

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA

DANILO ALVES PIMENTA NETO

Detecção de adulteração de espécies em pescado  
e derivados por meio da técnica de  
*DNA Barcoding*

BELO HORIZONTE

2013

DANILO ALVES PIMENTA NETO

Detecção de adulteração de espécies em pescado  
e derivados por meio da técnica de  
*DNA Barcoding*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Zootecnia.

Área de concentração: Genética e Melhoramento Animal  
Profa. Orientadora: Denise Aparecida Andrade de Oliveira

BELO HORIZONTE  
2013

Dissertação defendida e aprovada em    /    /    pela Comissão Examinadora  
composta pelos seguintes membros:

---

Profa. Denise Aparecida Andrade de Oliveira

---

Prof. Eduardo Maldonado Turra

---

Dra. Marcela Gonçalves Drummond

Se fracassar, ao menos fracasse ousando grandes feitos,  
de modo que a sua postura não seja nunca  
a dessas almas frias e tímidas que não conhecem  
nem a vitória nem a derrota.

*Theodore Roosevelt*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus por guiar todos os meus passos nessa caminhada que acaba de ser concluída. Agradeço aos meus pais e minha irmã pela dedicação, carinho, atenção e exemplo. Aos meus orientadores, Denise Aparecida Andrade de Oliveira, Daniel Cardoso de Carvalho e Lilian Viana Teixeira pela oportunidade, confiança e todo o aprendizado recebido durante estes anos no Laboratório. A todos do Laboratório de Genética Animal da UFMG, Claudia, Eduardo, Gustavo, Ângelo, Ronaldo, Juliana, Sandra, Lívia, Flávia, Bruna, Diana, Sara, Renata e Marcelo, pelo incentivo, ensinamentos. Ao INCT Pecuária, CAPES, Fapemig, Cnpq e FEP pelos auxílios financeiros. A todos os professores com quem tive aulas ou que me ajudaram com conselhos e dicas. Aos amigos pela ajuda, companheirismo e por me aguentarem falando sobre peixes por esse tempo todo. Muito obrigado a cada um de vocês!

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
2.1 O pescado e a importância mundial.....	11
2.2 <i>Barcode</i> genético.....	12
2.3 Aplicações do <i>Barcode</i> .....	13
2.4 DNA <i>barcoding</i> em pescado.....	14
2.5 A regulamentação do pescado.....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1 Coleta das amostras e o banco de espécimes.....	15
3.2 Extração de DNA e confecção de alíquotas.....	16
3.3 Amplificação por PCR – Reação em Cadeia da Polimerase.....	16
3.4 Sequenciamento de DNA e análises de bioinformática.....	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
4.1 Amostragem.....	23
4.2 Análise das Amostras.....	24
4.3 Amostras analisadas quanto à substituição.....	25
4.3.1 Pescado com substituição.....	26
4.3.2 Pescado onde não se observou substituições.....	32
4.3.3 Substituições correlacionadas com o processamento.....	33
4.4 Amostras que não puderam ser analisadas por falta de identificação nos rótulos.....	34
5. CONCLUSÕES.....	36

## LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

### LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Amostras analisadas quanto à substituição.....	25
Gráfico 2 - Amostras analisadas por grupo.....	33

### LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Nomes dos pescado como identificados no ato da aquisição e suas quantidades.....	15
Tabela 2: Divisão dos grupos nos quais as amostras foram enquadradas para melhor identificação.....	16
Tabela 3: Nomes científicos e populares em português e inglês das espécies que podem se consideradas pelo FishBase ( <a href="http://www.fishbase.org">http://www.fishbase.org</a> ).....	19
Tabela 4: Listagem adaptada de nomes vulgares, sinônimas e nome científicos de espécies e famílias das categorias de pescado produzidas no Brasil (MPA, 2010)....	22
Tabela 5. Substituições observadas em pescado. ....	25
Tabela 6. Amostras que não puderam ser analisadas quanto à substituição.....	34

### LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Árvore de haplótipos dos peixes comercializados como Merluza.....	27
Figura 2: Árvore de haplótipos dos peixes comercializados como Bacalhau.....	28
Figura 3: Árvore de haplótipos dos peixes comercializados como Panga.....	30
Figura 4: Árvore de haplótipos dos peixes comercializados como Merluza.....	31
Figura 5: Árvore de haplótipos dos peixes comercializados como Traíra.....	32

## LISTAS DE SIGLAS E ABREVIACÕES

% - Porcentagem

uL - Microlitros

C - Graus Célsius

Blast - *Basic Local Alignment Search Tool*

Bold – *Barcode Of Life Data System*

CBol - *Consortium for the Barcode of Life*

COI - Citocromo Oxidase Sub-unidade 1

DNA – Ácido desoxirribonucleico

Etc - Et cetera

FAO -*Food and Agriculture Organization of the United Nations*

FDA - *Food and Drug Administration*

Fish-Bol - *Fish Barcode of Life Initiative*

GE – *General Electric*

IUCN - *International Union for Conservation of Nature*

Kg – Quilogramas

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento

MPA - Ministério da Pesca e Aquicultura

n – Número

OMS – Organização Mundial da Saúde

pb – Pares de Bases

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PIB – Produto Interno Bruto

PR – Paraná

SEBRAE - Agência de Apoio ao Empreendedor e Pequeno Empresário

SEAP - Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

## RESUMO

A identificação ou certificação de peixes tornou-se uma ferramenta importante para a detecção de fraude ou substituições intencionais frequentemente encontradas na forma de substituições por produtos de maior disponibilidade e menor valor comercial. A ocorrência de substituições em peixes tem sido relatada em vários países, como o Canadá, Estados Unidos, Japão, Coréia e Brasil, principalmente devido à ausência de caracteres morfológicos em espécies processadas. Além disso, a técnica de identificação de espécies por eletroforese de proteínas é laboriosa, requerendo trabalho especializado e não pode ser aplicada a produtos quimicamente ou termicamente processados. Neste trabalho, utilizou-se a técnica de identificação molecular de DNA barcoding, para identificação da composição de espécies de peixes e frutos do mar, *in natura* e processados. Vinte e dois por cento das amostras foram consideradas substituições, 60% das amostras fidedignas e 18% não puderam ser analisadas por falta de informações nos rótulos. O pescado onde mais se observou substituição foi a Merluza (70%), sendo que a espécie mais comercializada com esse nome popular foi a *Gadus chalcogrammus* (n= 17). Em segundo lugar em número de fraudes está o Bacalhau, sendo identificadas as espécies *Molva molva* e *Pollachius virens*, não consideradas como bacalhau segundo portaria do MAPA, respondendo então, por 63% da amostragem considerada como "substituição". Em outros tipos de pescado como o Panga, Salmão e Traíra, também foram observadas substituições. Sendo assim, pode-se afirmar que a técnica de DNA Barcoding é uma ferramenta importante e útil na detecção de substituições em peixes e frutos do mar, processados e *in natura*. Portanto, recomenda-se o estabelecimento de uma lista válida de nomes comerciais e científicos para os peixes e frutos do mar comercializados no Brasil. Tal lista de referência tornaria possível aos órgãos reguladores do Brasil, a detecção de fraudes e substituições na comercialização de produtos. Além disso, os serviços aduaneiros teriam respaldo para regular e fiscalizar itens importados / exportados, para fins de tributação e também para a proteção do consumidor.

**Palavras-chave:** COI, Fraude, Pescado, Substituição, Certificação

## ABSTRACT

The certification or identification of fish has become an important tool for the detection of fraud or replacement intentional often found as replacements for products of higher availability and low commercial value. The occurrence of substitutions in fish has been reported in several countries, such as Canada, USA, Japan, Korea and Brazil, mainly due to the absence of morphological characters in species processed. Furthermore, the protein electrophoresis technique for species identification is laborious, requiring skilled labor and can't be applied to chemically or thermally processed. In this work, we used the technique of molecular identification of DNA barcoding to identify the species composition of fish and seafood, fresh and processed. Twenty-two percent of the samples were considered replacements, 60% of the sample reliable and 18% could not be analyzed due to lack of information on labels. The fish where more substitution observed was Merluza (70%), and the kind marketed under the name most popular has been the *Gadus chalcogrammus* (n = 17). Second in number of frauds is the Cod, identified species *Molva molva* and *Pollachius virens*, that were not considered codas second order of the MAPA, accounting then for 63% of the sample considered "replacement". In other types of fish such as Panga, Salmon and Traíra, substitutions were also observed. Thus, one can say that the technique of DNA Barcoding is an important tool and useful in detecting substitutions in fish and seafood, processed and fresh. Therefore, we recommend the establishment of a valid list of commercial and scientific names for fish and seafood sold in Brazil. This reference list would make it possible for regulators of Brazil, fraud detection and replacement market. In addition, customs services would support regulating and supervising items imported / exported, for tax purposes, and also to protect the consumer.

**Key-words:** COI, Fraud, Seafood, Mislabeled, Certification

## 1. INTRODUÇÃO

A ocorrência de substituições em pescado foi relatada em diversos países como no Canadá e Estados Unidos da América (Wong e Hanner, 2008), Japão e Coréia (Baker, 2008). É importante ressaltar que a autenticação de pescado é dificultada pela ausência de caracteres morfológicos identificadores em alimentos processados e/ou filetados. Além disso, técnicas de identificação baseadas em proteínas ou lipídeos são laboriosas, exigem mão-de-obra especializada e não podem ser aplicadas sobre produtos processados termicamente ou quimicamente.

O sistema moderno de taxonomia molecular foi apresentado por Tautz *et al.* (2003), baseado no uso do DNA como ferramenta para a identificação taxonômica nos diversos grupos de organismos, sendo hoje aceita mundialmente. Neste contexto, as análises moleculares por DNA, vêm ganhando destaque entre as metodologias utilizadas, devido à necessidade de pequenas quantidades amostrais (fragmentos de tecido animal) e por permitirem a identificação do produto em circunstâncias diversas, como: produtos congelados, salgados ou processados por de aquecimento ou cozimento. Desta forma, o *Barcode* genético surge como uma ferramenta robusta e sensível para a autenticação de pescado e produtos derivados.

Um exemplo da aplicação da técnica de *DNA Barcoding* na identificação de fraude em pescado é o trabalho de Carvalho *et al.* (2011). Estes pesquisadores mostraram adulterações no pescado vendido como surubim (*Pseudoplatystoma corruscans*) por outras espécies de menor valor comercial.

Entretanto, a verificação da autenticidade de espécies variadas de pescado, tanto em produtos de supermercados, como restaurantes ainda não foi realizada no Brasil. Como já mostraram Jacquet e Pauly (2008), a rotulagem errada pode trazer várias complicações, como perdas econômicas para o consumidor e o governo, perda de recursos naturais, perda das eco-campanhas existentes em vários países e preocupação com a saúde.

Um pedaço de sushi de atum tem potencial para ser uma espécie em extinção, uma fraude, ou um perigo para a saúde (Lowenstein *et al.*, 2009).

Assim sendo, o objetivo deste trabalho, foi o de fazer a identificação genética das espécies de pescado comercializados em restaurantes e lanchonetes, bem como como comércio varejista da região sudeste do Brasil, avaliando o percentual de amostras identificadas erroneamente por meio da técnica de *DNA Barcode*.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 O pescado e a importância mundial

De acordo com dados do *FishBase* ([www.fishbase.org](http://www.fishbase.org)), existem aproximadamente 30.000 espécies de peixes no mundo, o que corresponde a pelo menos 50% de todas as espécies de vertebrados. Os peixes são muito diversos em nível de taxonomia, incluindo espécies “primitivas” sem mandíbula (Agnatha: feiticeiras e lampréias), peixes cartilagosos (Chondrichthyes: chimeras, tubarões e arraias) e peixes ósseos (Osteichthyes: celacanto, enguias, carpas, atuns, salmão) (FishBase, 2012).

Dados da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) indicam que em 2007 o pescado proveu mais de 13% de toda proteína animal no fornecimento de alimento global, gerando empregos para 41 milhões de pessoas e com uma estimativa de vendas de 84,9 bilhões de dólares (FAO, 2010). Desse modo, os peixes e seus produtos se caracterizam como importantes contribuintes para a segurança alimentar humana. Neste cenário, o Brasil se destaca entre os dez maiores produtores de pescado de água doce do mundo, com 243 mil toneladas por ano (FAO, 2010).

O pescado é um alimento saudável, rico em proteínas e sais minerais. A Organização Mundial da Saúde, OMS, recomenda o consumo de pelo menos 12 kg por pessoa ao ano. Hoje o Brasil tem 190 milhões de habitantes que consomem 7 kg/habitante/ano (SEAP/PR, 2007).

A estimativa mundial de consumo per capita de peixe aumentou de forma constante a partir de uma média de 9,9 kg em 1960 até 11,5 kg em 1970, 12,5 kg em 1980 e 14,4 kg em 1990, 16,4 kg em 2005 e para chegar finalmente em 2006, proporcionando uma oferta aparente per capita de 16,7 Kg. Uma das exceções foi o Brasil, onde o consumo seguiu estabilizado, aproximadamente em 7 kg/habitante/ano, bem abaixo dos 12,0kg recomendados pela OMS. (FAO, 2009).

A aquicultura vem se expandindo de forma sustentável e atualmente é o segmento onde mais se implantam projetos, sendo o foco mais importante no setor pesqueiro mundial. Além disso, representa uma forma alternativa de maior viabilidade para o suprimento da crescente demanda por pescado, tanto de origem marinha, como de água doce. Com a queda do setor pesqueiro extrativo nas últimas décadas, o rápido crescimento da aquicultura tem sido a única forma de acompanhar esta alta demanda do consumo de pescado mundial (CHAMMAS, 2007).

O Brasil hoje produz aproximadamente 1 milhão de toneladas/ano de pescado, gerando um PIB pesqueiro de R\$ 5 bilhões, ocupando 800 mil profissionais entre pescadores e aquicultores e criando 3,5 milhões de empregos diretos e indiretos. O potencial de

crescimento é enorme e o Brasil pode se tornar um dos maiores produtores mundiais de pescado (SEAP/PR, 2007; MPA, 2010).

O país apresenta um forte crescimento na produção de pescado, principalmente na parte da aquicultura que vem crescendo nesses últimos anos. E com o incentivo do governo e a criação do Ministério de Aquicultura e Pesca, que têm como finalidade estruturar a cadeia produtiva para garantir um desenvolvimento sustentável no setor pesqueiro e aquícola (MPA, 2010).

## **2.2 Barcode genético**

A diversidade de sequências de DNA é reconhecidamente uma ferramenta para distinção entre espécies, seja por acesso direto ou indireto, através da análise de proteínas. Há cerca de 40 anos atrás, a identificação de espécies era realizada pela eletroforese de proteínas em gel de amido e a abordagem com DNA mitocondrial passou a predominar na sistemática molecular nas décadas de 1970 e 1980 (Avisé, 1994).

Na tentativa de padronizar o marcador utilizado na identificação molecular de espécies animais, em 2003, pesquisadores da Universidade de Guelph (Ontário, Canadá) propuseram a criação de um sistema diagnóstico universal, baseado em um fragmento de aproximadamente 650 pares de bases (pb), a partir da base 58 da extremidade 5' do gene Citocromo Oxidase subunidade I. Esse processo foi denominado *DNA Barcode*, pois sequências desse gene funcionariam como um código de barras (Hebert *et al.*, 2003).

Segundo Hebert *et al.* (2003) a idéia é a mesma do código de barras universal de produtos do mercado varejista, que emprega 10 números alternados em 11 posições para gerar 100 bilhões de identificadores únicos. No caso do *DNA Barcode*, pode haver até quatro possibilidades de nucleotídeos (adenina, citosina, guanina e timina) em cada posição, mas com uma cadeia de sítios mais longa que 11 posições. A combinação de apenas 15 dessas posições de nucleotídeos, por exemplo, criaria um bilhão de códigos únicos, um número muito maior do que o de espécies conhecidas, aproximadamente 15 milhões. Isso permite que cada táxon seja identificado por apresentar uma sequência única de *DNA Barcode*.

Foi criado um banco gênico do *DNA Barcode* para o depósito de todas as espécies que possuam estas sequências publicadas, assim como as demais espécies, que posteriormente, também tivessem suas sequências estudadas. Preferencialmente utilizando amostras depositadas em museus ou outras instituições e previamente identificadas por taxonomistas (Ratnasingham e Hebert, 2007). Esse banco de dados, denominado de BOLD (*Barcode of Life Database*) permite associar outros tipos de dados às amostras tais como: fotos do espécimen (*voucher*), ponto de coleta, data da coleta e coletor, número do espécimen, instituição na qual foi depositado, dados taxonômicos e informações moleculares (como

eletroferogramas das sequências e primers utilizados na amplificação e no sequenciamento).

O Consórcio para o Código de Barras da Vida (CBOL) foi lançado em maio de 2004 e já conta com mais de 120 organizações de 45 países. O CBOL tem o propósito de promover o desenvolvimento das alianças internacionais de investigação necessárias para construir, ao longo dos próximos 20 anos, a biblioteca de códigos de barras para toda vida eucariótica (Ratnasingham e Hebert, 2007).

### **2.3 Aplicações do *DNA Barcode***

O uso do *DNA Barcode* tem apresentado alta taxa de sucesso na identificação rápida de espécies de diversos grupos de artrópodes, aves, peixes e anfíbios (Hebert *et al.* 2003, 2004; Kerr *et al.*, 2007; Ward *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2008). A taxa de evolução molecular do gene COI permite distinguir espécies próximas e também grupos filogeográficos dentro de uma mesma espécie (Hebert *et al.*, 2004; Hogg e Hebert, 2004; Ward *et al.*, 2005).

Em estudos como o de Hurst e Jiggins (2005), foi demonstrado que também podem existir sequências de DNA que tenham maior similaridade entre espécies do que dentro da mesma espécie, mas esta situação seria uma exceção. Entretanto, para peixes neotropicais observamos uma grande divergência entre espécies, e em nenhuma espécie comercial houve problemas de identificação pela técnica do *Barcode* (Carvalho *et al.*, 2011).

No setor comercial, a aplicação da taxonomia molecular para autenticação de alimentos é destinada principalmente a proteger os consumidores contra a fraude (Lockley e Bardsley, 2000; Gil, 2007). No entanto, rotulagem inadequada de animais e produtos da pesca também podem mascarar fontes de exploração ilegal, não declarada e não regulamentada e a comercialização de espécies protegidas (Baker *et al.*, 2002; Marko *et al.*, 2004).

### **2.4 *DNA Barcoding* em pescado**

A identificação inequívoca dos peixes - de ovos a adultos, bem como seus produtos, é importante para diversas áreas e pode viabilizar, por exemplo, a detecção de fraudes ou substituição de espécies em transações comerciais (Smith *et al.*, 2008), assistência na sustentabilidade e no manejo da pesca a longo prazo (Metcalf *et al.*, 2007) e ainda incrementar a pesquisa em conservação, na identificação de espécies crípticas (Hebert *et al.*, 2004).

Até o momento, uma grande variedade de métodos vêm sendo utilizados para a identificação de espécies de peixes (Ward e Grewe, 1994; Smith *et al.*, 2008).

Segundo Smith *et al.*, (2008), a certificação de filés de peixes necessita usualmente da aplicação de ferramentas moleculares, uma vez que a maioria das características morfológicas utilizadas na identificação das espécies são removidas durante o processo de filetagem. Ainda segundo os mesmos autores, os primeiros métodos de identificação baseados em eletroforese de proteínas foram reconhecidos como métodos oficiais para identificação de filés de peixes. No entanto, as proteínas são estáveis em produtos frescos e congelados, mas são desnaturadas e danificadas por calor ou processo de salga, o que torna tal metodologia inadequada para identificação de produtos de peixes defumados e enlatados (Carvalho *et al.*, 2008).

A abordagem de taxonomia molecular por sequenciamento de DNA de espécies comercializadas tem sido facilitada pelo programa de vigilância de DNA (Ross *et al.*, 2003). A Vigilância de DNA é aplicada atualmente para a identificação das cerca de 90 espécies de baleias, golfinhos e botos (ordem dos cetáceos), utilizando sequências da região controle do DNA mitocondrial e do gene do citocromo b. O programa tem sido usado com sucesso na rotina, para identificação de espécies da "carne de baleia", em pesquisas de mercado feitas no Japão e na Coreia ( Endo *et al.*, 2005; Baker *et al.*, 2006).

Na Índia, o laboratório de aquicultura, liderado pelo pesquisador Dr. Babasaheb Ambedkar da Universidade de Marathwada, recebeu 330 mil dólares para o desenvolvimento de um centro de genética para a validação do *Barcode* das espécies de importância econômica de uma bacia daquele país (Fish-Bol, 2012). No Brasil, empresas comerciais têm um grande interesse por esse tipo de certificação. E até o Instituto Estadual de Florestas de Minas Gérias já fez uso do processo, para autuar pesca fora da época permitida (Peixes São Francisco, 2010).

Carvalho *et al.*, 2011, mostraram que no Brasil existe substituição na comercialização de peixes nobres, por outros tipos de considerados menos nobres. Outros trabalhos no exterior também demonstraram este tipo de substituição (Wong e Hanner, 2008; Filonzi *et al.*, 2010 e Warner *et al.*, 2013).

## **2.5 A regulamentação do pescado**

Atualmente o comércio de pescado é regulado por barreiras tanto econômicas, quanto sanitárias. A identificação (certificação) de pescado tem se tornado uma ferramenta importante para detecção de substituições ou fraudes intencionais, frequentemente encontradas na forma de substituições por produtos de maior disponibilidade e menor valor comercial (CEPAL, 2005).

A corrupção e a adulteração são proibidas e estão quase sempre conectadas a comportamento fraudulento. Produtos falsificados são os que apresentam a aparência de um produto legítimo, genuíno, protegido ou não por marca registrada e se denominam

como estes, sem sê-los, para ludibriar a qualidade, a quantidade, a apresentação, a procedência e a propaganda (Ministério Público de Santa Catarina, 2012).

São exemplos de fraudes por falsificação, a comercialização de bebidas nacionais como sendo estrangeiras; venda de carnes de 2ª ou de 3ª como sendo de 1ª; peixes de categoria inferior vendidos como peixes finos (Ministério Público de Santa Catarina, 2012).

Recentemente, o órgão norte americano FDA (*Food and Drugs Administration*) implementou o *Barcode* genético na identificação de peixes e seus produtos para certificação e detecção de fraudes (Yancy *et al.*, 2008). Iniciativas semelhantes já existem em alguns países em desenvolvimento.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Coleta das amostras e banco de espécimes

Um total de 259 amostras de pescado e seus derivados (Tabela 1) foram adquiridos em diversos supermercados, restaurantes e lanchonetes entre os anos de 2010-2012 em 10 cidades dos quatro estados pertencentes à região sudeste do Brasil (Belo Horizonte, Betim, Contagem e Divinópolis em Minas Gerais; Arraial do Cabo, Búzios e Cabo Frio no Rio de Janeiro; Santos e São Paulo em São Paulo e Guarapari no Espírito Santo).

Tabela 1: Nomes dos pescado como identificados no ato da aquisição e suas quantidades.

<b>Pescado (como identificado no ato da aquisição)</b>	<b>N</b>
Salmão	52
Bacalhau	30
Atum	30
Merluza	30
Panga	30
Peixe Branco	30
Tilápia	30
Kani	11
Cação	4
Tipo Caviar	4
Hambúrguer	4
Nuggets	2
Sardinha	1
Traíra	1

Um banco de dados com o local de coleta, identificação do pescado no qual ele foi comercializado, qual grupo ele foi inserido para melhor identificação (Tabela 2) e fotografia, entre outros dados, foi mantido nos arquivos do Laboratório de Genética Animal da Escola de Veterinária na UFMG.

Tabela 2: Divisão dos grupos nos quais as amostras foram enquadradas para melhor identificação.

<b>Grupo 1 - amostras obtidas em restaurantes e lanchonetes</b>	Pratos prontos
<b>Grupo 2 - amostras obtidas no comércio varejista</b>	Produtos <i>in natura</i> , congelados, <i>nuggets</i> , enlatados, etc.
<b>Grupo 3 - amostras sem informação de origem</b>	Amostras colhidas por terceiros e enviadas ao laboratório sem maiores informações.

### 3.2 Extração do DNA e confecção de alíquotas

O DNA foi extraído pelo método de *Salting Out*. Após a extração, foi feita a quantificação e verificação da qualidade do DNA, sendo que proporção de ~ 1,8 em A 260/A 280 foi aceita como "puro" (Thermo Scientific, 2011), no aparelho *NanoVue* (GE *HealthCare*), para a confecção de alíquotas a 100 ng/ $\mu$ L. As alíquotas foram armazenadas em microtubos de 200  $\mu$ L à 4°C.

### 3.3 Amplificação por PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

Fragmentos de aproximadamente 650 pares de bases do gene Citocromo Oxidase I (COI) foram amplificados utilizando os pares de *primers* FishF1 – 5'TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC3', e FishR1 - 5' TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA3', apresentados por Ward *et al.* (2005).

A reação da PCR com volume final de 25  $\mu$ l, continham os seguintes reagentes em concentração final: Tampão 1X, 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,096  $\mu$ M de cada *primer*, 0,1 mM de dNTP, 0,05 unidades/ $\mu$ L de Taq Polimerase e 8 ng/ $\mu$ L de DNA.

As amplificações foram realizadas com um passo inicial de desnaturação a 94° C por 1 min, seguido de 35 ciclos de: 94° C por 60 s, 54° C por 90 s e 72° C por 60 s. A extensão foi feita a 72° C por 5 min, em termociclador Veriti® - 60-Well *Thermal Cycler* (Applied Biosystems®).

Os produtos da PCR foram conferidos por eletroforese em gel de agarose 1,5% corados com GelRed® e visualizados em luz Ultravioleta, certificando-se do peso molecular e intensidade e pureza da banda obtida para posterior sequenciamento.

### 3.4 Sequenciamento de DNA e análises de bioinformática

As sequências bi-direcionais foram determinadas utilizando o kit BigDye 3.1 Terminator Cycle Sequencing de acordo com o fabricante (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, U.S.A.), utilizando também os *primers* FishF1 e FishR1, apresentados por Ward *et al.* (2005).

A precipitação do DNA em placa de 96 *wells* seguiu os seguintes passos: foram acrescentados 2,5 µL de EDTA [125 mM], pH 8,0 e 30 µL de Etanol 100% em cada poço. Depois de homogeneizado, o material foi incubado à temperatura ambiente por 15 minutos. A placa foi centrifugada a 2.200 Força Centrífuga Relativa (RCF) por 45 minutos e depois de escorrido o sobrenadante, acrescentou-se 30 µL de etanol 70%. A placa foi centrifugada novamente, a 1.850 RCF por 15 minutos. Depois de retirar o sobrenadante e secar a placa em estufa, foram acrescentados 15 µL de formamida Hidi. A placa foi agitada para ressuspender o DNA antes de ser levada ao Sequenciador ABI 3130 (Applied Biosystems®), para a eletroforese capilar.

Os cromatogramas foram analisados manualmente e as sequências de DNA editadas, quando necessário, no software *Seq Scape* (Life Technologies). As análises genéticas foram processadas no software MEGA v.5 adaptado de Kumar *et al.* (2004).

Após as análises, as sequências obtidas foram comparadas para a identificação das espécies, nos bancos genéticos on-line BOLD System (<http://www.boldsystems.org>) e Blast-GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). No BOLD foram utilizados dois métodos de pesquisa, o “*All Barcode Records on BOLD*” que considera todas as sequências depositadas no banco de dados e o “*Species Level Barcode Records*” que só considera as sequências que obtiveram mais de 98% de similaridade com a pesquisada.

Sequências previamente depositadas do gene COI, das espécies, foram utilizadas como referências para as análises. O programa Mega v.5 foi utilizado para a construção da árvore de haplótipos aplicando-se o algoritmo de agrupamento *Neighbor-Joining* (NJ) e modelo de substituição de nucleotídeos *Kimura-2-parameter* (K2P), metodologia indicada para análise da região mitocondrial COI (Carvalho *et al.*, 2011).

Após esta etapa, todos os dados gerados foram adicionados a uma tabela, comparando os bancos genéticos, com os grupos de pescado para a análise final das amostras.

As análises de substituições tomaram como base os nomes populares em português e os nomes em inglês utilizados pela FAO, de acordo com o FishBase (<http://www.fishbase.org>) (Tabela 03) e a listagem dos pescado produzidos no Brasil (Tabela 04). Utilizou-se estas listagens já que no Brasil não existe uma lista oficial contendo os nomes populares e de espécies de pescado que são comercializados no país.

Os nomes científicos das espécies que foram identificadas pelo BOLD, utilizando as sequencias de DNA das amostras, foram comparados com as tabelas 1 e 2. Era determinada a substituição, quando os nomes populares e da FAO mostravam ser diferentes daquele utilizado na comercialização. Como exemplo, o Cação apresenta 21 espécies com este nome comum. Se a sequencia de DNA de uma amostra for de qualquer uma destas 21 espécies ela não será considerada substituição. Somente para o Bacalhau foi utilizada a normativa do Ministério da Pesca e Aquicultura, a qual delega diretrizes para a regulamentação deste peixe (MPA,2012).

Tabela 3: Nomes científicos e populares em português e inglês das espécies que podem se consideradas pelo FishBase (<http://www.fishbase.org>).

Nome Popular	Língua	Pais	Nome Popular	Língua	Pais	Tipo da Nomeclatura	Espécie
<b>Atum</b>	Português	Brasil	Albacore	Inglês	USA	AFS	<i>Thunnus alalunga</i>
<b>Atum</b>	Português	Brasil	Yellowfin tuna	Inglês	UK	FAO	<i>Thunnus albacares</i>
<b>Atum</b>	Português	Brasil	Blackfin tuna	Inglês	Global	FAO	<i>Thunnus atlanticus</i>
<b>Atum</b>	Português	Brasil	Bigeye tuna	Inglês	UK	FAO	<i>Thunnus obesus</i>
<b>Atum</b>	Português	Brasil	Atlantic bluefin tuna	Inglês	UK	FAO	<i>Thunnus thynnus</i>
---	---	---	Pacific bluefin tuna	Inglês	Global	FAO	<i>Thunnus orientalis</i>
<b>Bacalhau-do-Pacífico</b>	Português	Portugal	Pacific cod	Inglês	Global	FAO	<i>Gadus macrocephalus</i>
<b>Bacalhau-do-Atlântico</b>	Português	Portugal	Atlantic cod	Inglês	UK	FAO	<i>Gadus morhua</i>
<b>Bacalhau-da-Gronelândia</b>	Português	Portugal	Greenland cod	Inglês	USA	AFS	<i>Gadus ogac</i>
<b>Caçã</b>	Português	Brasil	Porbeagle	Inglês	UK	FAO	<i>Lamna nasus</i>
<b>Caçã</b>	Português	Brasil	Cuban dogfish	Inglês	Global	FAO	<i>Squalus cubensis</i>
<b>Caçã</b>	Português	Brasil	Blacknose shark	Inglês	Global	FAO	<i>Carcharhinus acronotus</i>
<b>Caçã</b>	Português	Brasil	Copper shark	Inglês	UK	FAO	<i>Carcharhinus brachyurus</i>
<b>Caçã</b>	Português	Brasil	Spinner shark	Inglês	USA	AFS	<i>Carcharhinus brevipinna</i>
<b>Caçã</b>	Português	Brasil	Silky shark	Inglês	USA	AFS	<i>Carcharhinus falciformis</i>
<b>Caçã</b>	Português	Brasil	Galapagos shark	Inglês	USA	AFS	<i>Carcharhinus galapagensis</i>
<b>Caçã</b>	Português	Brasil	Bull shark	Inglês	Global	FAO	<i>Carcharhinus leucas</i>
<b>Caçã</b>	Português	Brasil	Blacktip shark	Inglês	UK	FAO	<i>Carcharhinus limbatus</i>
<b>Caçã</b>	Português	Brasil	Dusky shark	Inglês	USA	AFS	<i>Carcharhinus obscurus</i>
<b>Caçã</b>	Português	Brasil	Sandbar shark	Inglês	USA	AFS	<i>Carcharhinus plumbeus</i>
<b>Caçã</b>	Português	Brasil	Smalltail shark	Inglês	Global	FAO	<i>Carcharhinus porosus</i>
<b>Caçã</b>	Português	Brasil	Tiger shark	Inglês	USA	AFS	<i>Galeocerdo cuvier</i>
<b>Caçã</b>	Português	Brasil	Caribbean sharpnose shark	Inglês	Global	FAO	<i>Rhizoprionodon porosus</i>
<b>Caçã</b>	Português	Brasil	Bonnethead	Inglês	Global	FAO	<i>Sphyrna tiburo</i>
<b>Caçã</b>	Português	Brasil	Dusky smooth-hound	Inglês	Global	FAO	<i>Mustelus canis</i>

<b>Caçã</b>	Português	Brasil	Narrowfin smooth-hound	Inglês	Global	FAO	<i>Mustelus norrisi</i>
<b>Caçã</b>	Português	Brasil	Tope shark	Inglês	UK	FAO	<i>Galeorhinus galeus</i>
<b>Caçã</b>	Português	Brasil	Smalleye smooth-hound	Inglês	Global	FAO	<i>Mustelus higmani</i>
<b>Caçã</b>	Português	Brasil	Narrownose smooth-hound	Inglês	Global	FAO	<i>Mustelus schmitti</i>
<b>Caçã-azul</b>	Português	Brasil	Blue shark	Inglês	USA	AFS	<i>Prionace glauca</i>
<b>Merluza</b>	Português	Brasil	Argentine hake	Inglês	Global	FAO	<i>Merluccius hubbsi</i>
<b>Panga</b>	Espanhol	Global	Sutchi catfish	Inglês	Global	FAO	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>
<b>Tilápia</b>	Português	Brasil	Nile tilapia	Inglês	Global	FAO	<i>Oreochromis niloticus</i>
<b>Tilápia</b>	Português	Brasil	Redbreast tilapia	Inglês	Global	FAO	<i>Tilapia rendalli</i>
<b>Tilápia</b>	Português	Brasil	Wami tilapia	Inglês	Global	FAO	<i>Oreochromis urolepis</i>
<b>Tilapia</b>	Português	Brasil	Blue tilapia	Inglês	Global	FAO	<i>Oreochromis aureus</i>
<b>Tilapia</b>	Português	Brasil	Mozambique tilapia	Inglês	Global	FAO	<i>Oreochromis mossambicus</i>
<b>Traira</b>	Português	Brasil	Trahira	Inglês	Global	FAO	<i>Hoplias malabaricus</i>
<b>Traira</b>	Português	Brasil	---	---	---	---	<i>Hoplias aimara</i>
<b>Traíra</b>	Português	Brasil	Inshore lizardfish	Inglês	Global	FAO	<i>Synodus foetens</i>
<b>Traíra</b>	Português	Brasil	Sand diver	Inglês	USA	AFS	<i>Synodus intermedius</i>
<b>Traíra</b>	Português	Brasil	Snakefish	Inglês	Global	FAO	<i>Trachinocephalus myops</i>
<b>Traíra</b>	Português	Brasil	Aimara	Inglês	Global	FAO	<i>Hoplerythrinus unitaeniatus</i>
<b>Traíra</b>	Português	Brasil	Giant trahira	Inglês	USA	AFS	<i>Hoplias macrophthalmus</i>
<b>Traíra</b>	Português	Brasil	---	---	---	---	<i>Serranus flaviventris</i>
<b>Traíra</b>	Português	Brasil	---	---	---	---	<i>Hoplias microcephalus</i>
<b>Traíra</b>	Português	Brasil	---	---	---	---	<i>Hoplias brasiliensi</i>
<b>Salmão-do-Atlântico</b>	Português	Portugal	Atlantic salmon	Inglês	USA	AFS	<i>Salmo salar</i>
<b>Salmao-cão</b>	Português	Portugal	Chum salmon	Inglês	Global	FAO	<i>Oncorhynchus keta</i>
<b>Salmão-rosa</b>	Português	Portugal	Pink salmon	Inglês	Global	FAO	<i>Oncorhynchus gorbuscha</i>
<b>Salmão-prateado</b>	Português	Portugal	Coho salmon	Inglês	Global	FAO	<i>Oncorhynchus kisutch</i>
<b>Salmão-real</b>	Português	Portugal	Chinook salmon	Inglês	USA	AFS	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>
<b>Salmão-japonês</b>	Português	Portugal	Masu salmon	Inglês	Global	FAO	<i>Oncorhynchus masou masou</i>

<b>Salmão-vermelho</b>	Português	Portugal	Sockeye salmon	Inglês	Global	FAO	<i>Oncorhynchus nerka</i>
<b>Sardinha</b>	Português	Brasil	Bates' sabretooth anchovy	Inglês	Global	FAO	<i>Lycengraulis batesii</i>
<b>Sardinha</b>	Português	Brasil	Round sardinella	Inglês	UK	FAO	<i>Sardinella aurita</i>
<b>Sardinha</b>	Português	Brasil	False herring	Inglês	Global	FAO	<i>Harengula clupeola</i>
<b>Sardinha</b>	Português	Brasil	Scaled herring	Inglês	Global	FAO	<i>Harengula jaguana</i>
<b>Sardinha</b>	Português	Brasil	Atlantic thread herring	Inglês	Global	FAO	<i>Opisthonema oglinum</i>
<b>Sardinha</b>	Português	Brasil	Brazilian sardinella	Inglês	Global	FAO	<i>Sardinella brasiliensis</i>
<b>Sardinha</b>	Português	Brasil	River Plate sprat	Inglês	Global	FAO	<i>Platanichthys platana</i>
<b>Sardinha</b>	Português	Brasil	Spicule anchovy	Inglês	Global	FAO	<i>Anchoa spinifer</i>
<b>Sardinha</b>	Português	Brasil	Zabaleta anchovy	Inglês	Global	FAO	<i>Anchovia clupeioides</i>
<b>Sardinha</b>	Português	Brasil	Atlantic anchoveta	Inglês	USA	AFS	<i>Cetengraulis edentulus</i>
<b>Sardinha</b>	Português	Brasil	Wingfin anchovy	Inglês	Global	FAO	<i>Pterengraulis atherinoides</i>
<b>Sardinha</b>	Português	Brasil	Jenyns's sprat	Inglês	Global	FAO	<i>Ramnogaster arcuata</i>
<b>Sardinha</b>	Português	Brasil	Bahia sprat	Inglês	Global	FAO	<i>Rhinosardinia bahiensis</i>
<b>Sardinha</b>	Português	Brasil	Argentine menhaden	Inglês	Global	FAO	<i>Brevoortia pectinata</i>
<b>Sardinha</b>	Português	Brasil	Yellowfin river pellona	Inglês	Global	FAO	<i>Pellona flavipinnis</i>
<b>Sardinha</b>	Português	Brasil	American coastal pellona	Inglês	Global	FAO	<i>Pellona harroweri</i>
<b>Sardinha</b>	Português	Brasil	Dogtooth herring	Inglês	Global	FAO	<i>Chirocentrodon bleekermanus</i>
<b>Sardinha</b>	Português	Brasil	Guiana longfin herring	Inglês	Global	FAO	<i>Odontognathus mucronatus</i>
<b>Sardinha</b>	Português	Brasil	Cayenne anchovy	Inglês	Global	FAO	<i>Anchoviella cayennensis</i>
<b>Sardinha</b>	Português	Brasil	Guyana anchovy	Inglês	Global	FAO	<i>Anchoviella guianensis</i>
<b>Sardinha</b>	Português	Brasil	Broadband anchovy	Inglês	Global	FAO	<i>Anchoviella lepidentostole</i>
<b>Sardinha</b>	Português	Brasil	Elongate hatchetfish	Inglês	USA	AFS	<i>Triportheus elongatus</i>
<b>Sardinha</b>	Português	Brasil	---	---	---	---	<i>Triportheus angulatus</i>
<b>Sardinha</b>	Português	Brasil	---	---	---	---	<i>Triportheus rotundatus</i>
<b>Sardinha</b>	Português	Brasil	---	---	---	---	<i>Ctenobrycon hauxwellianus</i>
<b>Sardinha</b>	Português	Brasil	---	---	---	---	<i>Triportheus pictus</i>
<b>Sardinha</b>	Português	Brasil	---	---	---	---	<i>Triportheus albus</i>

<b>Sardinha</b>	Português	Brasil	---	---	---	---	<i>Triportheus paranensis</i>
<b>Sardinha</b>	Português	Brasil	---	---	---	---	<i>Triportheus nematurus</i>
<b>Sardinha</b>	Português	Brasil	---	---	---	---	<i>Triportheus guentheri</i>
<b>Sardinha</b>	Português	Brasil	---	---	---	---	<i>Triportheus signatus</i>
<b>Sardinha</b>	Português	Brasil	---	---	---	---	<i>Triportheus auritus</i>

FAO – Nomes populares em inglês selecionados pela *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

AFS – Nomes populares que não tinham nenhuma referencia pela FAO, então se utilizou os da *American Fisheries Society* (FishBase, 2013)

Tabela 4: Listagem adaptada de nomes vulgares, sinónímias e nome científicos de espécies e famílias das categorias de pescado produzidas no Brasil (MPA, 2010).

<b>Nome Vulgar</b>	<b>Sinónímia</b>	<b>Família</b>	<b>Nome Científico</b>	<b>Listagem MPA</b>
<b>Albacora-bandolim</b>	Atum-cachorra	Scombridae	<i>Thunnus obesus</i>	1
<b>Albacora-branca</b>	Atum-voador	Scombridae	<i>Thunnus alalunga</i>	1
<b>Albacora-lage</b>	Atum-galha-amarela	Scombridae	<i>Thunnus albacares</i>	1
<b>Albacorinha</b>	Binta	Scombridae	<i>Thunnus atlanticus</i>	1
<b>Tainha</b>	Saúna; Curimã; Cacetao; Tainhota	Mugilidae	<i>Mugil spp.</i>	1
<b>Merluza</b>	Marmota	Merlucciidae	<i>Merluccius hubbsi</i>	1
<b>Peixe-espada</b>	Espada; Catana	Trichiuridae	<i>richiurus lepturus</i>	1
<b>Dourado</b>		Coryphaenidae	<i>Coryphaena hippurus</i>	1
<b>Truta</b>	Truta-arco-íris	---	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	2
<b>Tilápia</b>	---	---	<i>Oreochromis spp.</i>	2
<b>Tilápia</b>	---	Cichlidae	<i>Oreochromis niloticus</i>	3
<b>Dourada</b>	---	Pimelodidae	<i>Brachyplatystoma rousseauxii</i>	3

1 - Listagem de nomes vulgares, sinónímias e nome científicos de espécies e famílias das categorias de pescados produzidos no Brasil pela pesca extrativa marinha.

2 - Listagem de nomes vulgares, sinónímias e nomes científicos de espécies das categorias de pescados produzidos no Brasil pela aquicultura.

3 - Listagem de nomes vulgares, sinónímias e nomes científicos de espécies e famílias das categorias de pescados produzidos no Brasil pela pesca extrativa continental.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Amostragem

Todas as amostras de Atum foram obtidas de restaurantes de culinária japonesa. A identificação por *DNA Barcode* indicou que pelo menos quatro espécies, pertencentes ao gênero *Thunnus* (*T. obesus*, *T. albacares*, *T. alalunga* e *T. orientalis*) são comercializadas com o nome genérico atum.

Para as 4 amostras de caviar, sendo de duas empresas diferentes, que continham no rótulo quais as espécies de peixes das quais eram as ovas (grupo 2 – Comércio varejista), o teste pode comprovar que eram realmente *Mugil liza* (Tainha) e *Mallotus villosus* (Capelim), não detectando substituição.

As amostras de Cação e Sardinha foram agrupadas no grupo 1 – Restaurante e Lanchonetes. Foram identificadas molecularmente como *Prionace glauca* (Tubarão azul) e *Sardinella aurita* (Sardinha) respectivamente. Nenhuma delas sendo consideradas substituições.

Já nas amostras de Tilápia, 13 eram do grupo 1 – Restaurantes e Lanchonetes; e 17 do grupo 2 - Comércio; segundo a divisão já apresentada anteriormente. Foram identificadas 3 espécies; *Oreochromis mossambicus* (Tilápia de Mozambique), *Oreochromis niloticus* (Tilápia do Nilo) e *Oreochromis aureus* (Blue tilápia), sendo todas do gênero *Oreochromis*, também não caracterizando substituição.

Foram identificadas 4 espécies sendo comercializadas como Bacalhau. *Gadus macrocephalus* (Bacalhau do Pacífico), *Gadus morhua* (Bacalhau do Atlântico), *Molva molva* (Donzela) e *Pollachius virens* (Badejo).

Para o grupo de Merluza, Traíra, Salmão e Panga foram identificadas outras espécies que não são correspondentes com as comercializadas. Entre as amostras de Merluza foram encontradas as espécies *Gadus chalcogrammus* (Escamudo do Alasca), *Pangasius hypophthalmus* (Panga), *Trichiurus lepturus* (Peixe Espada) e *Merluccius hubbsi* (Merluza).

Entre as amostras de Panga, detectou-se o maior número de espécies distintas. Pelo menos 6 espécies são comercializadas com o nome Panga, sendo elas: *Oreochromis mossambicus* (Tilápia de Mozambique), *Brachyplatystoma rousseauxii* (Dourada), *Gadus chalcogrammus* (Escamudo do Alasca) e *Merluccius hubbsi* (Merluza), *Oreochromis niloticus* (Tilápia-do-Nilo) e *Pangasius hypophthalmus* (Panga).

Entre as amostras de Salmão, o grupo com a maior amostragem (n=52), foram identificadas as espécies: *Salmo salar* (Salmão do Atlântico) (n=45), *Oncorhynchus keta* (Salmão Cão) (n=3), *Oncorhynchus mykiss* (Truta arco-iris) (n=2), *Oncorhynchus gorbuscha* (Salmão Rosa) (n=1) e *Oncorhynchus kisutch* (Salmão Prateado) (n=1).

Na única amostra de Traíra, coletada em um restaurante, identificamos sua substituição por outra espécie, a Merluza (*Merluccius hubbsi*).

Segundo Hebert *et al.* (2003), a taxa de substituição de aminoácidos é mais baixa neste gene do que em qualquer outro gene mitocondrial, o que permitiria reconstruções filogenéticas mais profundas.

O percentual de identidade pode variar dependendo dos grupos de animais. Por exemplo, diferentes espécies de vertebrados normalmente apresentam divergência nas sequências de mais de 2% para o gene do citocromo b (Avice e Walker, 1999), mas Hebert *et al.* (2003) utilizaram um valor de até 3% como corte (*threshold*) para lepidópteros .

Ao realizar a comparação das sequências pelo *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) do GenBank, 31 sequências apresentaram resultados com menos de 98% (variação de 83 - 97%) de identidade.

Destas mesmas 31 amostras, todas mostraram ser da mesma espécie, quando foi feita a comparação no BOLD. Em contrapartida no BOLD. Somente 10 sequências apresentaram menos do que 98% de identidade máxima (variação de 94,36 – 97, 85%).

No presente trabalho foi utilizada uma margem de corte de até 2% para identificação da espécie. Das 10 amostras com menos de 98% de similaridade, somente 2 amostras (Panga 16 – 95,27% e Merluza 29 – 97,85%) foram consideradas substituições, por se tratarem de outra espécie, diferente da comercializada. Outras 3 amostras, identificadas como sendo *Pollachius virens*, foram consideradas como substituição por causa da legislação que determina as espécies de bacalhau (ver item 4.2.1.1 Pescado com substituições).

## **4.2 Análise das Amostras**

Das 259 amostras colhidas, 212 continham em seus rótulos o peixe usado. Quarenta e sete não apresentavam os nomes dos peixes nos rótulos dos produtos, talvez por não existir legislação que determine quais os peixes podem ser usados como constituintes dos mesmos (ex: Hamburger, Nuggets, etc.).

Sendo assim as análises foram divididas em duas sessões: 4.3 - Amostras analisadas quanto à substituição e 4.4 - Amostras que não puderam ser analisadas quanto à substituição por falta de identificação nos rótulos.

### 4.3 Amostras analisadas quanto à substituição

As amostras analisadas foram divididas em 2 grupos: “Com Substituição”, quando a identificação da espécie mencionada no rótulo ou anúncio não correspondia à espécie comercializada; “Sem Substituição”, quando não observamos a substituição de espécie. Sendo assim, vinte e seis por cento das amostras foram consideradas substituições e 74% fidedignas (Gráfico 1) (Tabela 5).

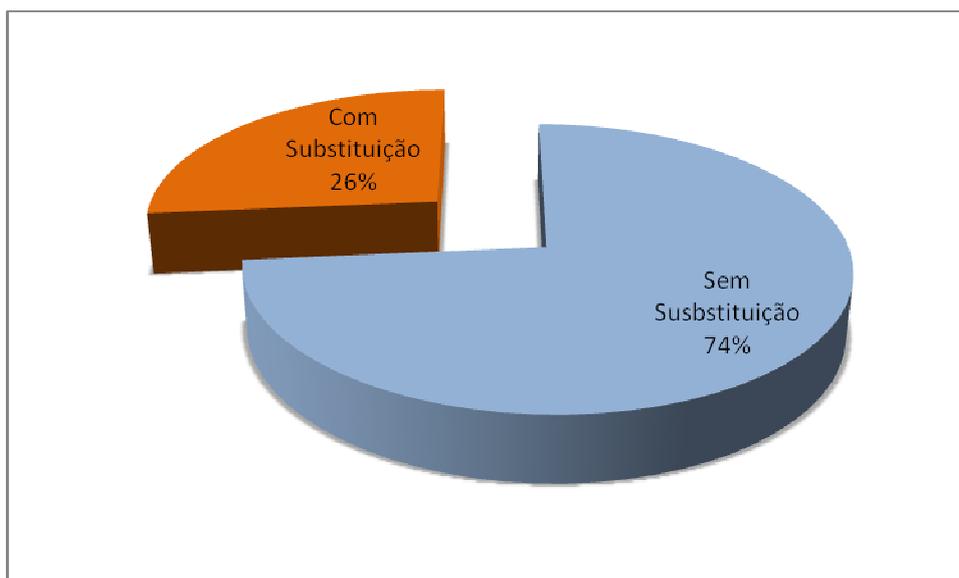


Gráfico 1 – Amostras analisadas quanto à substituição

Tabela 5. Substituições observadas em pescado.

Pescado (como identificado no ato da aquisição)	Espécie Identificada (% média de similaridade com a sequência depositada no BOLD)	N	Nome Popular (FishBase)	Nome FAO (FishBase)	Substituição
<b>Atum</b>	<i>Thunnus albacares</i> - 99,69 %	24	Albacora Lage	Yellowfin tuna	Não
	<i>Thunnus obesus</i> - 99,56 %	3	Atum-cachorro	Bigeye tuna	Não
	<i>Thunnus alalunga</i> - 100 %	2	Albacora Branca	Albacore	Não
	<i>Thunnus orientalis</i> - 100 %	1	---	Pacific bluefin tuna	Não
<b>Caviar</b>	<i>Mugil liza</i> - 99,45 %	2	Taíinha	Lebranche mullet	Não
	<i>Mallotus villosus</i> - 99,59 %	2	Capelim	Capelin	Não
<b>Cação</b>	<i>Prionace glauca</i> - 99,95 %	4	Tubarão Azul	Blue shark	Não
<b>Sardinha</b>	<i>Sardinella aurita</i> - 100 %	1	Sardinha	Round sardinella	Não
	<i>Oreochromis mossambicus</i> - 99,73 %	9	Tilapia de Mozambique	Mozambique tilapia	Não
<b>Tilápia</b>	<i>Oreochromis niloticus</i> - 99,78 %	20	Tilápia-do-nilo	Nile tilapia	Não
	<i>Oreochromis aureus</i> - 99,61 %	1	---	Blue tilapia	Não
	<i>Gadus macrocephalus</i> - 100 %	5	Bacalhau-do-Pacífico	Pacific cod	Não

	<i>Gadus morhua</i> - 99,42 %	6	Bacalhau-do-Atlântico	Atlantic cod	Não
	<i>Molva molva</i> 99,93 %	3	Donzela	Blue ling	Sim
	<i>Pollachius virens</i> - 97,50 %	15	Badejo	Saithe	Sim
<b>Merluza</b>	<i>Gadus chalcogrammus</i> 99,92 %	17	Escamudo-do-alasca	Alaska pollock	Sim
	<i>Pangasius hypophthalmus</i> - 99,89 %	2	---	Striped catfish	Sim
	<i>Merluccius hubbsi</i> - 100 %	9	Merluza	Argentine hake	Não
	<i>Trichiurus lepturus</i> - 98,18 %	2	Peixe-espada	Largehead hairtail	Sim
<b>Panga</b>	<i>Brachyplatystoma rousseauxii</i> - 100 %	2	Dourada	---	Sim
	<i>Pangasius hypophthalmus</i> 99,75	17	---	Striped catfish	Não
	<i>Gadus chalcogrammus</i> - 99,70 %	3	Escamudo-do-alasca	Alaska pollock	Sim
	<i>Merluccius hubbsi</i> - 97,63 %	3	Merluza	Argentine hake	Sim
	<i>Oreochromis niloticus</i> - 100 %	4	Tilápia-do-nilo	Nile tilapia	Sim
	<i>Oreochromis mossambicus</i> 100 %	1	Tilápia de Mozambique	Mozambique tilapia	Sim
<b>Salmão</b>	<i>Salmo salar</i> - 99,87 %	45	Salmão-do-Atlântico	Atlantic salmon	Não
	<i>Oncorhynchus keta</i> - 100 %	3	Salmão Cão	Chum salmon	Não
	<i>Oncorhynchus mykiss</i> - 99,91 %	2	Truta-arco-iris	Rainbow trout	Sim
	<i>Oncorhynchus gorbuscha</i> - 100 %	1	Salmão Rosa	Pink salmon	Não
	<i>Oncorhynchus kisutch</i> - 99,83 %	1	Salmão Prateado	Coho salmon	Não
<b>Traira</b>	<i>Merluccius hubbsi</i> - 100 %	1	Merluza	Argentine hake	Sim

#### 4.3.1 Pescado com substituições

O pescado onde mais se observou substituição foi a Merluza, com 70% das amostras comercializadas como merluza sendo substituição (Figura 1). A Merluza é um peixe amplamente comercializado no país, com uma carne bastante apreciada e várias pisciculturas criando este peixe. A espécie mais comercializada com esse nome popular foi *Gadus chalcogrammus* (Escamudo do Alasca) (n=17). É importante ressaltar que a espécie *Gadus chalcogrammus* apresenta um valor comercial menor quando comparada com *Merluccius hubbsi*, espécie correspondente à Merluza (FishBase, 2012).

A captura da Merluza (*Merluccius hubbsi*) em 2010 no Brasil foi de 1.901 toneladas (MPA, 2010). No Mar de Bering, no Alasca, são capturados mais de um milhão de toneladas do *Gadus chalcogrammus* (Escamudo do Alasca), o que explica seu intenso uso em substituição à Merluza.

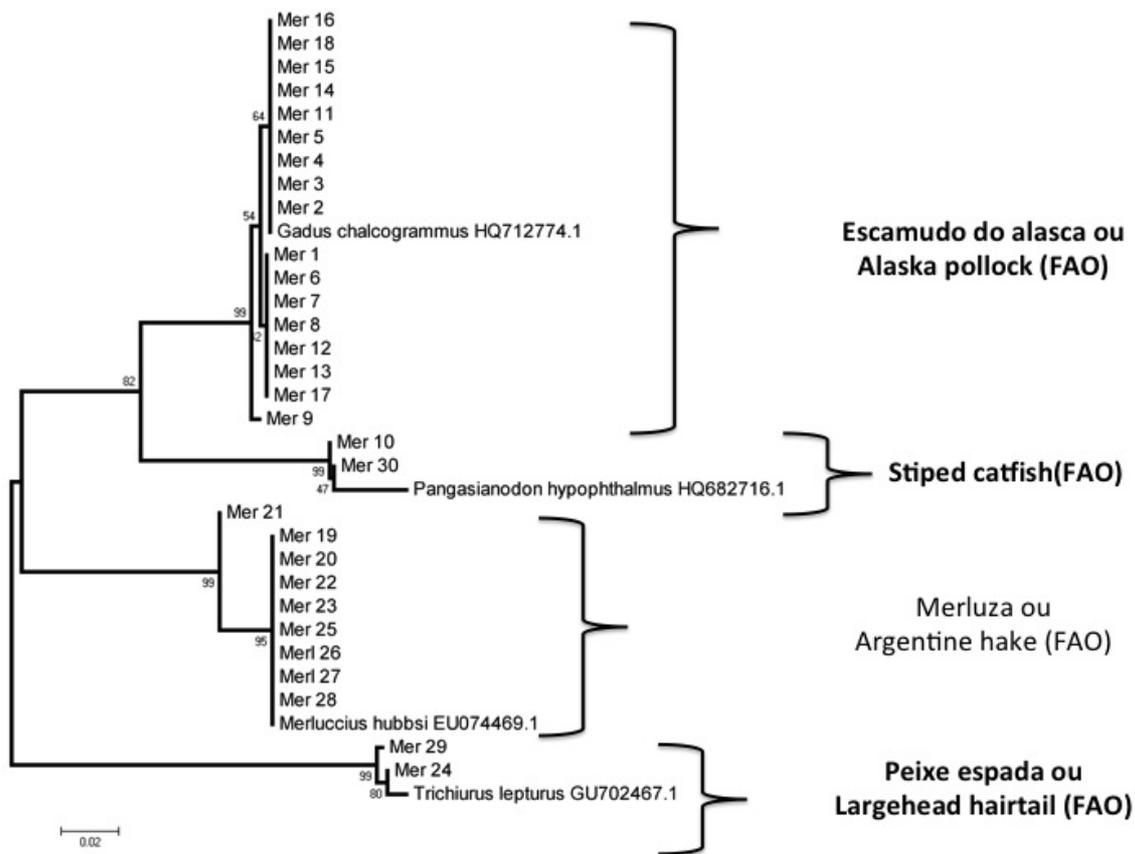


Figura 1: Árvore de haplótipos dos peixes comercializados como Merluza.

Em segundo lugar no número de fraudes está o Bacalhau. Por regulamentação do Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA) somente as espécies *Gadus morhua* (Bacalhau Cod), *Gadus macrocephalus* (Bacalhau do Pacífico) podem ser comercializadas como bacalhau, enquanto que os peixes Saithe, Ling e Zarbo devem ser comercializados como peixe salgado seco, ou “tipo bacalhau” salgado seco. Sendo assim, as espécies *Molva molva* (Ling) e *Pollachius virens* (Saithe) não são consideradas como bacalhau, e desse modo, 63% da amostragem foi considerada como substituição ou fraude (Figura 2).

É interessante notar que uma amostra de Bacalhau, rotulada pelo estabelecimento como bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*), foi identificada molecularmente como bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*), indicando assim um caso de fraude, o que lesa o consumidor por se tratar de pescado com valor comercial menor do que o da espécie citada no rótulo. O *Gadus morhua* é pescado no Atlântico Norte e é considerado o bacalhau mais nobre devido à sua alimentação, já que é encontrado nas profundezas do oceano. É a espécie que possui as postas altas, largas e com uma coloração palha e uniforme quando salgado e seco. Após o cozimento sua carne se desfaz em lascas claras e tenras. É conhecido como tradicional bacalhau do Porto. O quilo com pele custa, em média, R\$ 80,00 (oitenta Reais). Já o *Gadus macrocephalus* é do Pacífico Norte e tem uma diferença na coloração, mais branca. Com relação à textura, a carne desse bacalhau não se desfaz em

lascas, mas pode ser facilmente desfiada. O quilo custa, em média, R\$ 60,00 (sessenta Reais) (G1, 2009).

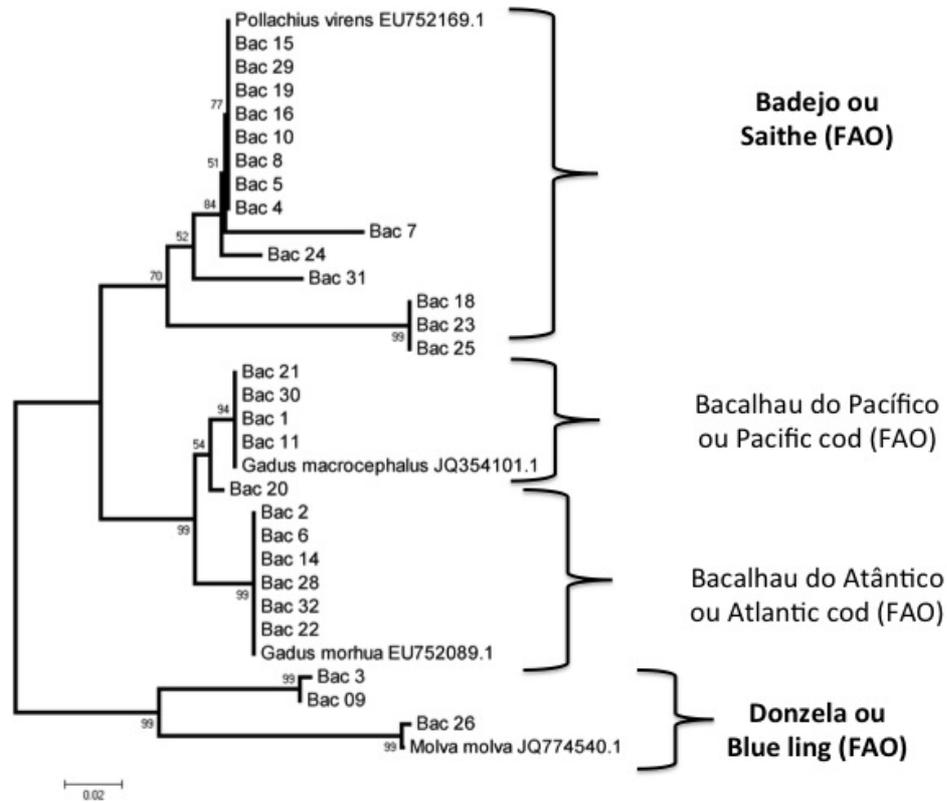


Figura 2: Árvore de haplótipos dos peixes comercializados como Bacalhau.

Os peixes Panga e Salmão apresentaram uma maior porcentagem de rotulagem correta, do que de substituições.

O Panga foi o peixe que apresentou mais espécies sendo comercializadas com esse nome popular. Em 43% da amostragem (13/30) foram encontradas substituições; sendo comercializados os peixes *Brachyplatystoma rousseauxii* (Dourada), *Gadus chalcogrammus* (Escamudo-do-alasca), *Merluccius hubbsi* (Merluza), *Oreochromis niloticus* (Tilápia do Nilo) e *Oreochromis mossambicus* (Tilápia de Mozambique) (Figura 3).

Uma situação curiosa que está acontecendo é a substituição do peixe Panga por Tilápia (*Oreochromis niloticus*). A Tilápia é um peixe com um valor comercial superior e uma carne mais apreciada e já incorporada aos hábitos alimentares do consumidor brasileiro. Esta espécie apresenta uma carne clara, sem espinhos e com sabor suave (Nogueira e

Rodrigues, 2007). Ao contrário, o peixe Panga que está sendo introduzido no país tem um menor valor, uma carne menos saborosa e um teor de gordura maior (DECO, 2009).

Podemos interpretar de duas maneiras essa substituição. Ao substituir o Panga por Tilápia, os restaurantes e lanchonetes estão enganando o consumidor, induzindo-o a acreditar que aquela é uma carne mais saborosa. Isto pode gerar uma maior comercialização do Panga no mercado brasileiro. Ou que a Tilápia usada nessas substituições não são essas de valor comercial alto, mas sim as Tilápias *off-flavor*. Lovshin (1997) relata que a tilápia absorve biomoléculas produzidas por algas azuis-verdes e outros microrganismos, assim, para assegurar a qualidade do peixe, a tilápia deve ser mantida em água limpa por três a cinco dias para depurar o sabor da carne. Para produtos de tilápia destinados a mercados internacionais ou domésticos de primeira linha, o controle do *off-flavor* é um pré-requisito para a comercialização. A maioria das grandes fazendas agora incorporam a fase de depuração entre a despesca e o processamento. Peixes tratados desta maneira podem perder até 4% em peso após o tratamento. Isto pode ser um custo adicional significativo para o aquicultor (Chavez et al., 2013). Por esse motivo podemos pensar que essas Tilápias não depuradas podem ser comercializadas como Panga, que é um peixe com sabor não tão delicado.

O peixe Panga (*Pangasius hypophthalmus*) está classificado como “Em perigo” pela Lista Vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais (IUCN). No entanto, é um peixe que está sendo bastante comercializado no Brasil. Sua importação passou de inexpressivas 225 toneladas em 2007 para 29,5 mil em 2011 (MPA, 2013).

Roberts (1993) observou o desaparecimento de adultos selvagens da Tailândia durante os anos 1980 e início de 1990. Indivíduos adultos ainda estão presentes no rio Chao Phraya em pequenas áreas protegidas perto de templos, mas o status da população fora destas áreas protegidas não é claro (Hogan, 2007). Vidthayanon e Hogan (2012) afirmam que na bacia do rio Chao Phraya a espécie agora só existe como populações de semi-cativeiro. A mesma também foi extinta no Mekong, Tailândia, devido à pesca excessiva de adultos. Mas esta espécie é cultivada em larga escala em toda a região. Baird *et al.* (2004).

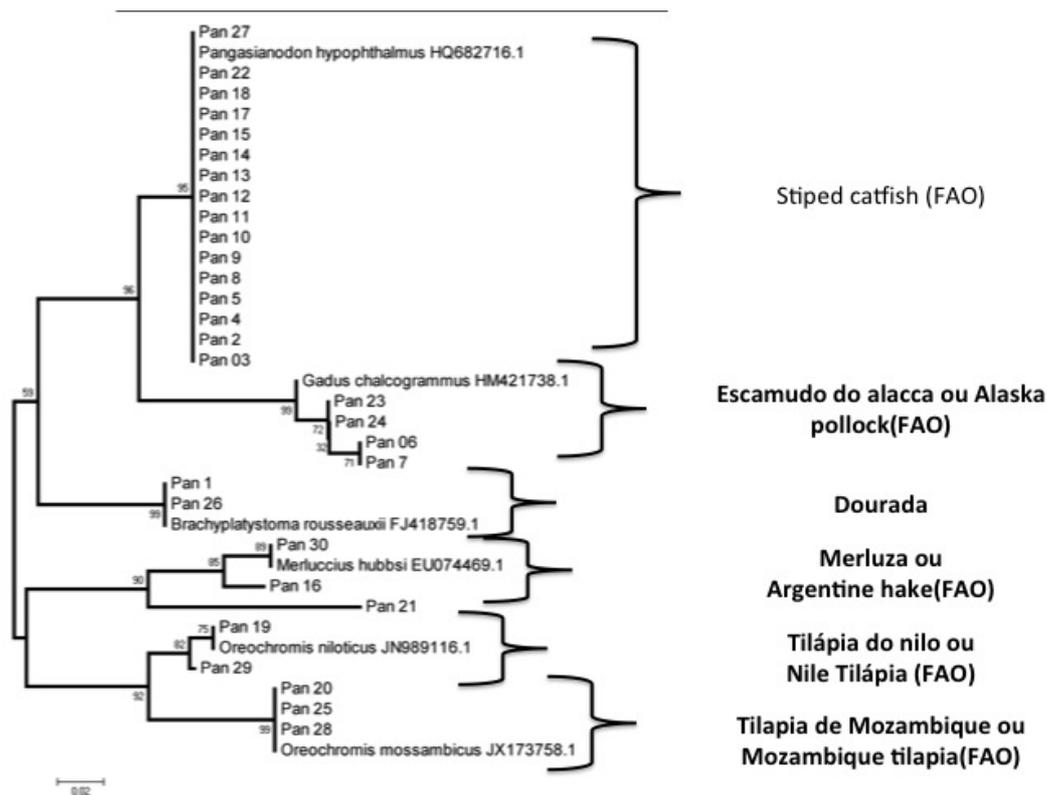


Figura 3: Árvore de haplótipos dos peixes comercializados como Panga.

Já o Salmão apresentou apenas 4% de substituição, correspondendo a duas amostras que foram identificadas como *Oncorhynchus mykiss* (Truta-arco-íris) (Figura 4).

O salmão (*Salmo salar*) é um peixe de alto valor comercial e seu comércio deve ser monitorado constantemente, já que fraudes, por parte dos comerciantes, podem ser facilmente realizadas colocando outra espécie, como a truta salmonada, que apresenta características morfológicas e sensoriais semelhantes às do salmão (Vallandro, 2010).

A truta salmonada, conhecida pelos pescadores como truta do arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) é nativa da região oeste da América do Norte, onde habita lagos, rios e riachos (McDowall e Tilzey, 1980). Segundo registros, é considerado o peixe mais introduzido no mundo, tendo sido detectado em 106 países e regiões, estando estabelecido na América do Norte (vários locais fora das áreas de origem), América Central, Caribe, América do Sul e Europa (Fishbase, 2012). Apresenta a coloração da carne muito semelhante à do salmão, no entanto, tem valor nutricional menor e um custo de produção significativamente menor quando comparado ao custo de produção salmão, que vive em águas salgadas enquanto a truta pode ser facilmente cultivada em tanques de piscicultura (Sosisnki, 2004).

O Brasil tem uma produção considerável de Truta por aquicultura continental, com 5.122,7 toneladas em 2010, sendo o sétimo peixe mais produzido ficando atrás da Tilápia

(155.450,8 t), Carpa (94.579,0 t), Tambaqui (54.313,1 t), Tambacu (21.621,4 t), Pacu (21.245,1 t), Curimatã (5.226,0 t). Mas a maior parte do pescado é advindo do Chile. O Brasil quintuplicou as importações de truta chilena nos últimos anos (MPA, 2010).

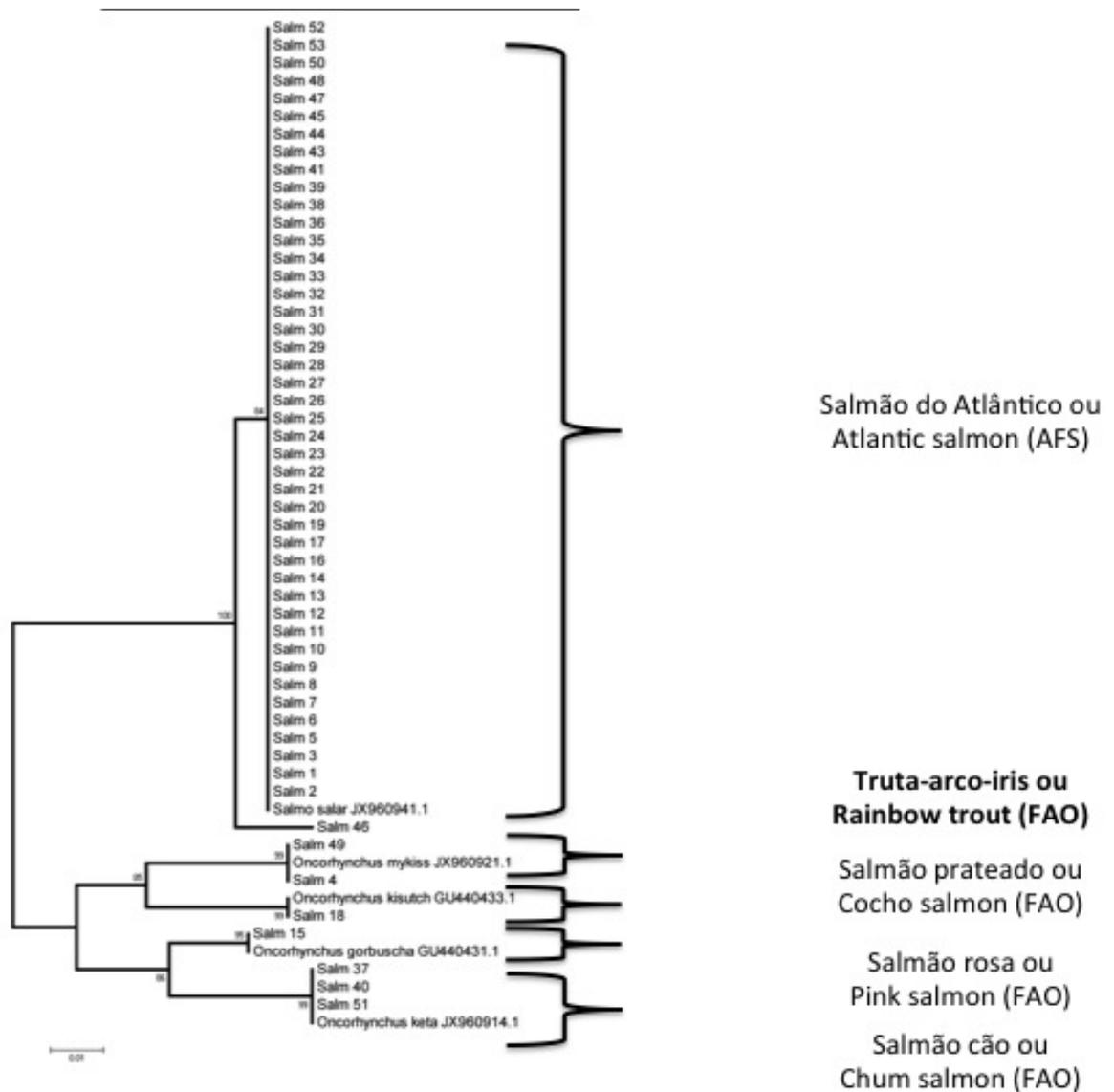


Figura 4: Árvore de haplótipos dos peixes comercializados como Salmão.

A Traíra, com somente uma amostra analisada, foi identificada como sendo Merluza, *Merluccius hubbsi* (Figura 5). Esta amostra foi obtida em um restaurante e estava na forma de ensopado. A carne estava misturada com outros ingredientes e em pedaços menores, o que confunde, ainda mais o consumidor.

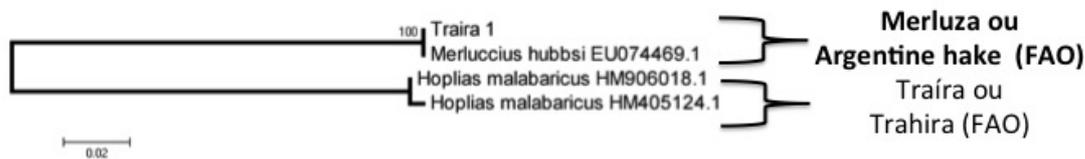


Figura 5: Árvore de haplótipos dos peixes comercializados como Traira.

Resultados semelhantes foram obtidos em análises de carne de várias espécies de peixes por vários autores (Baker, 2008; Wong e Hanner, 2008; Lowenstein *et al.*, 2009 e Lowenstein *et al.*, 2010; Cawthorn *et al.*, 2012).

No Brasil Carvalho *et al.*, (2011) já encontraram substituições em Surubins. Em filés, 42% eram do gênero *Pseudoplatystoma*, mas nenhuma delas sendo o *P. corruscans* (Surubim verdadeiro) e 58% eram de gêneros totalmente distintos, sendo até identificados peixes marinhos comercializados como surubim.

Este resultado de 26% de substituição é maior do que foi relatado para os frutos do mar norte-americanos e canadenses com 25% (Wong e Hanner, 2008). No entanto menor do que os produtos de pesca italianos com 32% de substituição (Filonzi *et al.*, 2010) e em pescado analisados em 21 estados norte-americanos com 33% de substituição (Warner *et al.*, 2013).

#### 4.3.2 Pescado onde não se observou substituições

Nas amostras de pescado e derivados de Atum, Cação, Caviar, Sardinha e Tilápia, não foram observadas substituições. Mesmo nos casos do Atum e Tilápia, onde observamos diversas espécies distintas, todas são consideradas válidas, correspondendo aos peixes pertencentes ao mesmo gênero, apenas de espécies distintas e comercialmente aceitas por seu nome popular. Ou seja, as espécies identificadas de Atum: *Thunnus albacares*, *T. atlanticus*, *T. obesus*, *T. Orientalis* podem ser rotuladas como Atum e *Oreochromis mossambicus*, *O. niloticus* e *O. aureus*, como Tilápia.

Várias espécies de atum são vendidas sob um mesmo nome popular. Seja ele enlatado, *in natura* ou já transformados em pratos prontos em restaurantes. Isto pode dificultar ao consumidor saber se está consumindo realmente a espécie que está no rótulo (quando rotulado). Muitos restaurantes ainda não conseguem explicar qual espécie está sendo

vendida (Lowenstein *et al.*, 2009, Viñas e Tudela, 2009). Entretanto, com a utilização apenas do gene COI não é possível identificar todas as espécies de atum (Viñas e Tudela, 2009). Uma solução para este problema, pode ser a utilização de outras sequencias em conjunto com a do gene COI, como no caso das plantas, que utilizam em conjunto os genes *rbcL* e *matK* (BOLD, 2013). Também a introdução de outras técnicas adicionais como mini-sequenciamento ou a análise por microssatélites pode contribuir para o aumento da precisão na identificação de espécies.

#### 4.3.3 Substituições correlacionadas com o processamento

Com base no modo de processamento do pescado, as amostras foram divididas em 3 grupos: Grupo 1 – amostras obtidas em restaurantes e lanchonetes, Grupo 2 – amostras obtidas no comercio varejista, Grupo 3 - amostras sem informação de origem.

No total foram analisadas 136 amostras do Grupo 1; 62 amostras do Grupo 2 e 14 amostras do Grupo 3, representando 64%, 29% e 7% respectivamente (Gráfico 2).

Em relação às substituições, podemos confirmar pelo teste estatístico de Qui-Quadrado com 99% de confiança, que o Grupo 2 (amostras obtidas no comercio varejista), apresenta uma maior porcentagem de substituições em comparação com os outros grupos (Gráfico 3).

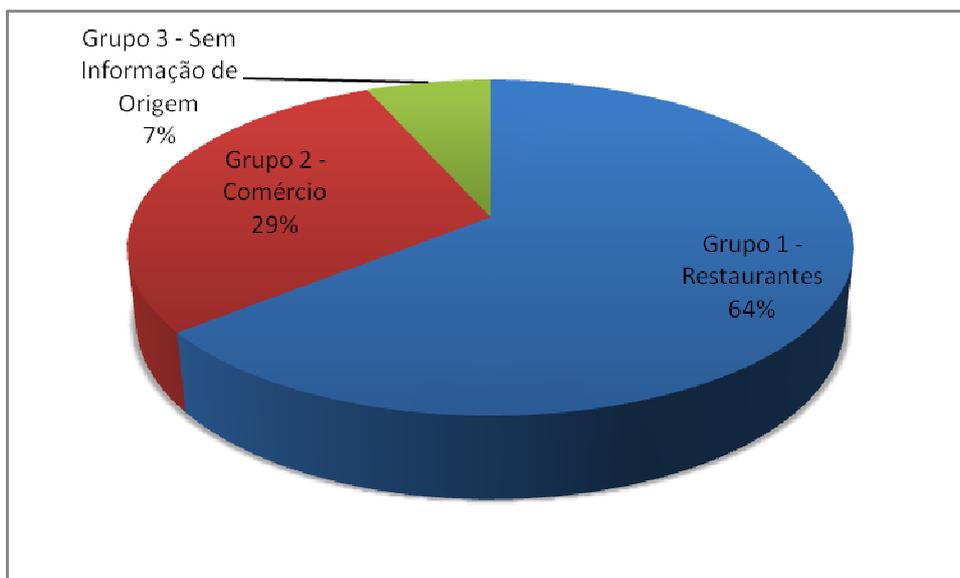


Gráfico 2 - Amostras analisadas por grupo.

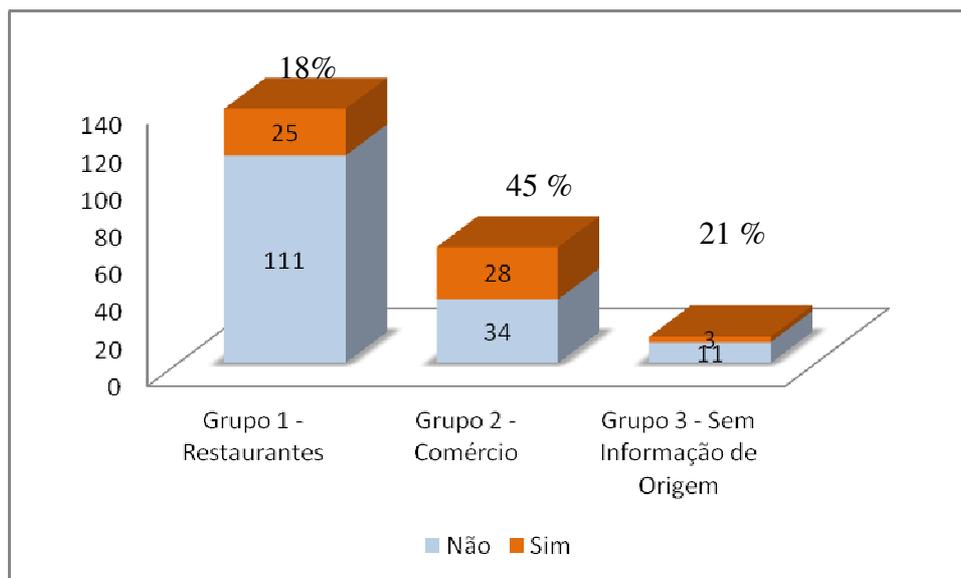


Gráfico 3 – Porcentagem de substituições por grupo.

#### 4.4 Amostras que não puderam ser analisadas por falta de identificação nos rótulos

Estas amostras foram colhidas com o propósito de identificar se eram mesmo de peixes, bem como para verificar a gama de peixes que eram utilizados como matéria prima destes produtos.

Das 47 amostras (Tabela 6) que não apresentavam os nomes dos peixes nos rótulos dos produtos, ou que não possuem legislações pertinentes que determinam quais peixes podem ser comercializados como sendo a matéria prima de tais produtos, 4 amostras eram comercializadas como Hambúrguer, 11 amostras como Kani, 2 amostras como Nuggets e 30 amostras como Peixe Branco.

Tabela 6. Amostras que não puderam ser analisadas quanto à substituição.

Pescado (como identificado no ato da aquisição)	Espécie Identificada (% média de similaridade com a sequência depositada no BOLD)	N	Nome Popular (FishBase)	Nome FAO (FishBase)	Substituição
<b>Hambúrguer</b>	<i>Merluccius hubbsi</i> - 100 %	2	Merluza	Argentine hake	Não Analisada
	<i>Merluccius gayi</i> - 100 %	2	Pescada-do-Chile	South Pacific hake	Não Analisada
<b>Nuggets</b>	<i>Merluccius hubbsi</i> - 100 %	2	Merluza	Argentine hake	Não Analisada
<b>Kani</b>	<i>Trachurus murphyi</i> - 99,91 %	2	Carapau-chileno	Chilean jack mackerel	Não Analisada
	<i>Micromesistius australi</i> - 100 %	7	--	Southern blue whiting	Não Analisada
	<i>Oreochromis niloticus</i> 97,18 %	2	Tilápia-do-nilo	Nile tilapia	Não Analisada
<b>Peixe Branco</b>	<i>Coryphaena hippurus</i> - 99,32 %	24	Dourado-do-mar	Common dolphinfish	Não Analisada
	<i>Oreochromis niloticus</i> - 99,72 %	5	Tilápia-do-nilo	Nile tilapia	Não Analisada
	<i>Oreochromis aureus</i> - 99,03 %	1	--	Blue tilapia	Não Analisada

Das amostras de Hambúrguer, 2 eram de produtos congelados comercializados em supermercados e 2 eram de restaurantes *FastFood*. As 2 amostras de *Nuggets* eram produtos congelados encontrados à venda em supermercados. Nenhuma delas especificavam que peixes eram utilizados, somente que eram produtos à base de peixe. Foram identificadas como tendo como matéria prima peixes do gênero *Merluccius*, a saber: *Merluccius hubbsi* (Merluza) e *Merluccius gayi* (Pescada do Chile).

O Kani é um surimi, termo japonês para carne de pescado desossada, triturada e lavada, a qual é utilizada como matéria prima para produção de uma série de imitações de frutos do mar (Mira e Lanfer-Marquez, 2005). O surimi apresenta praticamente as mesmas características nutricionais do pescado, o que, combinado com preços acessíveis, tem contribuído para o aumento no consumo mundial de produtos baseados no surimi (Martín-Sánchez *et al.*, 2009).

Foram colhidas 11 amostras comercializadas como Kani. Uma amostra era de um produto encontrado à venda em supermercado e as outras 10 foram obtidas de restaurantes. Foram identificadas três espécies como matéria prima. Duas amostras identificadas como *Tacurus murphyi* (Carapau Chileno), outras 2 sendo *Oreochromis niloticus* (Tilápia-do-Nilo). As 7 demais como *Micromesistius australis* (Merluza de Três Aletas).

Com o aumento do uso de surimi e a falta de identificação nos rótulos das espécies de peixes utilizadas no preparo do Kani, torna-se difícil para o consumidor saber ao certo qual o peixe realmente está consumindo.

Um exemplo disto pode ser comprovado no trabalho de Pepe *et al.* (2007), que utilizaram o gene *cty b* para fazer a identificação de 19 produtos comercializados na forma de surimi. Foram identificadas 8 espécies sendo que em 84% eram espécies diferentes da declarada no rótulo. Isto mostra a quantidade de espécies que são usadas para fazer a preparação destes produtos.

As amostras de Peixe Branco, assim denominadas por restaurantes de culinária japonesa e procedentes dos mesmos, foram identificadas como: *Coryphaena hippurus* (Dourado do Mar), *Oreochromis niloticus* (Tilápia do Nilo) e *Oreochromis aureus* (Blue tilápia).

Neste caso não existe nenhuma regulamentação quanto à espécie a ser utilizada para o preparo deste produto e nenhuma denominação de quais peixes poderiam ser chamados de "peixe branco".

A técnica de DNA *Barcoding* é bastante confiável para a identificação de espécies de pescado como já citado em vários trabalhos anteriormente, e a *U.S. Food and Drug*

*Administration* (FDA) utiliza-o como método padrão para suas análises como descrito por Hary *et al.* (2011).

O Brasil deveria adotar uma norma que obrigasse o produtor a especificar o pescado que está sendo usado na confecção dos produtos. Essa informação mais completa poderia evitar prejuízos econômicos e diminuir os riscos à saúde humana, como no caso de algumas alergias alimentares.

A adoção de uma lista válida de nomes comerciais e científicos para o pescado comercializado no Brasil é recomendada. A publicação da Portaria 52, 29/12/2000 do MAPA, que regula que somente serão denominadas como Bacalhau as espécies *Gadus morhua*, *Gadus macrocephalus* e *Gadus ogac*, é um começo. Mas uma lista de referência tornaria possível para órgãos reguladores/fiscalizadores do Brasil, detectarem e punirem fraudes e substituições na comercialização de produtos. Além disso, os serviços aduaneiros teriam a capacidade de regular e fiscalizar itens importados/exportados, para fins de tributação e para proteção ao consumidor. Outros itens importantes a serem considerados são: identificação do nome científico da espécie no rótulo dos produtos, que também está disposto na Portaria 52 e também a informação se o peixe é capturado na natureza, ou se é de piscicultura. Estas medidas tomadas pelo governo e órgãos reguladores, poderiam diminuir estas substituições e possíveis fraudes com o pescado comercializado no Brasil. Com isto teríamos produtos mais confiáveis e seguros para o consumo.

O teste de certificação de pescado poderia ser adotado por órgãos reguladores ou fiscalizadores como o MAPA (<http://www.agricultura.gov.br>), bem como por associações que atuam na defesa e no fortalecimento dos direitos dos consumidores brasileiros, tais como: PROTESTE, Associação Brasileira de Defesa do Consumidor (<http://www.proteste.org.br>), Movimento das Donas de Casa (<http://www.mdcmg.com.br>) e grandes redes de supermercados. Um exemplo foi a adoção, pela Associação Brasileira de Criadores de Búfalos do Brasil (<http://www.bufalo.com.br>), do selo de pureza criado para identificar produtos que façam o uso de somente leite de búfala na fabricação de seus produtos. Todos os produtos lácteos que desejam usar em suas embalagens este selo, devem passar por testes de DNA que comprovem sua autenticidade. Dessa forma o produto se torna mais confiável e tem um valor agregado maior (ABCB, 2012).

## 5. CONCLUSÕES

- A técnica de DNA Barcoding é uma ferramenta importante e útil na detecção de substituições em pescado.
- Os peixes com maiores evidências de substituições na região sudeste do Brasil foram: Merluza (70%), Bacalhau (63%) e Panga (43%).
- O número de fraudes encontradas mostra que o consumidor brasileiro está sendo economicamente lesado.

## REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABCB – Associação Brasileira de Criadores de Búfalos. *Mozzarella só de Búfala*. Disponível em: < <http://www.bufalo.com.br/mozzarellabufala/mozzarella.asp> > Acesso em: 01 jul. 2012.

AVISE, J.C., *Molecular Markers, Natural History and Evolution*, Chapman & Hall, New York, 1994.

AVISE, J. C. e WALKER, D. 1999 Species realities and numbers in sexual vertebrates: perspectives from an asexually transmitted genome. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **96**, 992–995.

BAIRD, I.G., FLAHERTY, M.S. e PHYLAVANH, B. Mekong River Pangasiidae catfish migrations and the Khone Falls wing trap fishery in southern Laos. *Natural History Bulletin of the Siam Society*. v.52, p. 81-109, 2004.

BAKER, C.S.; DALEBOUT, M.L.; LENTO, G.M.; et al. Gray whale products sold in commercial markets along the Pacific Coast of Japan. *Marine Mammal Science*. n. 18, p. 295–300, 2002.

BAKER, C.S; LUKOSCHEK, V.; LAVERY, S.; et al. Incomplete reporting of whale, dolphin and porpoise ‘bycatch’ revealed by molecular monitoring of Korean markets. *Animal Conservation*. n. 9, p.474 – 482, 2006.

BAKER; C.S. A truer measure of the market: the molecular ecology offisheries and wildlife trade. *Molecular Ecology*. 2008

BOLD – BARCODE OF LIFE DATABASE, Indetification. Disponível em: <[http://www.boldsystems.org/index.php/IDS\\_OpenIdEngine](http://www.boldsystems.org/index.php/IDS_OpenIdEngine)> Acesso em: 05 mar, 2013

CARVALHO, D.C; SEERIG, A; MELO, D. C.; et al. Identificação molecular de peixes: o caso do Surubim (*Pseudoplatystoma* spp.). *Rev Bras Reprod Anim*. v.32, n.4, p.215-219, 2008.

CARVALHO, D. C.; PIMENTA NETO, D. A.; BRASIL, B. S. A. F.; et al. DNA barcoding unveils a high rate of mislabeling in a commercial freshwater catfish from Brazil. *Mitochondrial DNA*. 2011.

CAWTHORN, D.M; STEINMAN, H.A.; WITTHUHN, R.C. DNA barcoding reveals a high incidence of fish species misrepresentation and substitution on the South African market. *Food Research International*, v. 46, n. 1, p. 30-40, 2012.

CEPAL - COMISSÃO ECONÔMICA PARA A AMÉRICA LATINA E O CARIBE, Acordo sobre a aplicação de medidas sanitárias e fitossanitárias: balanço de uma década buscando o equilíbrio entre a proteção do comércio e a proteção da saúde dos consumidores. Divisão de Comércio Internacional e Integração. 2005.

CHAMMAS, M. A. Status da Aquicultura no Mundo e no Brasil em Sergipe. 2007 Biblioteca on-line Disponível em: <<http://www.biblioteca.sebrae.com.br>> Acesso em: 08 jul. 2012.

CHAVEZ, D.;RIVEIRA, T.; QUINTO,J.; et.al. Combatendo o off-flavor na tilápia *Informe Empresarial*. Disponível em: <<http://www.panoramadaaquicultura.com.br/paginas/revistas/112/InformeInve112.asp> > Acesso em: 11 fev. 2012.

DECO, P. *Peixe panga sem químicos* Disponível em: <<http://www.deco.proteste.pt/alimentacao/seguranca-alimentar/testes-primeira-impressao/peixe-panga-sem-quimicos> > Acesso em: 11 ago. 2012

ENDO, T; HARAGUCHI, K; HOTTA, Y; et al. Total mercury, methyl mercury and selenium levels in the red meat of small cetaceans sold for human consumption in Japan. *Environmental Science and Technology*. n. 39, p. 5703–5708, 2005.

FAO. The state of world fisheries and aquaculture. *World review of fisheries and aquaculture* part 1, Rome, Fisheries Department. 2010.

FAO – Pesca e Departamento da Aquicultura, O Estado Mundial da Pesca e da Aquicultura - 2009 SOFIA. Disponível em :<<http://www.fao.org>> acesso em: 09 jul. 2012.

FILONZI, L; CHIESA, S; VAGHI, M; et al. Molecular barcoding reveals mislabelling of commercial fish products in Italy. *Food Research International*, V.43 p. 1383–1388, 2010.

FISHBASE 2012, Banco de Dados. Disponível em: <<http://www.fishbase.org/home.htm>> Acesso em 02 de junho, 2012.

FISH-BOL, Aquaculture Research Laboratory, Dr.Babasaheb Ambedkar Marathwada University receives Rs. 1.32 Crore (\$330,000) for DNA bar-coding project  
Disponível em: <<http://www.fishbol.org/news.php>>. Acessado em: 24 jan. 2012.

GIL, LA. PCR-based methods for fish and fishery products authentication. *Trends in Food Science and Technology*.n. 18, p. 558–566, 2007.

HANDY, S.M.; DEEDS, J.R.; IVANOVA, N.V.; 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*, v. 94, n. 1, p. 201-210, 2011.

HEBERT, P.D.N; CYWINSKA, A; BALL, SL; et al. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc R Soc B*. v.270, p.313-322, 2003.

HEBERT, P.D.N.; PENTON, E. H.; BURNS, J. M.; et al.. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrartes fulgerator*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. n.101, p. 14812-14817, 2004.

HOGAN, Z, BAIRD, I.G., RADTKE, R. et al. Long distance migration and marine habitation in the Asian catfish *Pangasius krempfi*. *Journal of Fish Biology*. v.71, p. 818-832, 2007.

HOGG, ID; HEBERT, PDN. Biological identification of springtails (Collembola: Hexapoda) from the Canadian Arctic, using mitochondrial DNA barcodes. *Can J Zool*. v.82, p.749-754, 2004.

HURST, GD; JIGGINS, FM. Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. *Proc Biol Sci*. v.272, p.1525-1534, 2005.

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

KERR, K. C. R.; STOECKLE, M. Y.; DOVE, C. J.; WEIGT, L. A.; FRANCIS, C. F. e HEBERT, P. D. N. Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds. *Mol. Ecol. Notes*, 7, 535-543., 2007

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*. v. 5, n. 2, p.150–163, 2004.

LOCKLEY, A. K; BARDSLEY, R. G. DNA-based methods for food authentication. *Trends in Food Science and Technology*. n. 11, p. 67–77, 2000.

LOVSHIN, L.L. Tilapia farming: a growing worldwide aquaculture industry. *Simpósio Sobre Manejo e Nutrição de Peixes*, v. 1, p. 137-164, 1997.

LOWENSTEIN, J.H.; AMATO, G.; KOLOKOTRONIS, S.O. The real maccoyii: Identifying Tuna Sushi with DNA Barcodes – Contrasting Characteristic Attributes and Genetic Distances. *PLoS ONE*. v.4, p.78-66, 2009.

LOWENSTEIN, J. H.; BURGER, J.; JEITNER, C. W.; et al.; Michael. DNA barcodes reveal species-specific mercury levels in tuna sushi that pose a health risk to consumers. *Biology Letters*. 2010.

MARKO, P.B.; LEE, S.C.; RICE, A.M.; et al. Fisheries: mislabelling of a depleted reef fish. *Nature*. n. 430, p. 309–310, 2004.

MARTÍN-SANCHEZ, A. M.; NAVARRO, C.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A.; KURI, V. Alternatives for efficient and sustainable production of surimi: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 8, p. 359-374, 2009.

MCDOWALL, R. M.; TILZEY, R. D. J. Family Salmonidae, salmon, trouts and chars. *Freshwater Fishes of South-eastern*. p. 72-78, 1980.

METCALF, JL; PRITCHARD, VL; SILVESTRI, SM; et al. Across the great divide: genetic forensics reveals misidentification of endangered cutthroat trout populations. *Mol Ecol*. v.16, p. 4445-4454, 2007.

MINISTÉRIO PÚBLICO DE SANTA CATARINA, 2010. Disponível em [http://www.mp.sc.gov.br/portal/site/portal/portal\\_imprensa.asp?campo=2569&conteudo=fixo\\_detalhe](http://www.mp.sc.gov.br/portal/site/portal/portal_imprensa.asp?campo=2569&conteudo=fixo_detalhe) Acesso em: 11 de março de 2012

MIRA, N. V. M.; LANFER-MARQUEZ, U. M. Avaliação da composição centesimal, aminoácidos e mercúrio contaminante no surimi. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. v. 25(4), p. 665-671, 2005.

NOGUEIRA, A.C.; RODRIGUES, T. Criação de tilápias em tanques-rede. *SEBRAE*, Salvador, 2007.

PEIXES SÃO FRANCISCO. Jornal Nacional. Rio de Janeiro: Rede Globo, 18 de outubro, 2010. Programa de TV

PEPE, T.; TROTTA, M.; DI MARCO, I.; et al. Fish Species Identification in Surimi-Based Products. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 55, n. 9, p. 3681-3685, 2007.

RATNASINGHAM, S.; HEBERT, P. D. N. BOLD: The barcode of life data system [www.barcodinglife.org](http://www.barcodinglife.org). *Molecular Ecology Notes*, n. 7, p. 355–364, 2007.

ROBERTS, T.R. Artisanal fisheries and fish ecology below the great waterfalls of the Mekong River in southern Laos. *The Natural History Bulletin of the Siam Society* 41: 31-62, 1993.

ROSS, H.A; LENTO, GM; DALEBOUT, ML; *et al.* DNA surveillance: web-based molecular identification of whales, dolphins and porpoises. *Journal of Heredity*. n. 94, p. 111–114, 2003

SEAP, Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca. Pescado Fresco. 2007. Disponível em: <[http://www.abrasnet.com.br/pdf/cartilha\\_pescado.pdf](http://www.abrasnet.com.br/pdf/cartilha_pescado.pdf)> Acesso em: 12 jul. 2012

SMITH, P.J.; MCVEAGH, S.M.; STEINKE, D. DNA barcoding for the identification of smoked fish products. *J Fish Biol.* v.72, p.464-471, 2008.

SOSISNKI, L. T. W. Introdução da truta arco-íris (*Oncorhynchus mikiss*) e suas consequências para a comunidade aquática dos rios de altitude do sul do Brasil. Porto Alegre: UFRGS, 254p. 2004

TAUTZ, D; ARCTANDER, P; MINELLI, A; et al. A plea for DNA taxonomy. *Trends in Ecology & Evolution*. n. 18, p. 70–74, 2003.

VALLANDRO, M.J. Avaliação da qualidade microbiológica de sashimis a base de salmão, preparados em restaurantes especializados em culinária japonesa na cidade de Porto Alegre-RS. 2010

VIDTHAYANON, C. & HOGAN, Z. 2011. *Pangasianodon hypophthalmus*. In: IUCN 2012. *IUCN Red List of Threatened Species*. Version 2012.2. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Acesso em 08 novembro 2012.

VIÑAS, J.; TUDELA, S. A Validated Methodology for Genetic Identification of Tuna Species (genus *Thunnus*). *PLoS ONE*.v.4, p.7606, 2009.

YANCY, H.F.; ZEMLAK, T.S.; MASON, J.A.; et al. Potential use of DNA barcodes in regulatory science: applications of the regulatory fish encyclopedia. *J Food Prot.* v.71, p.210-217, 2008.

WARD, R.D.; GREWE, P.M. Appraisal of molecular genetic techniques in fisheries. *Rev Fish Biol Fish.* v.4, p.300-325, 1994.

WARD, R.D.; ZEMLAK, T.S.; INNES, B.H.; et al. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*, v. 360(1462), p. 1847-1857, 2005.

WARNER, K.; WALKER TIMME, B.L.; HIRSHFIELD, M.. Oceana Study Reveals Seafood Fraud Nationwide. *Oceana. Retrieved*, v. 16, 2013.

WONG, E.H; HANNER, H.R. DNA barcoding detects market substitution in North American seafood. *Food Research International* 41:828–837, 2008.