

Sophia Cassol

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR POR DNA *BARCODING* DE
ESPÉCIES COMERCIALIZADAS EM CASQUINHAS DE SIRI
NO ESTADO DE SANTA CATARINA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito para
cumprimento da disciplina TCC II
(BIO7016) do currículo do Curso de
Graduação em Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Santa
Catarina

Orientadora: Prof^a. Dr^a.Andrea Rita
Marrero

Coorientadora: Leandra Formentão

Florianópolis
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária
da UFSC.

Cassol, Sophia

Identificação molecular por DNA barcoding de
espécies comercializadas em casquinhas de siri no
estado de Santa Catarina / Sophia Cassol ;
orientador, Andrea Rita Marrero, coorientador,
Leandra Formentão, 2018.

58 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de
Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas,
Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Genética. 3. DNA
barcoding. 4. Portunidae. 5. Callinectes. I.
Marrero, Andrea Rita. II. Formentão, Leandra. III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em
Ciências Biológicas. IV. Título.

Sophia Cassol

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR POR DNA *BARCODING* DE
ESPÉCIES COMERCIALIZADAS EM CASQUINHAS DE SIRI
NO ESTADO DE SANTA CATARINA**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para o cumprimento da disciplina TCCII (BIO7016) e aprovado em sua forma final pela Banca Examinadora.

Florianópolis, 27 de novembro de 2018.

Prof. Carlos Roberto Zanetti, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof.^a Andrea Rita Marrero, Dr.^a
Orientadora
Universidade Federal de Santa
Catarina

Leandra Formentão
Coorientadora

Josiane Ribolli, Dr.^a
Universidade Federal de Santa
Catarina

Mari Dalva Staffen, MSc.
Universidade Federal de Santa
Catarina

Clisten Fátima Staffen, MSc.
Universidade Federal de Santa
Catarina

Dedico este trabalho aos meus pais por me ajudarem a tornar este sonho em realidade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho. À Universidade Federal de Santa Catarina, instituição que eu tenho o maior orgulho de ter estudado nestes anos. Aos professores maravilhosos que tive durante a graduação com quem tanto aprendi. Aos servidores e funcionários terceirizados que possibilitam a manutenção de toda a estrutura necessária para o ensino, pesquisa e extensão da UFSC.

Agradeço aos membros da banca Josiane Ribolli, Mari Dalva Staffen e Clisten Fátima Staffen por terem aceitado o convite e por contribuírem com este trabalho.

Agradeço à minha orientadora Andrea pela oportunidade de participar do grupo de Evolução Molecular, por todos os ensinamentos, orientações e risadas durante estes anos.

À minha coorientadora Leandra faltariam palavras para agradecer por tudo. Sempre serei grata pela disponibilidade em me ajudar e por todos os momentos compartilhados, sejam eles de angústias ou de felicidade.

À toda equipe do LAPOGE por tantos aprendizados proporcionados. Em especial a Iara por todas as risadas, cafés e experimentos. À Mazza, Gabriel, Anna, Tâmela e Manu pela companhia no Congresso Internacional de Genética 2018, o qual eu nunca esquecerei.

À minha família que sempre acreditou em mim e que tanto me incentivou para a conclusão deste trabalho. Em especial à minha mãe, por ser minha maior incentivadora da vida. Ao meu pai, por todo o apoio e confiança depositados. Ao John, Oliver, Maya, Cléo, Filó, Miguel e Astolfo, meus filhos felinos e criaturinhas maravilhosas que estiveram comigo neste tempo, agradeço a eles por todo o carinho e amor, pela companhia e por sempre me darem tanta força. À minha irmã Clarissa, à minha sobrinha Rose, à tia Tânia, à tia Sandra e aos meus avós João e Nena por todo o carinho que sempre tiveram comigo.

Aos meus padrinhos Vânia e Alípio e também ao Andrey e à Hênella por estarem presentes na minha vida desde sempre.

Ao meu namorado e melhor amigo Gabriel por toda a paciência e conselhos nessa reta final. Obrigada por ser tão importante na minha vida, por sempre me incentivar e acreditar em mim, por todos os momentos maravilhosos que vivemos e ainda vamos viver juntos.

Também agradeço à Nádia, ao Marcelo e à Betina pelo carinho, pelo apoio e por fazerem parte dessa família que eu escolhi e que tanto amo.

Ao Fernando pela ajuda nas coletas, mas principalmente por todo o apoio e incentivo ao meu trabalho.

À todos da minha turma 14.1 e às outras pessoas maravilhosas que tive a oportunidade de conhecer na UFSC. Agradecimento especial para Vivian, Isis, Ane e Karen por serem companhias maravilhosas durante esses anos de graduação e que levarei pro resto da vida.

“Se um dia tiver que escolher entre o mundo e o amor, lembre-se: se escolher o mundo ficará sem o amor, mas se escolher o amor, com ele você conquistará o mundo.”

(Albert Einstein)

RESUMO

A família Portunidae abrange 307 espécies de animais conhecidos popularmente como “sirís” e é notável pelo seu grande potencial na pesca e aquicultura mundial. O estado de Santa Catarina apresenta a ocorrência de 13 espécies, sendo reconhecido o potencial pesqueiro do gênero *Callinectes*. Os sirís são comercializados individualmente sem os apêndices, apenas a carne ou o exoesqueleto vazio para a produção de “casquinhas de siri”. Por ser um alimento altamente processado, na hora do consumo a identificação das espécies utilizadas no preparo torna-se difícil, exigindo um método molecular para a identificação. O DNA *barcoding* é uma técnica que utiliza uma pequena sequência de DNA, geralmente o gene mitocondrial COI em animais, que permite a identificação da espécie, utilizando uma amostra, que pode ser comparada com um banco de dados. O objetivo desse estudo foi identificar as espécies presentes em casquinhas de siri comercializadas em Santa Catarina através do DNA *barcoding*. As amostras, obtidas em peixarias, foram fracionadas e armazenadas em *freezer* até o momento da extração do DNA. Após a extração, as amostras foram amplificadas por PCR seguindo dois protocolos, os quais diferem principalmente nas concentrações de dNTP, MgCl₂ e *primers*. Os produtos foram visualizados por eletroforese e seguiram para purificação e sequenciamento. As sequências obtidas foram comparadas com bancos de dados. Duas espécies de sirís foram identificadas em 19 das 20 amostras. Também foram analisadas amostras de mistura intencional de siri com duas espécies de peixe e duas espécies de outros invertebrados. Para estas amostras evidenciou-se a ineficácia da técnica de sequenciamento utilizada. Os rótulos das embalagens foram analisados e 80% não apresentou todas as informações necessárias previstas na legislação. Ainda são necessários mais estudos que empreguem outras técnicas para casquinhas de siri que contenham mistura de espécies e mais esforços para coleta de dados sobre a pesca e ações de conservação das espécies deste grupo.

Palavras-chave: *Callinectes*. COI. DNA barcode. Portunidae.

ABSTRACT

Portunidae family consists of 307 species of animals known as "swimming crabs" and is notable for its great potential in world fishery and aquaculture. Thirteen species have been described from the state of Santa Catarina and the genus *Callinectes* is recognized for its fishing potential. Swimming crabs are marketed individually without appendages, only meat or the empty exoskeleton for production of "stuffed swimming crab shells". Because it is a highly processed food, at the time of consumption the identification of the species used in the preparation becomes difficult, requiring a molecular method for identification. DNA barcoding is a technique that uses a small DNA sequence, usually the mitochondrial COI gene in animals, which allows the identification of species using a sample that can be compared to a database. The aim of this study was to identify the species in stuffed swimming crab shells marketed in Santa Catarina through DNA barcoding. The samples, obtained from fish markets, were fractionated and stored in freezer until the moment of DNA extraction. After extraction, the samples were amplified by PCR following two protocols, which differ in dNTP, MgCl₂ and primers concentrations. The products were visualized by electrophoresis and then were purified and sequenced. The sequences were compared to databases. Two species of swimming crabs were identified in 19 of the 20 samples. Intentional mixed samples of swimming crab with two species of fish and two species of other invertebrates were analyzed. For these samples the inefficacy of the sequencing technique was evidenced. Packaging labels were analyzed and 80% did not provide all the information required by the legislation. Other techniques for mixed samples analysis, efforts to collect data of the fishery and conservation actions for this group underscore the need for additional studies.

Keywords: *Callinectes*. COI. DNA barcode. Portunidae.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Indivíduo da espécie <i>Callinectes danae</i>	26
Figura 2 - Indivíduo da espécie <i>Callinectes sapidus</i>	26
Figura 3 - Indivíduo da espécie <i>Callinectes ornatus</i>	27
Figura 4 - Representação do genoma mitocondrial do siri <i>Charybdis feriata</i> . A seta evidencia o gene COI.	28
Figura 5 - Gel de qualificação do DNA extraído.....	40
Figura 6 - Gel de agarose mostrando a amplificação das amostras provenientes de casquinhas de siri utilizando as concentrações descritas por Abe (2007). CP = controle positivo	41
Figura 7 - Gel de agarose mostrando a amplificação das amostras provenientes de casquinhas de siri e de mistura intencional utilizando as concentrações da reação de PCR descritas por Evans e Paulay (2012) e <i>primers</i> descritos para invertebrados por Folmer e colaboradores (1994). CN = controle negativo.	41
Figura 8 - Gel de agarose mostrando a amplificação das amostras de mistura intencional utilizando as concentrações da reação de PCR descritas por Evans e Paulay (2012) e <i>primers</i> descritos para invertebrados por Folmer e colaboradores (1994). CP = controle positivo. CN = controle negativo.	42
Figura 9 - Gel de agarose mostrando a amplificação das amostras de mistura intencional utilizando as concentrações da reação de PCR descritas por Evans e Paulay (2012) e <i>primers</i> descritos para vertebrados por Miya e Nishida (2000) e Melo (2011). CP = controle positivo. CN = controle negativo.	43

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Locais de coleta e origem das amostras.	32
Quadro 2 – Espécies de siris que ocorrem em Santa Catarina. *: espécie exótica.	39
Quadro 3 – <i>Checklist</i> das informações obrigatórias previstas na Instrução Normativa N° 22 de 24 de novembro de 2005. O “X” representa que a informação está contida no rótulo e o hífen (-) representa que a informação não está contida.	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Proporções das amostras misturadas intencionalmente. A nomenclatura das amostras seguiu o critério “MI” = mistura intencional; 85S, 70S; 50S = porcentagem de siri, 15C = porcentagem de camarão na amostra; 15L = porcentagem de lula na amostra. Letra final “A” = mistura de siri com atum, letra final “O” = mistura de siri com olhete. 34

Tabela 2 – Soluções e respectivas concentrações da primeira reação de amplificação. 35

Tabela 3 – Soluções e respectivas concentrações da segunda reação de amplificação. 36

Tabela 4 – Espécies identificadas nas amostras provenientes de casquinhas de siri. A letra “C” indica que a amostra provém de casquinha de siri, os números se referem às dez diferentes marcas e as letras “A” e “B” se referem a fragmentos diferentes da mesma amostra. 44

Tabela 5 – Espécies identificadas nas amostras de mistura intencional. Amostras com final A = mistura de siri (*Callinectes sapidus*) e atum (*Thunnus obesus*). Amostras com final O = mistura de siri (*Callinectes sapidus*) e olhete (*Seriola lalandi*). Amostra com final C = mistura de siri (*Callinectes sapidus*) e camarão (*Pleoticus muelleri*). Amostra com final L = mistura de siri (*Callinectes sapidus*) e lula (*Dosidicus gigas*). 45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BOLD - *Barcode of Life Database*
CN - Controle Negativo
CP - Controle Positivo
COI - Citocromo C Oxidase I
DNA - Ácido desoxirribonucleico (do inglês, *deoxyribonucleic acid*)
EDTA - Ácido etilendiamino tetra-acético (do inglês, *ethylenediamine tetraacetic acid*)
Exo - Exonuclease I
FDA - *Food and Drug Administration*
HCl – Ácido clorídrico
IUCN - União Internacional para Conservação da Natureza (do inglês, *International Union for Conservation of Nature*)
LAMEB - Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia
MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
M - Molar
mg - Miligrama
MgCl₂ - Cloreto de Magnésio
mL - Mililitro
mM - Milimolar
NaCl – Cloreto de Sódio
ng - Nanograma
NGS – Sequenciamento de Nova Geração (do inglês, *Next Generation Sequencing*)
pb - Pares de base
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*)
pH - Potencial Hidrogeniônico
rpm - Rotações por minuto
R\$ - Reais
SAP - *Shrimp Alkaline Phosphatase*
SC - Santa Catarina
SDS - Dodecil Sulfato de Sódio (do inglês, *Sodium Dodecyl Sulfate*)
SUDEPE - Superintendência do Desenvolvimento da Pesca
TBE - Tris/Borato/EDTA
U - Unidade
UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina
UV - Ultravioleta
V - Volts
X - Vezes

μL - Microlitro
 μM - Micromolar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	OBJETIVOS	30
2.1	Objetivo geral.....	30
2.2	Objetivos específicos	30
3	MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1	Levantamento de espécies.....	31
3.2	Coleta e processamento das amostras	31
3.3	Extração e dosagem de DNA	32
3.4	Amostras de mistura intencional	33
3.5	Amplificação dos fragmentos de DNA das amostras provenientes de casquinhas de siri	34
3.6	Amplificação dos fragmentos de DNA das amostras de mistura intencional	36
3.7	Purificação das amostras amplificadas.....	37
3.8	Sequenciamento das amostras.....	37
3.9	Análise das sequências	38
4	RESULTADOS	39
4.1	Levantamento de espécies.....	39
4.2	Amplificação das amostras	40
4.3	Análise das sequências	43
4.4	Análise dos rótulos.....	45
5	DISCUSSÃO	47
5.1	Amplificação das amostras.....	47
5.2	Análise das sequências.....	47
5.3	Levantamento de espécies.....	49
5.4	Análise dos rótulos.....	51
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	52
7	REFERÊNCIAS	53

1 INTRODUÇÃO

A família Portunidae abrange 307 espécies de animais conhecidos popularmente como “sirís” e é notável pelo seu grande potencial na pesca e aquicultura mundial (IGARASHI, 2009; SEVERINO-RODRIGUES; PITA; GRAÇA-LOPES, 2001). A principal característica que distingue os portunídeos dos demais caranguejos é o achatamento dorso-ventral do último artícuo do quinto par de pereiópodos, o que lhes confere forma hidrodinâmica que possibilita a natação ou rápido deslocamento na coluna d’água (PINHEIRO et al., 2016). No Brasil, foram registradas 21 espécies desta família (MANTELATTO; DIAS, 1999) e dessas, 13 ocorrem no estado de Santa Catarina (BOOS et al., 2012), sendo reconhecido o potencial pesqueiro do gênero *Callinectes*, que pode ser alvo direto da pesca ou capturado como fauna acompanhante na pesca do camarão (PINHEIRO et al., 2016).

A região sul do Brasil é caracterizada pela presença de três espécies abundantes de portunídeos: *Callinectes danae* Smith, 1869 (Figura 1), *Callinectes sapidus* Rathbun, 1866 (Figura 2) e *Callinectes ornatus* Ordway, 1863 (Figura 3), além de outras duas espécies menos abundantes, *Callinectes bocourti* A. Milne-Edwards, 1879 e *Callinectes exasperatus* Gerstaecker, 1856 (MELO, 1996 apud PEREIRA et al., 2009). A bibliografia referente às espécies desse gênero é extremamente rica e aborda diferentes aspectos da biologia, ecologia e pesca desse grupo, principalmente da espécie *C. sapidus* (SEVERINO-RODRIGUES; PITA; GRAÇA-LOPES, 2001) .

A captura do *C. sapidus*, conhecido popularmente como siri-azul, é predominantemente praticada de forma artesanal, constituindo uma importante fonte de renda para famílias de pescadores de todo o litoral brasileiro (SEVERINO-RODRIGUES; PITA; GRAÇA-LOPES, 2001). Os sirís são comercializados individualmente sem os apêndices, somente o filé, ou apenas o cefalotórax e o seu valor comercial varia de R\$ 18,00 a R\$ 20,00 por quilograma. Além disso, o exoesqueleto vazio também é comercializado para a produção de pratos conhecidos como “casquinha de siri” no valor de R\$ 0,50 a unidade (RODRIGUES; BATISTA-LEITE, 2015).

Figura 1 - Indivíduo da espécie *Callinectes danae*



Fonte: (OGATA, s. d.).

Figura 2 - Indivíduo da espécie *Callinectes sapidus*.



Fonte: (RADOSTA, 2016).

Figura 3 - Indivíduo da espécie *Callinectes ornatus*.



Fonte: (PAULAY; ANKER, s. d.)

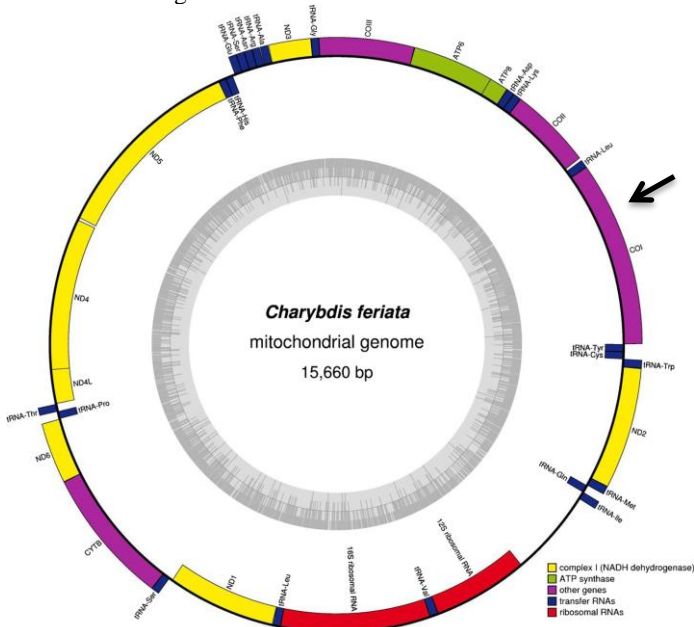
A casquinha de siri é um prato tradicional da cozinha popular brasileira bastante consumido em regiões litorâneas e consiste basicamente na carne de siri refogada com outros ingredientes e servida na própria carapaça. Por ser um alimento altamente processado, na hora do consumo a identificação das espécies utilizadas no preparo torna-se praticamente impossível.

As espécies de frutos do mar consumidas geralmente são identificadas de acordo com a área de origem e com o auxílio de taxonomistas que se baseiam em características morfológicas. No entanto, o aumento pela demanda de frutos do mar e a globalização do mercado tornou mais difícil o controle dos sistemas de produção pesqueiros (GALIMBERTI et al., 2013). Além disso, a identificação de espécies através de características morfológicas nem sempre pode ser realizada com facilidade, pois muitas vezes as espécies podem ser morfológicamente similares ou vendidas altamente processadas. Outra dificuldade na identificação deve-se ao fato de um mesmo nome popular ser utilizado para mais de uma espécie (BARBUTO et al., 2010). Portanto, surge a necessidade de outro método que possibilite a identificação correta das espécies consumidas.

A técnica DNA *barcoding*, proposta por Hebert e colaboradores (2003), surgiu para auxiliar na resolução deste problema. Em teoria, utilizando um pequeno pedaço de tecido de qualquer organismo seria possível identificá-lo a nível de espécie de forma rápida e eficaz. O “DNA *barcode*” trata-se de uma pequena sequência de DNA de uma

parte do genoma que permite a identificação das espécies através da comparação de sua sequência com outras previamente depositadas em bancos de dados. Normalmente, é utilizada a primeira porção do gene mitocondrial Citocromo C Oxidase I (COI), representado na Figura 4.

Figura 4 - Representação do genoma mitocondrial do siri *Charybdis feriata*. A seta evidencia o gene COI.



Fonte: adaptado de Ma e colaboradores (2015).

Sabe-se que o DNA mitocondrial possui alta taxa evolutiva em metazoários quando comparado com o genoma nuclear (LYNCH; KOSKELLA; SCHAACK, 2006). O gene COI apresenta pouca variação em indivíduos da mesma espécie e grande variação entre indivíduos de espécies diferentes, sendo considerado um bom marcador para a identificação molecular (HEBERT et al., 2003). No entanto, a taxa evolutiva do genoma mitocondrial em protistas, plantas e fungos é muito menor, evidenciando a necessidade de outros marcadores moleculares para a identificação de espécies destes grupos (LYNCH; KOSKELLA; SCHAACK, 2006).

O DNA *barcoding* sendo uma ferramenta de pesquisa para taxonomistas permite identificar um organismo em todos os seus

estágios de vida e inclusive em espécies monoicas, espécies crípticas (HEBERT et al., 2004), amostras danificadas e fezes. Essa técnica também é utilizada para testar a identidade e a pureza de produtos biológicos como medicamentos fitoterápicos, suplementos dietéticos e frutos do mar (KRESS; ERICKSON, 2012). No Brasil, o MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) implementou o DNA *barcoding* como metodologia para regulação da cadeia de produtos pesqueiros (CARVALHO et al., 2017), a exemplo de outros países. O FDA (*Food and Drug Administration*), órgão estadunidense responsável por controlar os alimentos e medicamentos, também adotou essa metodologia (HANDY et al., 2011).

Nos Estados Unidos foi verificada a substituição de espécies em um estudo realizado com bolinhos de siri de Maryland, um prato típico que deveria conter apenas *C. sapidus* produzidos na região da baía de Chesapeake, mas que na verdade mostrou conter outras oito espécies de siri oriundas da Ásia, Oceania e da costa do México (WARNER et al., 2015).

Em Santa Catarina, estudos identificaram peixes após sofrerem processamento culinário (CARVALHO et al., 2014) e invertebrados marinhos processados (BECKER, 2018). No entanto, até o momento não existem dados de identificação das espécies comercializadas em casquinhas de siri. Sendo assim, surge a necessidade de avaliar a eficácia do DNA *barcoding* na identificação de espécies consumidas neste tipo de processamento. A hipótese é que as casquinhas de siri comercializadas no estado de Santa Catarina contenham apenas espécies de siri.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Identificar a(s) espécie(s) presente(s) em casquinhas de siri comercializadas no estado de Santa Catarina, através da técnica de DNA *barcoding*.

2.2 Objetivos específicos

- ↳ Levantar as espécies da família Portunidae que têm sua ocorrência registrada no estado de Santa Catarina;
- ↳ Verificar se os rótulos das casquinhas de siri estão de acordo com a legislação vigente, possuindo as informações obrigatórias previstas;
- ↳ Identificar as espécies contidas nas casquinhas de siri, comparando as sequências obtidas com sequências depositadas nos bancos de dados *BOLD Systems* e *BLAST GenBank*;
- ↳ Analisar a eficiência do gene Citocromo Oxidase I (COI) como marcador molecular para identificação das espécies encontradas nas casquinhas de siri;
- ↳ Analisar o potencial das técnicas moleculares empregadas (PCR e sequenciamento de Sanger) na identificação de amostras que contenham mistura de espécies.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Levantamento de espécies

Foi realizado um levantamento das espécies da família Portunidae que possuem ocorrência registrada no estado de Santa Catarina, local deste estudo, baseando-se nas espécies descritas no livro “Vida Marinha de Santa Catarina” de Lindner (2014) e no artigo de revisão de Boos e colaboradores (2012), que faz um compilado dos dados de publicações e coleções dos crustáceos de Santa Catarina.

3.2 Coleta e processamento das amostras

As amostras foram coletadas em peixarias do litoral de Santa Catarina durante os meses de outubro de 2017 a agosto de 2018, como descrito no Quadro 1, cujos dados foram obtidos segundo as informações contidas nos rótulos das embalagens. Quando este dado não estava fornecido no rótulo, foi questionado no momento da compra qual a origem da amostra. Os rótulos foram analisados de acordo com a Instrução Normativa N° 22 de 24 de novembro de 2005, que aprova o regulamento técnico para a rotulagem de produtos de origem animal embalados (BRASIL, 2005). Foram verificadas as seguintes informações obrigatórias previstas: 1. denominação do produto (nome de venda), 2. lista de ingredientes, 3. conteúdos líquidos, 4. identificação da origem, 5. nome ou razão social e endereço do estabelecimento, 6. conservação do produto, 7. marca comercial do produto, 8. identificação do lote, 9. data de fabricação, 10. prazo de validade.

As 20 amostras são provenientes de 10 bandejas de casquinhas de siri congeladas, de marcas diferentes, as quais continham de seis a oito casquinhas por bandeja. Para o processamento do material biológico foi escolhida aleatoriamente uma casquinha em cada bandeja e após o seu descongelamento, foram retirados dois fragmentos de aproximadamente 1cm³ de tecido animal considerados morfologicamente diferentes a olho nu, denominados “A” e “B”. Esses fragmentos foram retirados da casquinha com o auxílio de tesoura e pinça de metal desinfetadas com álcool 70% após a manipulação de cada amostra e colocados em microtubos de 1,5 mL para serem armazenados em *freezer* a -20°C.

Quadro 1 – Locais de coleta e origem das amostras. A letra “C” é referente a amostra ser proveniente de casquinha de siri. A numeração de 1 a 10 segue a ordem de coleta. As letras “A” e “B” são referentes aos dois fragmentos retirados de cada casquinha.

Peixaria	Amostras coletadas	Amostras geradas	Local de coleta	Local de produção
Peixaria 1	Casquinha 1	C1 A, C1 B	Florianópolis – SC	São José – SC
Peixaria 2	Casquinha 2	C2 A, C2 B	Laguna – SC	Laguna – SC
Peixaria 3	Casquinha 3	C3 A, C3 B	Laguna – SC	Laguna – SC
Peixaria 4	Casquinha 4	C4 A, C4 B	Laguna – SC	Laguna – SC
Peixaria 5	Casquinha 5	C5 A, C5 B	Laguna – SC	Imaruí – SC
Peixaria 6	Casquinha 6	C6 A, C6 B	Florianópolis – SC	Florianópolis – SC
Peixaria 7	Casquinha 7	C7 A, C7 B	Balneário Camboriú – SC	Balneário Camboriú – SC
Peixaria 8	Casquinha 8	C8 A, C8 B	Balneário Camboriú – SC	Balneário Camboriú – SC
Peixaria 9	Casquinha 9	C9 A, C9 B	Balneário Camboriú – SC	Palhoça – SC
Peixaria 10	Casquinha 10	C10 A, C10 B	Itajaí – SC	Penha – SC

Fonte: Elaborado pela autora.

3.3 Extração e dosagem de DNA

A extração de DNA foi realizada segundo o protocolo descrito por Aljanabi e Martinez (1997) com modificações realizadas por Scaranto (2017). Em microtubos de 1,5 mL foram colocados de 50 a 100 mg de cada amostra e adicionados 400 µL de tampão de lise (0,4M NaCl, 10mM Tris-HCl pH 8,0 e 2mM EDTA pH 8,0). Em seguida, as amostras foram colocadas no vórtex por 30 segundos e foram adicionados 40 µL de SDS a 20% e 5 µL de proteinase K a 20 mg/mL. Novamente as amostras foram vortexadas e logo após incubadas a 60°C *overnight* em um banho maria (Centauro).

Após o período de incubação, foram adicionados 300 µL de NaCl 6M e as amostras foram invertidas na mão durante 3 minutos. Em seguida, foram centrifugadas por 30 minutos a 13000rpm na centrífuga 5415 D (Eppendorf). Cerca de 500 a 600 µL do sobrenadante foram transferidos para um microtubo novo de 1,5 mL e foi adicionada uma alíquota igual (500-600 µL) de isopropanol gelado. Os tubos foram virados suavemente 5 vezes, quando foi possível a visualização de um aglutinamento precipitado. As amostras foram colocadas em *freezer* a -20°C por 1 hora e logo após foram centrifugadas por 15 minutos a 13000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o microtubo invertido cuidadosamente para não perder o *pellet*.

Em seguida, foram adicionados 200 µL de etanol 70% e esperou-se 5 minutos para centrifugar novamente a 13000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado, adicionado 200 µL de etanol 100% e centrifugado por 13000 rpm durante 15 minutos. Após a centrifugação,

o sobrenadante foi descartado e os microtubos foram deixados com a tampa aberta e deitados em papel toalha em temperatura ambiente até o *pellet* secar. Depois de seco, o mesmo foi eluído com 90 μL de água Milli-Q®. As amostras foram incubadas a 37°C por uma hora.

A concentração do DNA extraído e a pureza das amostras foram medidas por espectrofotometria no aparelho NanoVue™ (GE Healthcare Life Sciences). Para verificar a qualidade do DNA extraído, as amostras passaram por uma corrida eletroforética a 90V durante 50 minutos em gel de agarose 1%, onde foram utilizados 2 μL de DNA, 0,3 μL de GelRed© (Biotium) e 0,3 μL de solução carreadora (azul de bromofenol). Em seguida as amostras foram diluídas com água Milli-Q® para concentração final de 20 ng/ μL de DNA.

3.4 Amostras de mistura intencional

Além das amostras obtidas das casquinhas de siri, foram utilizadas amostras contendo espécies diferentes misturadas intencionalmente para avaliar o potencial de identificação de espécies em amostras com mistura.

Foram feitas misturas de siri (*Callinectes sapidus*) com duas espécies de vertebrados: atum (*Thunnus obesus*) e olhete (*Seriola lalandi*) em três proporções diferentes e misturas de siri (*Callinectes sapidus*) com outras duas espécies de invertebrados: camarão (*Pleoticus muelleri*) e lula (*Dosidicus gigas*) em uma proporção. As amostras das espécies utilizadas na mistura já tinham sido previamente identificadas por DNA *barcoding* (BECKER, 2018; STAFFEN, 2015)

Nas misturas foi utilizado DNA extraído na concentração de 20 ng/ μL , as proporções foram calculadas considerando um volume final de 20 μL e encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 – Proporções das amostras misturadas intencionalmente. A nomenclatura das amostras seguiu o critério “MI” = mistura intencional; 85S, 70S; 50S = porcentagem de siri, 15C = porcentagem de camarão na amostra; 15L = porcentagem de lula na amostra. Letra final “A” = mistura de siri com atum, letra final “O” = mistura de siri com olhete.

Misturas com vertebrados		
Amostra gerada	Porcentagem de <i>Callinectes sapidus</i>	Porcentagem de <i>Thunnus obesus</i>
MI 85S A	85% 17 µL	15% 3 µL
MI 70S A	70% 14 µL	30% 6 µL
MI 50S A	50% 10 µL	50% 10 µL
Amostra gerada	Porcentagem de <i>Callinectes sapidus</i>	Porcentagem de <i>Seriola lalandi</i>
MI 85S O	85% 17 µL	15% 3 µL
MI 70S O	70% 14 µL	30% 6 µL
MI 50S O	50% 10 µL	50% 10 µL
Misturas com outros invertebrados		
Amostra gerada	Porcentagem de <i>Callinectes sapidus</i>	Porcentagem de <i>Pleoticus muelleri</i>
MI 15 C	85% 17 µL	15% 3 µL
Amostra gerada	Porcentagem de <i>Callinectes sapidus</i>	Porcentagem de <i>Dosidicus gigas</i>
MI 15 L	85% 17 µL	15% 3 µL

Fonte: Elaborado pela autora.

As amostras de mistura intencional seguiram etapas similares às amostras provenientes das casquinhas de siri.

3.5 Amplificação dos fragmentos de DNA das amostras provenientes de casquinhas de siri

A amplificação de sequências-alvo específicas do gene mitocondrial Citocromo Oxidase I foi realizada pela técnica PCR (do inglês *Polymerase Chain Reaction*) utilizando o conjunto de *primers* descritos por Folmer et. al (1994): LCO1490 5' GGTCAAACAAATCATAAAGATATTGG 3' e HCO2198 5' TAAATTTCAGGGTGACCAAAAAATCA 3'.

A reação de amplificação foi realizada no SimpliAmp™ Thermal Cycler (Applied Biosystems) utilizando 4 µL de DNA genômico de cada amostra, com o volume final de 25 µL. Os volumes e as concentrações das demais soluções estão na Tabela 2, conforme descrito por Abe (2007).

As amostras foram amplificadas de acordo com as condições descritas por Chiachio (2009) com temperatura de hibridização definida por Eischeid et al. (2016): desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, hibridização a 50°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 2 minutos e passo final de extensão a 72°C durante 5 minutos.

Tabela 2 – Soluções e respectivas concentrações da primeira reação de amplificação.

Solução	Concentração	Volume	Concentração final
H ₂ O Milli-Q®	-	16,4 µL	-
Tampão (Invitrogen™)	10X	2,5 µL	1X
dNTP (Invitrogen™)	10mM	0,5 µL	0,2mM
MgCl ₂ (Invitrogen™)	50mM	0,5 µL	1mM
Primer F - LCO1490 (IDT)	10µM	0,5 µL	0,2µM
Primer R - HCO2198 (IDT)	10µM	0,5 µL	0,2µM
Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific™)	5U/µL	0,1 µL	0,5U
DNA	20ng/µL	4 µL	3,2ng
Volume final		25 µL	

Fonte: adaptado de Abe (2007).

Os produtos da reação de amplificação foram visualizados em gel de agarose 1%. As corridas eletroforéticas ocorreram a 90V durante 50 minutos, utilizando tampão TBE na concentração 0,5X. Foi utilizado 1 µL de cada produto de amplificação, corado com 3 µL de GelRed® e solução carreadora. Em todas as corridas foram utilizados controles positivos baseados em um marcador de peso molecular de 100pb para servir de comparação com o tamanho dos fragmentos de interesse (650pb) e controles negativos para verificar a não-contaminação dos reagentes e garantir o sucesso da PCR. Os géis foram expostos à luz UV e analisados e fotografados com o *software* GelCapture e fotodocumentador MiniBIS Pro (DNR Bio-Imaging Systems).

Em algumas amostras, mesmo após repetidas reações, não foi possível obter a sua amplificação. Assim, foi realizada uma nova reação

de amplificação com as concentrações das soluções conforme descrito por Evans e Paulay (2012) e mostrado na Tabela 3, com modificações na concentração de DNA.

Tabela 3 – Soluções e respectivas concentrações da segunda reação de amplificação.

Solução	Concentração	Volume	Concentração final
H ₂ O Milli-Q®	-	16,5 µL	-
Tampão (Invitrogen™)	10X	2,5 µL	1X
dNTP (Invitrogen™)	10mM	0,125 µL	0,05mM
MgCl ₂ (Invitrogen™)	50mM	1,25 µL	2,5mM
Primer F - LCO1490 (IDT)	10µM	0,25 µL	0,1µM
Primer R - HCO2198 (IDT)	10µM	0,25 µL	0,1µM
Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific™)	5U/µL	0,125 µL	0,625U
DNA	20ng/µL	4 µL	3,2ng
Volume final		25 µL	

Fonte: adaptado de Evans e Paulay (2012).

Novamente, os produtos da reação foram visualizados e analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, seguindo os passos descritos anteriormente.

3.6 Amplificação dos fragmentos de DNA das amostras de mistura intencional

Para as amostras de mistura intencional, foram utilizadas as concentrações da segunda reação de amplificação mostrada na Tabela 3 em dois testes diferentes. No primeiro teste, foram utilizados os *primers* descritos anteriormente para invertebrados por Folmer e colaboradores (1994), seguindo as mesmas condições da reação descrita para as amostras provenientes de casquinhas de siri.

No segundo teste, foram utilizados *primers* para amplificação de fragmentos do gene COI em vertebrados: L5698-Asn F AGG CCT CGA TCC TAC AAA GKT TTA GTT AAC (MIYA; NISHIDA, 2000) e H7271-COI R 5' GTG GTG GGC TCA TAC AAT AAA 3' (MELO et al., 2011). As condições da reação de amplificação mantiveram-se as mesmas em relação ao primeiro teste, com exceção da temperatura de hibridização que foi 56°C. Os produtos da reação dos dois testes foram visualizados e analisados por eletroforese em gel de agarose 1%,

segundo os passos descritos no item anterior. As amostras do segundo teste não seguiram os próximos passos de purificação e sequenciamento.

3.7 Purificação das amostras amplificadas

Os produtos amplificados foram purificados com o auxílio da enzima ExoSAP-IT™ PCR *Product Cleanup Reagent* (USB Corporation), a qual hidrolisa o excesso de *primers* e nucleotídeos da reação de PCR. Em microtubos de 0,2 µL foi adicionado 0,5 µL de Exo; 0,5 µL de SAP e 9 µL do produto de PCR. Uma rotação rápida foi dada nos tubos em uma microcentrífuga e logo após, as amostras foram colocadas no termociclador *Thermal Cycler Veriti 96 Well* (Applied Biosystems®) seguindo o programa: 37°C por 60 minutos e 75°C por 15 minutos. Os produtos de purificação foram analisados em gel de agarose 1% submetido à corrida eletroforética de 90V por 30 minutos, utilizando 2 µL de produto amplificado; 0,3 µL de GelRed® e 0,3 µL de solução carreadora. Após a corrida, o gel foi submetido à luz UV para visualização do fragmento amplificado e purificado. O gel foi fotografado com o *software* GelCapture e fotodocumentador MiniBIS Pro (DNR Bio-Imaging Systems).

3.8 Sequenciamento das amostras

O sequenciamento das amostras foi realizado no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia da Universidade Federal de Santa Catarina (LAMEB/UFSC) pela profissional responsável pelo equipamento. Para cada reação de PCR para sequenciamento, foi utilizado 1,0 µL de *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems®); 1,5 µL de tampão *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems®), 1,0 µL do *primer* LCO1490 a 10µM, 10 µL de água milliQ e 6,5 µL de produto da PCR inicial que foram aplicados em microplaca para PCR, a qual foi selada com filme de vedação e levada ao termociclador (*Thermal Cycler, Veriti 96 Well, Applied Biosystems®*), seguindo o programa: 96 °C por 1 minuto; 35 ciclos de 96°C por 15 segundos, 50°C por 15 segundos, 60°C por 4 minutos e etapa final a 15°C por tempo infinito.

Para a precipitação do DNA foram adicionados 2,5 µL de EDTA 125mM e 25 µL de etanol absoluto nas amostras. A microplaca foi selada e homogeneizada por inversão quatro vezes e logo após, centrifugada a 4000 rpm por 45 minutos. O sobrenadante foi descartado

e 150 µL de etanol 70% foram adicionados. A microplaca foi novamente centrifugada por 15 minutos a 4000 rpm e o sobrenadante descartado. As amostras seguiram para sequenciamento após a evaporação completa do álcool.

As sequências das amostras amplificadas foram obtidas através da técnica de sequenciamento por capilaridade no sequenciador ABI3500 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems®).

3.9 Análise das sequências

Os eletroferogramas foram visualizados no software Chromas 2.6.5, analisados manualmente e as sequências foram exportadas em formato FASTA e comparadas com sequências depositadas nos bancos de dados *on-line BOLD Systems* (www.boldsystems.org) e *Blast GenBank* (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Para a identificação correta das espécies foi considerado um valor mínimo de 99% de similaridade.

4 RESULTADOS

4.1 Levantamento de espécies

O livro “Vida Marinha de Santa Catarina” cita seis espécies de siris que têm ocorrência registrada neste estado. Na arrebentação das ondas é comum encontrar o siri-fantasma (*Arenaeus cribrarius*) e no infralitoral os siris *Callinectes danae*, *Callinectes ornatus* e *Callinectes sapidus*. Já no fundo móvel, em contato com os costões rochosos, encontram-se *Portunus spinimanus* e *Cronius ruber* (GIRALDES; FREIRE, 2014). Além dessas espécies nativas, o livro ainda traz a foto de uma espécie invasora (BOOS JUNIOR; OLIVEIRA; DELFIM, 2010) *Charybdis helleri*, conhecida popularmente como siri bidu.

Todas as espécies citadas por Giralde e Freire (2014) também estão apresentadas no artigo de Boos e colaboradores (2012), que além dessas, apresenta outras sete espécies, totalizando treze espécies, como mostra o Quadro 2. No entanto, a espécie *Portunus spinimanus* foi renomeada para *Achelous spinimanus*, pertencendo atualmente ao gênero *Achelous* (MANTELATTO et al., 2009).

Quadro 2 – Espécies de siris que ocorrem em Santa Catarina. *: espécie exótica.

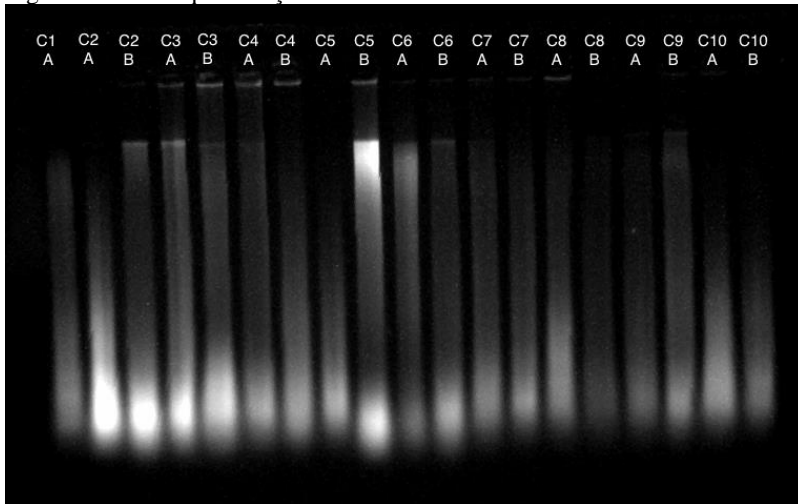
Espécies
<i>Achelous ordwayi</i> (Stimpson, 1860)
<i>Achelous spinicarpus</i> (Stimpson, 1871)
<i>Achelous spinimanus</i> (Latreille, 1819)
<i>Arenaeus cribrarius</i> (Lamarck, 1818)
<i>Callinectes bocourti</i> (A. Milne-Edwards, 1879)
<i>Callinectes danae</i> (Smith, 1869)
<i>Callinectes exasperatus</i> (Gerstaecker, 1856)
<i>Callinectes ornatus</i> (Ordway, 1863)
<i>Callinectes sapidus</i> (Rathbun, 1896)
<i>Charybdis hellerii</i> (A. Milne-Edwards, 1867)*
<i>Coenophthalmus tridentatus</i> (A. Milne-Edwards, 1879)
<i>Cronius ruber</i> (Lamarck, 1818)
<i>Ovalipes trimaculatus</i> (De Haan, 1833)

Fonte: adaptado de Boos e colaboradores (2012).

4.2 Amplificação das amostras

Todas as amostras provenientes de casquinhas de siri mostraram algum grau de degradação do DNA, visto no gel de qualificação apresentado na Figura 5. A degradação do DNA possivelmente deve-se ao fato de que o tecido animal utilizado foi processado mecanicamente e termicamente, já que a carne é desfiada e pré-cozida. Além disso, a adição de sal de cozinha e de temperos no preparo também podem ter contribuído para a degradação.

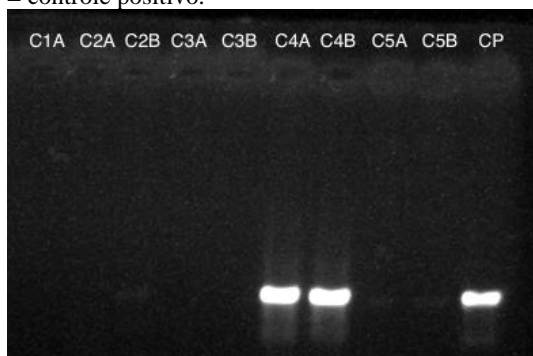
Figura 5 - Gel de qualificação do DNA extraído.



Fonte: elaborado pela autora.

Para as amostras provenientes de casquinhas de siri, primeiramente foram testadas as concentrações da reação de PCR proposta por Abe (2007). Após repetidos testes, não se obteve sucesso na amplificação de todas as amostras, conforme mostra a Figura 6.

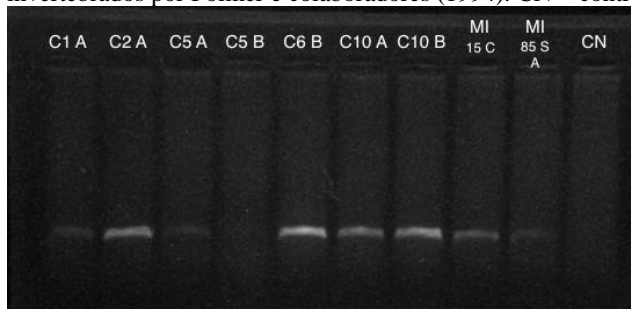
Figura 6 - Gel de agarose mostrando a amplificação das amostras provenientes de casquinhas de siri utilizando as concentrações descritas por Abe (2007). CP = controle positivo.



Fonte: elaborado pela autora.

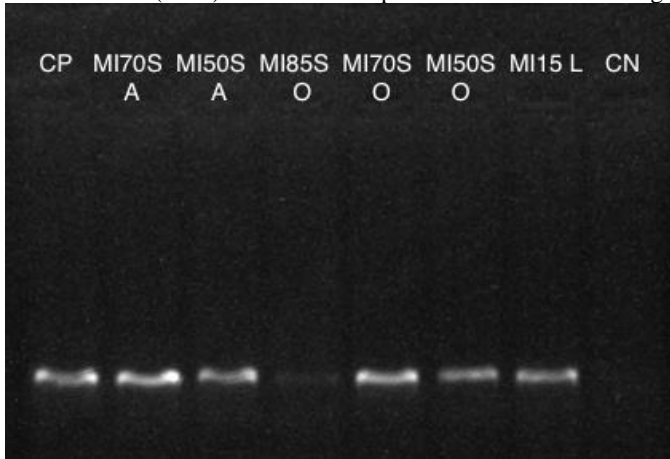
Para a segunda concentração de reagentes testada, descrita por Evans e Paulay (2012), obteve-se sucesso na amplificação de todas as amostras provenientes de casquinhas de siri e nas amostras de misturas intencionais quando utilizados os *primers* descritos por Folmer e colaboradores (1994), como mostram as Figuras 7 e 8. No gel de agarose da Figura 7 a amostra C5B não amplificou, mas após um segundo teste foi amplificada com sucesso.

Figura 7 - Gel de agarose mostrando a amplificação das amostras provenientes de casquinhas de siri e de mistura intencional utilizando as concentrações da reação de PCR descritas por Evans e Paulay (2012) e *primers* descritos para invertebrados por Folmer e colaboradores (1994). CN = controle negativo.



Fonte: elaborado pela autora.

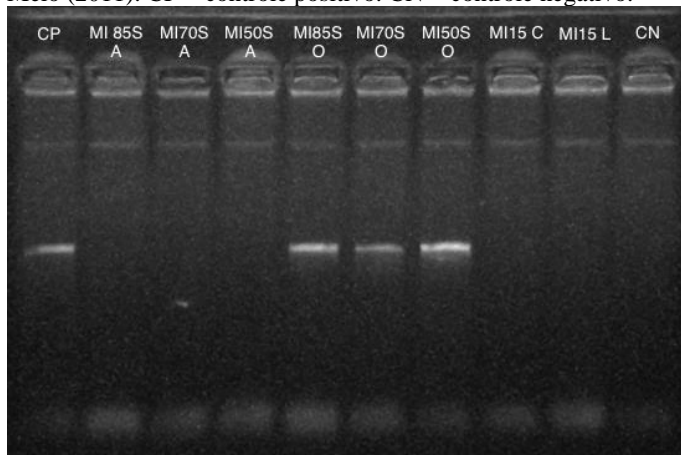
Figura 8 - Gel de agarose mostrando a amplificação das amostras de mistura intencional utilizando as concentrações da reação de PCR descritas por Evans e Paulay (2012) e *primers* descritos para invertebrados por Folmer e colaboradores (1994). CP = controle positivo. CN = controle negativo.



Fonte: elaborado pela autora.

Para as amostras de mistura intencional, quando testados os *primers* descritos por Miya e Nishida (2000) e Melo et al. (2011) para amplificação de fragmentos em vertebrados, apenas as amostras que continham mistura de siri (*Callinectes sapidus*) e olhete (*Seriola lalandi*) amplificaram, nas três proporções de mistura (Figura 9).

Figura 9 - Gel de agarose mostrando a amplificação das amostras de mistura intencional utilizando as concentrações da reação de PCR descritas por Evans e Paulay (2012) e *primers* descritos para vertebrados por Miya e Nishida (2000) e Melo (2011). CP = controle positivo. CN = controle negativo.



Fonte: elaborado pela autora.

4.3 Análise das sequências

Após o sequenciamento e comparação das sequências com os bancos de dados, foi possível fazer a identificação a nível de espécie em 19 das 20 amostras provenientes de casquinhas de siri. Foi observada a predominância da espécie *Callinectes sapidus*, presente em 18 amostras. A espécie *Callinectes bocourti* está presente em 1 amostra. Para a amostra C8B, não foi possível fazer a identificação a nível de espécie, conforme mostra a Tabela 4.

Tabela 4 – Espécies identificadas nas amostras provenientes de casquinhas de siri. A letra “C” indica que a amostra provém de casquinha de siri, os números se referem às dez diferentes marcas e as letras “A” e “B” se referem a fragmentos diferentes da mesma amostra.

Amostra	Melhor ID	% de similaridade	
		BOLD	GenBank
C1A	<i>Callinectes sapidus</i>	99,63%	98%
C1B	<i>Callinectes sapidus</i>	100%	99%
C2A	<i>Callinectes sapidus</i>	99,64%	98%
C2B	<i>Callinectes sapidus</i>	100%	99%
C3A	<i>Callinectes sapidus</i>	99,84%	99%
C3B	<i>Callinectes sapidus</i>	100%	99%
C4A	<i>Callinectes sapidus</i>	100%	99%
C4B	<i>Callinectes sapidus</i>	100%	100%
C5A	<i>Callinectes sapidus</i>	100%	99%
C5B	<i>Callinectes sapidus</i>	100%	99%
C6A	<i>Callinectes sapidus</i>	100%	100%
C6B	<i>Callinectes sapidus</i>	100%	96%
C7A	<i>Callinectes sapidus</i>	100%	99%
C7B	<i>Callinectes sapidus</i>	100%	99%
C8A	<i>Callinectes sapidus</i>	100%	100%
C8B	-	-	-
C9A	<i>Callinectes sapidus</i>	99,72%	99%
C9B	<i>Callinectes sapidus</i>	100%	99%
C10A	<i>Callinectes bocourti</i>	100%	97%
C10B	<i>Callinectes sapidus</i>	100%	100%

Fonte: elaborado pela autora.

Para as seis amostras de mistura intencional de siri e peixe, foi possível obter a identificação a nível de espécie em todas elas. Para as duas amostras de mistura intencional de siri com outro invertebrado em apenas uma foi possível obter a identificação, conforme mostra a Tabela 5.

Tabela 5 – Espécies identificadas nas amostras de mistura intencional. Amostras com final A = mistura de siri (*Callinectes sapidus*) e atum (*Thunnus obesus*). Amostras com final O = mistura de siri (*Callinectes sapidus*) e olhete (*Seriola lalandi*). Amostra com final C = mistura de siri (*Callinectes sapidus*) e camarão (*Pleoticus muelleri*). Amostra com final L = mistura de siri (*Callinectes sapidus*) e lula (*Dosidicus gigas*).

Amostra	Melhor ID	% de similaridade	
		BOLD	GenBank
MI 85S A	<i>Callinectes sapidus</i>	98,67%	96%
MI 70S A	<i>Callinectes sapidus</i>	100%	99%
MI 50S A	<i>Callinectes sapidus</i>	100%	99%
MI 85S O	<i>Callinectes sapidus</i>	100%	100%
MI 70S O	<i>Callinectes sapidus</i>	100%	100%
MI 50S O	<i>Callinectes sapidus</i>	100%	99%
MI 15 C	no match	-	-
MI 15 L	<i>Dosidicus gigas</i>	100%	99%

Fonte: elaborado pela autora.

4.4 Análise dos rótulos

Os rótulos das 10 bandejas de casquinhas de siri utilizadas neste estudo foram analisados de acordo com a Instrução Normativa N° 22 de 24 de novembro de 2005 (BRASIL, 2005). O Quadro 3 apresenta um *checklist* das informações obrigatórias previstas nessa instrução.

Apenas duas das dez marcas analisadas continham todas as informações obrigatórias que foram analisadas. Todas as marcas apresentaram a denominação do produto, a data de fabricação e o prazo de validade.

Quadro 3 – *Checklist* das informações obrigatórias previstas na Instrução Normativa Nº 22 de 24 de novembro de 2005. O “X” representa que a informação está contida no rótulo e o hífen (-) representa que a informação não está contida.

Casquinha	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Informações obrigatórias										
1. Denominação do produto	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
2. Lista de ingredientes	X	-	X	-	X	-	X	X	X	X
3. Peso líquido	X	-	-	X	X	-	X	X	X	X
4. Identificação da origem	X	X	X	-	X	-	X	X	X	X
5. Nome ou razão social e endereço do estabelecimento	X	X	X	-	X	-	X	-	X	X
6. Conservação do produto	X	X	X	-	X	-	-	X	X	X
7. Marca comercial do produto	X	X	X	-	X	X	X	X	X	X
8. Identificação do lote	X	-	X	-	-	-	X	-	X	-
9. Data de fabricação	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
10. Prazo de Validade	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Fonte: elaborado pela autora.

5 DISCUSSÃO

5.1 Amplificação das amostras

Considerando os dois protocolos de PCR testados, é possível afirmar que o de Evans e Paulay (2012) conferiu um melhor resultado em relação ao protocolo de Abe (2007), possibilitando o sucesso na amplificação de todas as amostras. Este sucesso pode ser em virtude da padronização deste protocolo para amostras de invertebrados, enquanto que o protocolo de Abe (2007) era padronizado para uma família específica de peixes, os Gasteropelecidae.

É importante padronizar a temperatura e o tempo de cada etapa da PCR para aumentar sua eficácia, assim como a concentração dos reagentes utilizados (GREEN; SAMBROOK, 2012). As maiores diferenças que os dois protocolos apresentaram foram em relação às concentrações finais dos *primers*, do dNTP e do Cloreto de Magnésio ($MgCl_2$).

No caso dos *primers*, concentrações muito altas podem resultar em acúmulo de produtos não específicos, reduzindo a concentração do produto desejado e concentrações muito baixas podem ser esgotadas antes do final da reação, também resultando em baixa concentração do produto de interesse.

Em relação ao dNTP, concentrações muito altas podem afetar a especificidade dos *primers*. Para o Cloreto de Magnésio, cofator da Taq DNA Polimerase, a sua concentração deve ser otimizada para cada primer utilizado. Muitos componentes da reação ligam-se a este íon como os *primers* e os dNTPs. Concentrações abaixo de 1,5mM são em geral pouco funcionais e concentrações acima de 2,0mM podem gerar resultados satisfatórios, mas também pode haver incremento de produtos inespecíficos (KOLMODIN; BIRCH, 2002).

5.2 Análise das sequências

Analisando os resultados obtidos no banco de dados *BOLD*, obteve-se correspondência com alguma espécie em 19 das 20 amostras provenientes de casquinhas de siri analisadas. A espécie predominante *Callinectes sapidus* correspondeu com 18 amostras, seguida de *Callinectes bocourti* que correspondeu com 1 amostra, sendo registrada a ocorrência dessas duas espécies no estado de Santa Catarina (BOOS JUNIOR; OLIVEIRA; DELFIM, 2010). Para a amostra C8B, o *BOLD* afirma que esta sequência poderia ser alguma das seguintes espécies:

Callinectes sapidus, *Callinectes bocourti*, *Callinectes amnicola* ou *Callinectes rathbunae*, mas não é possível fazer a identificação porque a diferença entre a sequência da amostra e as sequências dessas quatro depositadas é menor que 1%, limiar utilizado por este banco de dados. No entanto, a nível de gênero, pode-se afirmar que esta amostra também é proveniente de siri do gênero *Callinectes*.

Considerando um valor mínimo de 99% de similaridade para o *BOLD*, pode-se afirmar que as 19 amostras foram identificadas a nível de espécie, devido a menor porcentagem de similaridade encontrada ser 99,63%.

Para o banco de dados *GenBank* foi obtida a mesma correspondência das 19 amostras que foram identificadas no *BOLD*. No entanto, no *GenBank* a porcentagem de similaridade das sequências foi igual ou menor do que no *BOLD* para todas as amostras. Para as amostras C6B e C8B não seria possível considerar a sua identificação devido a porcentagem de similaridade encontrada ser 96% e 91%, respectivamente.

O *BOLD* é um banco de dados *online* que permite a identificação de espécies comparando as sequências de interesse (*query*) com as sequências de referência. Para isso, a *query* é alinhada com as sequências depositadas e então é feita uma busca das 100 sequências mais similares. Uma árvore filogenética de *Neighbor-joining* é construída a partir dessas 100 sequências e analisando a relação entre elas, tem-se o resultado das 20 sequências mais similares e da espécie correspondente (FRÉZAL; LEBLOIS, 2008). Enquanto que o *GenBank* compara as sequências, mas sem considerar a distância genética entre as espécies (MADDEN, 2013).

Por essa razão, pode-se considerar que o *BOLD* é uma ferramenta mais eficaz na identificação das espécies do que o *GenBank* e portanto, neste estudo será considerado os resultados apresentados no *BOLD* para a identificação.

Quando analisadas as amostras de mistura intencional, apenas uma amostra não foi possível ser identificada, para ambos os bancos de dados. Em todas as amostras de mistura de siri com vertebrado, obteve-se a correspondência da espécie de siri, independente da porcentagem utilizada, fato que pode ser explicado pela utilização de um *primer* desenhado para invertebrados (FOLMER et al., 1994). Para a única amostra de mistura de siri com outro invertebrado que foi possível realizar a identificação, a espécie correspondente foi a que estava presente em menor quantidade na amostra (15% de DNA da lula *Dosidicus gigas*).

A amostra que obteve menor porcentagem de similaridade (MI85S A) para os dois bancos de dados possuía maior quantidade de DNA de siri do que outras amostras que tiverem maior similaridade.

Assim, percebemos que a técnica empregada não é ideal para amostras que contenham misturas de espécies. Sugere-se então o uso de Sequenciamento de Nova Geração (NGS), visto que o sequenciamento de Sanger não é eficaz para a resolução desse problema. A presença de mais de um DNA *template* com diferentes sequências resulta na sobreposição de picos na sequência do eletroferograma. Esses picos podem ser facilmente confundidos com ruído de fundo, o que pode levar a incorreta atribuição da autenticidade de um produto (KAPPEL et al., 2017).

O NGS é utilizado em diversos estudos envolvendo identificação de espécies em amostras com mistura, como é o caso de misturas em suplementos herbais (IVANOVA et al., 2016), em amostras de pólen oriundos de diferentes espécies de plantas (KELLER et al., 2015) e até mesmo em produtos alimentícios, como no caso de atum enlatados (KAPPEL et al., 2017) e carnes com mistura de mamíferos e aves (BERTOLINI et al., 2015).

Pode-se afirmar que todas as amostras provenientes de casquinhas de siri contém de fato siri na sua composição, o que não impede de conter outras espécies misturadas. Devido ao sucesso da correspondência da maioria das amostras com uma espécie de siri, o COI mostrou mais uma vez ser um bom marcador molecular na identificação de crustáceos (COSTA et al., 2007; HAYE et al., 2012; MA; MA; MA, 2012; RADULOVICI; SAINTE-MARIE; DUFRESNE, 2009), visto que esse grupo possui uma variação interespecífica muito maior (19,2-48,3%) do que intraespecífica (0,46%) para esse gene (COSTA et al., 2007).

5.3 Levantamento de espécies

Considerando as 13 espécies que possuem ocorrência registrada em Santa Catarina, apenas 6 possuem sequências depositadas no *BOLD*. Para os 7 gêneros registrados, em 2 (*Coenophthalmus* e *Cronius*) não existe nenhuma sequência depositada, sendo notável a carência de informações sobre este grupo neste banco de dados.

Em relação à pesca e à conservação da família Portunidae em Santa Catarina, mais uma vez é notada a carência de dados. O boletim estatístico da produção pesquisa de Santa Catarina (UNIVALI/CTTMAR, 2013) mais recente não traz dados de

desembarque de siris. Na região Sul, o único estado que apresenta estatísticas oficiais de desembarque de *C. sapidus* é o Rio Grande do Sul (IBAMA, 2011).

As duas espécies de siri identificadas não possuem registro na *Red list* da IUCN. Dentre as ameaças que os portunídeos sofrem em geral, Pinheiro e Boos (2016) destacam a pesca (intencional ou não) e a degradação e fragmentação do hábitat. Porém não há indícios de que essas ameaças sejam significativas para o decréscimo populacional da maioria das espécies.

No entanto, para *C. sapidus* é sugerido que a pesca seja feita de maneira mais restrita e artesanal, devido ao grau de exploração dessa espécie pela qualidade de sua carne e do seu tamanho em relação às demais (CARMONA-SUARÉZ; CONDE, 2002). Apesar do grande interesse econômico em relação a esta espécie, pouco se sabe sobre o estado atual da população e dados biológicos básicos (CASCORBI, 2004).

No Brasil, existe um instrumento legal de ação de conservação focado nas espécies *C. sapidus* e *C. danae*. A portaria da extinta SUDEPE (Superintendência do Desenvolvimento da Pesca) N° 24 de 26 de julho de 1983, regulamenta a pesca dessas espécies, estabelecendo o tamanho mínimo de captura, para fins comerciais, de 12 cm de largura da carapaça e proíbe a captura e comercialização de fêmeas ovígeras. Porém, no estado do Rio Grande do Sul, a portaria proíbe a captura de qualquer espécie de siri, em todos os meses do ano na zona dos molhes da Barra do Rio Grande, por ser uma região de procriação das espécies deste grupo (BRASIL, 1983).

Para *C. sapidus*, *C. danae* e *C. ornatus*, a portaria SUDEPE N° 11 de 18 de maio de 1988 (BRASIL, 1988) também proíbe durante o ano todo a captura de fêmeas ovígeras e indivíduos de *C. danae* com menos de 8 cm de carapaça na Lagoa da Conceição em Florianópolis, SC.

Pinheiro e Boos (2016) ainda destacam outras três ações de conservação possíveis: propostas que restrinjam a pesca em regiões de trânsito de fêmeas ovígeras para a desova, tecnologia de pesca visando à introdução de aparelhos de captura seletivos que descartem indivíduos sem interesse de comercialização sem causar estresse nos mesmos e identificação de picos de reprodução e desova que possam indicar a necessidade de implantação de períodos de proibição da pesca.

5.4 Análise dos rótulos

Em relação aos rótulos analisados, pode-se afirmar que 80% não apresentou todas as informações obrigatórias previstas na Instrução Normativa N° 22 de 24 de novembro de 2005 (BRASIL, 2005), restringindo o consumidor sobre as informações básicas necessárias e estando em desacordo com a legislação vigente. Essa Instrução que prevê o regulamento da rotulagem de produtos de origem animal embalados não exige a obrigatoriedade da utilização do nome científico das espécies envolvidas no preparo do alimento. E de fato, nenhuma embalagem analisada neste estudo apresentou o nome científico da espécie consumida.

No caso dos peixes, a Instrução Normativa N° 29 de 23 de setembro de 2015 (BRASIL, 2015) estabelece a correlação entre os nomes comuns e os respectivos nomes científicos adotados para as principais espécies comercializadas no Brasil. A instrução também determina que a rotulagem de produtos da família Salmonidae e Gadidae deve conter o nome científico da espécie. No entanto, esta Instrução deixa de fora os frutos do mar, não existindo uma legislação específica para este comércio.

A autenticação de produtos alimentícios de origem natural tem pelo menos dois objetivos: a proteção e conservação das espécies utilizadas e a proteção do consumidor contra substituição das espécies (HAYE et al., 2012), mas para que o consumidor brasileiro saiba de fato quais frutos do mar está consumindo, é necessária a criação de medidas que regulamentem e fiscalizem a rotulagem destes produtos.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O COI mostrou mais uma vez ser um bom marcador molecular para identificação de amostras de crustáceos, visto que foram identificadas duas espécies de siri (*Callinectes sapidus* e *Callinectes bocourti*) em 19 das 20 amostras provenientes de casquinhas de siri. Este fato não exclui a possibilidade dessas amostras conterem outras espécies misturadas, visto que as técnicas moleculares empregadas mostraram ser ineficientes nas amostras que continham misturas intencionais. Sugere-se então mais estudos com casquinhas de siri e outros frutos do mar utilizando Sequenciamento de Nova Geração para analisar possíveis misturas de espécies.

No Brasil existem dois instrumentos legais de ações de conservação das espécies de siri, mas é notável a falta de dados oficiais sobre a pesca deste grupo, inclusive no estado de Santa Catarina. É necessária uma maior fiscalização da pesca para que se tenham mais dados disponíveis para embasar estudos futuros. Ademais, estudos ecológicos e populacionais também são importantes e devem ser aliados ao desenvolvimento de medidas de proteção das espécies de siri, principalmente estas que são consumidas como alimento e que sofrem maior pressão pesqueira.

Foi observado um alto percentual (80%) de rótulos analisados em desacordo com a legislação vigente, possuindo carência de uma ou mais informações obrigatórias. Recomenda-se a criação de medidas para regulamentação da rotulagem de frutos do mar, visto que no Brasil a legislação só diz respeito às principais espécies de peixes que possuem interesse comercial.

7 REFERÊNCIAS

- ABE, K. T. **Filogenia Molecular de Gasteropelecidae (Ostariophysi: Characiformes) e Estudo de Suas Relações com Outros Characiformes.** [s.l.] Universidade Estadual Paulista, 2007.
- ALJANABI, S. M.; MARTINEZ, I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 22, p. 4692–4693, 1997.
- BARBUTO, M. et al. DNA barcoding reveals fraudulent substitutions in shark seafood products: The Italian case of “palombo” (*Mustelus* spp.). **Food Research International**, v. 43, n. 1, p. 376–381, 2010.
- BECKER, M. L. **Avaliação da aplicabilidade da técnica DNA barcoding em invertebrados marinhos após processamento culinário.** [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2018.
- BERTOLINI, F. et al. A next generation semiconductor based sequencing approach for the identification of meat species in DNA mixtures. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, p. 1–16, 2015.
- BOOS, H. et al. Checklist of the crustacea from the state of Santa Catarina, Brazil. **Check List**, v. 8, n. 6, p. 1020–1046, 2012.
- BOOS JUNIOR, H.; OLIVEIRA, M. M. DE; DELFIM, R. Novos registros do siri exótico *Charybdis hellerii* (A. Milne-Edwards, 1867) (Crustacea, Portunidae), no litoral do Estado de Santa Catarina. **Revista CEPSUL - Biodiversidade e Conservação Marinha**, v. 1, n. 1, p. 1–7, 2010.
- BRASIL. **Portaria SUDEPE N° 24, 26 de julho de 1983**, 1983.
- BRASIL. **Portaria SUDEPE N° 11, 18 de maio de 1988**, 1988.
- BRASIL. **Instrução Normativa N° 22, de 24 de novembro de 2005.** **Diário Oficial da União de 25/11/2005, Seção 1, Página 15**, 2005. Disponível em: <<https://ambbrasil.esteri.it/resource/2009/09/INTotale.pdf>>. Acesso em: 4 out. 2018.
- BRASIL. **Instrução Normativa MAPA N° 29, de 23 de setembro de 2015.**

CARMONA-SUARÉZ, C. A.; CONDE, J. E. Local distribution and abundance of swimming crabs (*Callinectes* spp. and *Arenaeus cribrarius*) on a tropical arid beach. **Fishery Bulletin**, v. 100, n. 1, p. 11–25, 2002.

CARVALHO, D. C. et al. DNA barcoding identification of commercialized seafood in South Brazil: A governmental regulatory forensic program. **Food Control**, p. 784–788, 2014.

CARVALHO, D. C. et al. Nationwide Brazilian governmental forensic programme reveals seafood mislabelling trends and rates using DNA barcoding. **Fisheries Research**, v. 191, n. July, p. 30–35, 2017.

CASCORBI, A. **Seafood Report: Crabs**. [s.l.: s.n.].

CHIACHIO, M. C. **Estudos Filogenéticos na Subfamília Hypoptopomatinae (Teleostei: Siluriformes: Loricariidae) com Base em Sequências de DNA**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista, 2009.

COSTA, F. O. et al. Biological identifications through DNA barcodes: the case of the Crustacea. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 64, n. 2, p. 272–295, 2007.

EISCHEID, A. C. et al. Optimization and evaluation of a method for the generation of DNA barcodes for the identification of crustaceans. **LWT - Food Science and Technology**, v. 73, p. 357–367, 2016.

EVANS, N.; PAULAY, G. DNA Barcoding Methods for Invertebrates. In: KRESS, W. J.; ERICKSON, D. L. (Eds.). **DNA Barcodes: Methods and Protocols**. [s.l.] Humana Press, 2012. p. 470.

FOLMER, O. et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, v. 3, n. 5, p. 294–299, 1994.

FRÉZAL, L.; LEBLOIS, R. Four years of DNA barcoding: Current advances and prospects. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 8, n. 5, p. 727–736, 2008.

GALIMBERTI, A. et al. DNA barcoding as a new tool for food traceability. **Food Research International**, v. 50, n. 1, p. 55–63, 2013.

GIRALDES, B. W.; FREIRE, A. S. Crustáceos. In: **Vida Marinha de Santa Catarina**. 1. ed. Florianópolis: Editora da UFSC, 2014.

GREEN, M. R.; SAMBROOK, J. Polymerase Chain Reaction. In: GREEN, M. R.; SAMBROOK, J. (Eds.). **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 4. ed. [s.l.] Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.

HANDY, S. 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**, v. 94, n. 1, p. 201–210, 2011.

HAYE, P. A. et al. Authentication of commercialized crab-meat in Chile using DNA Barcoding. **Food Control**, v. 25, p. 239–244, 2012.

HEBERT, P. D. N. et al. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 270, n. 1512, p. 313–321, 2003.

HEBERT, P. D. N. et al. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 41, p. 14812–14817, 2004.

IBAMA. **Proposta de Plano Nacional de Gestão para o uso sustentável do Caranguejo-uçá, do Guaiamum e do Siri-azul** (J. D. Neto, Ed.) **Animal Genetics**. Brasília: [s.n.].

IGARASHI, A. M. Cultivo de siri: perspectivas para o pequeno criador. **Revista Acadêmica : Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 7, p. 12, 2009.

IVANOVA, N. V. et al. Authentication of herbal supplements using next-generation sequencing. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, p. 1–24, 2016.

KAPPEL, K. et al. Species identification in mixed tuna samples with next-generation sequencing targeting two short cytochrome b gene fragments. **Food Chemistry**, v. 234, p. 212–219, 2017.

KELLER, A. et al. Evaluating multiplexed next-generation sequencing as a method in palynology for mixed pollen samples. **Plant Biology**, v. 17, p. 558–566, 2015.

KOLMODIN, L. A.; BIRCH, D. E. Polymerase Chain Reaction: Basic Principles and Routine Practice. In: CHEN, B.-Y.; JANES, H. W. (Eds.). . **PCR Cloning Protocols**. 2. ed. [s.l.] Humana Press, 2002. p. 3–18.

KRESS, W. J.; ERICKSON, D. L. DNA Barcodes: Methods and Protocols. In: KRESS, W. J.; ERICKSON, D. L. (Eds.). . **DNA Barcodes: Methods and Protocols**. [s.l.] Humana Press, 2012. p. 470.

LINDNER, A. **Vida Marinha de Santa Catarina**. 1. ed. [s.l.] Editora da UFSC, 2014.

LYNCH, M.; KOSKELLA, B.; SCHAACK, S. Mutation pressure and the evolution of organelle genomic architecture. **Science**, v. 311, n. 5768, p. 1727–1730, 2006.

MA, H. et al. First mitochondrial genome for the red crab (*Charybdis feriata*) with implication of phylogenomics and population genetics. **Scientific Reports**, v. 5, n. May, p. 1–14, 2015.

MA, H.; MA, C.; MA, L. Molecular identification of genus *Scylla* (Decapoda: Portunidae) based on DNA barcoding and polymerase chain reaction. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 41, p. 41–47, 2012.

MADDEN, T. The BLAST Sequence Analysis Tool. In: **The NCBI Handbook**. 2. ed. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2013. p. 425–436.

MANTELATTO, F. L. et al. Molecular Phylogeny of the Genus *Cronius* Stimpson, 1860, with Reassignment of *C. tumidulus* and Several American Species of *Portunus* to the Genus *Achelous* De Haan, 1833 (Brachyura: Portunidae). In: MARTIN, J. W.; CRANDALL, K. A.; FELDER, D. L. (Eds.). **Decapod Crustaceans Phylogenetics**. New York: CRC Press, 2009. p. 567–579.

MANTELATTO, F. L.; DIAS, L. L. Extension of the know distribution of *Charybdis hellerii* (A. Milne- Edwards, 1867) (Decapoda, Portunidae) along the western tropical South Atlantic. **Crustaceana**, v. 72, n. 6, p. 617–620, 1999.

MELO, B. F. et al. A new species of tetragonopterus cuvier, 1816 (Characiformes: Characidae: Tetragonopterinae) from the rio Jari, Amapá,

northern Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 9, n. 1, p. 49–56, 2011.

MIYA, M.; NISHIDA, M. Use of Mitogenomic Information in Teleostean Molecular Phylogenetics: A Tree-Based Exploration under the Maximum-Parsimony Optimality Criterion. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 17, n. 3, p. 437–455, 2000.

OGATA, B. **Crab Database - Crabs - Species *Callinectes danae***. Disponível em: <<https://www.crabdatabase.info/en/crabs/brachyura/eubrachyura/heterotremata/portunoidea/portunidae/callinectes/callinectes-danae-3296>>. Acesso em: 5 dez. 2018.

PAULAY, G.; ANKER, A. **Crab Database - Crabs - Species *Callinectes ornatus***. Disponível em: <<https://crabdatabase.info/krabi/brachyura/eubrachyura/heterotremata/portunoidea/portunidae/callinectes/callinectes-ornatus-3291>>. Acesso em: 5 dez. 2018.

PEREIRA, M. J. et al. Population biology of *Callinectes danae* and *Callinectes sapidus* (Crustacea: Brachyura: Portunidae) in the south-western Atlantic. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, p. 1–11, 2009.

PINHEIRO, M. A. A. et al. Avaliação dos Caranguejos Portunídeos (Decapoda: Portunoidea: Ovalipidae, Polybiidae e Portunidae). In: PINHEIRO, M.; BOOS, H. (Eds.). **Livro Vermelho dos Crustáceos do Brasil: avaliação 2010-2014**. Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Carcinologia, 2016. p. 466.

RADOSTA, O. **Crab Database - Crabs - Species *Callinectes sapidus***. Disponível em: <<https://www.crabdatabase.info/en/crabs/brachyura/eubrachyura/heterotremata/portunoidea/portunidae/callinectes/callinectes-sapidus-3288>>. Acesso em: 5 dez. 2018.

RADULOVICI, A. E.; SAINTE-MARIE, B.; DUFRESNE, F. DNA barcoding of marine crustaceans from the Estuary and Gulf of St Lawrence: A regional-scale approach. **Molecular Ecology Resources**, v. 9, p. 181–187, 2009.

RODRIGUES, A. A.; BATISTA-LEITE, L. DE M. A. A pesca artesanal dos siris capturados no estuário do rio Paripe, ilha de Itamaracá,

Pernambuco. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, v. 8, n. 1, p. 11–25, 2015.

SCARANTO, B. M. S. **Caracterização genética do jundiá (*Rhamdia quelen*) por meio do DNA barcode e marcadores microssatélites Florianópolis**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2017.

SEVERINO-RODRIGUES, E.; PITA, J. B.; GRAÇA-LOPES, R. DA. Pesca artesanal de siris (Crustacea, Decapoda, Portunidae) na região estuarina de Santos e São Vicente (SP), Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 27, n. 1, p. 7–19, 2001.

STAFFEN, M. D. **Uso da técnica molecular DNA barcode na identificação de substituições fraudulentas de pescados comercializados em restaurantes de culinária japonesa de Florianópolis/SC**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2015.

UNIVALI/CTTMAR. **Boletim Estatístico da Pesca Industrial de Santa Catarina - Ano 2012**. [s.l.: s.n.]. v. 13

WARNER, K. et al. **Oceana Reveals Mislabeling of Iconic Chesapeake Blue Crab**. [s.l.: s.n.]