



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
NÚCLEO DE ECOLOGIA AQUÁTICA E PESCA DA AMAZÔNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA AQUÁTICA E PESCA

**BIANCA LIMA PAIVA**

**Uso do gene mitocondrial 16S rDNA na identificação molecular de espécies de lulas (Mollusca: Cephalopoda) comercializadas em feiras e mercados na América Latina.**

BELÉM – PA

2023

BIANCA LIMA PAIVA

**Uso do gene mitocondrial 16S rDNA na identificação molecular de espécies de lulas (Mollusca: Cephalopoda) comercializadas em feiras e mercados na América Latina**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia Aquática e Pesca - PPGEAP, da Universidade Federal do Pará como requisito à obtenção de Título de Mestre em Ecologia Aquática e Pesca.

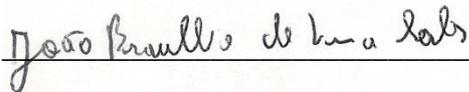
Orientador: Prof. Dr. João Bráullio de Luna Sales

BELÉM - PA

2023

BIANCA LIMA PAIVA

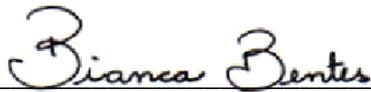
**Uso do gene mitocondrial 16S rDNA na identificação molecular de espécies de lulas (Mollusca: Cephalopoda) comercializadas em feiras e mercados na América Latina**



Orientador: Prof. Dr. João Bráullio de Luna Sales

Universidade Federal do Para

CEABIO-UFPA.



Membro Interno: Dra. Bianca Bentes da Silva

Núcleo de Ecologia Aquática e Pesca da Amazonia

NEAP-UFPA.



Membro Externo: Dr. Rodrigo Silvestre Martins

Universidade Federal de São Paulo

Instituto do Mar-UNIFESP.



Membro Externo: Dr. Luis Fernando da Silva Rodrigues Filho

Universidade Federal Rural da Amazonia, Campus Capanema

UFRA.

BELÉM - PA

2023

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará  
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

---

L732 Lima Paiva, Bianca.  
Uso do gene mitocondrial 16S rDNA na identificação molecular de espécies de lulas (Mollusca: Cephalopoda) comercializadas em feiras e mercados na América Latina / Bianca Lima Paiva. — 2023.  
50 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. João Bráullio de Luna Sales Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Núcleo de Ecologia Aquática e Pesca da Amazônia, Programa de Pós-Graduação em Ecologia Aquática e Pesca, Belém, 2023.

1. cefalópodes. 2. rotulagem. 3. identificação Molecular. 4. substituição. I. Título.

---

CDD 576.5

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho ao meu filho, Samuel.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo amor e cuidado derramado sobre a minha vida, bem como sabedoria para lidar com momentos difíceis encontrado durante a realização desse trabalho e por nunca ter me desamparado.

Ao meu filho, Samuel Paiva que é o verdadeiro responsável pela minha perseverança e minha força de nunca desistir.

Ao meus pais, Patricia Lima e Carlos Cleyton, por todo auxílio e suporte durante execução desse trabalho, por toda ajuda com o meu filho para que eu conseguisse conciliar a vida acadêmica com a maternidade, sendo eles a minha verdadeira rede de apoio, sem eles seria bem difícil.

A minha irmã Camila Lima, por ter me presenteado com o meu sobrinho Vicente Paiva, que é a minha alegria diária junto com o meu filho.

Aos meus avós Maria Nadir e Pedro Paulo e meus tios Paulo Sergio e Gleicy Lima, por todo apoio e confiança durante toda essa trajetória.

Ao meu namorado Alan Erik, pelo grande apoio, pela paciência e por sempre entender meus momentos de estresse, estando ao meu lado em quase todo o mestrado me dando suporte e apoio emocional.

Ao meu orientador, João Bráullio pela confiança depositada desde o ano de 2017, por todo tempo, ensinamento e compreensão durante todo esse período.

Aos meus grandes amigos do GIBI, Aisha Carolina, Amanda, Igor, Jéssica Aline, Kamila, Kerly, Karolzinha, Luiz Filipe, Rasna, Suellen, Orlando e Weverton John com quem dividi todas minhas alegrias e angústias nos últimos tempos, por todo suporte, parceria e sorrisos que fizeram esse período se tornar algo mais leve e especial. Em especial Aisha Carolina, Igor e Kamila por toda ajuda em bancada nesses últimos meses, sem vocês seria impossível, vocês são os melhores.

A Cíntia Oliveira por ter me auxiliado e me ensinado as primeiras coisas de bancada e a Silvia Brito por todo ensinamento e por ter feito toda a parte de sequenciamento.

A todos os meus amigos e familiares que sempre me apoiaram nessa trajetória, acreditando sempre nessa minha vitória, em especial minha amiga Jéssica Saraiva.

Ao meu Pastor Ari, por toda a palavra de incentivos em momentos difíceis que enfrentei durante a construção desse trabalho.

Ao Grupo de Investigação Biológica Integrada (GIBI), que é o grupo de pesquisa ao qual faço parte e onde fiz toda a triagem e extração do meu material.

À Universidade Federal do Pará e ao programa de Pós-graduação em Ecologia Aquática e Pesca (PPGEAP), pelo apoio científico para a realização deste trabalho.

Ao Global Sharks, pela concessão da bolsa de estudos.

## **EPÍGRAFE**

“Sabemos que tudo coopera para o bem daqueles que amam a Deus.”

(Romanos 8:28)

## **ESTRUTURA DE DISSERTAÇÃO**

Esta dissertação é composta por dois capítulos, com uma parte introdutória e outra parte em artigo científico. Este formato está de acordo com o regimento em vigor do Programa de Pós-Graduação em Ecologia Aquática e Pesca da Universidade Federal do Pará.

A primeira parte (Capítulo 1) contém uma introdução geral onde é abordado um pouco sobre a comercialização dos cefalópodes e dos outros recursos pesqueiros de forma geral, assim como a importância de utilizar métodos moleculares para identificação dos recursos pesqueiros. Além disso, são apresentados os objetivos do trabalho e a sua justificativa. A segunda parte (Capítulo 2) compreende a um artigo a ser submetido na revista *Reviews in Fish Biology and Fisheries* visando revelar a identificação genética das espécies de cefalópodes rotulados de forma incompleta em feiras e mercados da América Latina.

## SUMÁRIO

<b>Capítulo 1</b> .....	<b>10</b>
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>10</b>
1.1. COMERCIALIZAÇÃO DE RECURSOS MARINHOS PESQUEIROS .....	10
1.2. CEFALÓPODES DE IMPORTÂNCIA COMERCIAL: LULAS .....	11
1.3. POR QUE UTILIZAR MÉTODOS MOLECULARES PARA IDENTIFICAÇÃO DE PRODUTOS PESQUEIROS. ....	12
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>16</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>
3.1. OBJETIVO GERAL .....	17
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	17
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>18</b>
<b>Capítulo 2</b> .....	<b>23</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>24</b>
<b>Introdução</b> .....	<b>25</b>
<b>Material &amp; Métodos</b> .....	<b>28</b>
Amostragem .....	28
Extração, PCR e Sequenciamento de DNA .....	29
Análise de Dados.....	29
Formas de comercialização.....	34
<b>Discussão</b> .....	<b>36</b>
<b>Conclusão</b> .....	<b>40</b>
<b>Referências</b> .....	<b>41</b>

## RESUMO

Os cefalópodes são amplamente comercializados, principalmente as lulas onde as principais espécies exploradas são membros da família Loliginidae e Ommastrephidae, no entanto durante as várias formas de comercialização, ocorrem o processamento do animal, que inclui a retirada e a separação da cabeça do indivíduo, braços ou mesmo são cortados em anéis, o que acaba dificultando a identificação morfológica e facilitando substituições intencionais ou não intencionais, sendo necessário procedimentos mais eficientes para uma correta identificação. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo demonstrar a eficácia do fragmento do 16S rDNA para identificar geneticamente as espécies de lulas comercializadas em mercados e feiras da América Latina. Foram coletadas amostras de supermercado e diretamente de pescadores em feiras. Cada sequência gerada foi submetida ao site *Genbank* para comparação molecular e incluídas no banco de dados para posterior identificação genética, principalmente as amostras que estavam sendo vendidas processadas. Foram gerados um total de 552pb do fragmento mitocondrial 16S rDNA de 181 lulas. A comparação das sequências por meio do *Blastn* revelou a presença de oito espécies que são amplamente comercializadas na região Latino Americana. Todas as sequências avaliadas no presente estudo, quando comparadas aos dados do *Genbank*, obtiveram uma identificação a nível de espécie com similaridade >98%. As sequências identificadas no *Blastn* foram recuperadas em clados altamente suportados, separando duas famílias, sendo elas Loliginidae e Ommastrephidae, com cinco e três espécies identificadas, respectivamente. Nossos resultados indicam erro de rotulagem em algumas amostradas do estado do Pará que continham a espécie *Dosidicus gigas* d' Orbigny, 1823 encontradas somente no Oceano Pacífico, que estavam rotuladas genericamente como “Lula Nacional”. As sequências que foram identificadas como *Urroteuthis duvaucelii* d' Orbigny, 1835 demonstraram indícios de forte estruturação de agrupamento diferentes com sequências advindas do *Genbank*. Dessa forma, os nossos resultados demonstram a eficácia do fragmento 16S rDNA para a identificação de espécies e avaliação de erros de rotulagem, tais práticas de substituição e fraudes comerciais se tornaram uma problemática tanto na perspectiva econômica como ambiental, que poderiam ser cessados no Brasil com leis mais rigorosas no qual se exijam o nome comum e científico das espécies, assim como mecanismos eficientes de identificação, afim de se permitir uma negociação honesta com o consumidor.

**Palavras-Chaves:** Cefalópodes, Rotulagem, Substituição, Identificação molecular.

## ABSTRACT

The cephalopods are widely commercialized, especially the squids where the main species exploited are member of the Loliginidae and Ommastrephidae family. However for commercialization, the species suffer the animal process which includes the removal and separation of the animals head, arms or even sliced into rings, what implies difficulty for correct identification and improves substitutions. This process demands additional procedures for correct identification, like utilization of molecular methods. In this context, the present study aims to demonstrate the efficacy of the 16S rDNA fragment to genetically identify the squid's species commercialized in markets and fish mongers in Latin America. Each sequence generated was submitted to the *GenBank* site to molecular comparison and include in the database to posterior generic identification of the samples, especially the samples that was being sold processed. All sequences generated a total of 552 bp of the mitochondrial fragment 16S rDNA from 181 squids, and the sequence comparison of the sequences by *Blastn* revealed the presence of eight species that are widely commercialized in the Latin America regions at species level with similarity >98%. All identified sequences on *Blastn* were recovered in highly supported clades, separating two genetically distinct families, Loliginidae and Ommastrephidae, with five and three species identified respectively. Our results indicate a labeling error in some specimens from the Pará state that contained the species *Dosidicus gigas* (d'Orbigny, 1823) found only in the Pacific Ocean that was generically labeled as "National Squid". The sequences that were identified as *Uroteuthis duvaucelii* (d'Orbigny, 1835) showed evidence of strong structuration of different group with sequences coming from *Genbank*. Therefore our results show an efficiency of the 16S rDNA fragment to the identification of species and labeling errors validation, such practices of substitution and commercial fraud has become a problem from both an economical and environmental perspective, which could be assessed in Brazil with more rigorous laws in which require the common and scientific names from the species, as well as efficient identification mechanisms, in order to enable the honest negotiation with the consumer.

**Keywords:** Cephalopods; Labeling; Substitutions; Molecular Identifications.

## Capítulo 1

### 1. INTRODUÇÃO GERAL

#### 1.1. COMERCIALIZAÇÃO DE RECURSOS MARINHOS PESQUEIROS

A produção pesqueira tem mostrado um aumento constante nos últimos tempos, atingindo um recorde de 214 milhões de toneladas, no valor de cerca US\$ 424 bilhões, no qual a produção de animais aquáticos em 2020 foi mais de 60% superior à média da década de 1990 (FAO, 2022). A comercialização engloba uma das etapas da cadeia produtiva, sendo uma das ações da atividade pesqueira que tem intensa importância econômica e social, esta última, em virtude de grande parte das famílias que trabalham com a atividade dependerem exclusivamente da venda do pescado (Gass, 2022). Ainda se referindo ao ano de 2020, 225 estados e territórios, apresentaram algum tipo de atividade ligados a comercialização de produtos de pesca, sendo a China o maior produtor, exportador e processador mundial de recursos pesqueiros, no qual suas exportações compreendem em grande parte de cefalópodes, camarões, tilápias, moluscos bivalves e peixe branco processado (FAO, 2022).

Com o aumento da exploração dos recursos pesqueiros e o decaimento na abundância dos estoques das espécies alvos como camarões, lagostas, bacalhau e sardinhas, que sustentam as pescarias industriais, os chamados ‘recursos marinhos não convencionais’, dos quais os cefalópodes fazem parte, começaram a ganhar mais importância e aumento em sua exploração (Jereb *et al.*, 2005). O aumento nos desembarques de cefalópodes nas últimas décadas foi devido à crescente demanda do mercado e conseqüentemente no esforço da pesca (Arkhipkin *et al.*, 2015). Diversas espécies de cefalópodes de médio e grande porte estão sujeitas a exploração em larga escala, onde um dos principais motivos da preferência dos consumidores a estas espécies está ligado a características fisiológicas de algumas espécies como corpos musculares com sabor e textura aceitáveis para o consumo humano (Zlatanov *et al.*, 2006; Jereb & Roper, 2010; Wen *et al.*, 2015).

A pesca de cefalópodes colabora com uma pequena porcentagem (2-5%) dos desembarques globais de espécies marinhas em relação aos peixes durante os anos de 1960 a 2014. Contudo, sua contribuição para a produção pesqueira mundial aumentou gradativamente de 0,5 milhões de toneladas em 1950 para 4,85 milhões de toneladas em 2014 (FAO, 2019). Em 2020, as exportações de cefalópodes totalizaram US\$10,2 bilhões, representando o equivalente a 6,8% do valor total das exportações de produtos aquáticos, tendo China, Itália,

Espanha, Japão e a República da Coreia como um dos mercados mais importantes de importações de cefalópodes (FAO, 2022).

O aumento de desembarques de cefalópodes foi relatado nas estatísticas de captura marinha durante as últimas décadas (Caddy & Rodhouse, 1998; Rocha & Vega, 2003; Doubleday *et al.*, 2016). Esses desembarques aumentaram em 416% desde 1961, marcando um recorde histórico de quatro milhões de toneladas (Ospina-Alvarez *et al.*, 2022). No entanto, na maioria das pescarias de grandes escalas, os cefalópodes são desembarcados como capturas acessórias (Lishchenko *et al.*, 2021). Como é o caso de *Loligo vulgaris* Lamarck, 1798 que é principalmente capturado por captura acessória das pescarias de arrasto pelágicos e de fundo durante todo o ano, no Atlântico e no Mediterrâneo (Jereb *et al.*, 2015).

## 1.2. CEFALÓPODES DE IMPORTÂNCIA COMERCIAL: LULAS

O comércio global de cefalópodes envolve a pesca e a produção de mais de dez espécies de valor comercial, contribuindo também, para a subsistência econômica de milhares de comunidades costeiras em todo o mundo (Ospina-Alvarez *et al.*, 2022). As espécies de maiores interesses econômicos pertencem a duas ordens distintas: Decapodiformes e Octopodiformes (Arkhipkin *et al.*, 2015) e apenas algumas espécies de cefalópodes são pescadas comercialmente em grande escala (Kreuzer, 1984), como as espécies de polvos que vem se tornando um dos principais recursos pesqueiros com um alto valor comercial mundialmente (Teixeira, 2011).

Para a costa brasileira, especialmente nas regiões Sudeste e Sul as principais espécies de lulas capturadas e comercializadas são da família Loliginidae Lesueur, 1821, sendo as espécies mais capturadas em desembarques industriais e artesanais: *Doryteuthis pleii* Blainville, 1823 e *Doryteuthis sanpaulensis* Brakonieccki, 1984. A espécie *Lolliguncula brevis*, Steenstrup, 1881 é regulamente capturada em pesca de camarão como fauna acompanhante, porém, é também pescada e comercializada em São Paulo, onde é chamada de "lula-branca". (Zaleski, 2010; Sales *et al.*, 2011; Tosadori, 2022).

Do ponto de vista da pesca industrial de cefalópodes, espécies da família Ommastrephidae Steenstrup, 1857, como o *Illex argentinus* Castellanos, 1960, é a espécie de cefalópodes mais capturada na região do Sul do Brasil e mundialmente a mais comercializada (Perez *et al.*, 2009; Jereb & Roper, 2010) havendo também participação nas pescarias industriais de *D. sanpaulensis* e *D. pleii*, principalmente nos estados de São Paulo e Santa Catarina (Perez *et al.*, 2002, Gasalla *et al.*, 2005a,b; Perez *et al.*, 2005; Postuma, 2010).

As capturas médias por viagem de *Doryteuthis pleii* pela frota artesanal em São Paulo apresentou uma sazonalidade durante o período de novembro de 2002 a março de 2009, onde as maiores capturas chegaram a 90kg no mês de janeiro de 2002 e 120 kg em março de 2004, tendo uma queda para 45 kg em novembro de 2004, contudo, em fevereiro de 2009 foi registrado a maior alta na pesca desses cefalópodes, chegando ao monte de 160 kg em fevereiro daquele ano (Postuma, 2010). Não existindo relatos de acompanhamento de estatística de pesca para cefalópodes de outras partes da costa brasileira, devido ao fato da maioria das capturas destes indivíduos nestas regiões, ocorrem de forma acidental, muitas vezes associadas a fauna acompanhante de camarões marinhos, sendo baixa a procura por estas espécies nestas outras regiões (Branco, Freitas-Júnior & Christoffersen, 2015).

Entretanto, no estado do Pará, levantamentos moleculares prévios junto a frota pesqueira indicam a ocorrência de cinco espécies de lulas: *Doryteuthis pealeii* Le Sueur, 1821; *Doryteuthis pleii* Blainville, 1823; *Doryteuthis surinamensis* Voss, 1974; *Lolliguncula brevis* Blainville, 1823; *Ommastrephes cylindraceus* Le Sueur, 1821 (Araújo *et al.*, 2008, Sales *et al.*, 2011), havendo algumas vezes a presença destas espécies vendidas para redes varejistas locais, que reembalam os indivíduos e colocam para venda.

### 1.3. POR QUE UTILIZAR MÉTODOS MOLECULARES PARA IDENTIFICAÇÃO DE PRODUTOS PESQUEIROS?

A importância atual do comércio de pescado exige desenvolvimento tecnológico na produção, no manuseio, no processamento e na distribuição de alimento, a fim de garantir a autenticidade e origem desses produtos pesqueiros (Gil., 2007; Rasmussen & Morrissey, 2008; Di Pinto *et al.*, 2013). A autenticação de alimentos tornou-se muito importante com a crescente procura dos produtos de pesca, devido à preocupação não apenas para a prevenção de fraudes comerciais, mas também para avaliação dos riscos de segurança resultante da introdução de ingredientes alimentares que possam oferecer riscos à saúde humana (Rasmussen & Morrissey, 2008). Visto que, espécies que não declaradas nos rótulos podem causar riscos para pessoas que possuem alergias, como no caso do Surimi (Kani-Kama) que são feitos com cefalópodes, bem como a ocorrência de substituição com espécies que contém neurotoxinas como o peixe Baiacu (e.g., *Takifugu rubripes*) (Guisti, Armani & Sotelo, 2017). A rotulagem incorreta contribui também para a superexploração dos recursos estoques, ocasionando uma diminuição dos recursos pesqueiros, implicando na possibilidade extinção das espécies superexploradas que são mais vulneráveis (Agnew *et al.*, 2009; Pardo *et al.*, 2018).

A substituição de espécies pesqueiras de alta qualidade por espécies de qualidade inferior é uma prática cada vez mais comum porque oferece recompensas financeiras imediatas (Di pinto *et al.*, 2015). Normalmente, as espécies utilizadas nas substituições possuem valores inferiores aos que são declarados nos rótulos das embalagens, ou são uma forma de comércio de espécies que foram capturadas (de forma acidental ou não) em alto mar que tem o seu status de comercialização e captura proibidas pelas legislações vigentes, mas mesmo assim, são vendidas de forma processada sobre nomes vulgares “guarda-chuva” ocorrendo principalmente com espécies de elasmobrânquios (Palmeira *et al.*, 2013; Feitosa *et al.*, 2018; Rodrigues-Filho *et al.*, 2020).

Entretanto, nem sempre a substituição de espécies comerciais pode ser caracterizada como fraude comercial, uma porção da rotulagem inadequada ocorre de forma não intencional, muito por conta dos caracteres morfológicos utilizados para a identificação de espécies que podem ser facilmente equivocados. A troca também pode surgir devido ao fato de diferentes espécies possuírem um nome vernacular em comum, ou por diferentes nomes vulgares em diferentes regiões, embora casos de fraudes também ocorram de forma intencional afim de se obter maiores lucros (Pauly *et al.*, 2005; Worm *et al.*, 2006, Brito *et al.*, 2015). Em geral, estes produtos são apenas identificados por termos genéricos como “Lula nacional”, identificação esta que não oferece ao consumidor a informação de quais espécies estão sendo comercializadas, visto que o Brasil apresenta muitas espécies de lulas capturadas ao longo da costa (Haimovici *et al.*, 1994).

Os cefalópodes apresentam poucos caracteres morfológicos que são informativos em nível de espécie, fato este que geralmente pode causar problemas na correta identificação de espécies proximalmente relacionadas (Guzik *et al.*, 2005). No caso das lulas, a forma de consumo é extensa e diversificada, passando por vários tipos de processamento: os indivíduos podem ser comercializados secos, enlatados, frescos, congelados ou inteiros (Chapela *et al.*, 2003), porém, na maioria dos mercados são popularmente vendidos eviscerados, sem pele e cortados em anéis, o que torna a identificação da espécie que está sendo comercializada bastante desafiadora (Colombo *et al.*, 2002; Chapela *et al.*, 2003; Sales *et al.*, 2011). Estas também podem ser comercializados em forma de “salada”, comprometendo a identificação morfológica e mascarando o número de espécies e indivíduos processados, podendo conter mais de um indivíduo em uma única bandeja (Figura 1).

A identificação de espécies inteiras de cefalópodes frescos pode ser realizada por inspeção visual de acordo com chaves morfológicas disponíveis. No entanto, isso requer um alto nível de especialização, por que os caracteres morfométricos podem ser influenciados por

fatores ambientais (Martínez, *et al.*, 2002). Além disto, em virtude do seu corpo mole os cefalópodes podem ser facilmente danificados durante a coleta, tornando assim uma identificação morfológica completamente inviável para produtos processados, onde as características anatômicas foram removidas ou alteradas (Wen *et al.*, 2017).

Essas modificações dificultam ou mesmo impedem à identificação, tornando mais propício a fraude econômica, onde as espécies altamente valorizadas como, por exemplo, as da família Loliginidae, sejam substituídas por aqueles de menor valor comercial como as da família Ommastrephidae, o que se torna uma preocupação para o mercado comercial internacional (Johnson, 2007; Chapela *et al.*, 2003).



**Figura 1:** Imagens ilustram as diferentes formas de comercialização das lulas A) lulas em formato de anéis B) lulas inteiras em bandeja C) “salada” D) lulas vendidas em feiras. **Fonte:** arquivo pessoal.

A utilização de técnicas moleculares tem colaborado significativamente para a identificação de diversas espécies de cefalópodes, que representam similaridade morfológica (Brierley *et al.*, 1994; Sin *et al.*, 2009; Sales *et al.*, 2013; Jin *et al.*, 2022). Numerosas técnicas

que se baseiam na análise de proteínas têm sido utilizadas para a identificação de espécies de pescados (Asensio, 2007). No entanto, as proteínas são sensíveis ao calor, podendo ser desnaturadas, por cozimento, fritura, ou exposição prolongada ao ambiente (Asensio, 2007). Para amostras processadas, cozidas ou degradadas, técnicas baseadas em DNA podem ser usadas para fornecer suporte significativo para a autenticidade de espécies (Di Pinto *et al.*, 2013). Com o avanço de técnicas moleculares, houve um grande desenvolvimento e utilização do DNA, apresentando vantagens sobre técnicas que utilizam proteínas, pois o DNA apresenta estabilidade a temperatura elevada, está presente em todos os tipos de tecidos, além de apresentar variação intra e interespecífica (Mackie, 1996; Asensio, 2007).

Uma técnica amplamente utilizada atualmente é a reação em cadeia da polimerase (PCR), que se revelou uma ferramenta útil para a identificação de espécies, ajudando a desvendar eventuais substituições, permitindo analisar pequenas quantias de amostras e que foram submetidas a diferentes tipos de processamento como congelamento por períodos prolongados, cozimento, fritura e mistura com outros tipos de tecido (Colombo *et al.*, 2002; Rasmussen & Morrissey, 2008). Quando auxiliados por métodos moleculares, as pesquisas de mercado podem fornecer identificação precisa de espécies e estimativa do volume do comércio, mesmo os produtos que são vendidos de formas processados (Clarke *et al.*, 2006; Palumbi, 2007).

Dos diferentes marcadores utilizados para a identificação de pescados, o gene originalmente proposto para ser o marcador mitocondrial específico para animais, utilizado pela iniciativa de código de barras de DNA (*DNA barcoding*), é o gene citocromo oxidase subunidade I (COI) (Hebert *et al.*, 2003). Entretanto, existem críticas a aplicabilidade geral do uso do gene COI, por causa da presença de pseudogenes (Rubinoff, 2006). Sendo esta questão um problema exclusivo para os moluscos, pois vários estudos demonstraram algumas alterações nos genomas mitocondriais, incluindo reorganização, duplicação e deleção de genes (Boore & Brown, 1995; Boore, 1999). Para a classe Cephalopoda, já foram relatadas limitações para o uso do gene COI, com alguns membros da família Ommastrephidae apresentando duas cópias do gene (Yokobori *et al.*, 2004).

No entanto, outros genes mitocondriais têm sido eficientes como marcadores de código de barras, em particular o 16S rDNA, o qual faz parte da grande subunidade ribossomal, e que tem sido amplamente utilizado em trabalhos de identificação de espécies devido a conservação estrutural de suas sequências, além da abundância (devido a repetição), sendo útil também na amplificação de diversos táxons como: bactérias, esponjas e mamíferos (Wainwright *et al.*, 1993; Colombo *et al.*, 2002; Gomes, 2009; De Oliveira *et al.*, 2013; Sales *et al.*, 2013). Sendo

usado para análises filogenéticas de cefalópodes (Bonnaud et al., 1994; Warnke *et al.*, 2004; Sales *et al.*, 2013), proporcionando assim, um bom conjunto de dados de referências, e está atualmente disponível para identificação de espécies (Gomes, 2009; De Oliveira *et al.*, 2013). Para cefalópodes, este gene se mostrou amplamente efetivo para filogenias intraespecíficas, sendo bastante utilizada para a diferenciação entre espécies (Bonnaud *et al.*, 1994; Warnke *et al.*, 2004, Sales *et al.*, 2013). O uso de ferramentas molecular também tem sido eficaz para o auxílio na identificação de espécies ameaçadas de extinção (Barbuto *et al.*, 2010; Palmeira *et al.*, 2013; Brito *et al.*, 2015).

## 2. JUSTIFICATIVA

Os cefalópodes são animais amplamente comercializados, sendo um importante recurso pesqueiro ao redor do mundo, cujos desembarques têm aumentado rapidamente nas últimas décadas. Diversas espécies de lulas de médio e grande porte estão sujeitas à uma exploração em larga escala por possuírem uma alta taxa proteica e baixo teor de gordura, apresentando uma elevada preferência para o consumo humano. Esses animais podem ser comercializados de diferentes maneiras, como produtos frescos ou congelados, inteiros ou processados (anéis e braços), onde o processamento muitas vezes remove ou prejudica as características diagnósticas, importantes para a identificação das espécies.

Desta forma, o produto acaba tornando-se alvo para as substituições de espécies (intencionais ou não), onde as substituições intencionais ocorrem principalmente de espécies com o valor comercial maior para alguns grupos, por espécies de valor comercial menor, o que impossibilita o consumidor de fazer uma escolha consciente do produto que está comprando. Contudo, por não existir nenhuma legislação específica brasileira abrangente para as rotulagens de espécies de cefalópodes ou mesmo uma lista com os nomes vernaculares e científicos das espécies comercializadas em feiras e mercados, este fato, associado a remoção dos caracteres morfológicos devido ao processamento das espécies, podem levar o consumidor a adquirir a compra de espécies que não seriam a alvo primário de compra. Nesse sentido, buscou-se utilizar o fragmento do gene 16S rDNA para identificar quais espécies de lulas estão sendo comercializadas, tanto na forma de bandejas contendo animais processados, como espécimes vendidos inteiros, com o intuito de estimar se há indícios de substituição intencional ou não na comercialização de espécies de lulas em algumas regiões da América Latina, através da comparação de sequências do site *Genbank*.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GERAL**

O presente estudo teve como objetivo geral identificar geneticamente as espécies de lulas comercializadas em mercados e feiras na América Latina por meio do gene mitocondrial 16S rDNA.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Inferir quais são as espécies mais frequentemente comercializadas em feiras e mercados em algumas regiões da América Latina.
- Avaliar se há substituição ou não, bem como, a presença de informações genéricas acerca das espécies de lulas comercializadas em feiras e mercados dos locais amostrados.

## 7. REFERÊNCIAS

- AGNEW, D. J. P. *et al.* Estimating the worldwide extent of illegal fishing. **PLoS One**, 4(2), 1e8, 2009.
- ARAÚJO, K. N. O.; SANTO, S, M. Ó. T.; TORRES, I. K. A. **Cefalópodes costeiros capturados na pesca de arrasto dirigida ao camarão rosa *Penaeus subtilis* na costa paraense/norte do brasil**, III CBO. Livro de resumos, 2008.
- ARKHIPKIN, A. I. *et al.*, World squid fisheries. **Reviews in Fisheries Science & Aquaculture**, v. 23, n. 2, p. 92-252, 2015.
- ASENSIO, L. PCR-based methods for fish and fishery products authentication. **Trends in food & Science Technology**, 18, 558-566, 2007.
- BARBUTO, M. *et al.* DNA barcoding reveals fraudulent substitutions in shark seafood products: The Italian case of “palombo” (*Mustelus* spp.). **Food Research International**, 43, 376–381, 2010.
- BOYLE, P. R.; PIERCE, G. J. Fishery biology of Northeast Atlantic squid: an overview. **Fisheries Research**, 21: 1–15, 1994
- BONNAUD, L. *et al.* Phylogeny of decapod cephalopods based on partial 16S rDNA nucleotide sequences. *Comptes rendus de l'Academie des sciences. Serie III, Sciences de la vie*, 317(6), 581-588, 1994.
- BRANCO, J. O.; FREITAS-JÚNIOR, F.; CHRISTOFFERSEN, M. L. Bycatch fauna of seabob shrimp trawl fisheries from Santa Catarina State, southern Brazil. **Biota Neotropica**, v. 15, 2015.
- BRIERLEY, A. S. *et al.*. Genetic variation in the neritic squid *Loligo forbesi* (Myopsida: Loliginidae) in the northeast Atlantic Ocean. **Marine Biology**. 122:79-86, 1994.
- BRITO, M. A. *et al.* DNA barcoding reveals high substitution rate and mislabeling in croaker fillets (Scianidae) marketed in Brazil: The case of “pescada branca” (*Cynoscion leiarchus* and *Plagioscion squamosissimus*). **Food Research International**, 70, 40-46, 2015.
- CADDY, J. F.; RODHOUSE, P. G. Cephalopod and groundfish landings: evidence for ecological change in global fisheries? **Rev. Fish Biol.** 8, 431–444, 1998.
- CHAPELA, M. J. *et al.* Molecular identification of Cephalopods species by FINS and PCR-RFLP of a cytochrome b gene fragment European. **Food Research and Technology**, 217, 524 e 529, 2003.
- CLARKE, S. C. *et al.* Identification of shark species composition and proportion in the Hong Kong shark fin market based on molecular genetics and trade records. **Conservation Biology**, 20, 201–211, 2006.
- COLOMBO, F. *et al.* A simple polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method for the differentiation of cephalopod mollusk families Loliginidae from Ommastrephidae, to avoid substitutions in fishery field. **Food Control**, 13 185–190, 2002a.

- DE OLIVEIRA, J. A. *et al.* Sequências de gene mitocondrial para identificação de espécies animais. **Revista Colombiana de Ciência Animal**, 5(2), 396-407, 2013.
- DI PINTO, A. *et al.* DNA barcoding for detecting market substitution in salted cod fillets and battered cod chunks. **Food Chem**, 141, 1757–1762, 2013.
- DI PINTO, A. *et al.* Species identification in fish fillet products using DNA barcoding. **Fisheries Research**, v. 170, p. 9-13, 2015.
- DOUBLEDAY, Z.A., *et al.* Global proliferation of cephalopods. **Curr. Biol**, 26, 406–407, 2016.
- FAO., 2019. FAO Yearbook. Fishery and Aquaculture Statistics.
- FAO., 2022. The State of World Fisheries and Aquaculture. Towards Blue Transformation. Rome, FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0461en>. 2022.
- FEITOSA, L. M., *et al.* DNA-based identification reveals illegal trade of threatened shark species in a global elasmobranch conservation hotspot. **Scientific reports**, 8(1), 1-11, 2018.
- GASALLA, M. A. *et al.* *Loligo sanpaulensis*. In: M.C. Cergole, A.O. Ávila-da-Silva, and C.L.B. Rossi-Wongt-schowski, (eds.), **Análise das principais pescarias comerciais da região Sudeste-Suldo Brasil: dinâmica populacional das espécies em exploração**, pp. 69-73. Série documentos REVIZEE, Instituto Oceanográfico da Univ. de São Paulo, São Paulo, 2005a.
- GASS, C. M. Dinâmica da comercialização do pescado capturado pela pesca artesanal em Imbé e Tramandaí (RS). TCC (Graduação) – Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul – UFRGS, 2022. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10183/250752>
- GIL, L. A. PCR-based methods for fish and fishery products authentication. **Trends Food Sci. Technol.** 18, 558–566, 2007.
- GIUSTI, A.; ARMANI, A.; & SOTELO, C. G. Advances in the analysis of complex food matrices: Species identification in surimi-based products using Next Generation Sequencing technologies. **PloS one**, 12(10), e0185586, 2017.
- GOMES, D. A. V. Identificação de microrganismos presentes nos pescados e nos compartimentos de armazenamento de embarcações. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.
- GUZIK, M. T.; NORMAN, M. D.; CROZIER, R. H. Molecular phylogeny of the benthic shallow-water octopuses (Cephalopoda: Octopodinae). **Molecular Phylogenetic and Evolution**, 37: 235– 248, 2005.
- HAIMOVICI, M.; PEREZ, J. A. A.; SANTOS, R. A. Class Cephalopoda. Seashells of Brazil. (EC Rios, ed.), 311-320, 1994.
- HEBERT, P. D. *et al.* Biological identifications through DNA barcodes. **Proc Biol Sci.** Feb 7;270(1512):313-21. 2003. doi: 10.1098/rspb.2002.2218. PMID: 12614582; PMCID: PMC1691236.
- JEREB, P. *et al.* Introduction. “In” JEREB, P.; ROPER, C. F. E. (Eds.). Cephalopods of the world. An annotated and illustrated catalogue of species known to date. Volume 1. Chambered

nautilus and sepioids (Nautilidae, Sepiidae, Sepiolidae, Sepiaderiidae, Idiosepiidae and Spirulidae). **Rome: FAO, 1-19. (FAO species catalogue), 2005.**

JEREB, P.; ROPER, C. F. Family Loliginidae. Cephalopods of the world. **An annotated and illustrated catalogue of species known to date**, v.2, p. 38-117, 2010.

JIN, Y. *et al.* Species identification of two Loliginidae cryptic species in China Seas with morphological and molecular methods. **Regional Studies in Marine Science**, 55, 102549, 2022.

JOHNSON, H., M. Annual Report on the United States Seafood Industry. 14th ed. Jacksonville, **Oreg.: H. M. Johnson & Associates**. 101 p, 2007.

KREUZER, R. Cephalopods: Handling Processing and Products. Fisheries Technical Paper 254. **Food and Agriculture Organization**. Rome, 108, 1984.

LISHCHENKO, F., *et al.* A review of recent studies on the life history and ecology of European cephalopods with emphasis on species with the greatest commercial fishery and culture potential. **Fisheries Research**, v. 236, p. 105847, 2021.

MACKIE, I. M. **Authenticity of fish**. In P. R. Ashurt, & M. J. Dennis (Eds.). Food authentication (pp. 140 e170). London: Blackie Academic and Professional, 1996.

MARTÍNEZ, P.; SANJUAN, A.; GUERRA, A. Identification of *Illex coindetii*, *I. illecebrosus* and *I. argentinus* (Cephalopoda: Ommastrephidae) throughout the Atlantic Ocean; by body and beak characters. **Marine Biology**, 141(1), 131e143, 2002.

OSPINA-ALVAREZ, A. *et al.* A network analysis of global cephalopod trade. **Scientific reports**, v. 12, n. 1, p. 1-14, 2022.

PALMEIRA, C. A. M. *et al.* Commercialization of a critically endangered species (largetooth sawfish, *Pristis perotteti*) in fish markets of northern Brazil: authenticity by DNA analysis. **Food Control**, v. 34, n. 1, p. 249-252, 2013.

PALUMBI, S.R. *et al.* The simple fool's guide to PCR. Special publication. Honolulu: University of Hawaii. Dept. of Zoology, 1991.

PALUMBI, S. R. Economic ecology: in the market for minke whales. **Nature**, 447, 267–269, 2007.

PAULY, D., WATSON, R., ALDER, J. Global trends in world fisheries: Impacts on marine ecosystems and food security. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B**, 360, 5–12, 2005.

PARDO, M. Á. *et al.* DNA barcoding revealing mislabeling of seafood in European mass caterings. **Food Control**, v. 92, p. 7-16, 2018.

PEREZ, J. A. A., DE AGUIAR, D. C., OLIVEIRA, U. C. Biology and population dynamics of the long-finned squid *Loligo plei* (Cephalopoda: Loliginidae) in southern Brazilian waters. **Fisheries Research**, 58(3), 267-279, 2002.

PÉREZ, M. P. Evaluación de la población de pulpo (*Octopus maya*) en la península de Yucatán 2005. In: Secretaría de Agricultura, Ganadería y desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Instituto Nacional de la Pesca, 2005.

- PEREZ, J. A. A. *et al.* Deep-water fisheries in Brazil: history, status and perspectives. **Latin American Journal of Aquatic Research**, 37(3): 513-541, 2009.
- POSTUMA, F. A. Biologia pesqueira da lula *Loligo plei* capturada na Ilha de Sao Sebastiao (SP) e dinâmica da atividade pesqueira associada (Doctoral dissertation, Masters thesis, Instituto de Pesca de Sao Paulo, Sao Paulo, 2010.
- RASMUSSEN, R.S.; MORRISSEY, M.T. DNA-based methods for the identification of commercial fish and seafood species. **Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.** 7, 280–295, 2008.
- ROCHA, F.; VEGA, M. A. Overview of cephalopod fisheries in Chilean waters. **Fish. Res.** 60, 151–159, 2003.
- RODRIGUES-FILHO, L. F. S. *et al.* Molecular identification of ray species traded along the Brazilian Amazon coast. **Fisheries Research**, 223, 105407, 2020.
- ROPER, C. F.; SWEENEY, M. J.; NAUEN, C. E. FAO species catalogue: vol. 3 Cephalopods of the world; an annotated and illustrated catalogue of species of interest to fisheries. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **FAO Species Catalogue**, 3, 227, 1984.
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstruction phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, 4, 406-425, 1987.
- SALES, J. B. L. *et al.* Molecular differentiation of the species of two squid families (Loliginidae and Ommastrephidae) based on a PCR study of the 5S rDNA gene. **Food Control**, 22(1), 96-98, 2011.
- SALES, J. B. L. *et al.* New molecular phylogeny of the squids of the family Loliginidae with emphasis on the genus *Doryteuthis* Naef, 1912: Mitochondrial and nuclear sequences indicate the presence of cryptic species in the southern Atlantic Ocean. **Molecular phylogenetics and evolution**, 68(2), 293-299, 2013.
- SIN, Y. W. *et al.* Morphological and genetic differentiation of two loliginid squids, *Uroteuthis (Photololigo) chinensis* and *Uroteuthis (Photololigo) edulis* (Cephalopoda: Loliginidae) in Asia. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 369, n. 1, p. 22-30, 2009.
- TEIXEIRA, P. B. Biologia reprodutiva do polvo *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797) no sul do Brasil. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil, 2011.
- TOSADORI, L.G.C. Tendências da pesca de cefalópodes no litoral sudeste-sul do Brasil. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Bacharelado Interdisciplinar em Ciência e Tecnologia do Mar) - Universidade Federal de São Paulo, 31p. 2022.
- WAINWRIGHT, P. O. *et al.* Monophyletic origins of the metazoa: An evolutionary link with fungi. **Science**, v. 260, p. 340-342, 1993.
- WARNKE, K. *et al.* A new look at geographic and phylogenetic relationships within the species group surrounding *Octopus vulgaris* (Mollusca, Cephalopoda): indications of very wide distribution from mitochondrial DNA sequences. **J. Zool. Syst. Evol. Research**, 42, p.306–312, 2004.
- WEN, J. *et al.* Nutritional quality and safety of the important commercial cuttlefish *Sepia lycidas*. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, 24, 101e111, 2015

WEN, J. *et al.* An insight into the Chinese traditional seafood market: species characterization of cephalopod products by DNA barcoding and phylogenetic analysis using COI and 16S rRNA genes. **Food Control**, v. 82, p. 333-34, 2017.

WORM, B.; BARBIER, E. B.; BEAUMONT, N. Impacts of biodiversity loss on ocean ecosystem services. **Science**, 314, 787–790, 2006.

ZALESKI, T. Ciclo de vida e ecologia da lula *Lolliguncula brevis* na Armação de Itapocoroy, Santa Catarina, Brasil. PhD thesis. Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, Brasil, 2010.

ZLATANOS, S. *et al.* Proximate composition, fatty acid analysis and protein digestibility-corrected amino acid score of three Mediterranean cephalopods. **Molecular Nutrition & Food Research**, 50, 967, 2006.

## 1 **Capítulo 2**

2 Este capítulo foi escrito seguindo a formatação (disponível neste hiperlink) da revista

3 [Reviews in Fish Biology and Fisheries](#)

4

### 5 **16S rDNA revela a identificação genética de espécies de cefalópodes rotuladas de forma** 6 **incompleta em feiras e mercados em regiões da América Latina.**

7

8 Bianca Lima Paiva<sup>1</sup>, Alan Erik Souza Rodrigues<sup>1</sup>, Igor Oliveira de Freitas Almeida<sup>1</sup>, Manuel  
9 Haimovici<sup>2</sup>, Unai Markaida<sup>3</sup>, Patricia Charvet<sup>4</sup>, Vicente Farias<sup>5</sup>, João Braúllio de Luna  
10 Sales<sup>1\*</sup>

11 <sup>1</sup>Universidade Federal do Pará, Grupo de Investigação Biológica Integrada, Centro de Estudos  
12 Avançados da Biodiversidade. Av. Perimetral 01, PCT-Guamá, Terreno 11, CEP: 66075-750,  
13 Belém, PA, Brasil;

14 <sup>2</sup>Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Laboratório de Recursos Demersais e  
15 Cefalópodes, Caixa Postal 474, Rio Grande/RS CEP 96201-900, Brasil.

16

17 <sup>3</sup>Pesquerías Artesanales, El Colegio de la Frontera Sur, CONACYT, 24500 Campeche, México.

18

19 <sup>4</sup>Instituto de Ciências Do Mar - Labomar, Programa de Pós-Graduação Em Ciências Marinhas  
20 Tropicais, Universidade Federal Do Ceará, Av. Abolição 3207, Fortaleza, CE 60165-082,  
21 Brasil.

## 22 **Agradecimentos**

23 Agradecemos ao Instituto Tecnológico Vale (ITV) por ter disponibilizado o local para a realização do  
24 sequenciamento, a Silvia Britto Barreto pelo suporte com os procedimentos em laboratório. Ao  
25 programa de Pós-Graduação em Ecologia Aquática e Pesca (PPGEAP), por fim, ao projeto  
26 *Uncovering the Global Shark Meat Trade* pela concessão da bolsa.

27

28

29 \*Autor Correspondente: João Braúllio de Luna Sales

30 Tel: +55 91 987317337

31 Email: [braullio@ufpa.br](mailto:braullio@ufpa.br)

32 **Resumo**

33 Nas últimas décadas, a importância comercial dos cefalópodes teve aumento considerável,  
34 sendo um importante recurso pesqueiro ao redor do mundo. No entanto, durante as etapas de  
35 comercialização destas espécies, principalmente para as comercializadas em mercados, estes  
36 passam pelo processo conhecido como *finning* que inclui a retirada e separação da cabeça, do  
37 braço ou mesmo tendo a estrutura corporal cortada em anéis, o que acaba dificultando ou,  
38 muitas vezes, impede a identificação das espécies, o que pode proporcionar substituições. Nesse  
39 sentido, o presente estudo tem como objetivo utilizar o gene 16S rDNA para identificar  
40 geneticamente as espécies de cefalópodes comercializadas em mercados e feiras da América  
41 Latina. Foram coletadas amostras inteiras e processadas de supermercados e diretamente de  
42 pescadores locais, o local aproximado da coleta. Cada sequência gerada foi submetida ao site  
43 *Genbank* para comparação molecular e incluídas no banco de dados para posterior identificação  
44 genética. A comparação das sequências por meio do *Blastn* revelou a presença de oito espécies  
45 que são amplamente comercializadas na região Latino Americana. Nossos resultados indicam  
46 erro de rotulagem em algumas amostras do estado do Pará que continham a espécie *Dosidicus*  
47 *gigas* (d' Orbigny, 1823) encontradas somente no Oceano Pacífico que estavam rotuladas  
48 genericamente como “Lula Nacional”. Não sendo encontrado nenhum tipo de substituição entre  
49 as amostras que estavam sendo comercializadas em feiras e mercados, apenas erro de  
50 rotulagem. Dessa forma, os nossos resultados demonstram a eficácia do fragmento 16S rDNA  
51 para a identificação de espécies e avaliação de erros de rotulagem.

52

53 **Palavras-Chaves:** Cefalópodes, Recursos Pesqueiros, Identificação de espécies, Rotulagem.

54

55

## 56 **Introdução**

57 Nas últimas décadas, a importância comercial dos cefalópodes cresceu notavelmente em  
58 volume de comercialização (Caddy e Rodhouse 1998; Watson e Pauly 2001; Jereb e Roper,  
59 2010). O número de espécies de cefalópodes que são alvos de pescarias comerciais tem crescido  
60 nos últimos tempos, onde essa expansão foi causada tanto pelo aumento e demanda de consumo,  
61 bem como novas tecnologias e acesso a novas regiões de pesca e águas mais profundas (Vieites  
62 et al 2019). E se tratando de valor comercial, os membros da família Ommastrephidae  
63 representam o maior volume de comercialização e importância mundial (FAO 2016).  
64 Loliginideos representam a segunda família de interesse de capturas globais devido a sua  
65 distribuição limitada a plataforma continental, em regiões tropicais e temperadas ao redor do  
66 mundo, bem como a alta qualidade da carne das espécies (Jereb e Roper 2010; Sales et al. 2011),  
67 tendo alto valor protéico, alta variedade de aminoácidos essenciais e índices de gordura  
68 extremamente baixos, fazendo o consumo regular das espécies parte de dietas saudáveis e  
69 balanceadas (Anfaco-Cecopesca 2018; USDA 2018).

70 Atualmente, os cefalópodes representam cerca de 2,5% da produção de frutos do mar,  
71 seus desembarques aumentaram desde 1961, atingindo um recorde de cerca de 4 milhões de  
72 toneladas em 2013 (Ospina-Alvarez et al. 2022). Em consumo dos cefalópodes, os países  
73 asiáticos, europeus, africanos e norte americano detêm as dez maiores frotas pesqueiras do  
74 mundo (FAO 2020), tendo Espanha, Italia e Japão os maiores consumidores (FAO 2016; 2018).

75 Na América do Sul, *Dosidicus gigas* D'orbigny 1835 tem sido amplamente explorada,  
76 sendo exportada pelo Peru para mais de 50 países, onde várias tentativas estão sendo realizadas  
77 para diversificação de novos produtos feitos com as espécies dentre eles, enlatados, pré-cozidos,  
78 assados e entre outros (Vieites et al. 2019). Esta alta demanda para exportação, faz com que, a  
79 comercialização de espécies inteiras seja bastante reduzida ou dificultada, havendo muitas  
80 vezes a necessidade de processamento o que acarreta maior tempo de validade dos produtos  
81 derivados (Anfaco-Copesca 2018; USDA 2018).

82 Entretanto, o processamento na maioria das vezes remove ou danifica características  
83 diagnosticas que são importantes para uma identificação correta da espécie por meio de  
84 características taxonômicas tradicionais (Di pinto et al. 2013). No caso dos cefalópodes, existe  
85 a remoção dos intestinos, pele, braços, tentáculos, nadadeiras e cabeça, onde as espécies muitas  
86 vezes são cortadas em anéis ou tubos (Chapela et al 2003; Johnson 2007), desta forma,  
87 removendo todas as características morfológicas que são usadas para identificar as espécies  
88 como sexo, ou maturidade sexual (Roper e Mangold 1998; Chapela et al. 2003).

89           Essas modificações dificultam ou mesmo impedem à identificação, tornando mais  
90 propício à fraude econômica onde as espécies altamente valorizadas como, por exemplo, as da  
91 família Loliginidae são substituídas por espécies de menor valor comercial como as da família  
92 Ommastrephidae, o que se torna uma preocupação para o mercado comercial internacional  
93 (Johnson 2007; Chapela et al. 2003), ou muitas vezes, a substituição não intencional, onde por  
94 falta de conhecimento sistemáticos, os próprios fornecedores não conseguem identificar  
95 corretamente as espécies, atribuindo a estas termos guarda-chuva que abrigam muitas espécies  
96 diferentes (Cawthorn et al. 2013; Kroetz et al. 2020; Sharrad et al. 2023).

97           Os métodos moleculares vem sendo largamente empregados em primeiro ponto, para  
98 identificação de novas espécies ou populações de espécies distintas, fornecendo assim, uma  
99 complementação a estudos de sistemática pura, havendo sua aplicabilidade na identificação de  
100 espécies já consolidada em vários grupos taxonômicos distintos (Virgilio et al. 2010;  
101 Hollingsworth et al. 2011, Gales et al. 2022; Rodrigues-Filho et al. 2023), especialmente  
102 métodos de DNA barcodes (Hebert et al. 2003). Essa técnica se baseia na análise da  
103 variabilidade de uma curta sequência de nucleotídeos para avaliar as diferenças entre as  
104 espécies (Hebert et al. 2003). O gene citocromo oxidase subunidade I (COI) foi inicialmente  
105 proposto por Hebert et al. (2003), essa região do mitogenoma inclui tanto sítios primários e  
106 conservados, quanto uma adequada sequência de variação que permite diferenciação entre  
107 espécies (Hellberg et al. 2011).

108           Entretanto, existem muitas críticas a respeito da escolha do gene COI como região de  
109 código de barras, como por exemplo, a presença de pseudogenes (Rubinoff 2006; Rubinoff et  
110 al. 2006). Para espécies de moluscos, este é um grande problema onde vários estudos já tem  
111 demonstrado a presença de alterações no genoma mitocondrial, incluindo reorganizações,  
112 duplicações gênicas e deleções (Boore e Brown 1995; Boore 1999), além de herança bi parental  
113 em espécies de bivalves (Hoeh et al. 1996). Para espécies de cefalópodes, as principais  
114 limitações da aplicação do gene COI encontra-se na família Ommastrephidae devido a várias  
115 espécies apresentarem duas cópias deste gene (Yokobori et al. 2004), fazendo que sua aplicação  
116 como ferramenta de DNA barcoding para este grupo seja inadequada. A região ribossomal  
117 grande *rrnL* (tambem conhecida como 16S rDNA) é uma alternativa adequada para ser utilizada  
118 como região molecular para identificação de espécies, devido a sua natureza conservada, e  
119 grande numero de cópias nas mitocôndrias, já tendo sido usada amplamente na resolução de  
120 análises filogenéticas em espécies de cefalópodes (Bonnaud et al. 1994; Warnke et al. 2004;  
121 Sales et al. 2013; Sales et al. 2019; Costa et al. 2021).

122           Dentre as principais vantagens na utilização de métodos moleculares na identificação  
123 de produtos pesqueiros está o fato da facilidade de amplificação de regiões alvo, bem como  
124 poder ser utilizado qualquer porção do corpo de um espécime ou indivíduos provenientes de  
125 processos de preparo como cozimento, frituras, enlatamento (Teletchea et al. 2005; Villanueva-  
126 Zaya et al. 2021; Mottola et al. 2022). Desta forma, a aplicabilidade de métodos moleculares  
127 pode auxiliar na correta identificação da espécie que está sendo comercializada, podendo  
128 revelar, não apenas perdas econômicas por substituições, bem como identificar  
129 comercializações de espécies que podem acarretar riscos de saúde (Von der Hayden et al. 2010)  
130 ou a presença de espécies ameaçadas de extinção com status de captura e pesca proibidos,  
131 tornando-se necessário o uso de ferramentas adequadas para confirmar a rotulagem dos  
132 produtos e evitar fraudes comerciais (Barbutto et al. 2010).

133           Quando auxiliados por métodos moleculares, as pesquisas de mercado podem oferecer  
134 uma identificação precisa de espécies, mesmo para produtos que foram abatidos e processados  
135 antes da venda (Palumbi 2007). Técnicas usando DNA tem sido largamente usada para análises  
136 forenses de produtos alimentares porque eles fornecem um eficiente, informativo, sensível e  
137 estímulo específico de identificação e por conta do fato deles poderem ser aplicados para  
138 produtos alimentícios altamente processados (Hebert et al. 2003; Rasmussen e Morrissey 2008).

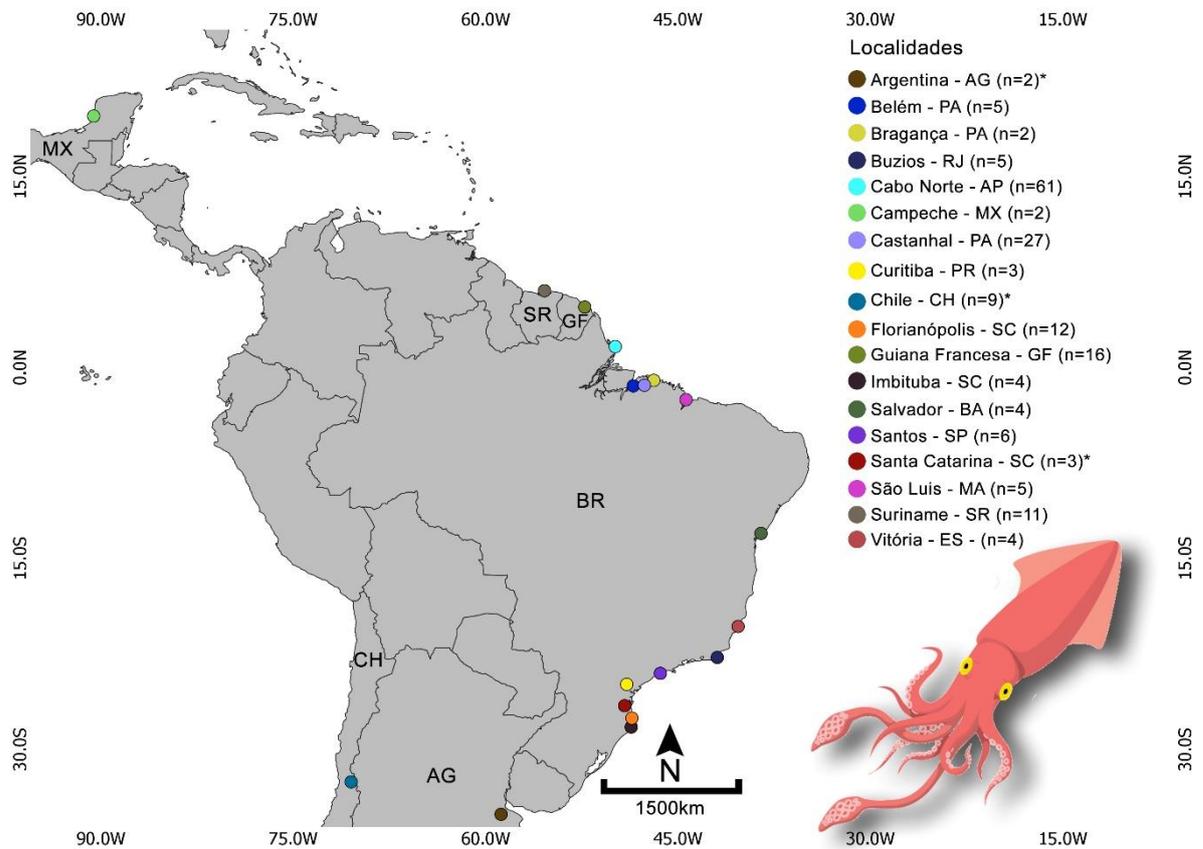
139           Visto que, no Brasil as leis de comércio para cefalópodes não exigem que todos os  
140 produtos contenham nos rótulos das embalagens o nome comum e o nome científico das  
141 espécies que estão sendo comercializadas, estes fatores promovem as substituições de produtos  
142 pesqueiros de forma intencional fato este que pode provocar prejuízos econômicos aos  
143 consumidores. No entanto, a União Europeia na tentativa de buscar soluções para diminuição  
144 de fraude comercial instituiu regulamentações (EC 104/200; EC 2065/2001) que exigem que  
145 os países membros disponibilizem listas oficiais com nomes científicos, comuns e comerciais  
146 das espécies de pescados que estão sendo comercializados, assim como exigem que nos rótulos  
147 dos produtos também esteja bem informado (Brito 2013).

148           Levando em consideração toda a problemática exposta referente a comercialização de  
149 cefalópodes, bem como a ausência de legislação oficial de rotulagem destes produtos que são  
150 comercializadas no Brasil, o presente estudo teve como objetivo utilizar o fragmento do gene  
151 16S rDNA para identificar quais espécies de lulas estão sendo comercializadas, tanto na forma  
152 de bandejas contendo animais processados, como espécimes vendidos inteiros nos mercados e  
153 feiras de peixes em alguns países da América Latina com o intuito de delimitar se há indícios  
154 de substituições intencionais ao comércio das espécies de cefalópodes.

155 **Material & Métodos**

156 Amostragem

157 Para o presente estudo, tanto lulas inteiras como processadas foram coletadas  
158 diretamente de pescadores ou de redes de supermercado em diferentes regiões do Brasil,  
159 Suriname, México e Guiana Francesa. Para algumas amostras, o local de origem (pesca) e  
160 compra era diferente, sendo todas as informações referentes a estes casos, também devidamente  
161 registradas (amostras compradas em Fortaleza-CE, possuíam a identificação de origem, sendo  
162 provenientes da Argentina e outro pacote comprado em Belém-PA também identificava a  
163 procedência do conteúdo como Chile (Figura 1). Posteriormente, foi retirado de cada amostra  
164 um pequeno pedaço de tecido muscular e armazenado em *ependorf* contendo álcool 70%,  
165 subsequentemente depositado em freezer a  $-4^{\circ}\text{C}$  até o momento da extração de DNA. Com  
166 relação às amostras compradas na forma processada, cada anel contido na embalagem, foi  
167 considerado como uma amostra diferente. Cada etiqueta com o nome genérico de identificação  
168 atribuído, bem como nome do distribuidor e empresa de pesca foi registrado.



169

170

171 **Fig. 1:** Mapa com as localidades elaborado no Qgis, onde foram obtidas as amostras de lulas  
172 do presente estudo. Os círculos demonstram as localidades associadas as suas respectivas cores.

173 Os nomes das localidades com (\*) indicam os locais de origem das lulas de alguns pontos  
174 amostrados conforme detalhado na Tabela 1. Abreviações representam o nome de cada país,  
175 sendo: AG=Argentina; BR=Brasil; CH=Chile; GF=Guiana Francesa; MX=México;  
176 SR=Suriname. Shapefile com projeção WGS84. Edição feita no programa Photoshop Cc2023.  
177 Fonte: Shapefile IBGE.

## 178 Extração, PCR e Sequenciamento de DNA

179 O DNA total foi extraído a partir do tecido muscular utilizando o protocolo de extração  
180 de DNA CTAB (Doyle e Doyle 1987). O fragmento do gene 16S rDNA foi isolado e  
181 amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os iniciadores: L1987 (5'-  
182 GCCTCGCCTGTTTACCAAAAAC-3') e H2609 (5'- CGGTCTGAACTCAGATCACGT-3')  
183 (Palumbi et al. 1991). As reações foram realizadas contendo um volume final de 15 µl, com 2,4  
184 µl de dNTP (1,25mM), 1,5 µl de solução tampão (10X), 0,8 µl de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0,6 µl de  
185 cada iniciador, 0,12 µl de Taq DNA polimerase (5 U/ul), 1 µl de DNA genômico (200 ng/ul),  
186 e água ultrapura para completar o volume final da reação.

187 As reações foram realizadas de acordo com Sales et al. (2013), cujo protocolo consiste  
188 em: desnaturação inicial de 94°C durante 2 min, seguido por 30 ciclos de desnaturação a 94°C  
189 durante 30 s, hibridização a 51°C durante 1 min e extensão a 72°C durante 2 min, com a etapa  
190 de extensão final de 72°C no período de 7 min. A qualidade e o tamanho do produto de PCR  
191 foram verificados usando eletroforese em gel de agarose a 2%. Para o sequenciamento dos  
192 fragmentos obtidos, as PCR's foram previamente purificadas usando isopropanol 65% e etanol  
193 70%, e as reações de sequenciamento foram realizadas com reagentes do Kit BigDye  
194 Terminator V3.1 Cycle e então sequenciadas no sequenciador SeqStudio Genetic Analyzer  
195 (Applied Biosystems).

## 196 Análise de Dados

197 As sequências de DNA geradas foram alinhadas com a ferramenta de alinhamento  
198 automático CRUSTAL W (Thompson et al. 1997) implementada no programa Bioedit v7.0.9.1  
199 (Hall 1999). Posteriormente as sequências passaram por inspeção visual para eventuais  
200 correções do alinhamento automático, principalmente na região hiper variável do gene 16S  
201 rDNA.

202 Nós utilizamos dois métodos de validação para identificação molecular das amostras do  
203 presente estudo. No primeiro momento, a ferramenta *Blastn*, disponível no site *Genbank*

204 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) foi usada adotando um critério de similaridade  
205 genética de 98% para a assinatura taxonômica específica à cada sequência. Com base no  
206 resultado da análise de similaridade genética (*Blastn*), foram agregadas sequências disponíveis  
207 do NCBI para as inferências filogenéticas subsequentes com as seguintes espécies: *Doryteuthis*  
208 *pleii* Blainville, 1823; *Doryteuthis pealeii* Lesueur, 1821; *Doryteuthis sanpaulensis*  
209 Brakoniecki, 1984; *Lolliguncula brevis* Blainville, 1823; *Illex argentinus* Castellanos, 1960;  
210 *Dosidicus gigas* d' Orbigny, 1835; *Nototodarus sloanii* Gray, 1849; *Uroteuthis duvaucelii* d'  
211 Orbigny, 1835. O número de sequências geradas neste estudo com o código de acesso, bem como  
212 as sequências baixadas do *Genbank* estão disponíveis no material suplementar 1.  
213 Adicionalmente, para a delimitação de espécie como segundo método de identificação, o  
214 modelo evolutivo TIM+F+G4, estimado pelo software ModelFinder (Kalyaanamoorthy et al.  
215 2017), melhor se adequou ao nosso banco de dados. Posteriormente, uma árvore filogenética  
216 de Máxima Verossimilhança com *bootstrap Ultrafast Bootstrap* (Hoang et al. 2018) baseadas  
217 em 1000 pseudorréplicas foi implementada com pacote do programa IQ-tree v2.2.0 (Minh et  
218 al. 2020). O software Figtree v1.4.4 (Rambaut 2010) foi utilizado para edição da árvore  
219 filogenética. Para a visualização dos dados, foram gerados Barplot e PieDonut no Software R  
220 (R Core Team 2022), utilizando o pacote “ggplot2” e “webr”, respectivamente.

## 221 **Resultados**

### 222 Identificação molecular

223 Foram gerados um total de 552pb do fragmento do gene mitocondrial 16S rDNA de 181  
224 amostras de lulas. A comparação das sequências por meio do *Blastn* revelou a presença de oito  
225 espécies que são amplamente comercializadas ao longo da região latino-americana, sendo elas:  
226 *D. pleii*, *D. pealeii*, *D. sanpaulensis*, *L. brevis*, *I. argentinus*, *D. gigas*, *N. sloanii*, *N. gouldi* e  
227 *U. duvalcelii*. (Tabela 1).

228 Todas as sequências avaliadas no presente estudo, quando comparadas aos dados do  
229 *Genbank*, obtiveram uma identificação à nível de espécie com similaridade >98%. Das 181  
230 amostras identificadas, 18 amostras apresentaram similaridade de 100% com *D. pleii* (n=13),  
231 *D. pealeii* (n=2) e *L. brevis* (n=3), das seguintes localidades respectivamente: Bragança,  
232 Florianópolis, Búzios, Campeche e Curitiba. O restante das amostras identificadas (47)  
233 apresenta um valor mínimo de similaridade de 99.80% com *D. pleii* (n=9), *L. brevis* (n=28), *D.*  
234 *sanpaulensis* (n=5) e *D. pealeii* (n=5), das respectivas localidades: São Luís, Imbituba, Santos,  
235 Cabo Norte e Suriname.

236 Além disso, 11 amostras mostraram um valor mínimo de similaridade de 99.79% com  
 237 *I. argentinus* (n=5) e *D. pleii* (n=6) advindas de Santa Catarina, Argentina e Suriname. E 34  
 238 amostras mostraram um valor de similaridade de 99.59% com as espécies *D. pleii* (n=8) e *D.*  
 239 *pealeii* (n=26) de Salvador, Fortaleza, Vitória e Cabo Norte respectivamente. Dentre as  
 240 amostras de Guiana Francesa e Belém, 11 amostras apresentaram um valor mínimo de  
 241 similaridade de 99.43% com as seguintes espécies, *U. duvaucelii* (n=6), *D. pleii* (n=4) e *D.*  
 242 *gigas* (n=1). Por último, 36 amostras obtiveram um valor de 99.41% de similaridade para *D.*  
 243 *gigas*, do Chile (n=9) e Castanhal (n=27). E oito amostras identificadas apresentaram uma  
 244 similaridade de 99.39% com *D. pleii*, advindo do Cabo Norte. Dentre as amostras de  
 245 Florianópolis, seis apresentaram um valor mínimo de 99.21% de similaridade com *I.*  
 246 *argentinus*, enquanto 10 amostras restantes da Guiana Francesa apresentaram um valor de  
 247 98.88% para *N. sloanii*. De acordo com os nossos resultados, não foi encontrada nenhum tipo  
 248 de substituição com as amostras analisadas no presente estudo.

249 **Tabela 1.** Espécies de lula identificadas indicando a localidade, identificação do rótulo, tipo de  
 250 processamento e valor mínimo de similaridade genética. Os números sobrescritos em algumas  
 251 localidades indicam o local de origem das amostras: 1 – Santa Catarina; 2 – Argentina; 3 –  
 252 Chile. A tabela estendida com os resultados do *Blastn* individualizados estão disponíveis no  
 253 material suplementar 1.

Localidade	Identificação do Rótulo	Tipo de processamento/ Local de Venda	Blastn ID (%)	Identificação Molecular
Bragança – PA	-	Inteira (Feira)	100	<i>D. pleii</i> (n=2)
Florianópolis – SC	Lula Nacional	Inteira (Supermercado)	100	<i>D. pleii</i> (n=6)
	Lula	Inteira (Supermercado)	>99.21	<i>I. argentinus</i> (n=6)
Salvador-BA	-	Inteira (Feira)	>99.59	<i>D. pleii</i> (n=4)
Fortaleza-CE <sup>1</sup>	Lula Brasileira	Inteira (Feira)	>99.79	<i>I. argentinus</i> (n=3)
Fortaleza-CE <sup>2</sup>	Lula	Inteira (Feira)	>99.79	<i>I. argentinus</i> (n=2)
Vitória-ES	Lula	Inteira (Feira)	>99.59	<i>D. pleii</i> (n=4)
Buzios-RJ	Lula	Inteira (Feira)	100	<i>D. pleii</i> (n=5)
São Luis-MA	Lula	Inteira (Feira)	>99.8	<i>D. pleii</i> (n=5)
Imbituba-SC	Lula	Inteira (Feira)	>99.8	<i>D. pleii</i> (n=4)
Campeche-Mx	Lula	Inteira (Feira)	100	<i>D. pealeii</i> (n=2)
Santos-SP	Lula	Inteira (Feira)	99.8	<i>L. brevis</i> (n=1)

	Lula	Inteira (Feira)	99.8	<i>D. sanpaulensis</i> (n=5)
Belem-PA <sup>3</sup>	Lula Nacional	Processada (Supermercado)	>99.41	<i>D. gigas</i> (n=9)
Cabo norte-AP	Lula	Inteira (Feira)	>99.39	<i>D. pleii</i> (n=8)
	Lula	Inteira (Feira)	>99.59	<i>D. pealeii</i> (n=26)
	Lula	Inteira (Feira)	>99.80	<i>L. brevis</i> (n=27)
Castanhal-PA	Lula Nacional	Processada (Supermercado))	>99.41	<i>D. gigas</i> (n=27)
Suriname-SR	-	Inteira (Feira)	>99.79	<i>D. pleii</i> (n=6)
	-	Inteira (Feira)	>99.80	<i>D. pealeii</i> (n=5)
Curitiba-PR	-	Inteira (Feira)	100	<i>L. brevis</i> (n=3)
Guiana	Calmars marinés	Processada (Supermercado)	>98.88	<i>N. sloanii</i> (n=10)
Francesa-GF	Petits Calmars marinés	Processada (Supermercado)	>99.43	<i>U. duvaucelli</i> (n=6)
Belém-PA	Lula G Inteira	Inteira (Supermercado)	>99.80	<i>D. pleii</i> (n=4)
	Lula em Anéis	Processada (Supermercado)	99.79	<i>D. gigas</i> (n=1)

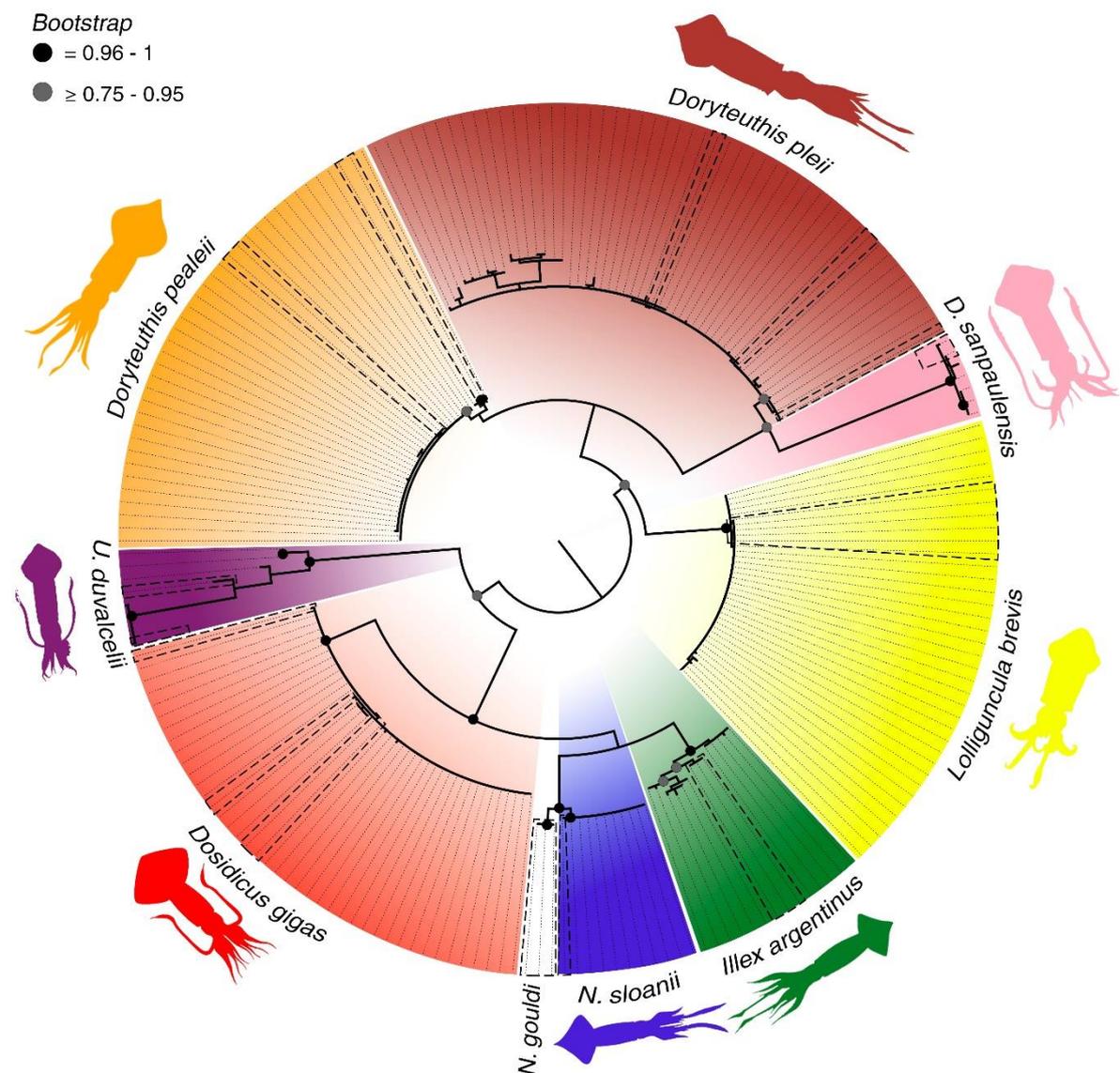
254

255           Foram adicionadas 29 sequências provenientes do *Genbank*, baixadas com base no grau  
256 de similaridade das sequências previamente identificadas, sendo 27 delas relativas as espécies  
257 identificadas com *Blastn* e três sequências da espécie *N. gouldi*, resultando em um alinhamento  
258 final de 210 sequências. Todas as sequências anteriormente identificadas no *Blastn* foram  
259 recuperadas em clados altamente suportados, separando duas famílias geneticamente distintas,  
260 sendo elas Loliginidae e Ommastrephidae, com cinco e três espécies identificadas,  
261 respectivamente. Os resultados encontrados com a árvore de Máxima Verossimilhança foram  
262 concordantes com a análise de similaridade genética (NCBI-Blast), exceto em alguns casos  
263 referentes às estruturações dentro de algumas espécies (Fig. 2).

264           Dentro da família Loliginidae foram recuperados três gêneros, *Lolliguncula*,  
265 *Doryteuthis* e *Uroteuthis*, totalizando 123 indivíduos identificados. A espécie mais abundante  
266 foi *D. pleii* com 48 indivíduos formando um ramo com 78% de suporte associadas a diferentes  
267 regiões (Tabela 1, Figura 2). *D. pealeii* corresponde ao táxon com a segunda maior abundância  
268 entre os Loliginídeos somando 33 sequências identificadas formando dois clados com valores  
269 de suporte 96% e 78% respectivamente. *L. brevis* (n=31) formou um agrupamento junto as

270 sequencias baixadas do *Genbank* de acordo com o respectivo táxon com o valor de suporte de  
271 97%, não formando estruturas dentro do clado. *U. duvaucelii* (n= 6) foi recuperado com alto  
272 valor de suporte (99%), no entanto havendo indícios de forte estruturas de agrupamento  
273 distintos com sequências provenientes do *Genbank*. *D. sanpaulensis* (n=5) formou um  
274 agrupamento com 100% de valor de suporte com uma estruturação estabelecida entre  
275 sequências provenientes de Santos-SP.

276         Para a família Ommastrephidae também foram recuperados três gêneros, *Dosidicus*,  
277 *Illex* e *Nototodarus* com um total de 58 indivíduos identificados. A espécie mais abundante para  
278 essa família foi o *D. gigas* com 37 indivíduos formando um ramo com 99% de valor de suporte.  
279 *I. argentinus* (n=11) formou um clado com 98% de suporte e mais uma estruturação com 87%  
280 de suporte com sequencias provenientes de Florianópolis-SC. No caso das sequencias de *N.*  
281 *sloanii* (n=10) o valor de suporte de 97% separou-as de *N. gouldi*, demonstrando também um  
282 valor de suporte de 99% que evidencia essa diferença entre as sequências, visto que o  
283 agrupamento com *N. sloanii* ficou com o valor de 97% junto com as sequências provenientes  
284 do *Genbank*. Na análise anterior, algumas sequências obtiveram similaridade genética alta com  
285 *N. goulgi*, no entanto, foi possível observar a separação com valor de *bootstrap* elevado entre  
286 os congêneres presentes no banco de dados.



287

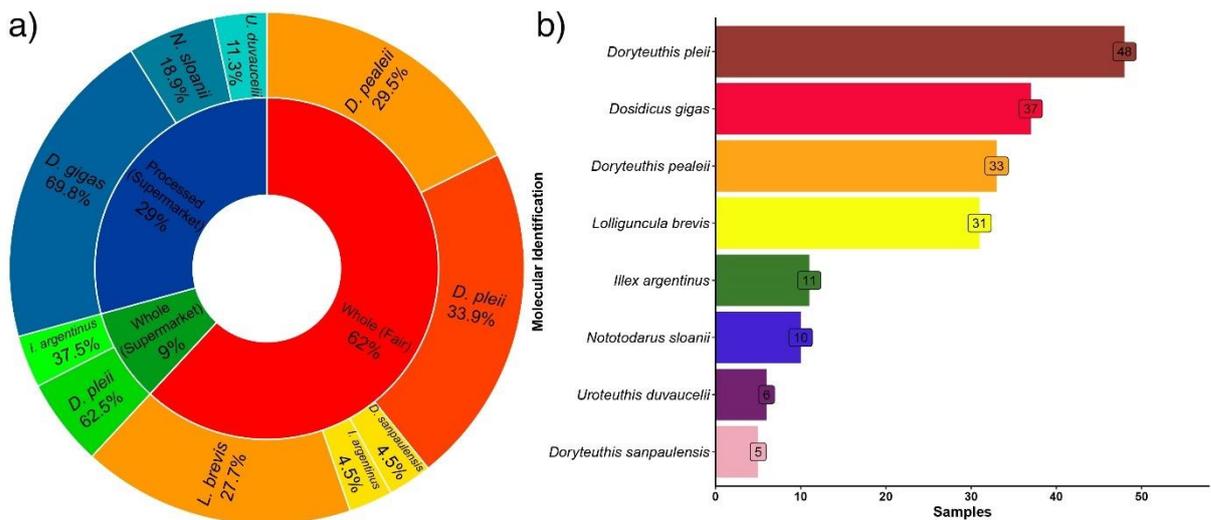
288 **Fig. 2:** Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança das espécies de lulas identificadas no  
 289 presente estudo a partir do fragmento do gene ribossomal 16S rDNA. As ilustrações foram  
 290 geradas de acordo com o shape de cada espécie, as cores associadas aos indivíduos são: *D. pleii*  
 291 – Marrom; *D. pealeii* – Laranja; *D. sanpaulensis* – Rosa; *L. brevis* – Amarelo; *D. gigas* –  
 292 Vermelho; *U. duvalcelii* – Roxo; *N. sloanii* – Azul e *I. argentinus* – Verde. Edição da imagem  
 293 a posteriori foi realizada utilizando o programa Photoshop Cc2023. As formas tracejadas  
 294 indicam o posicionamento das sequências provenientes do *Genbank* associadas aos clados das  
 295 respectivas espécies.

296 Formas de comercialização

297 De acordo com os nossos resultados, 71% das amostras estavam sendo vendidas de  
 298 forma inteira e 29% de forma processada (Fig. 3a). A maioria dos indivíduos comercializados

299 compreende a família Loliginidae, especialmente indivíduos que estavam sendo  
 300 comercializados de forma inteira nas feiras. A espécie mais frequente encontrada foi *D. pleii*  
 301 (Fig. 3b) do Atlantico Sul Ocidental distribuída entre os estados do Amapá, Pará, Maranhão,  
 302 Bahia, Rio de Janeiro, Espírito Santo e Santa Catarina, todos as amostras estavam sendo  
 303 vendidas na forma inteira em supermercado e feiras.

304 A segunda espécie com maior frequência encontrada *D. gigas* compradas no estado do  
 305 Pará. No caso desta espécie, os indivíduos estavam sendo comercializados de forma processada  
 306 (cortado em anéis), contendo nas rotulagens informações genéricas de “Lula Nacional”, “Lula  
 307 Brasileira”, ou somente “Lula”. Observa-se a ocorrência de erro de rotulagem em 100% dos  
 308 produtos, onde estas amostras são advindas das cidades de Belém-PA e Castanhal-PA. Somente  
 309 uma amostra que estava sendo comercializada em supermercado em Bélem-PA encontrava  
 310 sendo vendida sem informação nenhuma no rótulo do produto, contendo informação unicamente  
 311 na etiqueta do freezer do supermercado como “Lula em anéis”.



312  
 313 **Fig. 3.** Gráficos demonstrando os resultados quantificados do presente estudo. a) *PieDonut*  
 314 indicando as amostras identificadas com base no tipo de processamento e local de  
 315 comercialização das lulas. b) *Barplot* resumando a abundância das espécies de lulas  
 316 comercializadas.

317  
 318 A terceira espécie mais encontra foi a *D. pealeii* proveniente do Amapá e do México.  
 319 Outra espécie frequente foi *L. brevis*, senda esta proveniente de duas localidades Cabo Norte-  
 320 AP e Santos-SP, sendo mais encontra no estado Amapá com (n=27) amostras, todos os  
 321 indivíduos estavam sendo comercializados em feiras de forma inteira.

322 Dentre as espécies comercializadas com menos frequência identificada neste estudo

323 foram *I. argentinus*, encontradas tanto em feiras de peixe na cidade de Fortaleza-CE, porém  
324 tendo como local de origem no rótulo a Argentina, e redes de supermercado de Santa Catarina  
325 de forma inteira. A espécie *N. sloanii* também foi identificada com menor frequência, sendo  
326 comercializada na Guiana Francesa de forma processada (saladas) em supermercado, seguida de  
327 *U. duvaucelii* que também foi comercializada na Guiana Francesa de forma processada  
328 (saladas), seguida de *D. sanpaulensis* e *D. pealeii* do Norte do Atlântico Sul, linhagem  
329 geneticamente distinta de *D. pealeii* do Atlântico Norte (Sales et al. 2013).

### 330 **Discussão**

331 Rótulos incorretos acabam prejudicando a escolha consciente do consumidor,  
332 representando alguns riscos pontenciais à saúde (Tartre 2016), bem como gerando perdas  
333 financeiras aos consumidores (Van Der Heuden et al. 2010). Adicionalmente, do ponto de vista  
334 da conservação, “mascaram” a comercialização de espécies com status de pesca proibido  
335 (Palmeira et al. 2013; Zeng et al. 2019) ou, quando comercializados ao longo de todo o ano,  
336 espécies que estejam passando por período de defeso reprodutivo acabam sendo capturadas,  
337 acarretando desta forma, possíveis impactos futuros em seu recrutamento e estoque  
338 populacional (Stawitz et al. 2016).

339 O processamento muitas das vezes remove ou danifica características diagnósticas que  
340 são importantes para a identificação de espécies por meio da taxonomia convencionais (Barbuto  
341 et al. 2010; Di pinto et al. 2013) o que acaba colaborando para as possíveis substituições de  
342 espécies de maior valor comercial por outras de valor inferior. Os resultados gerados no presente  
343 estudo indicam que, quantidade de erro de rotulagem ocorreu em produtos que tinham  
344 espécimes vendidos em 2015 de forma processada, em anéis de lula comercializados com o  
345 nome genérico de “Lula Nacional”, ou seja, nome que sugere ao consumidor que o produto é  
346 pescado no Brasil. Todas as amostras compradas desta forma foram identificadas geneticamente  
347 como *D. gigas*, uma espécie de lula que ocorre apenas no Oceano Pacífico e não em águas  
348 brasileiras (Markaida et al. 2005; Jereb e Roper 2010). Uma única amostra que estava sendo  
349 vendida de forma processada no supermercado em Belém, com a identificação no freezer de  
350 “Lula em anéis” em junho de 2022 que também foi identificada como *D. gigas*, não estava de  
351 acordo com a Portaria SDA Nº 544, de 14 de março de 2022, artigo 16º no parágrafo 1º, onde  
352 a mesma enfatiza que “Para produtos da espécie *D. gigas* é obrigatório a inclusão de  
353 nomenclatura científica, como o aposto explicativo á denominação de venda de produto”. Sendo  
354 esta a única espécie de cefalópodes a qual existe uma portaria que regulamenta a

355 comercialização em território brasileiro.

356 Entretanto, nem sempre a substituição de espécies comerciais pode ser caracterizada  
357 como fraude comercial intencional. Uma porção da rotulagem inadequada ocorre de forma não  
358 intencional, muito por conta dos caracteres morfológicos utilizados para a identificação de  
359 espécies que podem ser facilmente equivocados, ou simplesmente quando se usa nomes  
360 vernaculares que são comuns a mais de duas espécies. Até certo nível, a rotulagem errada pode  
361 ser resultado de dificuldade de identificação de espécies, o que ocorre principalmente em grupos  
362 com poucos caracteres morfológicos informativos e com amplo histórico de espécies crípticas  
363 como membros da família Loliginidae (Sales et al. 2013; Cheng et al. 2014; Costa et al. 2021)  
364 e Ommastrephidae (Fernández-Álvarez et al. 2020). A confusão também pode surgir devido ao  
365 fato de diferentes espécies possuírem um nome vernacular, ou por diferentes nomes vulgares  
366 em diferentes regiões para a mesma espécie (Brito et al. 2015). Entretanto, normalmente  
367 as substituições de espécies que sempre caracterizam fraude comercial, tem por objetivo  
368 obtenção de lucro maior (Pauly et al. 2005; Worm et al. 2006).

369 Com relação as espécies compradas inteiras provenientes de feiras no norte do Atlântico  
370 Sul que foram identificadas no presente estudo, algumas considerações devem ser feitas. A  
371 fauna de lulas proposta para estas regiões é muito similar a relatada para a algumas regiões da  
372 Costa Norte do Brasil (Jereb e Roper, 2010). A presença de *D. pleii*, *L. brevis* e *D. pealeii* nestas  
373 localidades esta de acordo com o proposto por revisões moleculares recentes com espécimes  
374 oriundos da Costa norte do Brasil (Sales et al. 2011; 2013; 2014; 2017; Costa et al. 2021). Como  
375 as duas espécies de *Doryteuthis* identificadas no presente estudo apresentam uma elevada  
376 importância comercial, tanto no Brasil, quanto na América do Norte (Herke e Foltz 2002; Jereb  
377 e Roper 2010; Postuma e Gasalla 2015) é importante esclarecer que a linhagem de *D. pleii*  
378 comercializada no Brasil, corresponde a espécie de fato (Sales et al. 2017), enquanto que a  
379 linhagem explorada na América do Norte corresponde a uma espécie que até o momento não  
380 foi descrita. A mesma delimitação específica também é feita para *L. bevis* (Sales et al. 2014) e,  
381 embora esta não tenha importância comercial (Good et al. 2023), na costa Norte do Brasil,  
382 existe consumo pelos pescadores. Para *D. pealeii*, o padrão é o oposto, sendo a linhagem que  
383 ocorre no Brasil, uma nova espécie ainda não descrita (Sales et al. artigo em revisão).

384 De acordo com os nossos resultados, a maioria das amostras estavam de acordo com a  
385 fauna encontrada na costa brasileira (Haimovici et al. 2009), indicando que as espécies que  
386 estavam sendo comercializados em feiras são provenientes da pesca artesanal, o que colabora  
387 para a falta de fiscalização pelos órgãos responsáveis, o que dificulta a verificação das

388 ocorrências de fraude. A ausência de substituição entre os produtos que foram utilizados no  
389 presente estudo denota a dificuldade que é verificar a ocorrência de substituição para as  
390 amostras que são comercializadas no Brasil, por conta da ausência de informação no rótulo,  
391 como o nome da espécie que está sendo vendido para o consumidor, desse modo, tornando  
392 difícil rastrear a substituição de uma espécie de lula por outra do mesmo gênero, ou família.

393 Para as espécie do presente estudo em relação as outras espécies vendidas em mercados  
394 do Brasil e em países da América Latina obtidos, não se constatou caso de fraude comercial,  
395 mas sim erro de rotulagem, visto que os espécimes eram comercializados apenas como “Lula”.  
396 As sequências que foram identificadas como *U. duvaucelli* demonstraram indícios de forte  
397 estruturas de agrupamento diferentes com sequências advindas do *Genbank*. Este resultado  
398 está em concordância com outros estudos previos que já indicavam a presença de multiplas  
399 linhagens dentro de *U. duvaucelli*.

400 *U. duvaucelli*, apresenta um relevante polimorfismo morfológico e genético dentro de  
401 uma área geográfica mais ampla (Sin et al. 2009). A espécie apresenta importancia comercial  
402 na região asiática, sendo principalmente pescada ainda de forma artesanal, mas ja constitui um  
403 volume elevado de exportações principalmente da Tailândia para outros países. Para a Índia, a  
404 especie representa 68% das espécies de cefalópodes exportadas pelo país (Jereb e Roper 2010).  
405 O clado formado na árvore de Máxima Verosimilhança (ML) reforçam esse achado, no entanto,  
406 a identificação por *Blastn* reitera que todas as sequências geradas correspondem ao táxon em  
407 questão. Diferentes formas de *U. duvaucelli* são reconhecidos pela pesca comercial, contendo  
408 uma forma relativamente grande e outra menor do Golfo de Aden e do Mar Arábico (Nesis  
409 1987), e outras duas outras formas, uma mais robustas e uma mais esbelta do Pacífico Oriental  
410 (Okutani 2005). Nesse sentido, a diversidade do grupo pode estar subestimada, implicando  
411 significativamente no manejo e na conservação da espécie. Os resultados de revisões  
412 moleculares realizadas nos últimos anos reforçam a presença de diferentes espécies dentro de  
413 *U. duvaucelli* (Sales et al. 2013; Krishnan et al. 2022). Um dos grandes problemas do ponto de  
414 vista de manejo pesqueiro e exploração de recursos, decorre justamente quando uma  
415 determinada espécie alvo de exploração possui uma espécie críptica, pois do ponto de vista de  
416 manejo e exploração comercial, não seria uma única especie sob exploração, mas duas ou  
417 multiplas ao mesmo tempo, o que pode acarretar a redução do estoque populacional destas  
418 linhagens, ja que possivelmente, o período reprodutivo e área de reprodução muitas vezes são  
419 distintos entre elas (Avisé 1996)

420 Por fim, as sequências de *N. sloanii* ficaram bem separadas na árvore filogenética,

421 porém, para algumas sequências o *Blastn* indicou uma similaridade elevada com *N. gouldi*, no  
422 entanto, na mesma topologia, *N. sloanii* e *N. gouldi* formaram clados distintos com alto valor  
423 de suporte. Uma justificativa para explicar esse alto nível de similaridade entre as espécies é  
424 que antes *N. gouldi* era considerada como uma subespécie de *N. sloanii*. De acordo com as  
425 informações contidas no rótulo da embalagem que essas amostras vieram, a área de pesca da  
426 FAO era 81, Pacífico, cuja mesma condiz com a área de distribuição da espécie. Vale ressaltar  
427 que as amostras identificadas como *N. sloanii* eram proveniente da Guiana Francesa e estavam  
428 sendo comercializadas processadas em supermercados, contendo todas as informações  
429 referentes a rotulagem descrita pela União Européia na regulamentação “EC 104/200; EC  
430 2065/2001”. Os dados obtidos na FAO indicam que as capturas globais para essa espécie teve  
431 uma diminuição no ano de 2021, chegando a um volume de 29.832 toneladas, dados inferiores  
432 aos anos de 2020 e 2019 que tiveram um volume de 41.928 e 43.795 de toneladas,  
433 respectivamente.

434         Devido ao fato das espécies de cefalópodes apresentarem plasticidade morfológica, a  
435 utilização de ferramentas moleculares se torna necessária para uma correta identificação e  
436 rotulagem das espécies comercializadas. Visto que, não existe uma legislação brasileira  
437 abrangente para cefalópodes que exija nos rótulos o nome comum e científico de todas as  
438 espécies comercializadas, não existindo também uma lista oficial contendo os nomes comuns,  
439 comerciais ou científicos das espécies vendidas no país.

## 440 **Conclusão**

441 Com base nos resultados do presente estudo, as amostras identificadas como *D. gigas*  
442 que estavam sendo comercializadas de forma processadas (cortadas em anéis) em  
443 supermercados, foram consideradas rotulagem incorretas, visto que estavam sendo vendidas  
444 como “Lula Nacional”, “Lula” ou “Lulas em Anéis”. Todas as outras espécies identificadas  
445 no presente estudo, não foram encontradas nenhuma ocorrência de substituição intencional ou  
446 não intencional. Devido ao fato das espécies de cefalópodes apresentarem alta plasticidade  
447 morfológica, a utilização de ferramentas moleculares se torna necessária para uma correta  
448 identificação e rotulagem das espécies que estão comercializadas. Com os elevados níveis de  
449 rotulagens incorretas registradas, o presente estudo mostra a importância de utilizar métodos  
450 moleculares que auxiliem na identificação de espécies de lulas que são comercializadas. A  
451 falta de uma legislação brasileira específica sobre rotulagem para todos os produtos de  
452 cefalópodes da fauna brasileira, pode favorecer as substituições intencionais e não  
453 intencionais, trazendo problemáticas como fraude econômica, ou substituições de espécies.

454 **Referências**

- 455 Anfacó-Cecopesca (2018) IV Forum of Innovation and Technology of Anfacó-Cecopesca:  
456 “Innovation and Biotechnology for a more competitive Marine and Food sector” 10.9.2018.  
457 <https://anfacó.es/ponencias-del-iv-foro-de-innovacion-y-tecnologia-de-anfacó-cecopesca-2/>.  
458 Accessed 02 Feb 2023
- 459 Arkhipkin AI et al (2015) World squid fisheries. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*.  
460 23:92-252. <https://doi.org/10.1080/23308249.2015.1026226>
- 461 Avise JC (1996) Toward a regional conservation genetics perspective: phylogeography of  
462 faunas in the southeastern United States. In Avise JC, Hamrick JL, Chapman and Hall (eds.),  
463 *Conservation genetics: case histories from nature*. New York.
- 464 Barbuto M, Galimberti A, Ferri E, Labra M, Malandra R, Galli P (2010) DNA barcoding  
465 reveals fraudulent substitutions in shark seafood products: The Italian case of “palombo”  
466 (*Mustelus* spp.). *Food Research International* 43:376–381.  
467 <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.10.009>
- 468 Bonnaud L, Boucher-rodóni R, Monnerot M (1994) Phylogeny of decapod cephalopods based  
469 on partial 16S rDNA nucleotide sequences. *Comptes rendus de l'Académie des sciences. Serie*  
470 *III, Sciences de la vie* 317:581-588.
- 471 Boore JL, Brown WM (1994) Mitochondrial genomes and phylogeny of mollusks. *Nautilus*  
472 *Suppl* 2:61-78
- 473 Boore JL (1999) Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research* 27:1767-1780
- 474 Brito MA, Schneider H, Sampaio I, Santos S (2015) DNA barcoding reveals high substitution  
475 rate and mislabeling in croaker fillets (Scianidae) marketed in Brazil: The case of “pescada  
476 branca” (*Cynoscion leiarchus* and *Plagioscion squamosissimus*). *Food Research International*  
477 70:40-46. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.01.031>
- 478 Caddy JF, Rodhouse PG (1998) Cephalopod and groundfish landings: evidence for ecological  
479 change in global fisheries? *Rev. Fish Biol. Fish* 8:431–444

480 Cawthorn DM, Baillie C, Mariani S (2018) Generic names and mislabeling conceal high species  
481 diversity in global fisheries markets. *Conservation Letters* 11: e12573.  
482 <https://doi.org/10.1111/conl.12573>

483 Chapela MJ, Sotelo CG, Pérez-martin RI, (2003). Molecular identification of Cephalopods  
484 species by FINS and PCR-RFLP of a cytochrome b gene fragment European. *Food Research*  
485 *and Technology* 217:524-529. <https://doi.org/10.1007/s00217-003-0788-y>

486 Cheng SH, Anderson FE, Bergman A, Mahardika GN, Muchilsin ZA, Dang BT, et al. (2014)  
487 Molecular evidence for co-occurring cryptic lineages within the *Sepioteuthis cf. lessoniana*  
488 species complex in the Indian and Indo-West Pacific Oceans. *Hydrobiologia*, 725, 165-188.

489 Costa TA, Sales JB, Markaida U, Granados-Amores J, Gales SM, Sampaio I, Vallinoto M,  
490 Rodrigues-Filho LFS, Ready, JS (2021) Revisiting the phylogeny of the genus *Lolliguncula*  
491 Steenstrup 1881 improves understanding of their biogeography and proves the validity of  
492 *Lolliguncula argus* Brakonieccki & Roper, 1985. *Molecular phylogenetics and evolution*  
493 154:106968

494 Di Pinto A, Di Pinto P, Terio V, Bozzo G, Bonerba E, Ceci E, Tantillo G (2013) DNA barcoding  
495 for detecting market substitution in salted cod fillets and battered cod chunks. *Food Chem*  
496 141:1757–1762. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.093>

497 Doyle JJ, Doyle JL (1987). A Rapid DNA Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh  
498 Leaf Tissue. *Phytochemical Bulletin* 19:11-15

499 FAO (2016) The state of world fisheries and aquaculture 2016. Contribution to food security  
500 and nutrition for all, Rome, p 224

501 FAO (2018) The state of world fisheries and aquaculture. Fulfilling the objectives of sustainable  
502 development, Rome, <http://www.fao.org/3/i9540en/I9540EN.pdf>

503 FAO (2020) The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action.  
504 Rome. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>

505 Fernández-Álvarez FÁ, Braid HE, Nigmatullin CM, et al. (2020). Global biodiversity of the  
506 genus *Ommastrephes* (Ommastrephidae: Cephalopoda): an allopatric cryptic species complex.  
507 *Zoological Journal of the Linnean Society*, 190:460-482.

508 Gales SM, Ready JS, Sabaj MH, Bernt MJ, Silva DJF, Oliveira C, Oliveira G, Sales JBL (2022)  
509 Molecular diversity and historical phylogeography of the widespread genus *Mastiglanis*  
510 (Siluriformes: Heptapteridae) based on palaeogeographical events in South America.  
511 Biological Journal of the Linnean Society 135:322–335.  
512 <https://doi.org/10.1093/biolinnean/blab150>

513 Good JT, Kendrick MR, Podolsky RD, Whitaker JD, Kingsley-Smith PR (2023) Life History  
514 Patterns of the Atlantic Brief Squid, *Lolliguncula brevis* (Blainville, 1823), in the Charleston  
515 Harbor Estuary, South Carolina, USA. Journal of Shellfish Research 42:113-123.  
516 <https://doi.org/10.2983/035.042.0112>

517 Hall TA (1999). BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis  
518 Program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series, 41, 95-98.

519 Haimovici M, et al. (2009) Biomass and fishing potential yield of demersal resources from the  
520 outer shelf and upper slope of southern Brazil. Latin American Journal of Aquatic Research  
521 37:395-408.

522 Hebert PD, Cywinska A, Ball SL, de Waard JR (2003) Biological identifications through DNA  
523 barcodes. Proc. R. Soc. Lond B 270:313–321. <http://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>

524 Hellberg RSR, Morrissey MT (2011) Advances in DNA-Based Techniques for the Detection  
525 of Seafood Species Substitution on the Commercial Market. JALA: Journal of the Association  
526 for Laboratory Automation 16:308-321. <https://doi.org/10.1016/j.jala.2010.07.004>

527 Herke SW, Foltz DW (2002) Phylogeography of two squid (*Loligo pealei* and *L. plei*) in the  
528 Gulf of Mexico and northwestern Atlantic Ocean. Marine Biology, 140, 103-115.

529 Hoang DT, Chernomor O, von Haeseler A., Minh BQ, Vinh LS (2018) UFBoot2: Improving  
530 the ultrafast bootstrap approximation. Mol. Biol. Evol 35:518–522.  
531 <https://doi.org/10.1093/molbev/msx281>

532 Hoeh WR, Steward DT, Sutherland BW, Zouros E (1996) Cytochrome c oxidase sequence  
533 comparisons suggest an unusually high rate of mitochondrial DNA evolution in *Mytilus*  
534 (Mollusca: Bivalvia). Molecular Biology and Evolution 13:418-421.  
535 <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025600>

536 Hollingsworth PM, Graham SW, Little DP (2011) Choosing and using a plant DNA barcode.  
537 PloS one 6:19254. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019254>

538 Jereb P, Roper CF (2010) Family Loliginidae: In FAO (ed) Cephalopods of the world. An  
539 annotated and illustrated catalogue of species known to date, 2nd edn pp 38-117

540 Johnson HM (2007) Annual Report on the United States Seafood Industry. Jacksonville, Oreg.:  
541 H.M. Johnson & Associates, 14th edn 101 p

542 Kalyaanamoorthy S, Minh BQ, Wong TKF, von Haeseler A, Jermin LS (2017) ModelFinder:  
543 Fast model selection for accurate phylogenetic estimates. Nat. Methods 14:587-589.  
544 <https://doi.org/10.1038/nmeth.4285>

545 Krishnan N, Sukumaran S, Sebastian W, Gopalakrishnan A (2022) Morphological and  
546 Molecular Investigations on Squids of the Genera *Uroteuthis* and *Loliolus* from the Indian  
547 Coast to Resolve Taxonomic Ambiguities. Malacologia 64:215-230.  
548 <https://doi.org/10.4002/040.064.0205>

549 Kroetz K, Luque GM, Gephart JA, Jardine SL, Lee P, Moore KC, Steinkruger A, Donlan CJ  
550 (2020) Consequences of seafood mislabeling for marine populations and fisheries management.  
551 Proceedings of the National Academy of Sciences 117:30318–30323.  
552 <https://doi.org/10.1073/pnas.2003741117>

553 Markaida U, Rosenthal JJ, Gilly WF (2005) Tagging studies on the jumbo squid (*Dosidicus*  
554 *gigas*) in the Gulf of California, Mexico.

555 Minh BQ, Schmidt HA, Chernomor O, Schrempf D, Woodhams MD, von Haeseler A, Lanfear  
556 R (2020) IQ-TREE 2: New models and efficient methods for phylogenetic inference in the  
557 genomic era. Mol. Biol. Evol. 37:1530-1534. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015>

558 Mottola A, Piredda R, Catanese G, Lorusso L, Ciccarese G, Di Pinto A (2022) Species  
559 authentication of canned mackerel: Challenges in molecular identification and potential drivers  
560 of mislabelling. Food Control 137:108880. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.108880>

561 Nesis KN (1987) Cephalopods of the world: squids, cuttlefishes, octopuses, and allies.

562 Okutani T (2005) Past, present and future studies on cephalopod diversity in tropical west  
563 Pacific. Phuket Marine Biological Center Research Bulletin 66:39-50.

564 Ospina-Alvarez A, et al. (2022) A network analysis of global cephalopod trade. Scientific  
565 reports 12:1-14. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03777-9>

566 Palmeira, C. A. M.; Rodrigues-Filho, L. F.; Sales, J. B., Vallinoto, M.; Schneider, H., Sampaio,  
567 I., 2013. Commercialization of a critically endangered species (largetooth sawfish, *Pristis*  
568 *perotteti*) in fish markets of northern Brazil: authenticity by DNA analysis. Food Control, v.  
569 34, n. 1, p. 249-252.

570 Palumbi SR (2007) Economic ecology: in the market for minke whales. Nature 447:267–269.  
571 <https://doi.org/10.1038/447267a>

572 Palumbi SR, Martin AP, Romano S, Mcmillian WO, Stice L, Grabowski G (1991) The simple  
573 fool's guide to PCR. Special publication. Honolulu: University of Hawaii. Dept. of Zoology.

574 Pauly D, Watson R, Alder J (2005). Global trends in world fisheries: Impacts on marine  
575 ecosystems and food security. Philosophical Transactions of the Royal Society of London,  
576 Series B 360:5–12. <https://doi.org/10.1098/rstb.2004.1574>

577 Postuma FA, Gasalla MA (2015) Ethogram analysis reveals new body patterning behavior of  
578 the tropical arrow squid *Doryteuthis pleii* off the São Paulo coast. The Biological Bulletin,  
579 229:143-159.

580 R Core Team (2022) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation  
581 for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

582 Rambaut A (2010) FigTree v1.3.1. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh,  
583 Edinburgh. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>

584 Rasmussen RS, Morrissey MT (2008). DNA-based methods for the identification of  
585 commercial fish and seafood species. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf 7:280–295.  
586 <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2008.00046.x>

587 Rodrigues-Filho LF, Nogueira P, Sodré D, Leal, J, Nunes J, Rincon G, Lessa R, Sampaio I,  
588 Vallinoto M, Ready J, Sales J (2023). Evolutionary History and Taxonomic Reclassification of  
589 the Critically Endangered Daggernose Shark, a Species Endemic to the Western Atlantic.  
590 Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research 2023:16p.  
591 <https://doi.org/10.1155/2023/4798805>

592 Roper CFE, Mangold KM (1998) Systematics and distributional relationships of *Illex coindetii*  
593 to the genus *Illex* (Cephalopoda: Ommastrephidae), In: Rodhouse PG, Dawe EG, O’Dor RK  
594 (ed) Squid recruitment dynamics. The genus *Illex* as a model. The commercial *Illex* species.  
595 Influences on variability FAO Fisheries Technical Paper, Rome, pp 13-276

596 Rubinoff D (2006) Utility of mitochondrial DNA barcodes in species conservation.  
597 Conservation Biology 20:1026-1033. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2006.00372.x>

598 Rubinoff D, Cameron S, Will K (2006) A genomic perspective on the shortcomings of  
599 mitochondrial DNA for “barcoding” identification. Journal of Heredity 97:581-594.  
600 <https://doi.org/10.1093/jhered/esl036>

601 Sales JBL, Rodrigues-Filho LFS, Haimovici M, Sampaio I, Schneider H (2011) Molecular  
602 differentiation of the species of two squid families (Loliginidae and Ommastrephidae) based on  
603 a PCR study of the 5S rDNA gene. Food Control 22:96-98.  
604 <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.06.011>

605 Sales JBL, Shaw PW, Haimovici M, Markaida U, Cunha DB, Ready J, Sampaio I (2013) New  
606 molecular phylogeny of the squids of the family Loliginidae with emphasis on the genus  
607 *Doryteuthis* Naef, 1912: Mitochondrial and nuclear sequences indicate the presence of cryptic  
608 species in the southern Atlantic Ocean. Molecular phylogenetics and evolution 68:293-299.  
609 <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2013.03.027>

610 Sales JBL, Markaida U, Shaw PW, Haimovici M, Ready JS (2014) Molecular Phylogeny of the  
611 Genus *Lolliguncula* Steenstrup, 1881 Based on Nuclear and Mitochondrial DNA Sequences  
612 Indicates Genetic Isolation of Populations from North and South Atlantic, and the Possible  
613 Presence of Further Cryptic Species (vol 9, e88693, 2014). PLOS ONE, 9(7).

614 Sales JBL, Haimovici M, Ready JS et al (2019) Surveying cephalopod diversity of the Amazon  
615 reef system using samples from red snapper stomachs and description of a new genus and  
616 species of octopus. Scientific reports 9:1-16. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42464-8>

617 Sharrad AE, Reis-Santos P, Austin J, Gillanders BM (2023) Umbrella terms conceal the sale of  
618 threatened shark species: A DNA barcoding approach. Food Control 148:109606.  
619 <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.109606>

620 Sin YW, Yau Cynthia, Chu KH (2009) Morphological and genetic differentiation of two  
621 loliginid squids, *Uroteuthis (Photololigo) chinensis* and *Uroteuthis (Photololigo) edulis*  
622 (Cephalopoda: Loliginidae), in Asia. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*  
623 369:22-30. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2008.10.029>

624 Stawitz CC, Siple, MC, Munsch SH, Lee Q, Safs RD (2016) Financial and Ecological  
625 Implications of Global Seafood Mislabeling. *Conservation Letters*, DOI, 10.1111/conl. 12328.

626 Tartre RJ (2016) Testing Potential Fish Fraud in Community-Supported Fisheries.

627 Teletchea F, Maudet C, Hänni C (2005) Food and forensic molecular identification: update and  
628 challenges. *Trends in biotechnology* 23:359-366. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2005.05.006>

629 Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The CLUSTAL\_X  
630 windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis  
631 tools. *Nucleic acids research* 25:4876-4882. <https://doi.org/10.1093/nar/25.24.4876>

632 USDA (2018) United States Department of Agriculture Agricultural Research Service National  
633 Nutrient Database for Standard Reference. Tables available in three web pages:  
634 <https://ndb.nal.usda.gov/>

635 Vieites JM, Ruiz CS, Fernández F, Alonso RC (2019) Importance of cephalopod health and  
636 welfare for the commercial sector, In: Gestal, C., Pascual, S., Guerra, Á., Fiorito, G., Vieites, J.  
637 (ed) *Handbook of Pathogens and Diseases in Cephalopods*. Springer, Cham, pp 5-7.  
638 [https://doi.org/10.1007/978-3-030-11330-8\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-030-11330-8_2)

639 Villanueva-Zayas JD, Rodríguez-Ramírez R, Ávila-Villa LA, González-Córdova AF, Reyes-  
640 López MÁ, Hernández-Sierra D, de los Santos-Villalobos S (2021) Using a COI mini-barcode  
641 and real-time PCR (qPCR) for sea turtle identification in processed food. *Journal of Food*  
642 *Processing and Preservation* 45:15808. <https://doi.org/10.1111/jfpp.15808>

643 Virgilio M, Backeljau T, Nevado B, De Meyer M (2010) Comparative performances of DNA  
644 barcoding across insect orders. *BMC bioinformatics* 11:1-10. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-206>

645

646 Von Der Heyden S, et al. (2010) Misleading the masses: detection of mislabelled and  
647 substituted frozen fish products in South Africa. ICES Journal of Marine Science, v. 67, n. 1,  
648 p. 176-185.

649 Warnke K, Soller R, Blohm D, Saint-Paul U (2004). A new look at geographic and phylogenetic  
650 relationships within the species group surrounding *Octopus vulgaris* (Mollusca, Cephalopoda):  
651 indications of very wide distribution from mitochondrial DNA sequences. J. Zool. Syst. Evol.  
652 Research 42:306–312. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0469.2004.00277.x>

653 Watson R, Pauly D (2001) Systematic distortion in world fisheries catch trends. Nature  
654 424:534–536. <https://doi.org/10.1038/35107050>

655 Worm B, Barbier EB, Beaumont (2006) N. Impacts of biodiversity loss on ocean ecosystem  
656 services. Science 314:787–790. <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1132294>

657 Yokobori S, Fukuda N, Nakamura M, Aoyama T, Oshima T (2004) Long-term conservation of  
658 six duplicated structural genes in cephalopod mitochondrial genomes. Mol Biol Evol 21:2034-  
659 46. <https://doi.org/10.1093/molbev/msh227>

660 Zeng L, Armani A, Wen J, et al. (2019) Molecular identification of seahorse and pipefish  
661 species sold as dried seafood in China: A market-based survey to highlight the actual needs for  
662 a proper trade. Food Control, 103, 175-181.

663

#### 664 **Material Suplementar**

665 Suplementar 1: Metadados das sequências utilizadas no presente estudo. Em negrito, indicam  
666 as sequências baixadas do NCBI-Genbank.

667 Suplementar 2: Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança (ML) com os valores de  
668 suporte.

669 Suplementar 3: A) Scrypt do R construído para gerar o *PieDonut*. B) Planilha de dados utilizada  
670 na geração do gráfico.

671 Suplementar 4: A) Scrypt do R construído para gerar o gráfico de barras. B) Planilha de dados  
672 utilizada para gerar o *Barplot*.