa que além de ferir o direito do consumidor de saber exatamente aquilo que está adquirindo, oferece riscos à saúde de quem está consumindo, pois há peixes que possuem substâncias alérgicas, como metais pesados, toxinas e proteínas alergênicas, conforme apresentado por Santana Neto et al. (2010), Silva & Santos (2016) e a *U.S Food and Drug Administration* - FDA (2020), respectivamente.

De acordo com a Lei Federal nº 12.741/2012, é direito do consumidor ter informações corretas e transparentes a respeito dos produtos e serviços que está consumindo, contendo, principalmente, informações a respeito das características, da composição e se houver riscos com o consumo, a especificação dos mesmos.

Ainda segundo o código de defesa do consumidor exposto na Lei Federal nº 8.078/1990, o consumidor tem por direito, também, a proteção contra publicidade enganosa de produtos. Porém, apesar do código de defesa do consumidor defender, teoricamente, o consumidor, a fraude de produtos, em especial os pescados, ainda se faz presente não só no Brasil conforme apresentado por Pimenta Neto (2013) e Carvalho et al., (2015; 2017), como também em diversos outros países como Estados Unidos da América (WARNER et al., 2013); Itália (CUTTARELLI et al., 2014); China (WEN et al., 2015); e Canadá (SHEHATA et al., 2018).

Tendo em vista que o Brasil se destaca na produção de pescados de água doce, estando entre os dez maiores produtores do mundo, com aproximadamente 243 mil toneladas produzidos por ano, conforme apresentado por FAO (2010), complementado pela ausência de trabalhos relacionados a autenticação dos pescados vendidos no comércio da região nordeste brasileira, urge a necessidade de estudos relacionados ao tema nos estados pertencentes ao nordeste do Brasil.

Uma ferramenta que pode ser uma forte aliada na autenticação de produtos, não só de pescado, mas em produtos alimentícios de uma forma geral, como carnes, vinhos, azeite de oliva entre outros, conforme apresentado por Scarano & Rao (2014), é a técnica conhecida por DNA *barcoding*, inicialmente apresentada por Hebert et al. (2003) na tentativa de padronizar a região do DNA a ser utilizada para identificação genética de espécies. Essa técnica consiste no sequenciamento de uma região de aproximadamente 655 pb da subunidade I do gene mitocondrial citocromo oxidase (COI), permitindo, assim, a identificação correta da espécie a nível molecular.

O objetivo geral do presente trabalho foi verificar se a identificação das espécies de pescados que são comercializados com alguma forma de processo está sendo feita apropriadamente nos mercados e supermercados de Maceió/AL. Já como objetivos específicos do presente estudo, buscou-se realizar a identificação genética da espécie por DNA *barcoding* e averiguar se a prática de substituição de espécies de pescado que estão em diferentes formas de processo e a consequente rotulação errônea do produto também ocorrem nos estabelecimentos comerciais de Maceió/AL.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Panorama e conceitos básicos da Genética aplicados ao presente estudo

De acordo com Alberts et al. (2010), analisando a história, é possível perceber que embora os ancestrais mais antigos da espécie atualmente identificada como *Homo sapiens* não tivessem nenhum conhecimento ou noção sobre células ou material genético, já era perceptível, na visão deles, que apesar de organismos diferentes apresentarem formas totalmente distintas uns dos outros, havia algo em comum que unia os diversos organismos: a vida.

No entanto, mesmo não conseguindo desvendar naquele momento como essa maquinaria funcionava, a curiosidade e o encantamento eram imensos, cujos permaneceram ou até mesmo intensificaram-se com o passar dos anos, com as novas gerações, até que no século passado (séc. XX) veio a descoberta da natureza da vida: o maquinário celular. Foi possível constatar que todos os organismos compartilham de uma mesma maquinaria, em que grande parte de suas funções básicas também são compartilhadas entre os diversos tipos de organismos (ALBERTS et al., 2010).

Ainda segundo Alberts et al. (2010), não só foi descoberto que existe uma célula com maquinaria semelhante entre os organismos, mas também, que há um material dentro de cada célula onde é armazenada a informação hereditária necessária que confere a natureza do organismo, o que foi chamado de moléculas de *deoxyribonucleic acid* (DNA) ou ácido desoxirribonucleico em português, conforme descoberto por Watson e Crick (1953). Estas moléculas, para Griffiths et al. (2013), são definidas como um sistema que armazena as informações genéticas em praticamente todos os organismos e são formadas por fitas duplas em longas cadeias que são sempre constituídas pelo mesmo tipo de monômeros ou bases, sendo eles: Adenina (A), Timina (T), Guanina (G) e Citosina (C).

A informação genética de um organismo é codificada de acordo com a ordenação em que os monômeros de A, T, G e C estão dispostos em uma sequência linear (ALBERTS et al., 2010; GRIFFITHS et al., 2013). Esse fato permite a ocorrência de fenótipos variados dentro de uma mesma espécie ou até mesmo, possibilita a diferenciação entre as possíveis e estimadas cem milhões espécies atualmente existentes na Terra (ALBERTS et al., 2010).

Com a descoberta do material genético e de sua respectiva estrutura, inúmeras pesquisas visando melhor conhecê-lo se espalharam pelo mundo. Com isso, foram descobertas técnicas inovadoras e muito importantes, que atualmente são utilizadas em massa quando trabalha-se com DNA. Nesse viés, destacam-se duas ferramentas: os métodos de extração do DNA e o procedimento de amplificação do DNA, conhecido como reação em cadeia da polimerase ou *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

A extração do DNA é um procedimento necessário que permite ultrapassar todas as barreiras ou materiais para então chegar ao material genético, objetivando promover a lise celular e a purificação do DNA presente em uma amostra (ALVES & SOUZA, 2013). Destaca-se ainda que, esse processo é primordial e necessita apresentar sucesso para que outros procedimentos posteriores, como amplificação e sequenciamento do DNA, por exemplo, também possam ser bem sucedidos.

De acordo com Oliveira et al. (2007), as técnicas utilizadas para extrair o material genético de uma amostra variam, principalmente, de acordo não só com o tipo de tecido e a sua origem, mas também, conforme o estado que a amostra se encontra, como por exemplo, se está líquida ou sólida, entre outros.

No entanto, é válido evidenciar que existem duas técnicas que se destacam quando o assunto é a extração de DNA. A primeira, trata-se da extração orgânica do material genético, que é realizada com uma mistura de fenol-clorofórmio, que em suma, provocará a desnaturação das proteínas de uma forma extremamente eficiente, conforme apresentado por Oliveira et al. (2007).

O segundo método de extração é feito com a substância chamada *Chelex* e conforme defendido por Walsh, Metzger & Higuchi (2013), é um método bem mais simples, rápido, não tem envolvimento de solventes orgânicos, além de não precisar realizar várias trocas de tubos quando comparado com o método de extração utilizando fenol-clorofórmio. Em resumo, o seu funcionamento ocorre pelo fato da resina quelante do *Chelex* ligar-se à íons livres presentes na amostra coletada, prendendo-os, pois os mesmos são inibidores da polimerase, proteína que após a extração do material genético é extremamente importante para realizar a amplificação do DNA através da técnica da reação em cadeia polimerase (PCR).

A técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), conforme apresentado por Mesquita et al. (2001) e Oliveira et al. (2007), permite a amplificação *in vitro* de fragmentos específicos do genoma de qualquer espécime, o que possibilita a

obtenção de milhões de cópias de uma região-alvo do material genético a partir de uma baixa quantidade de DNA extraído. Essa grande quantidade de DNA obtida a partir da aplicação da PCR, que pode ser nomeada como DNA amplificado, permite a realização de diversos estudos e um deles diz respeito ao sequenciamento do material genético presente nos organismos, isto é, da determinação da sequência de nucleotídeos que há em um fragmento de DNA (OLIVEIRA et al., 2007).

## **2.2 Sistemas taxonômicos e principais metodologias existentes para descrever a diversidade biológica**

Diante da notória biodiversidade que atualmente habita o planeta Terra, assim como a importância de descobrir e descrever as espécies que já habitaram-na, existe a necessidade de ferramentas eficientes que possibilitem a identificação desses *táxons*. Um dos métodos mais famosos e utilizados trata-se do sistema de identificação baseado na morfologia, que consiste na análise, somente, de caracteres morfológicos de um organismo como critério para caracterização de sua espécie (LEFÉBURE et al., 2006).

Continuando nesse viés, em um estudo realizado por Tautz et al. (2003), foi apresentado que apesar da taxonomia morfológica auxiliar ou até mesmo ser o pilar de grande parte das pesquisas biológicas por mais de passados 250 anos, havia uma problemática: existiam poucos especialistas disponíveis que conseguissem atender toda demanda de identificação da diversidade biológica, além de que nem sempre é possível manter a integridade dos espécimes, o que prejudica os estudos baseados na morfologia do organismo.

Ainda como problemas da identificação das espécies através da taxonomia utilizando a morfologia do espécime, Hebert et al. (2003) atestou que essa metodologia possui várias limitações. Uma delas trata-se de que a identificação através de caracteres morfológicos só é efetiva, frequentemente, quando utilizado um determinado gênero e/ou estágio de vida de um organismo. Outra delas é que a plasticidade fenotípica que alguns *táxons* possuem, assim como a variabilidade genética em caracteres comumente utilizados no reconhecimento das espécies são fatores que podem levar a identificação inadequada de inúmeros espécimes, convergindo para uma estimativa exagerada ou até mesmo escassa da biodiversidade existente (LEFÉBURE et al., 2006).

Como solução para esse problema, Tautz et al. (2003) sugeriram a utilização de um novo sistema taxonômico de referência baseando-se em metodologias com o DNA, como por exemplo: a obtenção e utilização das sequências genéticas das mais variadas espécies, para fins taxonômicos, pois qualquer região do genoma de um organismo possui a capacidade de fornecer informações relacionadas a taxonomia, apesar de haver partes que são mais informativas do que outras. No entanto, foi sugerido o uso desse recurso não só como ferramenta auxiliar na identificação de um *táxon*, funcionalidade já bem estabelecida desde o final do séc. XX, e sim como instrumento base para tal objetivo, assim como era a taxonomia tradicional -baseada na morfologia do espécime-.

Porém, ainda com base em Tautz et al. (2003), é válido evidenciar que apesar de serem metodologias taxonômicas distintas, elas poderiam ser complementares. Ou seja, é possível e até mesmo ideal a combinação de diferentes fontes de dados para descrição de espécies, pois tendo em vista a complexidade biológica, há *táxons* que necessitam de estudos por múltiplas perspectivas. Esse conceito de complementaridade de ideias foi posteriormente nomeado de Taxonomia Integrativa por Dayrat (2005).

Continuando no viés apresentado por Tautz et al. (2003), a taxonomia baseada no DNA seria um procedimento muito direto: uma amostra do tecido de um espécime-tipo seria coletada e a partir dela seria realizada a extração do DNA presente nela. Com esse material, ampliações através de PCR poderiam ser realizadas em diversas regiões de genes específicos, em que após esse passo, a amostra poderia ter sua sequência genética identificada.

Essa sequência serviria como referência e funcionaria como um tipo de “código de barras” padrão para a espécie que teve sua informação genética sequenciada. De forma complementar e não menos importante, a sequência obtida deveria ser armazenada em bancos de dados específicos em conjunto com outras informações relevantes, como: descrição da espécie e seu *status* taxonômico. Isso possibilitaria a existência de uma plataforma universal mais acessível para informações taxonômicas, pois a forma como as pesquisas científicas eram publicadas em meados dos 2000, eram consideradas difíceis de acessar (TAUTZ et al., 2003).

Com isso, conseqüentemente, o sequenciamento genético do *táxon* serviria como referência para identificações futuras, em que essa identificação poderia ser

realizada através de comparação das sequências genéticas das amostras-referência com as amostras em análise, objetivando encontrar qual amostra-referência a amostra analisada possuiria maior similaridade, permitindo assim, chegar a espécie que o espécime analisado pertence. Essa situação além de realizar a identificação genética dos *táxons*, poderia indicar a existência de novas espécies, assim como facilitar a análise e/ou criação das árvores filogenéticas dos organismos. (TAUTZ et al., 2003).

### **2.3 DNA barcoding e gene COI**

Na tentativa de padronizar o fragmento utilizado para as identificações de espécies a nível molecular para o sistema taxonômico de referência baseando-se em metodologias com o DNA, Hebert et al. (2003) sugeriram o sequenciamento da subunidade I do gene mitocondrial citocromo oxidase, conhecido atualmente como gene COI, que possui aproximadamente 655 pb. Apesar de qualquer fragmento do genoma de um espécime possuir a capacidade de fornecer informações, ainda conforme Hebert et al. (2003), o sequenciamento do gene COI seria suficiente para diferenciar grande maioria ou até mesmo todas as espécies animais. Essa técnica recebeu o nome de *DNA barcoding* ou código de barras genético.

Para Hajibabaei et al. (2007), o código de barras genético ou *DNA barcoding* fundamenta-se na premissa de que uma curta sequência-referência é suficiente para promover a diferenciação de indivíduos, ou seja, averiguar se os organismos em análise pertencem ou não a uma mesma espécie, pois apesar de normalmente indivíduos pertencentes a uma mesma população apresentarem algumas variações genéticas e/ou fenotípicas, estas são menores das que ocorrem entre diferentes espécies.

Nesse sentido, diversos estudos iniciaram-se utilizando a técnica do *DNA barcoding* para identificação de diferentes tipos de organismos, incluindo vários grupos animais, como por exemplo: as aranhas, estudadas por Barrett e Hebert, (2005); e os pássaros, analisados por Hebert et al. (2004); assim como obteve sucesso em estudos com bactérias, conforme apresentado por Sogin et al. (2006); e com plantas, de acordo com o trabalho realizado por Kress et al. (2005); entre outros tipos de organismos estudados.

Os peixes foram um dos grupos animais que tiveram inúmeros estudos objetivando a obtenção de suas sequências genéticas. Um dos estudos pioneiros foi realizado com sucesso por Ward et al. (2005), utilizando o sequenciamento do gene COI que foi proposto por Hebert et al. (2003) para padronizar as identificações a nível molecular.

Na pesquisa de Ward et al. (2005), para a devida realização do sequenciamento, foram desenhados 4 (quatro) combinações de *primers* ou iniciadores. Eles foram denominados de *FishF1*, *FishF2*, *FishR1* e *FishR2*, e apresentaram a seguinte sequência de nucleotídeos: *FishF1*-5'TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC3'; *FishF2*-5'TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC3'; *FishR1*-5'TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA3'; e *FishR2*-5'ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA3'.

Os *primers* ou iniciadores, de acordo com Fernandes (2005), podem ser definidos como segmentos de ácidos nucléicos necessários e que permitem o início da replicação do DNA no fragmento exato a ser replicado. Sem eles, a amplificação do material genético através da técnica de PCR não seria possível, pois faltariam os iniciadores para realização das cópias exatas do fragmento específico a ser analisado. No âmbito das identificações moleculares de organismos, esse fragmento específico trata-se do gene COI.

É válido evidenciar que, o desenho dos *primers* realizado por Ward et al. (2005) para utilização em identificação de peixes, *primers FishF1*, *FishF2*, *FishR1* e *FishR2*, são utilizados com sucesso até a atualidade para o mesmo fim, conforme apresentado nos estudos de Tagliavia et al. (2016), Kannuchamy et al. (2016) e Bingpeng et al. (2018).

### 2.3.1 DNA barcoding como ferramenta auxiliar para fiscalização de produtos comercializados

Além de toda importância taxonômica que há quando se utiliza a técnica de DNA *barcoding*, outra vantagem de utilizar essa técnica gira em torno do comércio varejista e/ou atacadista. De acordo com Baker et al., 2002 e Marko et al., 2004, há um histórico de comercialização de espécies legalmente protegidas, como as espécies ameaçadas de extinção, através da rotulagem incorreta dos produtos, mascarando, assim, a verdadeira identidade do pescado. Nesse sentido, a técnica

de DNA *barcoding* pode contribuir na verificação da ocorrência desse tipo de comercialização irregular, além de poder auxiliar na identificação de prováveis mercados de exploração não regulamentados.

Ainda no âmbito comercial, outra possibilidade extremamente importante que vem com a aplicação do código de barras genético para identificação de espécies trata-se da autenticação dos mais diversos tipos de alimentos, incluindo os pescados, conforme apresentado por Lockley e Bardsley (2000), Gil (2007) e Scarano & Rao (2014). Analisando o caso dos pescados de forma específica, a necessidade de autenticidade vem do histórico da ocorrência de diversos relatos de fraudes na identificação de peixes comercializados não só no Brasil como em vários outros países.

Em um estudo descritivo realizado por Pardo, Jiménez e Pérez-Villarreal (2016), baseando-se em outras pesquisas publicadas que foram realizados na América do Sul, Itália, Espanha, Ásia e Oceania, África, América do Norte, Reino Unido, Itália, Espanha e o restante da Europa, entre os anos de 2010 a 2015, e que objetivavam expor questões relacionadas a fraudes em peixes comercializados, foi demonstrado que a média de adulterações encontradas nas regiões acima listadas, quando analisadas em conjunto, chegava a uma porcentagem de 30%.

As fraudes que ocorrem nos pescados, de acordo com o conceito exposto por Pimenta Neto (2013) embasado nas informações descritas por Almeida (2005), constituem-se basicamente em substituir uma espécie com alto valor comercial e muitas vezes com disponibilidade restrita, por uma espécie que possua não só um valor comercial mais baixo como uma ampla disponibilidade.

Destaca-se que os pescados, de forma geral, possuem uma importância muito significativa não só comercial como nutricional para a população mundial. Em aproximadamente 10 anos, a produção mundial de peixes destinada ao consumo humano aumentou aproximadamente 50%: de 100.7 milhões de toneladas em 2009 (*Food and Agriculture Organization of The United Nations* - FAO, 2009) para 151.2 milhões de toneladas em 2016 (FAO, 2018). Além disso, o consumo *per capita* dos pescados passou de uma média de 16kg (FAO, 2009), para 20.3kg em 2016 (FAO, 2018). Frisa-se ainda que, cerca de 17% da proteína animal consumida pela população global é proveniente dos pescados (FAO, 2016; 2018).

Ainda nesse sentido, é válido evidenciar que de acordo com o FAO (2016), da produção mundial de peixes destinada ao consumo humano, mais da metade é

comercializada com alguma forma de processo, como por exemplo: peixes salgados, congelados, em conserva, defumados, entre outros tipos de processo.

Continuando nesse viés, uma outra forma de processo também amplamente utilizada é a filetagem do peixe, como apresentado por Smith, McVeagh e Steinke (2008), que assim como os outros tipos de processo acima citados, pode retirar características morfológicas que permitiria ou facilitaria a identificação visual por parte do consumidor.

Tendo em vista essa maior dificuldade do consumidor em identificar visualmente um pescado que passou por algum tipo de processo, alguns produtores e/ou comerciantes varejistas e/ou atacadistas tiram proveito dessa situação para realizar as adulterações na rotulagem dos pescados: identificam o peixe como uma espécie que possui alto valor comercial, mas na realidade, trata-se de uma espécie de menor valor comercial, objetivando assim, um maior lucro, conforme exposto por Barbosa (2015). Ainda há questionamentos de qual seria o ponto inicial dessas substituições, se elas começam nos próprios produtores ou se é uma atitude realizada em maior grau pelos comerciantes, no entanto, há indícios que sugerem que há histórico de adulterações partindo de toda cadeia produtiva até o ato de venda do produto final ao consumidor (NAAUM et al., 2016).

Continuando no âmbito das adulterações, um dos Direitos e Garantias Fundamentais estabelecidos na Constituição da República Federativa do Brasil (1988) é a defesa do consumidor garantida pelo Estado, assim como também se trata de um dos princípios gerais da atividade econômica brasileira. Nesse sentido, foi criada a Lei nº 8.078/1990 (BRASIL, 1990), conhecida popularmente como o “Código de Defesa do Consumidor”. Como alguns dos direitos básicos do consumidor garantido pela legislação supracitada e por uma de suas alterações, a Lei nº 12.741/2012 (BRASIL, 2012), têm-se:

I - a proteção da vida, saúde e segurança contra os riscos provocados por práticas no fornecimento de produtos e serviços considerados perigosos ou nocivos;

[...]

III - a informação adequada e clara sobre os diferentes produtos e serviços, com especificação correta de quantidade, características, composição, qualidade, tributos incidentes e preço, bem como sobre os riscos que apresentem (BRASIL, 1990; 2012).

Sendo assim, a atitude de substituir uma espécie de pescado de maior valor comercial por uma espécie que possui menor valor comercial, além de desrespeitar o direito do consumidor de saber exatamente aquilo que está comprando e

consequentemente ingerindo, apresenta alguns outros possíveis impactos em alguns âmbitos específicos (NAAUM et al., 2016).

Um dos impactos possíveis quando ocorre fraudes na identificação de espécies de pescado refere-se a saúde humana, conforme Naaum et al. (2016). Diversas espécies de peixes podem apresentar níveis variados e muitas vezes elevados de metais pesados, conforme apresentado por Lima et al. (2015), por Azaman et al. (2015) e por Silva & Santos (2016); e/ou toxinas, segundo exposto por Santana Neto et al. (2010). Além disso, há pescados que apresentam proteínas alergênicas em sua composição, segundo a *Food and Drug Administration* dos Estados Unidos da América - FDA (2020), em que é válido destacar que os peixes estão na lista dos 8 (oito) principais grupos de alimentos com potencial alergênico conforme a Lei norte-americana nº 108-282 - Aug. 2, 2004 (United States - US, 2004), mais popularmente conhecida como *U.S Food Allergen Labeling and Consumer Protection Act of 2004* (FALCPA) ou Lei de Rotulagem de Alimentos Alergênicos e Proteção ao Consumidor de 2004 dos Estados Unidos da América; e conforme a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 26/2015 (BRASIL, 2015a).

Nos três casos descritos acima, é evidente o potencial de risco oferecidos ao consumidor quando da ingestão não somente de certas espécies de peixes, como de diversos outros alimentos que são comercializados com rotulagem errônea ou fraudes propositais, reforçando a necessidade de uma identificação adequada dos alimentos comercializados, principalmente os processados, assim como a presença de informações diretas na embalagem a respeito dessas substâncias, conforme exposto pela FALCPA (United States - US, 2004).

Além de todo impacto que as substituições de espécies em comercializações de peixe podem causar a saúde humana, há outros tipos de consequências que também podem ser gerados com essa atitude, como: impactos econômicos e na conservação de espécies, conforme apresentado por Naaum et al. (2016).

No que tange a economia, conforme exposto por Stiles et al. (2013), a diferença de preços entre espécies com alto valor comercial e as espécies que comumente são usadas para realizar as substituições, estas geralmente com menor valor comercial, pode chegar a 244% na venda a atacado, por exemplo. De forma complementar, de acordo com Cline (2012), as substituições de espécies de pescado podem custar, de forma exclusiva aos consumidores dos Estados Unidos da América, por exemplo, cerca de sete milhões de dólares ao ano.

Com relação aos impactos na conservação de espécies, segundo Naaum et al. (2016), a adulteração de produtos é um caminho que pode permitir a comercialização de produtos ilegais, não reportados e/ou não regulamentados, principalmente quando há a filetagem de peixes, por exemplo. Além disso, ainda segundo a mesma autora, mesmo que as espécies utilizadas nas substituições não estejam em perigo, há uma grande possibilidade da atual disponibilidade de espécies estarem mascaradas.

Tendo em vista os possíveis impactos que podem ser gerados ao realizar a rotulagem errônea de produtos ou a substituição de espécies, em especial os pescados, diversos estudos objetivando uma melhor percepção, caracterização e quantificação do tema foram e estão sendo realizados em diversos países do mundo, incluindo o Brasil. Além das pesquisas, há medidas que vêm sendo tomadas no objetivo auxiliar diretamente pesquisadores, equipes de fiscalização e os integrantes da cadeia produtiva dos pescados no reconhecimento de espécies de peixes, mesmo quando estes produtos apresentam algumas formas de processamento comuns, como por exemplo, a filetagem, cortes em postas e em pedaços. Essas medidas possuem potencial de prevenir e/ou diminuir as fraudes em pescados, assim como defender o direito do consumidor e protegê-lo das possíveis perdas econômicas, por exemplo.

A título exemplificativo, em 2015 e em 2016, foram publicados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA do Brasil dois documentos importantes: a Instrução Normativa MAPA nº 29, de 23 de setembro de 2015 (BRASIL, 2015b) e o Manual de Inspeção para Identificação de Espécies de Peixes e Valores Indicativos de Substituições em Produtos da Pesca e Aquicultura (BRASIL, 2016). Destaca-se que ambos podem ser definidos como ferramentas que objetivam prevenir substituições de espécies de pescados no Brasil.

A IN MAPA nº 29/2015 do Brasil (2015b) objetivou apresentar, dentro das principais espécies de pescado que possuem potencial comercial no território brasileiro, uma lista contendo a relação entre os nomes científicos dessas espécies e seus respectivos nomes comuns. É importante evidenciar que, a referida IN foi recentemente revogada, pois passou por atualizações, e em seu lugar entrou em vigor a Instrução Normativa MAPA nº 53, de 1º de setembro de 2020 (BRASIL, 2020).

Já o Manual do MAPA do Brasil (2016), que foi descrito anteriormente, é considerado como uma referência didática para identificação de pescados, pois apresenta várias instruções por imagens para a identificação dos *táxons* de peixes mais comercializados no território brasileiro, sendo ele nativo ou não, observando a conformação dos seus miômeros e mioseptos. Além da relação entre nomes científicos e comuns e das instruções de identificação, há, também, os nomes comuns dos pescados que frequentemente são usados para substituições de cada peixe apresentado.

No entanto, apesar dos documentos acima apresentados do MAPA do Brasil (2016; 2020) oferecerem grande ajuda na identificação de pescados no território brasileiro, há espécies que são extremamente parecidas, o que pode impossibilitar o reconhecimento físico ou abrir margem para dúvida, situação que facilmente pode enganar o consumidor, assim como pode dificultar o trabalho da fiscalização e dos pertencentes a cadeia produtiva do pescado. Sendo assim, ainda há a necessidade de outras formas de identificação, como por exemplo, a técnica de DNA *barcoding*, para verificação da autenticidade das espécies comercializadas a partir da comparação das suas informações genéticas com as informações contidas no rótulo do produto.

Devido ao seu potencial, a técnica de DNA *barcoding* é uma ferramenta validada pela FDA para identificação e autenticação de peixes, conforme apresentado por Handy et al., (2011), além de ter sido adotada e implementada pelo Brasil como metodologia padrão para a regulação dos pescados comercializados no país (CARVALHO et al., 2017).

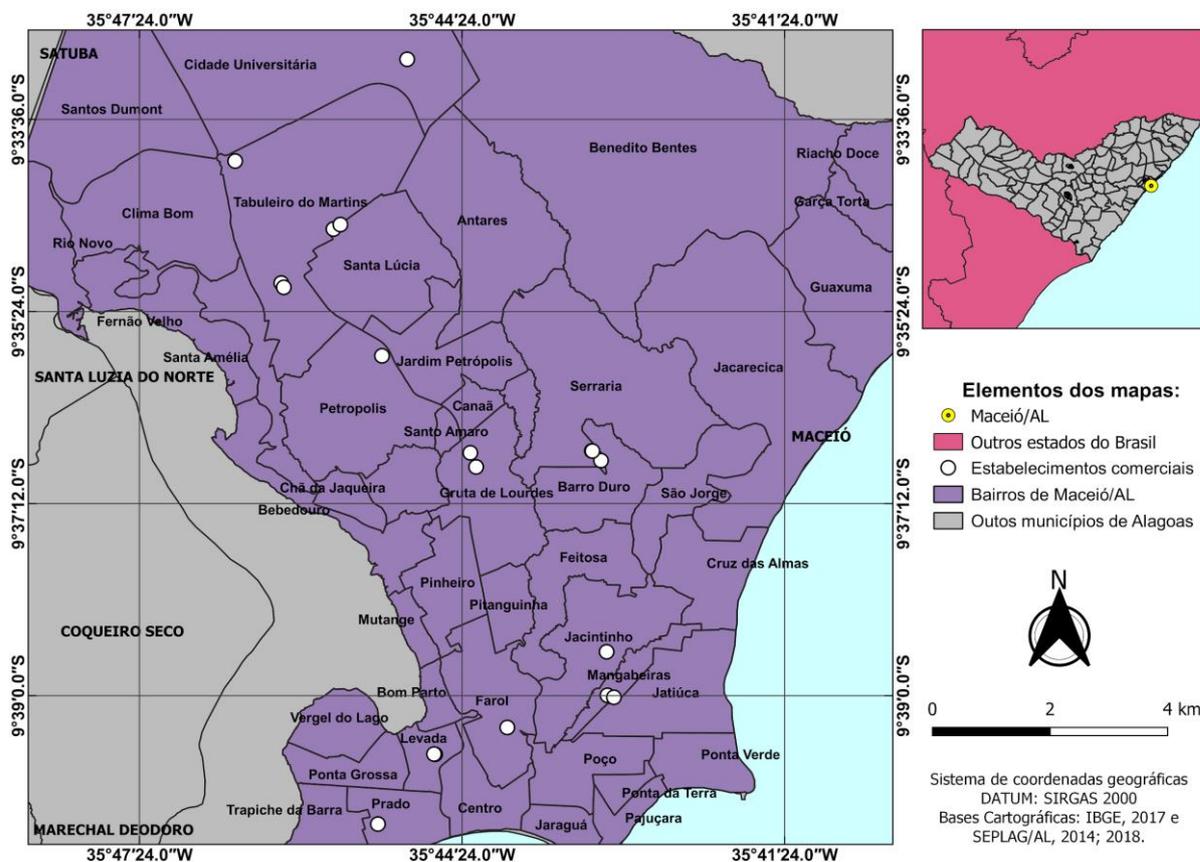
### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os processos experimentais ocorridos nas amostras de pescados utilizadas no presente estudo, que serão detalhados posteriormente, em quase totalidade, foram realizados no Laboratório de DNA Forense, um dos setores dos Laboratórios Integrados de Ciências do Mar e Naturais (LABMAR) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), nos anos de 2017 a 2019.

No presente trabalho, foram obtidas 42 (quarenta e duas) amostras de diferentes espécies de peixes vendidos em estabelecimentos comerciais da cidade de Maceió/AL na forma filetada ou com outro tipo de processo. Essas amostras são provenientes de 17 (dezessete) supermercados e mercados diferentes do referido município, como pode ser observado na Figura 1. Esses estabelecimentos comerciais estão distribuídos em 11 (onze) bairros do referido município, sendo eles: Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins, Santa Lúcia, Petrópolis, Gruta de Lourdes, Serraria, Jacintinho, Mangabeiras, Farol, Levada e Prado, conforme a divisão de bairros oficial do Estado de Alagoas, exposto através das bases de dados administrados pela Secretaria de Estado do Planejamento, Gestão e Patrimônio de Alagoas (2014; 2019), popularmente conhecida como SEPLAG/AL.

Todas as amostras citadas passaram pelos seguintes processos: extração de DNA, amplificação, purificação, sequenciamento e comparação das sequências obtidas das 42 amostras adquiridas no presente estudo com as que estão depositadas no banco de dados *GenBank* do *National Center for Biotechnology Information* - NCBI ou Centro Nacional de Informações Biotecnológicas em português; sendo que todos estes passos serão melhor detalhados a seguir.

**Figura 1 – Mapa demonstrando as 17 localidades onde as amostras utilizadas no presente estudo foram obtidas. Percebe-se que elas são provenientes de diversos bairros da cidade de Maceió/AL, tanto da parte baixa quanto da parte alta do município citado**



**Fonte: Software QGIS versão 3.10.4, com dados do presente estudo (2017-2020), complementos pelos dados da SEPLAG/AL (2014; 2019).**

### 3.1 Extração do DNA das amostras obtidas

As 42 amostras obtidas no presente trabalho passaram por processo de extração e isolamento do material genético (DNA), em quase totalidade, através do método de extração com *Chelex* (ESTOUP et al., 1996), por ser um método simples e relativamente rápido, além de prover um resultado de extração consideravelmente satisfatório. No entanto, a obtenção de DNA de algumas amostras não foi bem sucedida com o método de extração com *Chelex*. Nesses casos, foi utilizado o método de extração orgânica com fenol-clorofórmio seguido de precipitação com isopropanol/etanol, pois apesar de ser um método mais demorado e dispendioso, é um procedimento que resulta em uma extração com material genético mais “limpo”, além de apresentar uma maior concentração de DNA.

### 3.1.1 *Extração com Chelex*

No processo de extração com *Chelex*, as amostras foram cortadas em pedaços bem pequenos, aproximadamente 1 mm<sup>3</sup>, e colocadas em tubos de 1,5 mL, sendo cada amostra devidamente identificada. Foi adicionado aos tubos 500 µL de *Chelex* 10% e 15 µL de proteinase K (20 ng/mL). A preparação foi colocada em banho-maria por 1 (uma) hora a 56°C e, logo após, no termobloco a 100°C por 15 (quinze) minutos. As amostras de peixes salgados, como o “Bacalhau”, passaram por um processo de retirada do sal antes de começar o procedimento de extração propriamente dito, que se deu da seguinte forma: após cortar fragmentos das amostras e identificar os tubos de cada uma, foi adicionado 1 mL de água destilada e deionizada a cada tubo, colocando em banho maria a 56°C durante 30 (trinta) minutos. Após isso, as amostras foram centrifugadas a 14.100 g durante 2 (dois) minutos e o líquido foi descartado com micropipeta. Depois, todos os passos de retirada do sal anteriormente descritos foram repetidos mais uma vez e enfim o procedimento de extração foi iniciado.

### 3.1.2 *Extração orgânica com fenol-clorofórmio seguida precipitação com isopropanol/etanol*

No método de extração orgânica, as amostras foram cortadas em pequenos pedaços e colocadas em microtubos de 2 mL, com as respectivas identificações de cada amostra. A quantidade utilizada foi a suficiente para que a extremidade que apresenta formato de cone fosse preenchida com os pedaços de peixe. Logo após, foi adicionado aos microtubos 700 µL de solução de extração/tampão de lise (10 mM de Tris, 1 mM de EDTA e 0,5% de SDS) e 2 µL da enzima proteinase K (20 ng/mL), sendo depois colocadas em banho maria a aproximadamente 56°C por 1 (uma) hora. Após serem removidas do banho maria, transferiu-se 600 µL do sobrenadante para um tubo novo de 2 mL, adicionando-se à preparação igual volume de fenol, agitando bem até ficar com uma aparência leitosa. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14.100 g. A fase sobrenadante, de aparência transparente que é onde o DNA está localizado, foi transferida com micropipeta para um tubo novo de 1,5mL. O volume obtido para cada amostra foi de aproximadamente 500 µL. Para precipitação do DNA, foi adicionado igual volume

de isopropanol (500 µL) e deixado à temperatura ambiente por 20 min. A seguir a preparação foi centrifugada a 14.100 g por 15 min. Quando a centrifugação foi finalizada, o sobrenadante todo foi descartado invertendo o tubo. Em seguida, foi colocada a mesma proporção do passo anterior (aproximadamente 500 µL) de etanol 70% e centrifugado a 14.100 g por 5 min. Após este passo, o sobrenadante foi descartado com micropipeta e os tubos que continham o DNA foram mantidos virados a 180° para secar à temperatura ambiente, depois, sendo armazenados na geladeira. Para ressuspender o DNA, foi utilizado 30 µL de TRIS (10 mM, pH 8,0).

### 3.1.3 Verificação do sucesso da extração do material genético

Evidencia-se que independente do método utilizado para realizar a extração do DNA das amostras obtidas, a verificação do sucesso dessa etapa deu-se através da realização de eletroforese em gel de agarose concentrado a 1% corado com brometo de etídio.

Esse processo consiste na aplicação de uma diferença de potencial conduzidas por eletrodos contidos na cuba de eletroforese em que o gel de agarose estava imerso juntamente com uma quantidade considerável de tampão composto por Tris, Borato e EDTA (TBE) 10x. Essa ação provoca a migração das moléculas de DNA, quando existentes, em direção ao polo positivo do campo elétrico formado. Após finalização desse processo, o gel de agarose foi colocado em um transiluminador ultravioleta (UV), responsável por emitir radiação UV, que estimulava a ligação formada entre o corante (brometo de etídio) com a molécula de DNA, quando essa estava presente na amostra analisada. Nesse sentido, quando ocorria essa ligação, era visível uma “banda” colorida, indicando que a extração de DNA da amostra tinha sido bem sucedida, como pode ser visualizado na Figura 2.

## 3.2 Amplificação do DNA

Após a extração do DNA, as amostras com o material genético isolado foram submetidas a etapa de amplificação de um fragmento de aproximadamente 655 pb que está presente na subunidade I do gene mitocondrial da citocromo oxidase (COI), através da técnica *Polymerase Chain Reaction* - reação em cadeia da

polimerase em português, conhecida abreviadamente como PCR. Cada reação de termociclagem constituiu em 200 µM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1,25 µg/L de BSA e 2,5 µL de tampão PCR 10X (Tris-HCl 200 mM – pH 8,0, KCl 500 mM), 0,1 mM dos *primers* *FishF1*-5'TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC3' e *FishR1*-5'TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA3' cada, conforme apresentados por Ward et al. (2005), 1 U de *Platinum®* Taq DNA Polimerase (*Invitrogen*) e 10 µL de DNA ressuspendido, em um volume final de 50 µL.

É importante evidenciar que, tentativas com os *primers* *FishF2*-5'TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC3' e *FishR2*-5'ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA3', também apresentados por Ward et al. (2005), foram realizadas, no entanto, a qualidade das sequências e a quantidade de DNA amplificado utilizando os *primers* *FishF2* e *FishR2* não foram tão bons quanto as sequências utilizando os *primers* *FishF1* e *FishR1*.

Por fim, a termociclagem foi realizada a partir do protocolo apresentado por Pimenta Neto (2013), em que foi composta de 35 ciclos com 5 etapas cada ciclo, sendo elas: 1 - 94 °C e 5min; 2 - 94°C e 60 s; 3 - 54°C e 90 s; 4 - 72°C e 60 s; 5 - 72°C e 5 min. Após o último ciclo, acontecia mais uma etapa, que consistiu na permanência das amostras a 10°C no termociclador até a retirada delas do aparelho.

Assim como realizado na etapa de extração do material genético das amostras, o sucesso da fase de amplificação do DNA também foi verificado por eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio. No entanto, evidencia-se que no caso da análise dos produtos da PCR provenientes da termociclagem, o gel de agarose foi concentrado a 2%, como pode ser observado na Figura 2.

### 3.3 Purificação do DNA

Após verificado o sucesso da amplificação do DNA, através dos produtos da PCR submetidos a eletroforese em gel de agarose, as amostras bem sucedidas nesta etapa foram submetidas a purificação do seu DNA, por meio da precipitação com isopropanol e lavagem com etanol, seguido de diluição em 10 µl de Tris (10 mM, pH 8,0).

### 3.4 Sequenciamento do fragmento COI

Os *primers* utilizados para essa etapa foram os *FishF1* e *FishR1* anteriormente descritos, que foram apresentados por Ward et al. (2005), com concentração de 0,2  $\mu\text{M}$  para cada *primer* em cada amostra analisada. A reação de sequenciamento foi feita com o *Kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (*Applied Biosystems*, USA), de acordo com as instruções informadas pelo fabricante, tendo sido aumentado o número de ciclos para 45.

Para obtenção das sequências foi utilizado o método de eletroforese capilar em analisador genético ABI 310 (*Applied Biosystems*, USA). Os eletroferogramas obtidos foram analisados com o programa *Sequencing Analysis* (*Applied Biosystems*, USA) para verificação da qualidade e quando necessário, edição das sequências obtidas.

### 3.5 Identificação da fraude

Depois de analisadas, as sequências obtidas foram inseridas na seção de busca no banco de dados *GenBank* que é administrado pelo *National Center for Biotechnology Information* - NCBI, utilizando a ferramenta denominada *Basic Local Alignment Search Tool* - BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Esse processo retornava o nome científico da espécie com maior porcentagem (%) de semelhança com a sequência utilizada na busca, permitindo assim, a identificação a nível molecular das amostras pesquisadas. Evidencia-se que foi definida uma margem de segurança de 98% a 100% de semelhança, para conferir maior confiabilidade ao resultado obtido, ou seja, a identificação só foi dada como sucedida quando a porcentagem de semelhança entre a sequência obtida nos experimentos e o nome científico presente no *GenBank* do NCBI foi a partir de 98%.

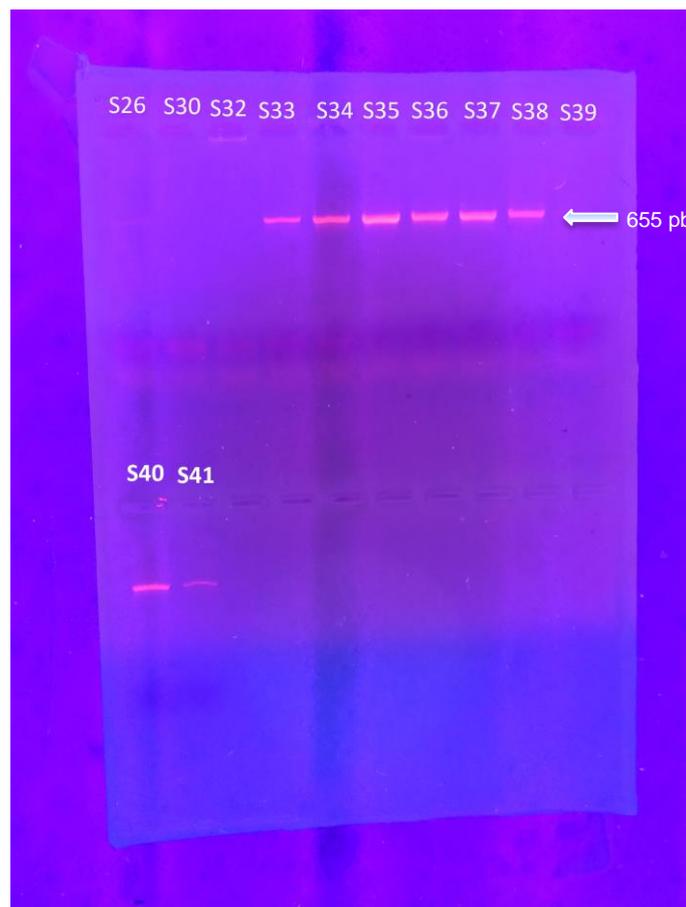
Após a identificação molecular da espécie de cada amostra obtida, através do banco de dados *Genbank* do NCBI, os nomes científicos obtidos foram comparados com àqueles informados pelo comerciante, sendo eles nomes científicos ou comuns, verificando assim, a autenticidade ou não da identificação do pescado comercializado. Para a caracterização das substituições, o Manual de Inspeção para Identificação de Espécies de Peixes e Valores Indicativos de Substituições em Produtos da Pesca e Aquicultura, publicado pelo Ministério da

Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA do Brasil (2016), e a Instrução Normativa nº 53, de 1º de setembro de 2020, também publicada pelo MAPA do Brasil (2020), foram utilizados como guia.

## 4 RESULTADOS

Como pode ser observado no Quadro 1, foi possível obter as sequências de 37 (trinta e sete) das 42 (quarenta e duas) amostras coletadas no presente trabalho, o que equivale a aproximadamente 88% do total. No entanto, 5 (cinco) amostras, sendo elas: S14, S17, S26, S32 e S39; equivalente a cerca de 12% do total de amostras analisadas, apesar de terem sido submetidas a diversas tentativas, não apresentaram sucesso, grande parte delas na fase de amplificação do DNA. Como o congelamento e descongelamento pode causar a degradação do DNA, esta pode ser uma provável causa do insucesso na amplificação do DNA.

**Figura 2 – Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio objetivando conferir o sucesso ou não da amplificação do gene COI, que possui aproximadamente 655 pb, das amostras identificadas em branco (produtos da PCR).**



Fonte: Presente estudo (2017-2020).

Quadro 1 - Relação das 42 amostras obtidas no presente estudo, contendo: seus nomes populares informados na compra, nome científico das espécies que foram identificadas geneticamente e *status* da adulteração ou não das amostras obtidas.

(continua)

IDENTIFICADOR DA AMOSTRA	NOME INFORMADO NA EMBALAGEM OU PELO VENDEDOR	NOME DA ESPÉCIE DE ACORDO COM O NCBI GENBANK	STATUS
S1	Salmão	<i>Salmo salar</i>	Identificação correta
S2	Bacalhau	<i>Gadus chalcogrammus</i>	Substituição
S3	Salmão	<i>Oncorhynchus gorbuscha</i>	Identificação correta
S4	Bacalhau	<i>Gadus chalcogrammus</i>	Substituição
S5	Polaca	<i>Gadus chalcogrammus</i>	Identificação correta
S6	Espada	<i>Acanthocybium solandri</i>	Substituição
S7	Bacalhau	<i>Gadus chalcogrammus</i>	Substituição
S8	Arabaiana	<i>Seriola lalandi</i>	Identificação correta
S9	Atum	<i>Thunnus albacares</i>	Identificação correta
S10	Bacalhau Saithe	<i>Pollachius virens</i>	Substituição
S11	Dourado	<i>Coryphaena hippurus</i>	Identificação correta
S12	Salmão	<i>Salmo salar</i>	Identificação correta
S13	Tilápia	<i>Oreochromis sp.</i>	Identificação correta
S14	Atum enlatado	Não aplicável**	Não identificado**
S15	Bacalhau	<i>Gadus chalcogrammus</i>	Substituição
S16	Bacalhau	<i>Pollachius virens</i>	Substituição
S17	Bacalhau	Não aplicável**	Não identificado**
S18	Corvina	<i>Micropogonias furnieri</i>	Identificação correta
S19	Tilápia	<i>Oreochromis mossambicus</i>	Identificação correta
S20	Cavala	<i>Scomberomorus cavalla</i>	Identificação correta
S21	Tilápia	<i>Oreochromis niloticus</i>	Identificação correta
S22	Arabaiana	<i>Seriola lalandi</i>	Identificação correta
S23	Dourado	<i>Coryphaena hippurus</i>	Identificação correta
S24	Bacalhau	<i>Pollachius virens</i>	Substituição

**Quadro 1 - Relação das 42 amostras obtidas no presente estudo, contendo: seus nomes populares informados na compra, nome científico das espécies que foram identificadas geneticamente e *status* da adulteração ou não das amostras obtidas**

			(conclusão)
S25	Salmão	<i>Oncorhynchus kisutch</i>	Identificação correta
S26	Bacalhau	Não aplicável**	Não identificado**
S27	Salmão	<i>Oncorhynchus kisutch</i>	Identificação correta
S28	Polaca	<i>Gadus chalcogrammus</i>	Identificação correta
S29	Salmão	<i>Salmo salar</i>	Identificação correta
S30	Bacalhau	<i>Gadus macrocephalus</i>	Identificação correta
S31	Badejo	<i>Genypterus brasiliensis</i>	Identificação correta
S32	Dourado	Não aplicável**	Não identificado**
S33	Bacalhau	<i>Gadus chalcogrammus</i>	Substituição
S34	Merluza	<i>Merluccius angustimanus</i> *	Identificação correta*
S35	Tilápia	<i>Oreochromis niloticus</i>	Identificação correta
S36	Salmão	<i>Salmo salar</i>	Identificação correta
S37	Dourado	<i>Coryphaena hippurus</i>	Identificação correta
S38	Merluza	<i>Merluccius gayi</i>	Identificação correta
S39	Bacalhau Morhua	Não aplicável**	Não identificado**
S40	Tilápia	<i>Oreochromis sp.</i>	Identificação correta
S41	Bacalhau	<i>Gadus chalcogrammus</i>	Substituição
S42	Bacalhau	<i>Gadus chalcogrammus</i>	Substituição

Fonte: Presente estudo (2017-2020).

**Notas: Significado dos sinais utilizados:**

\* O nome científico retornado pelo *GenBank* do NCBI não demonstrou o mínimo de 98% de similaridade adotado pelo presente trabalho, não sendo possível, assim, identificar geneticamente a amostra com confiança, pois a sequência não apresentou uma qualidade satisfatória.

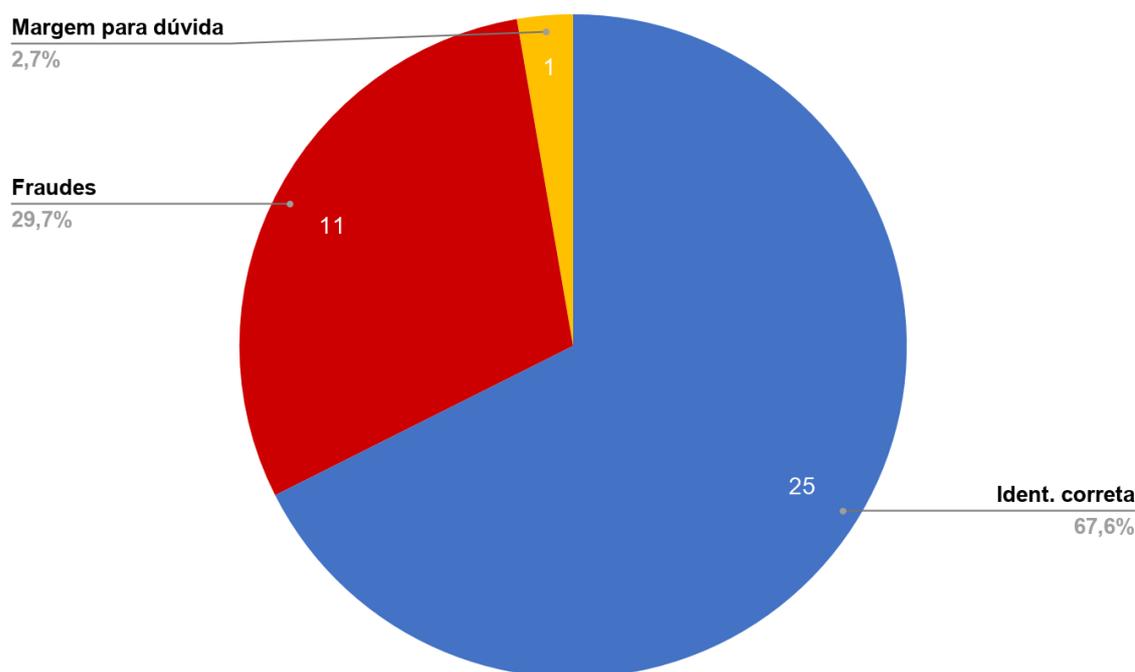
\*\* Falha na amplificação e/ou reação de sequenciamento.

Ainda observando o Quadro 1 complementado pela Figura 3, das 37 (trinta e sete) amostras identificadas a nível molecular, 25 (vinte e cinco) apresentaram concordância entre a espécie informada pelo vendedor e a espécie identificada pela

técnica de DNA *Barcoding*. Portanto, aproximadamente 67,6% das amostras analisadas apresentaram identificação correta dos pescados. Uma das amostras (2,7%), identificada como S34, apresentou concordância entre a espécie informada e a identificada, no entanto, com similaridade abaixo de 98% quando inserida na seção de busca no *GenBank* do NCBI, impossibilitando afirmar com segurança a espécie identificada, pois a qualidade da sequência obtida não foi satisfatória.

Dentre as 37 (trinta e sete) amostras identificadas com sucesso, 11 (onze) não apresentaram concordância entre o nome informado pelo comerciante e o nome científico retornado na seção de busca no *GenBank* do NCBI, ou seja, foram categorizadas como substituição, ou fraude. Essas amostras estão identificadas no Quadro 1 como: S2, S4, S6, S7, S10, S15, S16, S24, S33, S41 e S42. A porcentagem de amostras substituídas/adulteradas corresponde a cerca de 29,7%.

**Figura 3 – Resumo gráfico dos resultados obtidos na presente pesquisa**



**Fonte: Presente estudo (2017-2020).**

No que diz respeito às amostras que apresentaram identificação errônea e/ou foram substituídas por outras espécies (11 ocorrências), 1 (uma) delas foi informada como “Espada”, no entanto, foi identificada como “Cavala” (*Acanthocybium solandri*). As outras 10 (dez) foram informadas como “Bacalhau”,

sendo que 7 (sete) delas foram identificadas como “Polaca do Alasca” (*Gadus chalcogrammus*) e 3 (três) foram identificadas como “Saithe” (*Pollachius virens*). Destaca-se que ambas as identificações são consideradas equivocadas, conforme exposto pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil - MAPA do Brasil (2016; 2020). De acordo com o órgão supracitado, as únicas espécies que podem ser consideradas como “Bacalhau” no Brasil, são: *Gadus morhua*, *Gadus macrocephalus* e *Gadus ogac*.

Das 11 (onze) amostras que foram compradas como “Bacalhau”, apenas 1 (uma) amostra foi identificada de forma adequada, o que corresponde a aproximadamente 9% (Quadro 1). Complementar a essa estatística, 10 (dez) amostras, que equivale a 91% do total de amostras compradas como “Bacalhau”, não foram identificadas de forma correta, ou seja, o nome pelo qual essas amostras foram compradas não correspondem a espécie identificada molecularmente, caracterizando fraude na identificação. Sendo assim, é possível observar que o “Bacalhau” foi o tipo de pescado que mais apresentou irregularidades na sua identificação conforme o presente estudo.

Com relação à distribuição geográfica dos estabelecimentos comerciais nos quais foram detectadas substituições, dos 11 (onze) bairros incluídos no presente estudo, 8 (oito) apresentaram ao menos 1 (um) caso de rotulagem errônea ou de substituição de espécies de pescados, sendo eles: Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins, Santa Lucia, Gruta de Lourdes, Jacintinho, Mangabeiras, Farol e Prado, como pode ser observado na Tabela 1 e na Figura 4. O que corresponde a aproximadamente 73% do total de bairros analisados pelo presente trabalho.

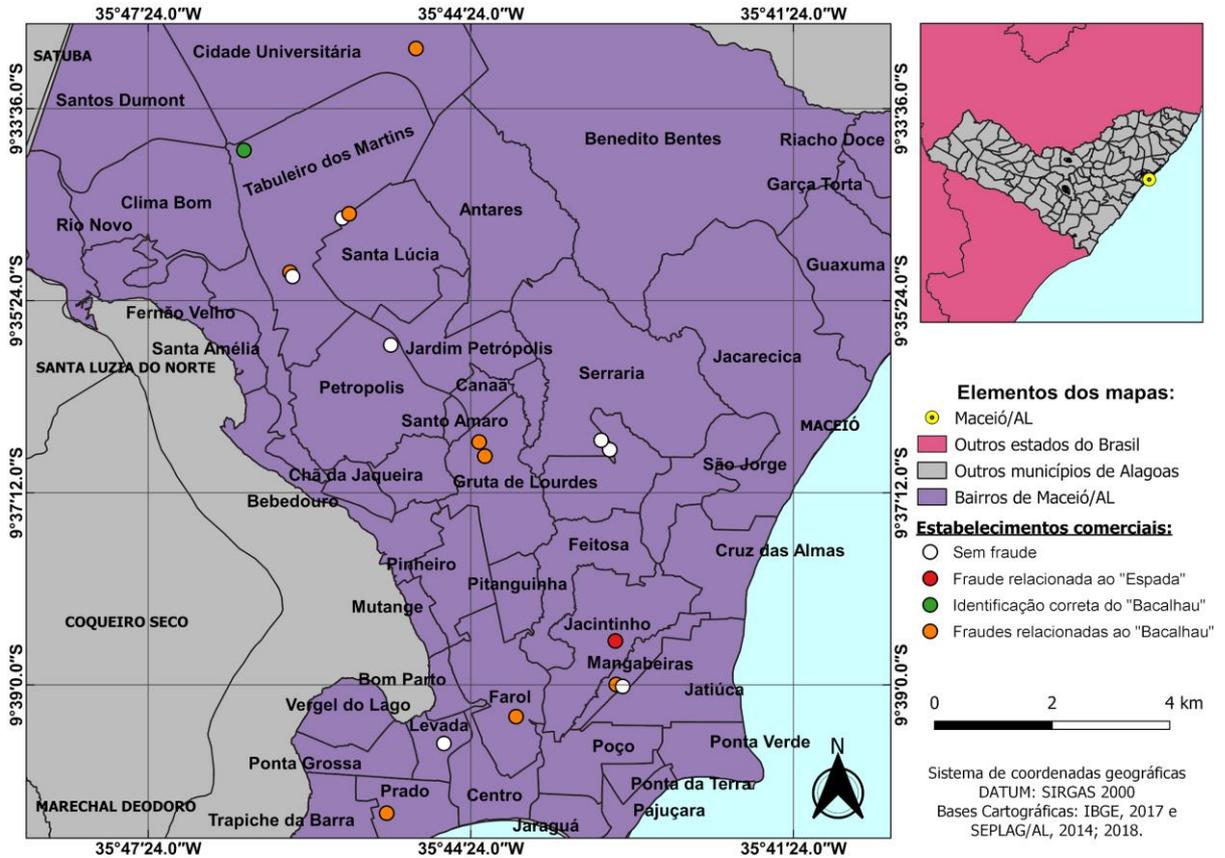
Evidencia-se ainda que, dos 11 (onze) bairros onde as amostras foram provenientes, cada um teve de 1 (um) a 3 (três) estabelecimentos comerciais analisados, somando-se 17 (dezesete) supermercados e mercados analisados no presente estudo, como pode ser visualizado na Tabela 1. Desses 17 (dezesete) estabelecimentos comerciais, 9 (nove) apresentaram ao menos 1 (um) caso de adulteração na identificação de pescados, como também pode ser observado na Tabela 1 e na Figura 4, o que corresponde a cerca de 53% dos mercados e supermercados analisados por esta pesquisa.

**Tabela 1 - Relação de bairros analisados pelo presente trabalho e as quantidades de: estabelecimentos comerciais totais, supermercados e mercados que apresentaram adulterações, e a quantidade de adulterações encontradas, todos eles de acordo com o bairro**

<b>BAIRROS</b>	<b>Quantidade de estabelecimentos comerciais analisados por bairro</b>	<b>Quantidade de estabelecimentos comerciais por bairro que apresentaram substituições</b>	<b>Quantidade de adulterações encontradas por bairro (com o identificador das amostras conforme Quadro 1)</b>
Cidade Universitária	1	1	1 (S15)
Tabuleiro dos Martins	3	1	2 (S4 e S10)
Santa Lúcia	2	1	1 (S33)
Petrópolis	1	0	0
Gruta de Lourdes	2	2	2 (S16 e S41)
Serraria	2	0	0
Jacintinho	1	1	1 (S6)
Mangabeiras	2	1	1 (S7)
Farol	1	1	1 (S24)
Levada	1	0	0
Prado	1	1	2 (S2 e S42)
<b>TOTAL</b>	<b>17</b>	<b>9</b>	<b>11</b>

Fonte: Presente estudo (2017-2020).

Figura 4 – Representação dos resultados obtidos através de mapa. Os pontos brancos representam estabelecimentos comerciais que não apresentaram fraude. Os pontos laranjas representam os estabelecimentos comerciais que apresentaram fraudes relacionadas ao “Bacalhau”. O ponto vermelho também representa uma das fraudes encontradas, relacionada ao peixe “Espada”. O ponto verde representa o único local analisado que não apresentou fraude relacionada ao “Bacalhau”



Fonte: Software QGIS versão 3.10.4, com dados do presente estudo (2017-2020), complementos pelos dados da SEPLAG/AL (2014; 2019).

## 5 DISCUSSÃO

Os estabelecimentos comerciais de Maceió/AL, de uma forma geral, apresentaram uma taxa de adulteração de 29.7%, valor um pouco menor em relação a estudos realizados em 21 (vinte e um) estados pertencentes aos Estados Unidos da América, conforme apresentado por Warner et al. (2013), que relataram uma porcentagem de adulteração de aproximadamente 33%, ao analisar, em conjunto, supermercados, mercados, restaurantes e pontos de sushi. No mesmo estudo realizado por Warner et al. (2013), ao considerar somente as amostras provenientes de mercados e supermercados, foi obtida uma porcentagem de 18% relacionada a fraude de pescados, inferior a obtida no presente trabalho.

Em uma pesquisa conduzida por Galal-Khallaf et al. (2014) em 03 (três) províncias do Egito, sendo elas: província do Cairo, província de Monufia e província de Caliuba, demonstrou uma porcentagem de substituição de espécies de 33.3%, superior ao que foi obtido no presente estudo (29.7%). No entanto, é válido evidenciar que no estudo de Galal-Khallaf et al. (2014), nenhuma das substituições encontradas estavam relacionadas ao “Bacalhau” e sim ao peixe “Panga” e a “Perca-do-Nilo”.

Na Índia, conforme estudo feito por Kannuchamy et al. (2016), foi apresentado que, das amostras obtidas em mercados locais e em supermercados, 22% delas apresentaram rotulagem ou identificação errônea, porcentagem inferior ao valor obtido no presente trabalho (29.7%). No entanto, destaca-se que nenhuma das ocorrências apresentadas por Kannuchamy et al. (2016) foram relacionadas ao “Bacalhau”.

Em uma pesquisa realizada na China por Wen et al. (2015), foi demonstrado que cerca de 53% das suas amostras analisadas foram incorretamente identificadas, no entanto, nenhuma delas foram relacionadas ao “Bacalhau” e sim a “Corvina”, a “Corvina-amarela” e a “Corvina-branca”. A porcentagem obtida por Wen et al. (2015) foi superior à que foi encontrada no presente estudo, de 29.7%.

Na Rússia, conforme trabalho realizado por Nedunoori, Turanov e Kartavtsev (2017), ao analisar amostras obtidas em supermercados russos, foi obtida uma porcentagem de adulteração na rotulagem de pescados de aproximadamente 23%, valor inferior ao que foi obtido no presente estudo (29.7%). Destaca-se que, no estudo realizado pelos autores supracitados, foi encontrado apenas um caso de

rotulagem errônea envolvendo o “Bacalhau”, em que ele foi substituído por *Gadus chalcogrammus*, a espécie mais utilizada para substituir o “Bacalhau” conforme encontrado no presente trabalho.

Em um estudo realizado por Shehata et al. (2018) com amostras provenientes do Canadá e de aproximadamente 25 (vinte e cinco) outros países, identificou que a porcentagem de adulteração considerando a média de todos esses países foi de 14.8%, e quando considerado somente o Canadá, essa porcentagem foi de 18.1%, ambos valores muito inferiores ao encontrado no presente estudo, que foi de 29.7%. É válido ressaltar que o valor encontrado por Shehata et al. (2018) para o Canadá é aproximadamente 2 (duas) vezes menor do que foi encontrado por Hanner et al. (2011) em um estudo no mesmo país, onde relatou que das suas amostras coletadas, mais de 41% delas foram identificadas incorretamente.

Em um estudo realizado na França por Bernard-Capelle et al. (2015), ao analisar supermercados, peixarias e restaurantes, foi diagnosticado que a porcentagem de substituição de espécie de pescados para esses estabelecimentos em conjunto, foi de 3.7%, valor aproximadamente 8 (oito) vezes menor ao que foi encontrado no presente trabalho (29.7%). Destaca-se que o “Bacalhau” foi um dos pescados que mais apresentou identificação errônea no trabalho de Bernard-Capelle et al. (2015).

Com relação a estudos realizados no Brasil, a taxa obtida no presente estudo, de 29.7% de adulteração em pescados, foi um pouco maior ao analisar outros trabalhos, como o de Pimenta Neto (2013), que obteve taxa de 26% ao analisar cidades pertencentes aos estados de Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo, 4 (quatro) estados que fazem parte da região sudeste brasileira.

Carvalho et al. (2015), em um estudo realizado em Florianópolis/SC, cidade pertencente a região sul brasileira, registrou uma porcentagem de 24% de adulterações na rotulagem de pescados, em que boa parte dessas fraudes foram relacionadas ao “Bacalhau”, valor inferior ao obtido no presente estudo. No entanto, em uma pesquisa realizada por Staffen et al. (2017), também na cidade de Florianópolis/SC, identificou que 30% das suas amostras que foram compradas em pescarias foram caracterizadas como fraude, no entanto, nenhuma delas foi referente ao “Bacalhau”. Destaca-se que o valor obtido no trabalho de Staffen et al.

(2017), apresentou muita semelhança ao obtido no presente estudo, de 29.7% amostras adulteradas.

Já no trabalho realizado por Carvalho et al. (2017), ao considerar todas as regiões brasileiras, sendo: centro-oeste, nordeste, norte, sudeste e sul, apresentou uma porcentagem de adulteração média de 17.3%, valor muito inferior ao que foi encontrado no presente estudo, de 29.7%. No entanto, se for considerado apenas os dados da região nordeste no estudo feito por Carvalho et al. (2017), das 20 (vinte) amostras coletadas nos estados da Bahia, Ceará, Pernambuco e Rio Grande do Norte, 8 (oito) delas foram caracterizadas como fraude, o que corresponde a 40% do total de amostras coletadas da região nordeste, valor muito superior ao encontrado no presente estudo.

Continuando no estudo realizado por Carvalho et al. (2017), foi demonstrado que a região nordeste do Brasil é a terceira região do país que mais apresenta casos de fraudes na identificação de pescados, todavia, as adulterações encontradas não foram relacionadas ao “Bacalhau” e sim a “Pescada”, “Pescada branca”, “Pescada amarela”, “Merluza”, “Dourada”, “Corvina” e “Abadejo”. Evidencia-se ainda que, para representação da região nordeste do estudo de Carvalho et al. (2017), não foram coletadas amostras do estado de Alagoas, estado que abriga o município de Maceió/AL, analisado pelo presente estudo.

Segundo Warner et al. (2013), os níveis de substituição de peixes com alto valor comercial como “Salmão” e “Bacalhau”, comumente trocados por espécies com menor valor comercial nos Estados Unidos da América, como também em diversos outros países, variam, geralmente, de 25% a mais de 70%. Cuttareli et al. (2014) em um estudo realizado na Itália apontou um percentual de 50% de fraude para o “Bacalhau”. Em ambas as pesquisas, os valores obtidos são inferiores ao valor encontrado no presente estudo de aproximadamente 91% de identificações errôneas, ou fraudes, para o “Bacalhau”.

No presente estudo, a espécie *Gadus chalcogrammus* (Polaca do Alasca) foi a mais utilizada nas substituições do Bacalhau. Pimenta Neto (2013), observou que *Gadus chalcogrammus* também foi a espécie mais utilizada para substituições, porém não para substituir o “Bacalhau” e sim a “Merluza”. Uma provável explicação para essa ampla utilização de *G. chalcogrammus* em substituições pode ser a imensa captura desse tipo de pescado no Mar de *Bering*, no Alasca, onde são capturados mais de um milhão de toneladas de “Polaca do Alasca”. Ainda no

mesmo trabalho, 63% das amostras de “Bacalhau” obtidas apresentaram substituições por outras espécies, como *Pollachius virens* ou *Molva molva*, mas não por *Gadus chalcogrammus*.

Irregularidades na identificação de Bacalhau foram observadas também no estudo de Carvalho et al. (2015), no qual das 10 (dez) amostras de “Bacalhau” coletadas, 3 (três) apresentaram irregularidades: 1 (uma) delas com rotulagem errônea, pois foi vendida como “Bacalhau Polaca do Alasca”, porém “Polaca do Alasca” não pode ser considerada como “Bacalhau”; e as outras 2 (duas), substituições foram por *Molva molva* e *Gadus chalcogrammus*. De todo seu trabalho, o “Bacalhau” foi um dos pescados que mais apresentou adulterações.

Comparando a porcentagem geral de identificação incorreta de peixes obtida no presente estudo (29.7%) com as porcentagens obtidas nos estudos realizados nos Estados Unidos da América (WARNER et al., 2013), Egito (GALAL-KHALLAF et al., 2014), Índia (KANNUCHAMY et al., 2016), China (WEN et al., 2015), Rússia (NEDUNOORI, TURANOV e KARTAVTSEV, 2017), Canadá individualmente e em conjunto com 25 outros países (SHEHATA et al., 2018), e França (BÉRNARD-CAPELLE et al., 2015), percebe-se que o resultado obtido em 5 (cinco) análises desses estudos apresentou uma porcentagem de adulteração de 7.7% a 26% menor quando comparadas com o resultado geral do presente trabalho.

As pesquisas que apresentaram uma porcentagem de adulteração consideravelmente menor da que foi obtida no presente estudo, foram: Kannuchamy et al. (2016), diferindo 7.7%; Shehata et al. (2018) considerando apenas o Canadá, onde diferiu 11.6%; Warner et al. (2013), diferindo 11.7%; Shehata et al. (2018) considerando o Canadá e outros 25 países diferiu cerca de 14.8%; e Bernard-Capelle et al. (2015), com a maior taxa de diferença: 26%.

Em comum, todos esses estudos apresentaram a análise com sucesso de 100 (cem) amostras ou mais, realidade diferente do que foi alcançado no presente estudo, em que foi possível concluir todas as fases metodológicas do trabalho em 37 (trinta e sete) amostras. Destaca-se que, esse padrão de analisar 100 (cem) amostras ou mais também foi observado em alguns estudos realizados no Brasil, a exemplo do estudo de Carvalho et al. (2017), em que a diferença do resultado obtido por esses autores e o resultado obtido no presente estudo foi de 12.4%.

Destaca-se ainda que, os estudos que trabalharam com uma quantidade de amostras inferior a 100 (cem), realidade mais próxima com a do presente trabalho,

foram: Carvalho et al. (2014) no Brasil; Galal-Khallaf et al. (2014) no Egito; Wen et al. (2015) na China; Nedunoori, Turanov e Kartavtsev (2017) na Rússia; Carvalho et al. 2017 considerando apenas a região nordeste do Brasil, e Staffen et al. (2017) também no Brasil. A maioria deles, sendo os estudos de Carvalho et al. (2014); Galal-Khallaf et al. (2014); Nedunoori, Turanov e Kartavtsev (2017) e Staffen et al. (2017), apresentaram resultado muito semelhante ao que foi observado no presente estudo, sendo: 24%, 33.3%, 23% e 30%, respectivamente, variações inferiores a 7%.

Com relação aos estudos apresentados por Wen et al. (2015), e Carvalho et al. (2017) considerando apenas a região nordeste brasileira, foram analisadas 15 (quinze) e 20 (vinte) amostras por eles, respectivamente, resultando em uma porcentagem de adulteração de 53% e 40%, na devida ordem, ambos valores com variação acima de 10% ao que foi encontrado no presente estudo (29.7%).

Ademais, é válido evidenciar que, segundo Bérnard-Capelle et al. (2015), a diferença, muitas vezes expressiva, nas porcentagens de adulteração encontradas nos países, podem ser decorrentes ou influenciadas por diversos fatores econômicos e sociais de cada país, assim como pela quantidade de fiscalização realizada pelos órgãos governamentais reguladores ou até mesmo pelo tamanho da cadeia de suprimento do pescado. Além disso, é válido frisar que, o número de amostras analisadas também pode ter uma influência no resultado, como pôde ser observado nas comparações realizadas no presente estudo. Porém, pelo fato do presente trabalho poder ser considerado como novo para o Estado de Alagoas e para cidade de Maceió/AL, justifica-se a realização desse primeiro estudo em pequena escala, conforme apresentado por Nedunoori, Turanov e Kartavtsev (2017).

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A fraude na identificação de pescados, por meio da substituição de uma espécie por outra, é uma prática que causa prejuízos ao consumidor. No presente estudo foi constatado por meio da identificação molecular de espécies que as substituições de pescados ou adulteração na sua rotulagem também ocorre no Estado de Alagoas, mais especificamente no município de Maceió/AL.

Das amostras analisadas no presente estudo, 29,7% tiveram sua identificação adulterada. Sendo que este resultado é semelhante aos resultados obtidos em outros estudos realizados em outros estados do Brasil, nos quais os percentuais de adulteração, em grande maioria, foram valores que não apresentaram diferenças maiores que 6%.

No entanto, quando a porcentagem obtida na presente pesquisa é comparada com os valores obtidos por trabalhos conduzidos em outros países, a taxa aqui obtida, na maior parte das vezes, demonstrou-se maior, com variações superiores a 7%. Essa diferença pode ser justificada, principalmente, por aspectos sociais e econômicos existentes em cada país, complementada pela efetividade da fiscalização no comércio dos pescados.

Chama a atenção a taxa de substituições observada nas amostras de “Bacalhau” de forma específica, a qual apresenta níveis extremamente preocupantes. O valor aqui obtido foi de aproximadamente 91% de adulteração na identificação ou fraude na venda do referido pescado, porcentagem muito maior das que foram encontradas em estudos em outros países, e em outros estados do Brasil.

Os resultados obtidos no presente estudo chamam a atenção para a necessidade urgente de tomada de medidas pelo poder público, tanto estadual como federal, para sanar ou diminuir as fraudes na identificação de pescado. Como sugestão, medidas educativas complementadas por maiores e mais rígidas fiscalizações na cadeia produtiva dos pescados, assim como no comércio varejista e atacadista de peixes, devem ser realizadas pelos órgãos cabíveis, como: Agência de Defesa e Inspeção Agropecuária de Alagoas - ADEAL, Instituto de Proteção e Defesa do Consumidor do Estado de Alagoas - PROCON/AL e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA do Brasil, por exemplo. Essas medidas poderiam melhor garantir o cumprimento do direito do consumidor, além

de prevenir ou diminuir diversos possíveis impactos na economia, na saúde humana e na conservação de espécies de pescados.

## REFERÊNCIAS

- ALBERTS, Bruce *et al.* **Biologia Molecular da Célula**. Tradução: Ana Leticia Vanz *et al.* 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. ISBN: 978-85-363-2170-7.
- ALMEIDA, Juliana Salles. Consultora da Divisão de Comércio Internacional e Integração da Comissão Econômica Para América Latina e Caribe - CEPAL. **Acordo sobre a aplicação de medidas sanitarias e fitosanitarias: balanço de uma década buscando o equilíbrio entre a proteção do comércio e a proteção da saúde dos consumidores**. 54. ed. Santiago: CEPAL, 2005. 71 p. ISBN: 92-1-322829-5. Disponível em: [https://repositorio.cepal.org/bitstream/handle/11362/4400/1/S2005204\\_pt.pdf](https://repositorio.cepal.org/bitstream/handle/11362/4400/1/S2005204_pt.pdf). Acesso em: 02 jun. 2020.
- ALVES, Emanuele Amorim; SOUZA, Daniel Santos. Capítulo 2 - Biologia Molecular. *In*: MOLINARO, Etelcia Moraes; CAPUTO, Luzia Fátima Gonçalves; AMENDOEIRA, Maria Regina Reis (org.). **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde**: volume 3. Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, 2013. p. 133-185. ISBN: 978-85-98768-41-0. Disponível em: <http://www.epsjv.fiocruz.br/sites/default/files/l227.pdf>. Acesso em: 01 mar. 2020.
- AZAMAN, Fazureen *et al.* Heavy metal in fish: Analysis and human health-a review. **Jurnal Teknologi (Sciences & Engineering)**, [S.l.], v. 77, n. 1, p. 61-69, nov. 2015. DOI: <https://doi.org/10.11113/jt.v77.4182>. eISSN: 2180–3722. Disponível em: [https://pdfs.semanticscholar.org/b09e/5dff7866485e27555eb30359c18e7744ba4e.pdf?\\_ga=2.24399996.739968496.1592254605-454112509.1592254605](https://pdfs.semanticscholar.org/b09e/5dff7866485e27555eb30359c18e7744ba4e.pdf?_ga=2.24399996.739968496.1592254605-454112509.1592254605). Acesso em: 19 mar. 2020.
- BAKER, C.S. *et al.* Gray whale products sold in commercial markets along the Pacific Coast of Japan. **Marine Mammal Science**, [S.l.], v. 18, n. 1, p. 295–300, jan. 2002. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1748-7692.2002.tb01036.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1748-7692.2002.tb01036.x#accessDenialLayout>. Acesso em: 21 jun. 2020.
- BARBOSA, José Milton. Fraudação na comercialização do pescado. **Acta of Fisheries and Aquatic Resources**, Aracaju, v. 3, n. 2, p. 89-99, 2015. DOI: <https://doi.org/10.2312/Actafish.2015.3.2.89-99>. ISSN: 2357-8068. Disponível em: <https://seer.ufs.br/index.php/ActaFish/article/view/4787/4138>. Acesso em: 04 fev. 2020.
- BARRETT, Rowan D. H.; HEBERT, Paul D. N. Identifying spiders through DNA barcodes. **Canadian Journal of Zoology**, [S.l.], v. 83, n. 3, p. 481-491, mar. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1139/z05-024>. Disponível em:

[https://www.researchgate.net/profile/Paul\\_Hebert2/publication/255609732\\_Identifying\\_spiders\\_through\\_DNA\\_barcodes/links/55846a1208aef58c039b3a43/Identifying-spiders-through-DNA-barcodes.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Paul_Hebert2/publication/255609732_Identifying_spiders_through_DNA_barcodes/links/55846a1208aef58c039b3a43/Identifying-spiders-through-DNA-barcodes.pdf). Acesso em: 15 jun. 2020.

BÉRNARD-CAPELLE, Julien *et al.* Fish mislabelling in France: substitution rates and retail types. **PeerJ**, [S.l.], v. 2, p. 714-733, jan. 2015. DOI: <https://doi.org/10.7717/peerj.714>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5407283/pdf/peerj-03-714.pdf>. Acesso em: 09 abr. 2020.

BINGPENG, Xing *et al.* DNA barcoding for identification of fish species in the Taiwan Strait. **PLoS ONE**, [S.l.], v. 13, n. 6, p. e0198109-e0198121, jun. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198109>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0198109&type=printable>. Acesso em: 19 mar. 2020.

BRASIL. [Constituição (1988)]. **Constituição da República Federativa do Brasil de 1988**. Brasília, DF: Presidência da República, [2020]. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/constituicao/constituicao.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/constituicao/constituicao.htm). Acesso em: 15 jun. 2020.

BRASIL. **Lei nº 8.078, de 11 de setembro de 1990**. Dispõe sobre a proteção do consumidor e dá outras providências. Brasília, DF: Presidência da República [2017]. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/l8078.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l8078.htm). Acesso em: 08 jun. 2020.

BRASIL. **Lei nº 12.741, de 8 de dezembro de 2012**. Dispõe sobre as medidas de esclarecimento ao consumidor, de que trata o § 5º do artigo 150 da Constituição Federal; altera o inciso III do art. 6º e o inciso IV do art. 106 da Lei nº 8.078, de 11 de setembro de 1990 - Código de Defesa do Consumidor. Brasília, DF: Presidência da República, [2012]. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2011-2014/2012/lei/l12741.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2011-2014/2012/lei/l12741.htm). Acesso em: 08 jun. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 26, de 02 de Julho de 2015**. Dispõe sobre os requisitos para rotulagem obrigatória dos principais alimentos que causam alergias alimentares. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 26 jul. 2015a. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2694583/RDC\\_26\\_2015\\_.pdf/b0a1e89b-e23d-452f-b029-a7bea26a698c](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2694583/RDC_26_2015_.pdf/b0a1e89b-e23d-452f-b029-a7bea26a698c). Acesso em: 18 jun. 2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. Instrução Normativa nº 29, de 23 de Setembro de 2015. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, edição 183, p. 3-5, 24 set. 2015b. Disponível em: <http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&data=24/09/2015&pagina=3>. Acesso em: 25 mar. 2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. Instrução Normativa nº 53, de 1º de Setembro de 2020. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, edição 171, p. 2, 04 set. 2020. Disponível em: <https://www.in.gov.br/web/dou/-/instrucao-normativa-n-53-de-1-de-setembro-de-2020-275906964>. Acesso em: 28 out. 2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. **Manual de inspeção para identificação de espécies de peixes e valores indicativos de substituições em produtos da pesca e aquicultura**. Brasília, DF: MAPA, 2016. 188p. ISBN 978-85-7991-101-9. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal/arquivos-publicacoes-dipoa/pescadoweb.pdf>. Acesso em: 28 out. 2020.

CARVALHO, Daniel Cardoso *et al.* DNA Barcoding identification of commercialized seafood in South Brazil: A governmental regulatory forensic program. **Food Control**, [S.l.], v. 50, p. 784-788, abr. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.10.025>. Disponível em: [https://www.researchgate.net/profile/Daniel\\_Carvalho/publication/267749979\\_DNA\\_Barcoding\\_identification\\_of\\_commercialized\\_seafood\\_in\\_South\\_Brazil\\_A\\_governmental\\_regulatory\\_forensic\\_program/links/5bbb9a98a6fdcc9552d99d9e/DNA-Barcoding-identification-of-commercialized-seafood-in-South-Brazil-A-governmental-regulatory-forensic-program.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Daniel_Carvalho/publication/267749979_DNA_Barcoding_identification_of_commercialized_seafood_in_South_Brazil_A_governmental_regulatory_forensic_program/links/5bbb9a98a6fdcc9552d99d9e/DNA-Barcoding-identification-of-commercialized-seafood-in-South-Brazil-A-governmental-regulatory-forensic-program.pdf). Acesso em: 17 jul. 2018.

CARVALHO, Daniel Cardoso *et al.* Nationwide Brazilian governmental forensic programme reveals seafood mislabelling trends and rates using DNA barcoding. **Fisheries Research**, [S.l.] v. 191, p. 30-35, jul. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2017.02.021>. Disponível em: [https://www.researchgate.net/profile/Daniel\\_Carvalho/publication/314276326\\_Nationwide\\_Brazilian\\_governmental\\_forensic\\_programme\\_reveals\\_seafood\\_mislabelling\\_trends\\_and\\_rates\\_using\\_DNA\\_barcoding/links/5bbb9ae7a6fdcc9552d99da7/Nationwide-Brazilian-governmental-forensic-programme-reveals-seafood-mislabelling-trends-and-rates-using-DNA-barcoding.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Daniel_Carvalho/publication/314276326_Nationwide_Brazilian_governmental_forensic_programme_reveals_seafood_mislabelling_trends_and_rates_using_DNA_barcoding/links/5bbb9ae7a6fdcc9552d99da7/Nationwide-Brazilian-governmental-forensic-programme-reveals-seafood-mislabelling-trends-and-rates-using-DNA-barcoding.pdf). Acesso em: 04 fev. 2020.

CLINE, Erica. Marketplace substitution of Atlantic salmon for Pacific salmon in Washington State detected by DNA barcoding. **Food Research International**, [S.l.], v. 45, n. 1, p. 388-393, jan. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.10.043>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996911006247>. Acesso em: 22 mar. 2020.

CUTARELLI, Anna *et al.* Italian market fish species identification and commercial frauds revealing by DNA sequencing. **Food Control**, [S.l.], v. 37, p. 46-50, mar. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.08.009>. Disponível em: [http://ssu.ac.ir/cms/fileadmin/user\\_upload/Mtahghighat/tfood/asil-article/a-z/Italian-market-fish-species-identification-and-commercial-frauds-revealing-by-DNA-sequencing\\_2014\\_Food-Control.pdf](http://ssu.ac.ir/cms/fileadmin/user_upload/Mtahghighat/tfood/asil-article/a-z/Italian-market-fish-species-identification-and-commercial-frauds-revealing-by-DNA-sequencing_2014_Food-Control.pdf). Acesso em: 17 jul. 2018.

DAYRAT, Benoît. Towards integrative taxonomy. **Biological Journal of the Linnean Society**, [S.l.], v. 85, n. 3, p. 407–415, jun. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2005.00503.x>. Disponível em: <https://academic.oup.com/biolinnean/article-pdf/85/3/407/14069446/j.1095-8312.2005.00503.x.pdf>. Acesso em: 01 mar. 2020.

ESTOUP, A. *et al.* Rapid one-tube DNA extraction for reliable PCR detection of fish polymorphic markers and transgenes. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, [S.l.], v. 5, p. 295-298, jan. 1996. Disponível em: [https://www.researchgate.net/profile/Arnaud\\_Estoup/publication/235733942\\_Rapid\\_one-tube\\_DNA\\_extraction\\_for\\_reliable\\_PCR\\_detection\\_of\\_fish\\_polymorphic\\_markers\\_and\\_transgenes/links/0deec5379ca62a8170000000/Rapid-one-tube-DNA-extraction-for-reliable-PCR-detection-of-fish-polymorphic-markers-and-transgenes.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Arnaud_Estoup/publication/235733942_Rapid_one-tube_DNA_extraction_for_reliable_PCR_detection_of_fish_polymorphic_markers_and_transgenes/links/0deec5379ca62a8170000000/Rapid-one-tube-DNA-extraction-for-reliable-PCR-detection-of-fish-polymorphic-markers-and-transgenes.pdf). Acesso em: 17 jun. 2020.

FERNANDES, Paula Rogério. **Construção de primers e otimização de ensaios de PCR e de NESTED-PCR para a detecção específica de *Trichomonas foetus***. 2005. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2005. Disponível em: [https://files.cercomp.ufg.br/weby/up/67/o/Dissertacao2005\\_Paula\\_Fernandes.pdf](https://files.cercomp.ufg.br/weby/up/67/o/Dissertacao2005_Paula_Fernandes.pdf). Acesso em: 01 mar. 2020.

Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture**. Roma: FAO, 2009. 196 p. ISBN 978-92-5-106029-2. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-i0250e.pdf>. Acesso em: 18 mar. 2020.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture**. Roma: FAO, 2010. 218 p. ISBN 978-92-5-106675-1. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-i1820e.pdf>. Acesso em: 18 mar. 2020.

Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture**: Contributing to food security and nutrition for

all. Roma: FAO, 2016. 200 p. ISBN 978-92-5-109185-2. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-i5555e.pdf>. Acesso em: 17 jul. 2018.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture: Meeting the sustainable development goals**. Roma: FAO, 2018. 227 p. ISBN 978-92-5-130562-1. Disponível em: <http://www.fao.org/3/i9540en/i9540en.pdf>. Acesso em: 02 fev. 2020.

Food and Drug Administration - FDA. Chapter 19: Undeclared Major Food Allergens and Food Intolerance Substances. *In*: FDA (Estados Unidos da América). **Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance**. 4 ed. Flórida: FDA, 2020. 18 p. Disponível em: <https://www.fda.gov/media/80637/download>. Acesso em: 05 fev. 2020.

GALAL-KHALLAF, Asmaa *et al.* DNA barcoding reveals a high level of mislabeling in Egyptian fish fillets. **Food Control**, [S.l.], v. 46, p. 441-445, dez. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.06.016>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713514003454>. Acesso em: 04 fev. 2020.

GIL, Luis Asensio. PCR-based methods for fish and fishery products authentication. **Trends in Food Science & Technology**, [S.l.], v. 18, n. 11, p. 558-566, nov. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.04.016>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224407001471>. Acesso em: 02 fev. 2020.

GRIFFITHS, Anthony J. F. *et al.* **Introdução à genética**. Tradução: Idília Vanzellotti. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. Título original: Introduction to genetic analysis. ISBN: 978-85-277-2191-2.

HAJIBABAEI, Mehrdad *et al.* DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. **Trends in Genetics**, [S.l.], v. 23, n. 4, p. 167-172, abr. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tig.2007.02.001>. Disponível em: <http://biodados.icb.ufmg.br/cromatina/biomol/2008/sem/grupo7.pdf>. Acesso em: 01 fev. 2020.

HANDY, Sara M. *et al.* A Single-Laboratory Validated Method for the Generation of DNA Barcodes for the Identification of Fish for Regulatory Compliance. **Journal of AOAC International**, [S.l.], v. 94, n. 1, p. 201-210, jan-fev. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1093/jaoac/94.1.201>. Disponível em: <https://academic.oup.com/jaoac/article-pdf/94/1/201/32422320/jaoac0201.pdf>. Acesso em: 25 mar. 2020.

HANNER, Robert *et al.* FISH-BOL and seafood identification: Geographically dispersed case studies reveal systemic market substitution across Canada. **Mitochondrial DNA**, [S.l.], v. 22, supl. 1, p. 106-122, out. 2011. DOI: <https://doi.org/10.3109/19401736.2011.588217>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.3109/19401736.2011.588217>. Acesso em: 04 fev. 2020.

HEBERT, Paul D. N. *et al.* Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London, series B: Biological Sciences**, [S.l.], v. 270, p. 313-321, fev. 2003. DOI: <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>. Disponível em: <https://royalsocietypublishing.org/doi/pdf/10.1098/rspb.2002.2218>. Acesso em: 17 jul. 2018.

HEBERT, Paul D. N. *et al.* Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S.l.], v. 101, n. 41, p. 14812–14817, out. 2004. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0406166101>. Disponível em: <https://www.pnas.org/content/pnas/101/41/14812.full.pdf>. Acesso em: 15 jun. 2020.

IBGE (Brasil). **Limites\_v2017**. [S.l.]: IBGE, 2017. Bases cartográficas contínuas. Escala: 1:250:000. Disponível em: [geofp.ibge.gov.br/cartas\\_e\\_mapas/bases\\_cartograficas\\_continuas/bc250/versao2017/shapefile/Limites\\_v2017.zip](http://geofp.ibge.gov.br/cartas_e_mapas/bases_cartograficas_continuas/bc250/versao2017/shapefile/Limites_v2017.zip). Acesso em: 13 abr. 2020.

KRESS, W. John *et al.* Use of DNA barcodes to identify flowering plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S.l.], v. 102, n. 23, p. 8369 – 8374, jun. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0503123102>. Disponível em: <https://www.pnas.org/content/pnas/102/23/8369.full.pdf>. Acesso em: 15 jun. 2020.

KANNUCHAMY, Nagalakshmi *et al.* Mislabeling in Indian seafood: An investigation using DNA barcoding. **Food Control**, [S.l.], v. 59, p. 196-200, jan. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.05.018>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S095671351530013X?via%3Dihub>. Acesso em: 13 jul. 2020.

LEFÉBURE, T. *et al.* Relationship between morphological taxonomy and molecular divergence within Crustacea: Proposal of a molecular threshold to help species delimitation. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, [S.l.], v. 40, n. 2, p. 435–447, ago. 2006. DOI: [10.1016/j.ympev.2006.03.014](https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.03.014). Disponível em: <https://research.nhm.org/pdfs/29778/29778.pdf>. Acesso em: 26 fev. 2020.

LIMA, Daniel Pandilha de *et al.* Contaminação por metais pesados em peixes e água da bacia do rio Cassiporé, Estado do Amapá, Brasil. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 45, n. 4, p. 405-414, dez. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1590/1809-4392201403995>. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/aa/v45n4/1809-4392-aa-45-04-00405.pdf>. Acesso em: 19 mar. 2020.

LOCKLEY, A. K.; BARDSLEY, R. G. DNA-based methods for food authentication. **Trends in Food Science & Technology**, [S.l.], v. 11, n. 2, p. 67-77, fev. 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(00\)00049-2](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(00)00049-2). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224400000492>. Acesso em: 15 jun. 2020.

NAAUM, Amanda M. *et al.* Chapter 1 - Seafood Mislabeling Incidence and Impacts. *In*: NAAUM, Amanda M.; HANNER, Robert H. (org.). **Seafood Authenticity and Traceability: A DNA-based Perspective**. Londres: Elsevier, 2016. p. 3-26. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801592-6.00001-2>. ISBN: 978-0-12-801592-6. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128015926000012>. Acesso em: 04 fev. 2020.

MARKO, Peter B. *et al.* Mislabelling of a depleted reef fish. **Nature**, [S.l.], v. 430, p. 309-310, jul. 2004. DOI: <https://doi.org/10.1038/430309b>. Disponível em: [https://www.researchgate.net/profile/Amber\\_Rice2/publication/8454059\\_Fisheries\\_Mislabelling\\_of\\_a\\_depleted\\_reef\\_fish/links/0c96051e80d0eb4717000000/Fisheries-Mislabelling-of-a-depleted-reef-fish.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Amber_Rice2/publication/8454059_Fisheries_Mislabelling_of_a_depleted_reef_fish/links/0c96051e80d0eb4717000000/Fisheries-Mislabelling-of-a-depleted-reef-fish.pdf). Acesso em: 15 jun. 2020.

MESQUITA, Ricardo Alves *et al.* Avaliação de três métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação de DNA genômico pela técnica da PCR / Evaluation of three methods of DNA extraction from paraffin-embedded material for the amplification of genomic DNA by means of the PCR technique. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, São Paulo, v. 15, n. 4, p. 314-318, dez. 2001. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1517-74912001000400008>. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/pob/v15n4/a08v15n4.pdf>. Acesso em: 14 jun. 2020.

MOORE, Michelle M. *et al.* **Updates to the FDA single laboratory validated method for DNA barcoding for de species identification of fish**. [S.l.]: Laboratory Information Bulletin - DFS/ORAFDA. [2012]. 24 p. LIB n.: 4528. Disponível em: [https://www.researchgate.net/profile/Michelle\\_Moore9/publication/271769495\\_Updates\\_to\\_the\\_FDA\\_single\\_laboratory\\_validated\\_method\\_for\\_DNA\\_barcoding\\_for\\_the\\_species\\_identification\\_of\\_fish/links/54d165ca0cf25ba0f0413212/Updates-to-the-FDA-single-laboratory-validated-method-for-DNA-barcoding-for-the-species-identification-of-fish.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Michelle_Moore9/publication/271769495_Updates_to_the_FDA_single_laboratory_validated_method_for_DNA_barcoding_for_the_species_identification_of_fish/links/54d165ca0cf25ba0f0413212/Updates-to-the-FDA-single-laboratory-validated-method-for-DNA-barcoding-for-the-species-identification-of-fish.pdf). Acesso em: 17 jul. 2018.

NEDUNOORI, A.; TURANOV, S.V.; KARTAVTSEV, YU.PH. Fish product mislabeling identified in the Russian far east using DNA barcoding. *Gene Reports*, [S.l.], v. 8, p. 144-149, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2017.07.006>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2452014417300547>. Acesso em: 21 jul. 2020.

OLIVEIRA, Márcia Cristina de Sena *et al.* **Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase**. São Carlos, SP: Embrapa Pecuária Sudeste, 2007. ISBN: 978-85-86764-12-7. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/32770/1/LivroProtMolecular.pdf>. Acesso em: 01 mar. 2020.

PARDO, Miguel Ángel; JIMÉNEZ, Elisa; PÉREZ-VILLARREAL, Begoña. Misdescription incidents in seafood sector. **Food Control**, [S.l.], v. 62, p. 277-283, abr. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.10.048>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S095671351530270X>. Acesso em: 04 fev. 2020.

PIMENTA NETO, Danilo Alves. **Detecção de adulteração de espécies em pescado e derivados por meio da técnica de DNA Barcoding**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013. Disponível em: [https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/BUBD-9D8EAV/1/disserta\\_\\_o\\_danilo\\_alves\\_pimenta\\_netto\\_barcode.pdf](https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/BUBD-9D8EAV/1/disserta__o_danilo_alves_pimenta_netto_barcode.pdf). Acesso em: 10 maio 2017.

SANTANA NETO, Pedro de Lima *et al.* Envenenamento fatal por baiacu (Tetrodontidae): relato de um caso em criança. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 43, n. 1, p. 92-94, jan./fev. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0037-86822010000100020>. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v43n1/a20v43n1.pdf>. Acesso em: 19 mar. 2020.

SCARANO, Daria; RAO, Rosa. DNA Markers for Food Products Authentication. **Diversity**, [S.l.], v. 6, n. 3, p. 579-596, set. 2014. DOI: <https://doi.org/10.3390/d6030579>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1424-2818/6/3/579>. Acesso em: 31 maio 2020.

SECRETARIA DE ESTADO DO PLANEJAMENTO, GESTÃO E PATRIMÔNIO (Alagoas) - SEPLAG/AL. **Bairros de Alagoas [SHP]**. [Maceió]: SEPLAG/AL, 17 out. 2014. Disponível em: <http://dados.al.gov.br/dataset/bairros-de-alagoas/resource/855fb4a7-719c-44de-9723-b064a7d70558>. Acesso em: 14 abr. 2020.

SECRETARIA DE ESTADO DO PLANEJAMENTO, GESTÃO E PATRIMÔNIO (Alagoas) - SEPLAG/AL. **Malha Municipal do ano 2018 [SHP]**. [Maceió]: SEPLAG/AL, 27 mar. 2019. Disponível em: <http://dados.al.gov.br/dataset/malha-municipal-do-estado-de-alagoas/resource/c3d137b5-a739-4198-8299-cc131b3e4bce>. Acesso em: 18 mar. 2020.

SHEHATA, Hanan R. *et al.* DNA *barcoding* as a regulatory tool for seafood authentication in Canada. **Food Control**, [S.l.], v. 92, p. 147-153, out. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.04.045>. Disponível em: [https://www.researchgate.net/profile/Rafael\\_Garduno2/publication/324712627\\_DNA\\_barcoding\\_as\\_a\\_regulatory\\_tool\\_for\\_seafood\\_authentication\\_in\\_Canada/links/5e1505744585159aa4bcdf91/DNA-barcoding-as-a-regulatory-tool-for-seafood-authentication-in-Canada.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Rafael_Garduno2/publication/324712627_DNA_barcoding_as_a_regulatory_tool_for_seafood_authentication_in_Canada/links/5e1505744585159aa4bcdf91/DNA-barcoding-as-a-regulatory-tool-for-seafood-authentication-in-Canada.pdf). Acesso em: 19 mar. 2020.

SILVA, Carlos Alberto da; SANTOS, Silvia de Oliveira. **Avaliação do potencial risco à saúde humana de metais pesados em peixes marinhos consumidos em Aracaju, Maceió e Salvador, Brasil**. 21 ed. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2016. 22 p. ISSN 1678-1961. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/157184/1/BP-126.pdf>. Acesso em: 19 mar. 2020.

SMITH, P. J.; MCVEAGH, S. M.; STEINKE, D. DNA barcoding for the identification of smoked fish products. **Journal of Fish Biology**, [S.l.], v. 72, n.2, p. 464-471, jan. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2007.01745.x>. Disponível em: <http://biodiversitygenomics.net/site/wp-content/uploads/2016/01/2008%20-%20Smith%20-%20DNA%20barcoding%20for%20the%20identification.pdf>. Acesso em: 02 fev. 2020.

SOGIN, Mitchell L. *et al.* Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S.l.], v. 103, n. 32, p. 12115–12120, ago. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0605127103>. Disponível em: <https://www.pnas.org/content/pnas/103/32/12115.full.pdf>. Acesso em: 15 jun. 2020.

STAFFEN, Clisten Fátima *et al.* DNA barcoding reveals the mislabeling of fish in a popular tourist destination in Brazil. **PeerJ**, [S.l.], v. 5, p. e4006-e4018, nov. 2017. DOI: <https://doi.org/10.7717/peerj.4006>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5712207/pdf/peerj-05-4006.pdf>. Acesso em: 19 mar. 2020.

STILES, Margot *et al.* **Seafood Sticker Shock: Why you may be paying too much for your fish**. [S.l.]: Oceana, ago. 2013. Disponível em: [https://oceana.org/sites/default/files/reports/Oceana\\_Price\\_Report.pdf](https://oceana.org/sites/default/files/reports/Oceana_Price_Report.pdf). Acesso em: 24 mar. 2020.

TAGLIAVIA, Marcello *et al.* Development of a fast DNA extraction method for sea food and marine species identification. **Food Chemistry**, [S.l.], v. 203, p. 375-378, jul. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.095>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814616302680?via%3Dihub>. Acesso em: 19 mar. 2020.

TAUTZ, Diethard *et al.* A plea for DNA taxonomy. **Trends in Ecology & Evolution**, [S.l.], v. 18, n. 2, p. 70-74, fev. 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(02\)00041-1](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(02)00041-1). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0169534702000411>. Acesso em: 30 jan. 2020.

UNITED STATES - US. **Public Law 108-282 - Aug. 2, 2004**: Food Allergen Labeling and Consumer Protection Act of 2004 (FALCPA). [Washington]: FDA, 2 ago. 2004. Disponível em: <https://www.fda.gov/media/77570/download>. Acesso em: 05 fev. 2020.

WALSH, P. Sean; METZGER, David A.; HIGUCHI, Russell. Chelex 100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR-Based Typing from Forensic Material. **BioTechniques**, [S.l.], v. 54, n. 3, p. 134–139, mar. 2013. DOI: [10.2144/000114018](https://doi.org/10.2144/000114018). Disponível em: <https://www.future-science.com/doi/pdf/10.2144/000114018>. Acesso em: 03 mar. 2018.

WARD, Robert D. *et al.* DNA barcoding Australia's fish species. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, [S.l.], v. 360, p. 1847-1857, set. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1716>. Disponível em: <https://royalsocietypublishing.org/doi/pdf/10.1098/rstb.2005.1716>. Acesso em: 08 ago. 2018.

WARNER, Kimberly, *et al.* **Oceana Study Reveals Seafood Fraud Nationwide**. [S.l.]: Oceana, fev. 2013. Disponível em: [https://oceana.org/sites/default/files/reports/National\\_Seafood\\_Fraud\\_Testing\\_Results\\_FINAL.pdf](https://oceana.org/sites/default/files/reports/National_Seafood_Fraud_Testing_Results_FINAL.pdf). Acesso em: 10 abr. 2020.

WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. **Nature**, [S.l.], v. 171, p. 737-738, abr. 1953. DOI: <https://doi.org/10.1038/171737a0>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/171737a0>. Acesso em: 09 fev. 2020.

WEN, Jing *et al.* Authentication and traceability of fish maw products from the market using DNA sequencing. **Food Control**, [S.l.], v. 55, p. 185-189, set. 2015.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.02.033>. Disponível em:  
[https://www.researchgate.net/profile/Sigang\\_Fan/publication/274096161\\_Authentication\\_and\\_traceability\\_of\\_fish\\_maw\\_products\\_from\\_the\\_market\\_using\\_DNA\\_sequencing/links/5cf9bc804585157d1598bce6/Authentication-and-traceability-of-fish-maw-products-from-the-market-using-DNA-sequencing.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Sigang_Fan/publication/274096161_Authentication_and_traceability_of_fish_maw_products_from_the_market_using_DNA_sequencing/links/5cf9bc804585157d1598bce6/Authentication-and-traceability-of-fish-maw-products-from-the-market-using-DNA-sequencing.pdf). Acesso em: 04 abr. 2020.