

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**Mini-DNA *Barcode* para autenticação de produtos de pescado
processado**

Glauber Batista Gois

Belo Horizonte
2021

Glauber Batista Gois

Mini-DNA Barcode para autenticação de produtos de pescado processado

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

Área de concentração: Genética e Melhoramento Animal

Prof^a. orientadora: Dra. Denise Aparecida Andrade de Oliveira.

Coorientadoras: Prof^a. Dra. Daniela Chemim de Melo Hoyos e Dra. Lissandra Sousa Dalsecco

Belo Horizonte

2021

G616m

Gois, Glauber Batista, 1985-

Mini-DNA Barcode para autenticação de produtos de pescado processado / Glauber Batista Gois . – 2021.

68 f.

Orientadora: Denise Aparecida Andrade de Oliveira

Coorientadora: Lissandra Sousa Dalsecco

Tese (Doutorado) apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção do título de Doutor

Bibliografias: f. 57 a 68.

1. Peixe - Teses - 2. DNA mitocondrial - Teses - 3. Veterinária - Teses - I. Oliveira, Denise Aparecida Andrade de - II. Dalsecco, Lissandra Sousa - III. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária - IV. Título.

CDD – 636.08



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS
GERAISESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

FOLHA DE APROVAÇÃO

Mini-DNA Barcode para autenticação de produtos de pescado

processado Glauber Batista Gois

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia dez de setembro de 2021, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Minas Gerais, constituída pelos seguintes professores:

Dr. Danilo Alves Pimenta Neto

Laboratório Hermes Pardini

Dr. Eduardo Geraldo Alves Coelho

Laboratório de Genética da Escola de Veterinária - UFMG

Profa. Dra. Joana Ribeiro da Glória

Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Dr. Galileu Crovatto Veras

Universidade Federal de Minas Gerais

Profa. Dra. Denise Aparecida Andrade de Oliveira - Orientadora

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte, 26 de janeiro de
2023.



Documento assinado eletronicamente por **Angela Maria Quintão Lana, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 26/01/2023, às 15:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2044155** e o código CRC **55B5546C**.

Dedico essa tese aos meus pais, Maurilio e Marina Góis.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por guiar todos os meus passos nessa caminhada que acaba de ser concluída, por me abençoar sempre, por me enviar em uma bela família e por ter amigos fantásticos.

Agradeço minha família, meus pais: Maurílio e Marina Góis, pelo amor, credibilidade e financiamento, as minhas irmãs, Amanda e Dâmares, pelo apoio de sempre.

À professora Denise, pela orientação sempre esclarecedora e disponível. Por ser a referência do que pretendo seguir. Obrigado por me receber e permitir que eu trabalhe com o que me faz feliz. Pela compreensão, respeito, confiança e conselhos. Obrigado por ser mais que uma orientadora científica!

A minha amiga e coorientadora Dra. Lissandra Sousa Dalsecco, meu muito obrigado.

Agradeço ao apoio e amizade de todos do Laboratório de Genética da Escola de Veterinária.

A todos os meus professores da Universidade Federal de Minas Gerais, pela excelência da qualidade e apoio técnico e intelectual de cada um.

Aos amigos de Ribeirão das Neves e do Couchsurfingbh meu muito obrigado pelos momentos de diversão e lazer.

A CAPES pelo apoio financeiro.

Aos que sempre torceram e colaboraram de maneira direta ou indireta para conclusão deste trabalho: Muito OBRIGADO pela ajuda.

Apesar da redação de uma tese ser um produto de responsabilidade e estresse de natureza individual, sem o apoio contínuo e incondicional da família e a contribuição e a dedicação coletiva dos meus amigos, certamente este trabalho não chegaria a bom termo. A todos eles registro minha mais profunda gratidão

“O correr da vida embrulha tudo; a vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem. Ser capaz de ficar alegre e mais alegre no meio da alegria, e ainda mais alegre no meio da tristeza...”

Guimarães Rosa.

Mini-DNA *Barcode* para autenticação de produtos de pescado processado

1.1. RESUMO

A substituição de espécies é uma forma de fraude em pescados com o propósito principal de ganho econômico. O DNA *Barcode* é uma metodologia que utiliza informações de sequência de DNA específicas de uma espécie para a sua identificação. Trabalhos anteriores estabeleceram a usabilidade de sequências curtas de DNA *Barcode* para identificação de espécimes contendo DNA degradado. Este estudo visa desenvolver um método de mini-DNA *Barcode* para 25 espécies de peixes comumente utilizadas em produtos de pescado na região de Belo Horizonte, MG, Brasil. Quatro pares de *primers* de mini-DNA *Barcode* direcionados a fragmentos curtos da região do código de barras do DNA do citocromo c oxidase I (COI) foram desenvolvidos usando diversas sequências de DNA já depositadas em bancos de dados universais. O método desenvolvido provou-se eficaz para a identificação de espécies em produtos processados de pescado.

Palavras-chaves: Peixes, Processados, Mini-DNA *Barcode*, Citocromo oxidase, *Primers*.

1.2. ABSTRACT

Species substitution is a form of fish fraud for the main purpose of economic gain. DNA Barcode is a methodology that uses species-specific DNA sequence information for its identification. Previous work has established the usability of short Barcode DNA sequences for identifying specimens containing degraded DNA. This study aims to develop a mini-DNA Barcode method for 25 fish species commonly used in fish products in the region of Belo Horizonte, MG, Brazil. Four pairs of mini-DNA Barcode primers targeting short fragments of the cytochrome c oxidase I (COI) DNA barcode region were developed using several DNA sequences already deposited in universal databases. The method developed proved to be effective for identifying species in processed fish products.

Keywords: Fish, Processed, Mini-DNA Barcode, Cytochrome oxidase, Primers.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

- Figura 1:** Sinais de sequenciamento de DNA obtidos com sequenciamento Sanger. Amostras contendo uma única espécie (amostras 38 e 68) apresentam picos únicos (A1 e A2, respectivamente).....32
- Figura 2:** Sinais de sequenciamento de DNA obtidos com sequenciamento Sanger. Amostras controladas contendo misturas duas espécies na proporção de 50% apresentam picos sobrepostos (B1 e B2).65
- Figura 3:** Sinais de sequenciamento de DNA obtidos com sequenciamento Sanger. Amostras contendo várias espécies (amostras 10 e 16) apresentam picos múltiplos (C1 e C2, respectivamente).....66
- Figura 4:** Árvore condensada de *Neighbor-Joining* das distâncias K2P entre fragmentos do gene COI das amostras amplificadas pelos *primers* Fish_miniA_F e Fish_miniA_R.23
- Figura 5:** Árvore condensada de *Neighbor-Joining* das distâncias K2P entre fragmentos do gene COI das amostras amplificadas pelos *primers* Fish_miniA_F e Fish_miniA_R.23
- Figura 6:** Árvore condensada de *Neighbor-Joining* das distâncias K2P entre fragmentos do gene COI das amostras amplificadas pelos *primers* Fish_miniA_F e Fish_miniA_R.23
- Figura 7:** Árvore condensada de *Neighbor-Joining* das distâncias K2P entre fragmentos do gene COI das amostras amplificadas pelos *primers* Fish_miniA_F e Fish_miniA_R.23
- Tabela 1:** *Primers* utilizados na amplificação por PCR e sequenciamento de mini-DNA *Barcode* em produtos de pescado processado.....67
- Tabela 2.** Resultados comparativos dos sequenciamentos para os produtos de pescado processados utilizando os *primers* para mini-DNA *Barcode*.....67
- Tabela 3.** Resultados detalhados para todos os produtos de pescado processados testados neste estudo usando mini-DNA *Barcode*.....14

LISTA DE ABREVIATURAS

%: Por cento
@: arroba
°C: Graus Célsius
A: Adenina
Bar: Barcode
BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*
BOLD: *Barcode of Life Data System*
C: Citosina
COI: Citocromo C Oxidase subunidade I
cytb: Citocromo B
ddPCR: *Droplet Digital Polymerase Chain Reaction*
DNA: ácido desoxirribonucleico
DOP: Denominação de origem protegida
EUA: Estados Unidos da América
FDA: Food and Drug Administration
FISH-BOL: *The Fish barcode of life*
G: Guanina
HRM: *High resolution melting*
K2P: *Kimura-2- Parameter*
Kb: Quilo base
LAMP: *Loop-mediated isothermal amplification*
LFD: *Lateral Flow Devices*
matK: Maturase K
MEGAX: *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*
MG: Minas Gerais
MgCl₂ : Cloreto de magnésio
mM: Milimolar
NCBI: *National Center for Biotechnology Information*
ng: Nano grama
NJ: *Neighbor-Joining*
Pb: Pares de Base
PCR: Reação da Polimerase em Cadeia
qPCR: PCR quantitativa em tempo real
RAPD: Amplificação aleatória de DNA polimórfico
rbcL: Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase / oxigenasse

RFLP: Polimorfismo de comprimento de fragmento de limitação

Rpm: Rotações por minuto

SNG: Sequenciamento de nova geração

SNPs: *Polimorfismo de nucleotídeo único*

SSR: Sequências simples repetidas

T: Timina

U\$: Dólar americano

U. S.: Estados Unidos

U: Unidades

μl: Microlitro

μM: Micro molar

SUMÁRIO

1.1. RESUMO.....	8
1.2. <i>ABSTRACT</i>	8
2. INTRODUÇÃO.....	14
3. ARTIGO I.....	17
3.1. RESUMO.....	17
3.2. <i>ABSTRACT</i>	17
3.3. INTRODUÇÃO.....	18
3.4. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE e REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL.....	20
3.5. DNA BARCODE E SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO	22
3.6. <i>HIGH RESOLUTION MELTING</i>	23
3.7. <i>LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION</i>	25
3.8. OUTRAS TÉCNICAS	25
3.9. TENDÊNCIAS.....	26
3.10. CONCLUSÃO.....	27
3.11. REFERÊNCIAS.....	28
4. ARTIGO II.....	35
4.1. RESUMO.....	35
4.2. <i>ABSTRACT</i>	35
4.3. INTRODUÇÃO.....	36
4.4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
4.4.1. COLETA DE AMOSTRAS.....	39
4.4.2. EXTRAÇÃO DE DNA	39
4.4.3. DNA BARCODE COMPLETO.....	39
4.4.4. MINI-DNA BARCODE.....	40
4.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4.6. CONCLUSÃO.....	57
4.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....64

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....65

Mini-DNA *Barcode* para autenticação de produtos de pescado processado

2. INTRODUÇÃO

O pescado foi reconhecido como o terceiro alimento de maior risco com potencial para fraude (Parlamento Europeu, 2013). Um grande estudo global descreveu práticas de rotulagem incorreta de peixes em todas as fases da cadeia de comercialização (Oceana, 2016). Este estudo relatou que, em média, 20% de todas as amostras de peixes testadas em 55 países foram rotuladas incorretamente. Alto nível de substituição de espécies foi detectado internacionalmente na América (Carvalho, *et al.*, 2011; Hanner, *et al.*, 2011; Willette *et al.*, 2017), Europa (Harris, *et al.*, 2016; Miller, *et al.*, 2012), Ásia (Chang, *et al.*, 2016; Chin, *et al.*, 2016; Md-Zain, *et al.*, 2018; Nagalakshmi, *et al.*, 2016; Xiong *et al.*, 2016), no Oriente Médio e Norte da África (Galal-Khallaf, *et al.*, 2014).

A fraude alimentar decorrente da substituição de espécies é um risco emergente, dada a crescente cadeia global de suprimentos de alimentos e potenciais problemas de segurança alimentar. Este tipo de fraude econômica é cometido quando um alimento fraudado é deliberadamente colocado no mercado, com o intuito de enganar o consumidor (Woolfe e Primrose, 2014).

Alimentos mal rotulados podem causar riscos significativos à segurança alimentar dos consumidores, especialmente quando espécies de peixes não tóxicas são substituídas por espécies tóxicas (Gleason *et al.*, 2014). Espécies como o baiacu (*Lagocephalus sp.*), o peixe escolar (*Lepidocybium flavobrunneum*) e o peixe anchova negra (*Ruvettus pretiosus*) podem sofrer bioacumulação de ciguatoxina (toxina produzida por organismos marinhos, protistas dinoflagelados, essencialmente o *Gambierdiscus toxicus*). A bioacumulação pode ocorrer mediante a ingestão de organismos marinhos ou a ingestão de outros peixes contaminados como garoupas (*Epinephelus marginatus*), meros (*Epinephelus itajara*), dentões (*Lutjanus synagris*), ciobas (*Lutjanus analis*), pargos (*Pagrus pagrus*), podendo causar formas graves de intoxicação alimentar (Gleason *et al.*, 2014; Danway *et al.*, 2017).

Em 2009, Cohen *et al.* relataram dois casos de peixes baiacu (*Lagocephalus sp.*) substituídos pelo tamboril (*Enterolobium maximum*) provocando graves intoxicações. Em 2015, Armani *et al.* relataram ocorrências de substituição de amostras de alimentos rotuladas como lulas por espécies tóxicas de baiacu. Essas substituições representam graves riscos à saúde do consumidor, e também reduzem a confiança na indústria de pescado.

Como resultado do aumento da demanda e a globalização da oferta de pescado, mais espécies de peixes estão sendo encontradas no mercado (Marko *et al.*, 2016). Uma das principais agências reguladoras de alimentação do mundo, a *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos da América (EUA), contém uma lista com mais de 2.700 nomes de peixes comerciais que podem ser usados para rotular produtos processados no comércio dos EUA (Hellberg e Morrissey, 2018).

A necessidade de produtos alimentícios rotulados com precisão e a divulgação completa da composição do produto torna-se cada vez maior (Wong e Hanner, 2008; Wallace *et al.*, 2017). O processo de autenticação de produtos de pescado por meio do exame da aparência física possui grandes limitações. Em sua forma inteira ou não processada, as espécies geralmente podem ser identificadas com base em indicadores morfológicos, no entanto, mais da metade dos peixes frescos ou congelados é descaracterizada da sua forma original em produtos como filés ou postas (Hellberg e Morrissey, 2018). Além disso, a identificação de espécies por indicadores morfológicos requer um profissional especializado para distinguir espécies estreitamente relacionadas. A maioria dos consumidores é incapaz de detectar casos de rotulagem incorreta ou fraude, uma vez que características morfológicas reconhecíveis são normalmente removidas quando o peixe é processado (Wong e Hanner, 2008).

Para auditar e prevenir a fraude de espécies no mercado, uma série de métodos moleculares foram desenvolvidos, incluindo o uso de proteínas ou marcadores de DNA encontrados em diferentes espécies (Teletchea, 2009). O DNA *Barcode* surgiu como uma ferramenta que fornece um método rápido e econômico para a identificação precisa de espécies, através da análise comparativa da variação na sequência de um fragmento padronizado do genoma (Hebert *et al.*, 2003).

A metodologia de DNA *Barcode* pode ser aplicada para autenticar e certificar rótulos. O DNA *Barcode* tem auxiliado vários pesquisadores na descoberta de rótulos errados ou substituição de espécies (Filonzi *et al.*, 2010; Maralit *et al.*, 2013). O DNA *Barcode* detectou produtos de pesca comercializados de forma *online* na China com 85% de rotulagem incorreta (Xiong *et al.*, 2016).

O DNA *Barcode* designado para identificação de espécies animais é um fragmento de aproximadamente 650 pares de bases (pb) do gene mitocondrial que codifica a proteína citocromo c (Hajibabaei *et al.*, 2007; Wallace *et al.*, 2017). Uma série de estudos tem mostrado a aplicabilidade do DNA *Barcode* para a identificação de uma ampla gama de espécies de peixes (Ward *et al.*, 2005; Ward *et al.*, 2009). Mais recentemente, o DNA *Barcode* foi empregado como uma ferramenta de identificação de espécies para autenticação de alimentos (Hubert *et*

al., 2018; Steinke *et al.*, 2019), substituições de ingredientes (Marko *et al.*, 2016), contaminação de alimentos (Hebert *et al.*, 2003; Nicolè *et al.*, 2012) e em uso regulatório (Handy *et al.*, 2011). O DNA *Barcode* foi também utilizado para monitorar o comércio ilegal de espécies protegidas ou ameaçadas de extinção (Baker *et al.*, 2020).

No entanto, alguns dos métodos de processamento de alimentos não são compatíveis com a técnica de DNA *Barcode* originalmente desenvolvida (fragmento completo com 650 pb) (Chapela *et al.*, 2017; Shokralla *et al.*, 2011; Shokralla *et al.*, 2010). A degradação do DNA durante o processamento foi reconhecida como uma limitação considerável nas análises e na amplificação por PCR de *Barcodes* completos de amostras moderadamente ou altamente processadas.

Além disso, produtos processados geralmente contêm aditivos, conservantes e palatilizantes que podem afetar a quantidade e a qualidade do DNA extraído desses produtos (Rasmussen-Hellberg *et al.*, 2018; Civera, 2015; Shokralla, *et al.*, 2011;). Alternativamente, uma abordagem de mini-DNA *Barcode*, que concentra a análise em fragmentos de DNA mais curtos (de 100 a 300 pb) dentro do fragmento total do *Barcode*, demonstrou ser eficaz na obtenção de informações de DNA de amostras processadas (Hajibabaei *et al.*, 2006; Meusnier *et al.* 2018).

O sequenciamento gerado a partir de um fragmento de mini-DNA *Barcode* pode fornecer as informações necessárias para a identificação de espécies individuais com uma resolução de mais de 98% (Rasmussen *et al.*, 2019; Shokralla *et al.*, 2011; Hajibabaei *et al.*, 2006).

Até o presente momento, não existem trabalhos específicos com pescados processados desenvolvidos no Brasil. O presente estudo tem como objetivo projetar e otimizar quatro pares de *primers* para a amplificação de mini-DNA *Barcodes* e, em seguida, aplicar na análise amostras comercializadas.

Atualmente, como a demanda cada vez maior por produtos de pescado, devido ao seu preço inferior em comparação com produtos de outras espécies, é oportuno que este método seja avaliado para posterior aplicação em programas de controle de alimentos para combater a fraude, etiquetagem incorreta e substituição de espécies na cadeia de produção peixes e seus derivados (Adibaha *et al.*, 2020).

3. ARTIGO I

Métodos baseados em DNA para autenticação de alimentos

Glauber Batista Gois

Doutorando em Genética e Melhoramento Animal, Escola de Veterinária da UFMG

E-mail: glaugois@hotmail.com

3.1. RESUMO

A adulteração, a identificação incorreta e a fraude comercial de produtos alimentícios, intencionais ou não, são fontes globais de perdas econômicas para os consumidores, assim como para todas as partes envolvidas na produção e na distribuição de alimentos. Legislações são aplicadas mundialmente, com o objetivo de garantir a autenticidade dos produtos alimentícios em toda a cadeia de distribuição, evitando assim a fraude de alimentos. Por conseguinte, existe uma necessidade crescente de novos métodos analíticos capazes de verificar se todos os ingredientes incluídos em um alimento correspondem coerentemente às qualidades informadas pelo fabricante ou distribuidor. Nesse sentido, o desempenho aprimorado das ferramentas baseadas em DNA em termos de sensibilidade, capacidade de multiplexação, alto rendimento e custo relativamente baixo conferem a elas um papel decisivo na autenticidade de alimentos. Este trabalho descreve uma visão atualizada das principais metodologias recentemente relatadas, as quais aplicam ferramentas baseadas em DNA para avaliar a autenticidade de componentes e produtos alimentares.

3.2. ABSTRACT

The adulteration, misidentification and commercial fraud of food products, whether intentional or not, are global sources of economic loss for consumers, as well as for all parties involved in food production and distribution. Legislation is applied worldwide, with the objective of guaranteeing the authenticity of food products throughout the distribution chain, thus preventing food fraud. Therefore, there is a growing need for new analytical methods capable of verifying that all ingredients included in a food consistently correspond to the qualities reported by the manufacturer or distributor. In this sense, the improved performance

of DNA-based tools in terms of sensitivity, multiplexing capability, high throughput and relatively low cost give them a decisive role in food authenticity. This paper describes an updated overview of the main recently reported methodologies, which apply DNA-based tools to assess the authenticity of food components and products.

3.3. INTRODUÇÃO

A adulteração de alimentos, intencional ou não, é uma fonte mundial de perdas econômicas para os consumidores e outras partes interessadas, como as empresas envolvidas na produção e distribuição de alimentos. Isso acontece porque grande parte dos incidentes de falsificação não causam danos direto à saúde, mas a maioria deles permanece sem ser detectado. Estima-se os resultados da fraude alimentar em mais de U\$ 40 bilhões, de perdas anuais para a indústria de alimentos (Johnson, 2014). Além disso, existe também a possível introdução de ingredientes não declarados que podem causar reações alérgicas em indivíduos sensíveis, gerando implicações na segurança alimentar (Ortea *et al.*, 2012). Assim nasce a necessidade de legislação que garanta a autenticidade dos alimentos ao longo de toda a cadeia, evitando assim erros de identificação, adulteração e fraude alimentar (Food and Drug Administration, 2019). Para fazer cumprir estes regulamentos, existe uma crescente necessidade por métodos analíticos que permitam verificar e garantir que todos os ingredientes incluídos em um alimento coincidam com as qualidades e as características descritas pelo fabricante.

Uma grande variedade de metodologias analíticas tem sido aplicada em estudos de autenticação de alimentos. Não obstante as técnicas pioneiras, como a cromatografia líquida, o perfil eletroforético e as análises sensoriais ainda serem comumente usadas, a adição de novas técnicas baseadas em DNA para alimentos supera as limitações das metodologias anteriormente citadas (Salihah *et al.*, 2016).

Os principais desafios associados à autenticidade dos alimentos foram descritos por Ortea *et al.*, (2016). Os autores relatam que a identificação, a detecção e a quantificação de uma determinada espécie em um alimento ou produto é a área de maior atividade na pesquisa. Porém, outras áreas de autenticação de alimentos, como identificação de variedades, métodos de produção, adições não declaradas e origem geográfica também possuem grande importância, pois são fontes para erros de identificação e fraude comercial.

A substituição de espécies animais ou vegetais de alto valor comercial por outras de menor valor e de qualidade inferior é uma fraude comum na indústria de alimentos, aparecendo em todos os tipos de carnes, frutos do mar, laticínios, alimentos de origem vegetal, como óleos

e sucos, entre outros. Logo, níveis elevados de identificação incorreta são publicados continuamente: 42,8% em produtos de carnes brasileiros (Dalsecco *et al.*, 2018), 57% em produtos de carne vermelha processada (Di Pinto *et al.*, 2015), 42,8% em filés de peixe vendidos na Itália (Tantillo *et al.*, 2015), 35% em produtos à base de carne vermelha vendidos nos EUA (Kane e Hellberg, 2016), 24,4% em camarões (Pascoal, *et al.*, 2008) e até 80% em laticínios (Di Pinto *et al.*, 2017).

A carne bovina é suscetível à substituição fraudulenta por carnes menos valiosas ou proveniente de animais domésticos. Além disso, a presença de carne de rato, cachorro e gato em alimentos pode representar ameaças substanciais à saúde pública, além de questões éticas e, por isso, tem sido objeto de diversos estudos nos últimos anos (Di Pinto *et al.*, 2015, Dalsecco *et al.*, 2018).

Da mesma forma, produtos alimentares de origem vegetal, como suplementos e especiarias, são comumente fraudados por meio da substituição das espécies vegetais correspondentes. Neste caso, as misturas de formulações em pó fazem o trabalho de autenticação ser desafiador. A substituição não declarada de espécies, também pode representar uma importante ameaça à saúde de consumidores alérgicos, devido à introdução de alérgenos, como diferentes tipos de castanhas, crustáceos e moluscos (Böhme *et al.*, 2019).

Consequentemente, estudos publicados na autenticação de alimentos comercializados estão relacionados à identificação e discriminação de espécies. Nesse sentido, o desenvolvimento de métodos baseados em DNA inclui o sequenciamento de DNA, o polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP), o DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD), a PCR multiplex, a PCR quantitativa (qPCR) e as repetições de sequência simples (SSR) ou microssatélites (Böhme *et al.*, 2015).

Nos últimos anos, novas técnicas foram avaliadas para fins de autenticidade dos alimentos como por exemplo a PCR de *High Resolution Melting* (HRM), a *Droplet Digital PCR* (ddPCR), a *Loop-Mediated Isothermal Amplification* (LAMP) e sequenciamento de nova geração.

Além da discriminação de espécies, a autenticidade alimentar também requer a identificação de certas raças de animais ou variedades de plantas e a avaliação da origem de um alimento. Padrões de qualidade como a denominação de origem protegida (DOP), criada pela União Europeia, utilizam metodologias que podem rastrear o ingrediente ou o produto alimentar de uma região geográfica específica. Nesse sentido, métodos baseados em DNA só podem ser usados quando a diferença geográfica está relacionada à diversidade genética (Kaltenbrunner *et al.*, 2018a).

Esta revisão tem como objetivo apresentar informações das principais metodologias recentemente relatadas, as quais aplicam ferramentas baseadas em DNA para avaliar a autenticidade de componentes e produtos alimentares.

3.4. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) E REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL (qPCR)

A PCR é a amplificação exponencial de uma molécula de DNA pelo uso de um termociclador, gerando milhões de cópias de um alvo e permitindo a sua detecção mesmo em concentrações muito baixas. A PCR foi proposta como uma técnica muito útil para a detecção e identificação de espécies animais e vegetais em alimentos pela sua alta sensibilidade e especificidade, além de ser relativamente rápida e não onerosa. Os ensaios de PCR *multiplex* permitem a identificação simultânea de várias espécies usando *primers* espécie-específicos (Saiki *et al.*, 1988). Um método de detecção por PCR *multiplex* foi relatado como forma de diferenciar entre cinco espécies de águas-vivas comestíveis ou potencialmente comestíveis (Armani *et al.*, 2014).

O DNA mitocondrial é frequentemente selecionado como alvo em ensaios qualitativos muito sensíveis, devido ao seu alto número de cópias em uma mesma célula (Amaral *et al.*, 2015). No entanto, devido ao número de cópias do DNA mitocondrial por célula variar entre espécies, indivíduos e até em tecidos dentro do mesmo indivíduo, torna os genes mitocondriais inadequados para quantificação em amostras mistas. Por conseguinte, nos casos em que é necessária quantificação para garantir a autenticidade dos alimentos, os genes nucleares são mais apropriados (Prado *et al.*, 2012).

Para a avaliação quantitativa de adulteração em produtos alimentícios, a qPCR se mostrou especialmente adequada, sendo considerada o método de escolha. Na qPCR, os ácidos nucleicos são amplificados, monitorados em tempo real e quantificados por meio da fluorescência liberada a cada ciclo de PCR (Ririe *et al.*, 1997).

Existem vários trabalhos que relatam o desenvolvimento de ensaios de qPCR para a detecção e quantificação simultânea de diferentes espécies animais em produtos cárneos (Kaltenbrunner *et al.*, 2018a; Kaltenbrunner *et al.*, 2018b). Da mesma forma, a presença de carne de espécies proibidas, por exemplo, a carne de porco em produtos Halal, foi estudada por qPCR (Sakalar, 2015). Em relação aos frutos do mar, os sistemas de qPCR foram aplicados para detectar fraude ou identificação incorreta em atum pescado no pacífico (Liu *et al.*, 2018).

A detecção de fraudes e a identificação incorreta de laticínios são também objetivos de ensaios de qPCR (Di Domenico *et al.*, 2017, Dalsecco, 2013).

Nesse sentido, sabe-se que a detecção de uma determinada espécie em um produto alimentar pode ser realizada até em concentrações muito baixas devido à alta especificidade das regiões de DNA. No entanto, as quantificações relativas ou absolutas têm algumas limitações, principalmente porque depende dos efeitos da composição tecidual e dos componentes da matriz (Von Holst *et al.*, 2012). A aplicação da qPCR na autenticidade de alimentos, nos quais quantidades mínimas (traços) precisam ser detectadas, tem sido frequentemente descrita. Pesquisas se mostraram eficazes para a detecção e quantificação de níveis baixíssimos de ingredientes alergênicos (López-Calleja *et al.*, 2013).

Um dos principais objetivos da pesquisa no campo do controle e autenticidade de alimentos é produzir uma tecnologia que permita um teste seguro e barato para a análise de alimentos. Nesse sentido, a combinação de técnicas baseadas em PCR com outras tecnologias, como a microfluídica, biossensores ou nanotecnologia, se destacam. Furutani *et al.* (2017) usaram um sistema de qPCR portátil para detectar carne bovina, suína, frango, coelho, cavalo e carne de carneiro, alimentos processados, alcançando a identificação correta das espécies em 20 minutos. Lin *et al.*, em 2014, relataram uma abordagem baseada em sondas direcionadas ao gene citocromo oxidase subunidade 1 (COI), combinada com hibridação por fluxo de detecção para identificação de espécies de carnes. Wang *et al.* (2015) descreveram um teste baseado em um filme óptico com biossensores, com capacidade de monitorar e distinguir até oito espécies de produtos cárneos em até 0,001% de conteúdo por mudança de cor, perceptível a olho nu.

Uma metodologia de PCR direta (amplificação de DNA sem extração prévia) foi descrita por Kitpipit *et al.* (2014), permitindo a detecção de seis espécies de carne por amplificação por PCR diretamente na amostra. Em 2017, Taboada *et al.*, desenvolveram um sistema *quadruplex* de PCR em um dispositivo de fluxo lateral (LFD) para o rastreamento *in situ* de duas espécies de bacalhau: a Pollock (*Theragra chalcogramma*) e a Ling (*Molva molva*). Neste caso, o LFD provou ser particularmente útil devido à sua portabilidade e simplicidade, permitindo o monitoramento simplificado dos resultados.

Essas tecnologias, porém, possuem limitações que inviabilizam a sua utilização em larga escala na rotina de laboratórios. O desenvolvimento depende, na maioria das vezes, do desenho e da otimização de *primers* específicos para cada espécie de interesse, requisitando um alto investimento em insumos, equipamentos e mão de obra qualificada.

3.5. DNA BARCODE E SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO - SNG

A técnica de DNA *Barcode* consiste em sequenciar e comparar regiões de DNA para identificação taxonômica, proposta como um método unificado para todas as espécies de seres vivos, seja utilizando sequenciamento convencional (Sanger) ou tecnologias de nova geração (Roslin e Majaneva, 2016).

Um desafio do DNA *Barcode* é a busca de um gene “perfeito”, apresentando uma baixa variabilidade dentro de uma mesma espécie e um alto nível de variabilidade entre espécies diferentes. Os genes mais comumente utilizados para a discriminação de espécies são: o COI e o gene do citocromo b (cytb) para espécies animais, e os genes maturase K (matK) e ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (rbcL) para espécies vegetais. A vantagem desses genes é que estão localizados nas mitocôndrias ou plastídios, onde estão presentes em maior número de cópias nas células, tornando os genes indicados nas abordagens de identificação, como no caso do DNA *Barcode* (Prado *et al.*, 2012).

Para a caracterização pelo DNA *Barcode* é utilizada uma sequência de comprimento padrão (em torno de 650 pb), mas em produtos moderadamente ou altamente processados, a eficácia da técnica é um grande desafio, principalmente devido a degradação do DNA. Nesse sentido, pesquisas com mini-*Barcodes*, que possuem o foco em fragmentos de DNA menores (100 a 300 pb) foram testados para autenticação de produtos carne vermelha, atingindo uma taxa de sucesso de 93% *versus* 20,5% quando o DNA *Barcode* de tamanho padrão foi usado (Shokralla *et al.*, 2015).

Desde 2004, o projeto global *Barcode of Life Data System* (BOLD) (<https://www.boldsystems.org/>) coleta e disponibiliza informações genéticas em um banco de dados público. Um cuidado especial foi dado às espécies vegetais, peixes e frutos do mar, devido à alta similaridade nas sequências de DNA entre espécies relacionadas (Ward *et al.* 2008). Em comparação com a carne vermelha, a diversidade de frutos do mar e de espécies vegetais é muito alta e a discriminação entre espécies semelhantes é desafiadora, especialmente em produtos alimentícios processados, como dito anteriormente. O *Barcode of Life* para Peixes (FISH-BOL) é uma biblioteca pública de sequências de referência padronizada para todas as espécies de peixes com o objetivo de identificação. Nesse contexto, o DNA *Barcode* foi aplicado com sucesso na detecção de fraudes e erros de identificação de diversas espécies, em vários tipos de produtos (Piras *et al.*, 2018).

A autenticidade de aditivos alimentares e suplementos de origem vegetal é outro campo de preocupação para os consumidores, necessitando de métodos precisos para garantir a

qualidade. No entanto, a criação de bibliotecas com sequência de DNA como referência para discriminação de espécies de plantas é ainda mais desafiadora devido à ausência de um gene único candidato ao *Barcode*. Recentemente, vários genes diferentes foram estudados como possíveis marcadores na discriminação de espécies de plantas. O DNA *Barcode* tem sido aplicado em testes de autenticidade em aditivos alimentares vegetais, plantas venenosas, chás de ervas e especiarias, como o açafrão (Wu *et al.*, 2018). Em um estudo semelhante, pequenas quantidades de até 10 diferentes tipos de óleos vegetais foram detectados no azeite de oliva, por um teste de DNA *Barcode* em conjunto com a eletroforese capilar (Lu *et al.*, 2013).

No caso do mel, sua origem vegetal e entomológica afeta muito suas propriedades e qualidades. O DNA *Barcode* demonstrou ser capaz de identificar a origem vegetal do mel através do sequenciamento de regiões plásticas, em que 39 espécies de diferentes plantas foram identificadas (Bruni *et al.*, 2015). Um estudo semelhante, usando três genes diferentes, forneceu informações não apenas sobre a origem botânica do mel, mas também sobre as espécies de abelhas que produzem um mel específico. Os autores também discutiram as dificuldades encontradas ao analisar méis com alto teor de compostos polifenólicos ou méis submetidos à cristalização (Prosser e Hebert, 2017).

Recentemente, trabalhos com o DNA *Barcode* foram integrados aos formatos de SNG, também chamados de sequenciamento de alto rendimento, demonstrando o alto potencial do DNA *Barcode* para a identificação simultânea de espécies animais e vegetais em produtos alimentícios. O SNG revolucionou a pesquisa genômica pela capacidade de sequenciar milhões de pequenos fragmentos de DNA na mesma reação (Behjati e Tarpey, 2013). A combinação das tecnologias de DNA *Barcode* e SNG tem sido usada com sucesso para a autenticação de espécies de peixes (Giusti *et al.*, 2017) e de carne vermelha em produtos processados (Bertolini *et al.*, 2015).

Da mesma forma, utilizando SNG, a origem do leite pode ser detectada nos produtos lácteos processados ou não, incluindo a detecção de espécies não declaradas e de DNA humano, sendo este último um indicador do nível higiênico do produto. A detecção qualitativa das espécies produtoras de leite pode ser realizada mesmo em concentrações muito baixas (Ribani *et al.*, 2018).

A aplicação das novas metodologias de SNG em escala comercial não é viável dentro da realidade grande maioria dos laboratórios, devido ao alto custo de equipamentos, insumos e manutenção dos mesmos.

3.6. HIGH RESOLUTION MELTING - HRM

A HRM é uma técnica rápida e de alto rendimento que permite genotipagem e correspondência de sequências (diferenciação de táxons) por meio da análise das curvas de *melting* de *amplicons* específicos de DNA, que refletem as variações genéticas de cada espécie. Esse método pós-PCR usa um corante fluorescente que permite o monitoramento da desnaturação dos produtos de PCR a medida que a temperatura aumenta.

A HRM conseguiu detectar simultaneamente até oito espécies animais diferentes em produtos de carne vermelha (Lopez-Oceja *et al.*, 2017). Em um estudo semelhante, relacionado à autenticação entomológica do mel, várias espécies de abelhas foram identificadas por HRM através da análise de amostras de mel (Soares *et al.*, 2018).

Outra metodologia desenvolvida, foi a combinação de HRM com DNA *Barcode*, denominada Bar-HRM. O método consiste em utilizar *primers* espécie-específicos com base nas sequências de marcadores genéticos já estabelecidos. A vantagem do Bar-HRM sobre o DNA *Barcode* é que esta permite medições quantitativas e, ao mesmo tempo, supera o poder de resolução da análise convencional da curva de *Melting* (Ganopoulos *et al.*, 2013).

A metodologia de Bar-HRM foi descrita para diferenciar as cinco espécies de camarão mais relevantes comercialmente, alcançando uma precisão de identificação acima de 99% (Fernandes *et al.*, 2017). A mesma metodologia foi aplicada para discriminar cinco espécies de pescada (*Cynoscion sp.*). Dois dos 45 produtos comerciais analisados apresentaram erros de identificação ou substituição de espécies (Fernandes *et al.*, 2018).

A combinação de HRM e DNA *Barcode* também foi aplicada na autenticação de vinhos. Verificou-se que 13 variedades de videira podem ser diferenciadas em mostos e vinhos. Este método, além de identificar a variedade de frutas utilizadas, pode ser útil também para a autenticação de vinhos com DOP (Pereira *et al.*, 2017).

O desenvolvimento do HRM demanda muitas vezes do desenho e da otimização de *primers* específicos para cada espécie a ser testada, com um alto custo de insumos, equipamentos e mão de obra qualificada, não representando uma metodologia adequada para realidade dos laboratórios.

3.7. LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION - LAMP

No LAMP, a sequência alvo é amplificada a uma temperatura constante de 60 a 65 °C, usando dois ou três conjuntos de *primers* e uma polimerase com alta atividade de cadeia, além

da atividade de replicação (Nagamine *et al.*, 2002). Na técnica LAMP, a detecção do produto de amplificação pode ser determinada por fotometria para verificar a turbidez causada por uma quantidade crescente de precipitado de pirofosfato de magnésio em solução como subproduto da amplificação. Isso permite uma fácil visualização a olho nu, especialmente para volumes maiores de reação ou através de abordagens simples de detecção para volumes menores. A reação pode ser acompanhada em tempo real, medindo a turbidez, ou por fluorescência, usando corantes intercalantes como SYTO 9. Outros corantes, como o SYBR *Green*, podem ser usados para criar uma mudança de cor visível a olho nu. As moléculas de corante intercalam ou marcam diretamente o DNA sendo correlacionadas com o número de cópias inicialmente presente, oferecendo uma resposta quantitativa (Song *et al.*, 2017).

O LAMP foi utilizado para detectar a adição de vegetais não permitidos nas dietas vegetarianas chinesas (alho, alho-poró e variedades de cebolas) (Sheu *et al.*, 2018). Garrido-Maestu *et al.* (2018) monitoraram e quantificaram glúten em amostras de trigo e milho utilizando o LAMP. Para as reivindicações halal, o LAMP detectou 0,01% na carne bovina apresentando limites de detecção bem baixos (Cho *et al.*, 2014). A detecção simultânea de oito espécies diferentes de carne vermelha também foi descrita por um ensaio LAMP (Mori *et al.*, 2016).

A utilização de mais de um conjunto de *primers* e de uma polimerase com alta atividade nas reações de LAMP, aumenta o custo total do teste, diminuindo a sua competitividade em relação às outras metodologias aqui descritas.

3.8. OUTRAS TÉCNICAS

Outras técnicas moleculares são amplamente utilizadas em estudos de genética populacional, como por exemplo os microssatélites, RFLP, RAPD e os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs). Tais técnicas podem ser úteis para a autenticação de produtos alimentícios (Ortea *et al.*, 2012; Mafra *et al.*, 2008).

Como essas técnicas geralmente são menos sensíveis, seletivas e trabalhosas, elas se tornaram menos interessantes quando o DNA *Barcode* surgiu. No entanto, a RFLP ainda é utilizada para a identificação das espécies presentes nos produtos de frutos do mar. Na RFLP, após a amplificação por PCR, o DNA alvo é digerido usando enzimas e os perfis de restrição resultantes são monitorados por eletroforese em gel para possam ser comparados. Em um experimento, 5 espécies de atum, 9 espécies diferentes de peixe pargo e 16 espécies comerciais de pepino-do-mar foram discriminadas pelas regiões mitocondriais de RFLP (Zeng *et al.*,

2018). Uma abordagem de RFLP também foi utilizada para detectar conteúdo de carne de gato em produtos cárneos (Ali *et al.*, 2015).

Além da identificação de espécies, a discriminação entre diferentes variedades e cultivares (classificação de subespécie que descreve variedades vegetais produzidas por seleção artificial) é importante na produção de alimentos. Diferentes cultivares de cacau e cana-de-açúcar foram avaliadas através de microssatélites, com o objetivo de diferenciar variedades (Kashi *et al.*, 1997). Os microssatélites são marcadores altamente polimórficos úteis para detectar diferenças intrapopulacionais, como as diferenças produzidas por divergência geográfica. Nesse sentido, diferentes origens geográficas de sementes e óleo de gergelim, por exemplo, podem ser discriminadas usando microssatélites (Horacek *et al.*, 2015).

3.9. TENDÊNCIAS

Rigorosos controles, monitoramentos dos rótulos e autenticidade dos alimentos são exigidos pela indústria de alimentos, governo e consumidores afim de garantir a qualidade e a segurança de alimentos. Os métodos analíticos usados para avaliar a autenticidade dos alimentos necessitam atender a diversos requisitos. Além de serem precisos e confiáveis, precisam ter alta sensibilidade, mesmo em baixas concentrações de DNA, o qual frequentemente se apresenta fragmentado em alimentos processados. Os métodos devem ser específicos para diferenciação de moléculas de DNA, devem ter a capacidade de multiplexação, alta capacidade de rendimento e baixo tempo de análise, para que um grande número de amostras possa ser analisado de forma eficiente (Rane *et al.*, 2015).

Nesse sentido, tecnologias disponíveis como o SNG, o DNA *Barcode*, o Bar-HRM, e o LAMP, estão superando os métodos clássicos. Os biossensores baseados em nanopartículas têm despertado grande interesse nos últimos anos. Como eles permitem plataformas analíticas e portáteis e dispensam a preparação da amostra, ou a reduzem muito, as nanopartículas já estão sendo incorporadas às análises de alimentos, como a detecção de compostos alergênicos e tóxicos e na autenticação de espécies (Nikoleli *et al.*, 2018). Como as amostras de alimentos frequentemente contém DNA fragmentado e em concentrações mínimas, também serão necessários novos protocolos de preparação de amostras capazes de lidar com esse tipo de material. Nesse sentido, o uso de dispositivos microfluídicos e nanopartículas aprimoram os processos de recuperação e extração de DNA de matrizes alimentares complexas (Carvalho *et al.*, 2018).

3.10. CONCLUSÃO

Além dos avanços em tecnologias e instrumentação, as questões de desenvolvimento, padronização e validação de métodos devem ser abordadas em termos de garantir a eficiência destes antes da sua implementação na indústria. Devem ser consideradas todas as fontes possíveis de variabilidade, como as alterações causadas por diferenças intraespécies ou o processamento sofrido pelo alimento. Análises devem ser realizadas para verificar a validade estatística dos resultados obtidos, comparações interlaboratoriais devem ser abordadas para garantir resultados analíticos comparáveis e os materiais de referência certificados. Além disso, os procedimentos operacionais devem ser padronizados e disponibilizados para utilização dos métodos. Percebe-se que, não há um método de escolha único que atenda todo o tipo de demanda, cada um deve se adequar a realidade considerando o tipo de alimento, objetivo e custo relativo.

3.11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, M. E., AMIN, M. D. A., HAMID, S. B. A., HOSSAIN, M. A. M., MUSTAFA, S. *Food Addit. Contam.* v. 32, p. 1373-1383, 2015.

AMARAL, J. S., VITOR G. S., COSTA, S. M. J., OLIVEIRA B. P. P., MAFRA I. Identification of Duck, Partridge, Pheasant, Quail, Chicken and Turkey Meats by Species-Specific PCR Assays to Assess the Authenticity of Traditional Game Meat Alheira Sausages. *Food Control.* v. 47, p.190-195, 2015.

ARMANI, A., GIUSTI, A., CASTIGLIEGO, L., ROSSI, A., TINACCI, L., GIANFALDONI, D., GUIDI A. Pentaplex PCR As Screening Assay for Jellyfish Species Identification in Food Products. *J. Agric. Food Chem.* v. 62, p. 12134-12143, 2014.

BEHJATI, S., TARPEY, P. S. What Is next Generation Sequencing? *Arch. Dis. Child. Educ. Pract.* v. 98, p. 236-238, 2013.

BERTOLINI, F., GHIONDA, M. C., D'ALESSANDRO, E., GERACI, C., CHIOFALO, V., FONTANESI L. Next Generation Semiconductor Based Sequencing Approach for the Identification of Meat Species in DNA Mixtures. *PLoS One.* v.10 (4), p. e0121701, 2015.

BRUNI, I., GALIMBERTI, A., MATTIA, F., BRUNI, I., SCACCABAROZZI, D., SANDIONIGI, A., BARBUTO, M., CASIRAGHI, M., LABRA M. DNA Barcoding Approach to Identify Plant Species in Multiflower Honey. *Food Chem.* v. 170, p. 308-315, 2015.

BÖHME, K. BARROS-VELÁZQUEZ, J., CALO-MATA, P., ORTEA, I Recent Applications of Omics-Based Technologies to Main Topics in Food Authentication. *Trends Anal. Chem.* v. 110, p. 221-232, 2019.

BÖHME, K., BARROS-VELÁZQUEZ, J., CALO-MATA, P., GALLARDO, J. M., ORTEA, I. Seafood Authentication Using Foodomics. In Genomics, Proteomics and Metabolomics in Nutraceuticals and Functional Foods. *John Wiley e Sons.* v. 2, p. 14-30, 2015.

CARVALHO, J., PUERTAS, G., GASPAR, J., AZINHEIRO, S., DIÉGUEZ, L., GARRIDO-MAESTU, A., VÁZQUEZ, M., BARROS-VELÁZQUEZ, J., CARDOSO, S.,

PRADOA, M. Highly Efficient DNA Extraction and Purification from Olive Oil on a Washable and Reusable Miniaturized Device. *Anal. Chim. Acta* 2018, 1020, 30–40.

CHO, A. R., DONG, H. J., CHO, S. Meat Species Identification Using Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay Targeting Species-Specific Mitochondrial DNA. *Korean J. Food Sci. Anim. Resour.* v. 34, p. 799-807, 2014.

DALSECCO, L. S., PALHARES, R. M., OLIVEIRA, P. C., TEIXEIRA, L. V., DRUMMOND, M. G., OLIVEIRA, D. A. A. . A Fast and Reliable Real-time PCR Method for Detection of Ten Animal Species in Meat Products. *J. Food Sci.*, v. 83, p. 258-265, 2018.

DALSECCO, L. S., Análise da Ocorrência de Substituição da Matéria-Prima e Quantificação de Material Bovino: Desenvolvimento da Técnica por PCR em Tempo Real. 2013.

DI DOMENICO, M., DI GIUSEPPE M., WICOCHEA RODRÍGUEZ J. D., CAMMÀ, C. Validation of a Fast Real-Time PCR Method to Detect Fraud and Mislabeling in Milk and Dairy Products. *J. Dairy Sci.* v. 100, p. 106-112, 2014.

DI PINTO, A. BOTTARO, M., BONERBA, E., BOZZO G., CECI E., MARCHETTI P., MOTTOLA A., TANTILLO G. DNA-Based Approach for Species Identification of Goat-Milk Products. *Food Chem.* v. 229, p. 93-97, 2017.

DI PINTO, A. Occurrence of Mislabeling in Meat Products Using DNA-Based Assay. *J. Food Sci. Technol.* v. 52 (4), p. 2479-2484, 2015.

FERNANDES, T. J. R. SILVA, C. R., COSTA, J., OLIVEIRA, M., MAFRA, I. COI Barcode- HRM as a Novel Approach for the Discrimination of Hake Species. *Fish. Res.* v. 197, p. 50-59, 2018.

FERNANDES, T. J. R., SILVA, C. R., COSTA, J., OLIVEIRA, M., MAFRA, I. High Resolution Melting Analysis of a COI Mini-Barcode as a New Approach for Penaeidae Shrimp Species Discrimination. *Food Control.* v. 82, p. 8-17, 2017.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. v. IV: Food. U.S. Code, p. 21. Disponível em: <https://www.fda.gov/federalfooddrugandcosmeticactfdcaact/fdcactchapterivfod/default>. Acesso em: 12 dez. 2019.

FURUTANI, S.; HAGIHARA, Y.; NAGAI, H. On-Site Identification of Meat Species in Processed Foods by a Rapid Real-Time Polymerase Chain Reaction System. *Meat Sci.*, v. 131, p. 56-59, 2017.

GANOPOULOS, I., BAZAKOS, C., MADEISIS, P., KALAITZIS, P., TSAFTARIS, A. Barcode DNA High-Resolution Melting (Bar-HRM) Analysis as a Novel Close-Tubed and Accurate Tool for Olive Oil Forensic Use. *J. Sci. Food Agric.* v. 93 (9), p. 2281-2286, 2013.

GARRIDO-MAESTU, A., AZINHEIRO, S., FUCIÑOS, P., CARVALHO, J., PRADO, J. Sensitive Detection of Gluten-Containing Cereals in Food Samples by Real-Time Loop-Mediated Isothermal AMPlification (qLAMP) and Real-Time Polymerase Chain Reaction (qPCR). *Food Chem.* v. 246, p. 156-163.

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.* v. 12 (10), p. e0185586, 2017.

HORACEK, M., HANSEL-HOHL, K., BURG, K., SOJA, G., OKELLO-ANYANGA, W., FLUCH, S. Control of Origin of Sesame Oil from Various Countries by Stable Isotope Analysis and DNA Based Markers: A Pilot Study. *PLoS One.* v. 10 (4), p. e0123020, 2015.

JOHNSON, R. Food fraud and “economically motivated adulteration” of food and food ingredients; CRS Report R43358 Prepared for Members and Committees of Congress; Congressional Research Service, 2014.

KALTENBRUNNER, M., HOCHEGGER, R., CICHNA-MARKL, M. (*Cervus nippon*)-Specific Real-Time PCR Method to Detect Fraudulent Labelling of Meat and Meat Products. *Sci. Rep.* v. 8, p. 7236, 2018b.

KALTENBRUNNER, M., HOCHEGGER, R., CICHNA-MARKL, M. Development and Validation of a Fallow Deer (*Dama dama*)-Specific TaqMan Real-Time PCR Assay for the Detection of Food Adulteration. *Food Chem.* v. 243, p. 82-90, 2018a.

KANE, D. E., HELLBERG, R. S. Identification of Species in Ground Meat Products Sold on the U.S. Commercial Market Using DNABased Methods. *Food Control.* v. 59, p. 158-163, 2016.

KASHI, Y., KING, D., SOLLER, M. Simple Sequence Repeats as a Source of Quantitative Genetic Variation. *Trends Genet.* v. 13 (2), p. 74-78, 1997.

KITPIPIT, T., SITTICHAN, K., THANAKIATKRAI, P. Direct-Multiplex PCR Assay for Meat Species Identification in Food Products. *Food Chem.* v. 163, p. 77-82, 2014.

LIN, C. C., FUNG, L. L., CHAN, K., LEE, C. M., CHOW, K. F., CHENG, S. H. A Rapid Low-Cost High-Density DNA-Based Multi- Detection Test for Routine Inspection of Meat Species. *Meat Sci.* v. 96 (2), p. 922-929, 2014.

LIU, Y., XIANG, L., ZHANG, Y., LAI, X., XIONG, C., LI, J., SU, Y., SUN, W., CHEN, S. DNA Barcoding Based Identification of Hippophae Species and Authentication of Commercial Products by High Resolution Melting Analysis. *Food Chem.* v. 242, p. 62-67, 2018.

LÓPEZ-CALLEJA, I. M., DE LA CRUZ, S., PEGELS, N., GONZÁLEZ, I., GARCÍA, T., MARTÍN, R. High Resolution TaqMan Real-Time PCR Approach to Detect Hazelnut DNA Encoding for ITS rDNA in Foods. *Food Chem.* v. 141 (3), p. 1872-1880, 2013.

LOPEZ-OCEJA, A., NUÑEZ, C., BAETA, M., GAMARRA, D., PANCORBO, M. M. Species Identification in Meat Products: A New Screening Method Based on High Resolution Melting Analysis of Cyt B Gene. *Food Chem.* v. 237, p. 701-706, 2017.

LU, Z., DAI, Q., YAN, Y. Fishery biology of *Cyanea nozakii* resources in the waters of Dongshan Island Chinese. *J Appl Ecol.* v. 14, p. 973-976, 2013.

MAFRA, I., FERREIRA, I. M. V. O., OLIVEIRA, M. B. P. P. Food Authentication by PCR-Based Methods. *Eur. Food Res. Technol.* v. 227 (3), p. 649-665, 2008.

MORI, Y., NAGAMINE, K., TOMITA, N., NOTOMI, T. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* v. 289, p. 150-154 2016.

NAGAMINE, K., HASE, T., NOTOMI, T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol. Cell. Probes.* v. 16 (3), p. 223-229, 2002.

NIKOLELI, G., DIMITRIOS, P., NIKOLELIS, P., SIONTOROU, C. G., KARAPETIS S., VARZAKAS, T. Novel Biosensors for the Rapid Detection of Toxicants in Foods. *Adv. Food Nutr. Res.* v. 84, p. 57-102, 2018.

ORTEA, I., O'CONNOR, G., MAQUET, A. Review on Proteomics for Food Authentication. *J. Proteomics.* v. 147, p. 212, 2016.

ORTEA, I., PASCOAL, A., CAÑAS, B., GALLARDO, J. M., BARROS-VELÁZQUEZ, J., CALO-MATA, P. Food authentication of commercially- relevant shrimp and prawn species: from classical methods to foodomics. *Electrophoresis.* v. 33, p. 2201-2211, 2012.

PASCOAL, A., BARROS-VELÁZQUEZ J., CEPEDA, A. A., GALLARDO, J. A. M., CALO-MATA, P. A Survey of the authenticity of prawn and shrimp species in commercial food products by PCR-RFLP Analysis of a 16S rRNA/tRNA^{Val} Mitochondrial Region. *Food Chem.* v. 109 (3), p. 638-646, 2008.

PEREIRA, L., GOMES, S., CASTRO, C., EIRAS-DIAS J. E., BRAZÃO, J., GRAÇA, A., FERNANDES, J. R., MARTINS-LOPES P. High Resolution Melting (HRM) Applied to Wine Authenticity. *Food Chem.* v. 216, p. 80-86, 2017.

PIRAS, P., SARDU, F., MELONI, D., RIINA, V. M., BELTRAMO, C., ACUTIS, P. L. Case Study on the Labeling of Bottarga Produced in Sardinia from Ovaries of Grey Mulletts (*Mugil cephalus* and *Mugil capurrii*) Caught in Eastern Central Atlantic Coasts. *Ital. J. Food Saf.* v. 7, p. e6893, 2018.

PRADO, M., BOIX, A., HOLST, V. C. Novel Approach for the Simultaneous Detection of DNA from Different Fish Species Based on a Nuclear Target: Quantification Potential. *Anal. Bioanal. Chem.* v. 403 (10), p. 3041-3050, 2012.

PROSSER, S. W. J., HEBERT, P. D. N. Rapid Identification of the Botanical and Entomological Sources of Honey Using DNA Metabarcoding. *Food Chem.* v. 214, p. 183-191, 2017.

RANE, T. D., CHEN, L., ZEC, H. C., WANG, T. H. Microfluidic Continuous Flow Digital Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP). *Lab Chip.* v. 15 (3), p. 776-782, 2015.

RIBANI, A., SCHIAVO G., UTZERI V. J., BERTOLINI F., GERACI C., BOVO S., FONTANESI L. Application of next Generation Semiconductor Based Sequencing for Species Identification in Dairy Products. *Food Chem.* v. 246, p. 90-98, 2018.

RIRIE, K. M., RASMUSSEN, R. P., WITTEWER, C. T. Product Differentiation by Analysis of DNA Melting Curves during the Polymerase Chain Reaction. *Anal. Biochem.* v. 245 (2), p. 154-160, 1997.

ROSLIN, T., MAJANEVA, S. The Use of DNA Barcodes in Food Web Construction: terrestrial and Aquatic Ecologists Unite! *Genome.* v. 59 (9), p. 603-628, 2016.

SAIKI, R. K., GELFAND, D. H., STOFFEL, S., SCHARF, S. J., HIGUCHI, R., HORN, G. T., MULLIS, K. B., ERLICH H. A. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science.* v. 239 (4839), p. 487-491, 1988.

SAKALAR, E., ERGUN, S.O., AKAR, E. A Simultaneous Analytical Method for Duplex Identification of Porcine and Horse in the Meat Products by EvaGreen Based Real-Time PCR. *J. Food Sci. Anim. Resour.* v. 35 (3), p. 382-388, 2015.

SALIHAN, N. T., HOSSAIN M. M., LUBIS, H., AHMED, M. U. Trends and Advances in Food Analysis by Real-Time Polymerase Chain Reaction. *J. Food Sci. Technol.* v. 53 (5), p. 2196-2209, 2016.

SHEU, S. C., TSOU, P. C., LIEN, Y. Y., Lee M. S. Development of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assays for the Rapid Detection of Allergic Peanut in Processed Food. *Food Chem.* v. 257, p. 67-74, 2018.

SHOKRALLA, S., HELLBERG, R. S., HANDY, S. M., KING, I., HAJIBABAEI, M. A DNA Mini-Barcoding System for Authentication of Processed Fish Products. *Sci. Rep.* v. 5, p. e15894, 2015.

SOARES, S., GRAZINA, L., MAFRA, I., COSTA, J., PINTO, M. A., DUC, H. P., BEATRIZ, M., OLIVEIRA, P. P., JOANA, AMARAL, S. Novel Diagnostic Tools for Asian (*Apis cerana*) and European (*Apis mellifera*) Honey Authentication. *Food Res. Int.* v. 105, p. 686-693, 2018.

SONG, K. Y., HWANG, H. J., KIM, J. H. Ultra-Fast DNA-Based Multiplex Convection PCR Method for Meat Species Identification with Possible on-Site Applications. *Food Chem.* v. 229, p. 341-346, 2017.

TABOADA, L., SÁNCHEZ, A., PÉREZ-MARTÍN, R. I., SOTELO, C. G. A New Method for the Rapid Detection of Atlantic Cod (*Gadus morhua*), Pacific Cod (*Gadus macrocephalus*), Alaska Pollock (*Gadus chalcogrammus*) and Ling (*Molva molva*) Using a Lateral Flow Dipstick Assay. *Food Chem.* v. 233, p. 182-189, 2017.

TANTILLO, G., MARCHETTI, P., MOTTOLA, A., TERIO, V., BOTTARO, M., BONERBA, E., BOZZO, G., DI PINTO, A. Occurrence of Mislabelling in Prepared Fishery Products in Southern Italy. *Ital. J. Food Saf.* v. 4 (3), p. e5358, 2015.

VON HOLST, C., A., BOIX, MARIEN, A., PRADO, M. Factors Influencing the Accuracy of Measurements with Real-Time PCR: The Example of the Determination of Processed Animal Proteins. *Food Control.* v. 24 (1-2), p.142-147, 2012.

WANG, W., ZHU, Y., CHEN, Y., XU, X., ZHOU, G. Rapid Visual Detection of Eight Meat Species Using Optical Thin-Film Biosensor Chips. *J. AOAC Int.* v. 98 (2), p. 410-414, 2015.

WARD, R. D., COSTA, F. O., HOLMES, B. H., e STEINKE, D. DNA barcoding of shared fish species from the North Atlantic and Australasia: Minimal divergence for most taxa, but *Zeus faber* and *Lepidopus caudatus* each probably constitute two species. *Aquat. Biol.* v. 3(1), p. 71-78, 2008.

WU, Y., LI, M., YANG, Y., JIANG, L., LIU, M., WANG, B., WANG, Y. Authentication of Small Berry Fruit in Fruit Products by DNA Barcoding Method. *J. Food Sci.* v. 83 (6), p. 1494-1504, 2018.

ZENG, L., WEN, J., FAN, S., CHEN, Z., XU, Y., SUN, Y., CHEN, D. Identification of Sea Cucumber Species in Processed Food Products by PCR-RFLP Method. *Food Control.* v. 90, p. 166-171, 2018.

4. ARTIGO II

A utilização do Mini-DNA *Barcode* na autenticação de pescado processado

Glauber Batista Gois

Doutorando em Genética e Melhoramento Animal, Escola de Veterinária da UFMG

E-mail: glaubergois@hotmail.com

4.1 RESUMO

O presente estudo utilizou das metodologias de DNA *Barcode* e mini-DNA *Barcode* para testar uma variedade de produtos alimentícios processados, com origem de pescados, com a finalidade de identificação de rotulagem incorreta. Foram analisadas 114 amostras de produtos de pescado comprados no varejo e em fontes *online*. Regiões do gene da citocromo C oxidase subunidade I (COI) foram amplificadas e sequenciadas utilizando *primers* específicos para DNA *Barcode*, resultando em fragmentos de aproximadamente 650 pares de bases, e também para mini-DNA *Barcode*, resultando fragmentos entre 100 a 300 pares de bases. A grande maioria das amostras (109 de 114) geraram sequências de *Barcode* nas análises. Testes com DNA *Barcode* completo apresentaram 62% de falhas, que foram solucionadas com o mini-DNA *Barcode* com sucesso de 96%. O trabalho revelou que 7 de 109 dos produtos de pescado foram rotulados incorretamente e que na maioria dos casos continham espécies não declaradas. Portanto, medidas regulatórias e monitoramento constante de rotulagem de produtos processados devem ser realizados.

4.2. ABSTRACT

The present study used the DNA Barcode and mini-DNA Barcode methodologies to test a variety of processed food products, originating from fish, in order to identify incorrect labeling. A total of 114 samples of fish products purchased in retail and online sources were analyzed. Regions of the cytochrome C oxidase subunit I (COI) gene were amplified and sequenced using specific primers for DNA Barcode, resulting in fragments of approximately 650 base pairs, and also for mini-DNA Barcode, resulting in fragments between 100 to 300

base pairs . The vast majority of samples (109 out of 114) generated Barcode sequences in the analyses. Tests with complete DNA Barcode showed 62% failures, which were resolved with the mini-DNA Barcode with 96% success. The work revealed that 7 out of 109 of the fish products were incorrectly labeled and that in most cases contained undeclared species. Therefore, regulatory measures and constant monitoring of the labeling of processed products must be carried out.

4.3. INTRODUÇÃO

A autenticação de alimentos é uma grande preocupação para a segurança e para a prevenção de fraudes alimentares. Devido à diferença de preço entre as espécies de alto valor e as de baixo valor, os alimentos de origem animal costumam estar sujeitos à adulteração para ganho econômico por parte do fabricante (Rasmussen e Morrissey, 2008; Khaksar *et al.*, 2015).

O mercado de alimentos derivados de animais tem se tornado cada vez mais desordenado devido ao aparecimento de adulterações, especialmente em produtos processados (Quinto *et al.*, 2016). Não é fácil identificar espécies animais em produtos processados, aumentando assim o potencial da rotulagem incorreta, com a substituição parcial ou completa de espécies (Perestam *et al.*, 2017).

Estudos anteriores atribuem a adulteração de alimentos a fatores como impulso econômico, erro humano, rotulagem inadequada de espécies e limpeza insuficiente durante a produção (Spink *et al.*, 2016). Usualmente existem dois tipos de adulteração de alimentos, um tipo é a substituição intencional de uma espécie por outra, o que pode ser feito por produtores, varejistas e processadores desonestos por motivos como evitar restrições à importação ou ganho financeiro, o outro tipo de adulteração de alimentos é a adulteração não intencional, que pode ocorrer durante a produção, manuseio e armazenamento (Belete, 2015). Por exemplo, o produto rotulado como peixe de menor valor comercial, mas identificado como de maior valor, resultaria em perda econômica, indicando possível manuseio incorreto do produto (Quinto *et al.*, 2016).

Diversos autores relataram taxas de rotulagem incorreta de 5% a 70% em uma grande variedade de produtos alimentícios de origem animal, incluindo carne moída, frios, salsichas, alimentos para animais de estimação, frutos do mar e carnes secas (Günther *et al.*, 2017; Hellberg *et al.*, 2017; Kane e Hellberg, 2016). No mercado brasileiro, a etiquetagem incorreta também é um problema grave (OGLOBO, 2020).

A rotulagem incorreta de produtos alimentícios de origem animal tem uma grande variedade de consequências. Uma pequena fraude comercial, por exemplo, pode causar danos potenciais à saúde, além de implicações religiosas (Kane e Hellberg, 2016).

Por consequência, a autenticação de alimentos, o aprimoramento dos regulamentos existentes e das estruturas de monitoramento se tornam fundamentais dentro e fora da indústria de alimentos. Métodos confiáveis e de fácil acesso para a rápida identificação de espécies em alimentos de origem animal são portanto decisivos para garantir a segurança alimentar do consumidor (Khaksar *et al.*, 2015).

Para detectar adulterações e determinar com eficiência as fontes biológicas de alimentos de origem animal, pesquisadores avaliaram várias técnicas analíticas nas últimas décadas. Em termos gerais, as tecnologias disponíveis para a autenticação de alimentos de origem animal incluem métodos organolépticos (Peris e Escuder-Gilbert, 2016), métodos físico-químicos e bioquímicos (Wasserman e Science, 2010) e mais recentemente as ferramentas moleculares (Iammarino *et al.*, 2016).

Como todas as metodologias, cada uma delas têm suas vantagens e desvantagens. Os métodos tradicionais de identificação organoléptica demandam profissionais altamente habilitados, com grande experiência prática para exames taxonômicos, e dificilmente conseguem distinguir entre substitutos de espécies intimamente relacionados e produtos processados (Kiani *et al.*, 2016). Os métodos físico-químicos e bioquímicos são usados para analisar metabólitos, estes podem sofrer influência de fatores ambientais, condições de cultivo, processamento ou armazenamento, inviabilizando a identificação (Orduna *et al.*, 2017).

As técnicas moleculares foram aprimoradas para análises de proteínas ou DNA nos últimos anos e melhoraram significativamente o estudo da autenticação de alimentos. No entanto, os métodos baseados em proteínas não são adequados para todas as demandas, por exemplo, muitas vezes não têm sucesso para análises de alimentos processados de origem animal (Fiorino *et al.*, 2018).

A autenticação através do DNA demonstrou ser mais confiável do que o procedimento baseado apenas em proteínas. O DNA é mais estável durante o processamento e é menos afetado por fatores externos, como idade, condição fisiológica e tipo de tecido do animal (Lo e Shaw, 2017). Outra característica de caráter prático do DNA é que, mesmo quando degradado, ainda pode ser empregado na caracterização de espécies animais (Ballin, 2010).

Portanto, as metodologias baseadas em DNA se tornaram as técnicas mais comumente usadas na identificação de espécies animais e na autenticação de alimentos, incluindo a PCR quantitativa (qPCR), o polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) e o

sequenciamento de DNA, métodos estes que possuem alta sensibilidade e especificidade (Corrado, 2016; Okuma e Hellberg, 2015).

O DNA *Barcode* é um sistema de identificação molecular e computacional que integra o sequenciamento do DNA (Parveen *et al.*, 2016). Ele fornece um método rápido, preciso e de baixo custo para a identificação concisa de espécies usando um fragmento de DNA padrão reconhecido. O DNA *Barcode* tem sido amplamente utilizado para distinguir espécies animais, vegetais, fúngicas e bacterianas (Hebert *et al.*, 2003).

Recentemente, o DNA *Barcode* ganhou considerável atenção nas pesquisas como uma ferramenta para identificação de espécies, na autenticação de alimentos e na avaliação de segurança alimentar, incluindo substituições de ingredientes, rotulagem incorreta de produtos de origem animal (Khaksar *et al.*, 2015), contaminação de alimentos e no exercício regulatório (Nicolè *et al.*, 2012).

Para a identificação de espécies animais em produtos alimentícios, o DNA *Barcode* completo é uma sequência de aproximadamente 650 pares de bases (pb) do gene mitocondrial para citocromo oxidase subunidade I (COI). No entanto, para alimentos moderadamente ou altamente processados, a qualidade do DNA pode ser severamente afetada e, portanto, a amplificação por PCR de *Barcodes* completos dessas amostras pode ser um desafio (Hajibabaei *et al.*, 2007; Sarri *et al.*, 2014).

Alternativamente, o método de mini-DNA *Barcode*, que se concentra na análise de marcadores de DNA de comprimento curto (100-300 bp), demonstrou ser eficaz para a identificação de espécies de alimentos processados contendo DNA degradado (Shokralla, *et al.*, 2015). Mini-DNA *Barcodes* são fragmentos de DNA *Barcode* dentro da região do COI completo que podem fornecer informações suficientes para identificação de espécies individuais com resolução acima de 98% (Hajibabaei *et al.*, 2006; Shokralla *et al.*, 2011).

Além do COI, outros mini-DNA *Barcodes*, como o gene do citocromo b (*cytb*) e o *16S* do RNA ribossômico, já foram usados em análises filogenéticas ou para complementar as análises do COI em estudos de *Barcodes* de DNA (Sarri *et al.*, 2014). O presente trabalho teve como objetivo desenvolver e avaliar a eficácia da utilização de mini-DNA *Barcodes* como método de discriminação de espécies em alimentos de pescados processados de origem nacional.

4.4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.4.1. COLETA DE AMOSTRAS

Foi obtido o total de 114 produtos processados de pescados rotulados como contendo uma única espécie animal. Parte dessas amostras foi adquirida de fontes *online*, enquanto outras foram coletadas no mercado local e em restaurantes da cidade de Belo Horizonte-MG. Todas as amostras foram catalogadas e armazenadas a - 20°C. Antes da análise, as amostras foram previamente descongeladas durante a noite a uma temperatura de 4°C.

4.4.2. EXTRAÇÃO DE DNA

A obtenção do DNA total de cada amostra foi realizada utilizando o kit comercial de extração de DNA *DNeasy Blood e Tissue kit* (Quiagen) ou o método de extração “*Salting Out*” descrito por Aljanabi e Martinez (1997).

4.4.3. DNA *BARCODE* COMPLETO

Para amplificação do fragmento de 650 pb do gene COI, foram utilizados os *primers*: o FishF1 *Forward* (5' ACGCCTGTTTATCAAAAACAT-3'), o FishR1 *Reverse* (5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3'), o FishF2 *Forward* (5'-TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC-3') e o FishR2 *Reverse* (5'- ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA-3') (Ward *et al.*, 2005). Para amplificação por PCR utilizou-se em cada reação: 2,5 µl de dNTP na concentração inicial de 1nM, 5 µl de Tampão 5X (Promega™), 0,24 µl de cada iniciador na concentração inicial de 1µM, 2 µl de MgCl₂ a 25µM, 0,25 µl de Taq DNA polimerase (Promega™) e 100 ng de DNA. O volume final da reação foi ajustado para 25 µl utilizando-se água ultrapura. As amplificações foram administradas em termociclador *Veriti® - 96-Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems™). Foi adicionado um processo de desnaturação inicial de 1 minuto a 94°C seguido de 35 ciclos de: 94°C por 60 segundos, 54°C por 90 segundos e 72°C por 60 segundos, e uma extensão final a 72°C por 5 minutos.

O sequenciamento foi realizado utilizando-se o kit *BigDye 3.1 Terminator Cycle Sequencing* (Applied Biosystems™). As reações foram feitas utilizando-se 1µl do produto da PCR, 1µl de um dos *primers* a 10µM, 1,5 µl de tampão 5X, 1 µl de *Big Dye terminator* e 5,5

μl de água ultrapura, completando-se o volume final de cada reação para 10μl. As amostras foram novamente inseridas em um termociclador *Veriti – 96 Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems™) com um processo de desnaturação inicial a 96°C por 1 minuto e 30 ciclos de desnaturação a 96°C por 15 segundos, uma etapa de anelamento a 50°C por 15 segundos, extensão a 60°C por 4 minutos e extensão final a 72°C por 8 minutos. Os *primers* utilizados foram os mesmos da reação inicial de PCR.

A precipitação do DNA foi realizada em placas de 96 poços da seguinte forma: acrescentou-se 2,5 μl de EDTA na concentração de 125 μM, pH 8,0 e 30 μl de etanol 100% em cada poço. Depois de homogeneizadas, as soluções nas placas foram incubadas à temperatura ambiente por 15 minutos e centrifugadas a 2.200 rpm por 45 minutos. Descartou-se o sobrenadante e o DNA foi lavado com 30 μl de etanol 70% e submetido à nova centrifugação por 15 minutos a 1.850 rpm. Descartou-se o sobrenadante novamente e a placa foi colocada em estufa para secagem do DNA. Em seguida, adicionou-se 15 μl de formamida e homogeneizada. Após esse processo, as placas foram inseridas no Sequenciador Capilar ABI 3500 (Applied Biosystems) e sequenciadas bidirecionalmente.

Para a análise dos resultados foi utilizado o *software Sequencing Analysis 5.2* (Life Technologies) para visualização do eletroferograma e dos parâmetros qualitativos das sequências obtidas. A geração da fita consenso foi feita utilizando-se o *software CodonCode Aligner v. 9.2.1* (CodonCode Corp., Dedham, MA, EUA). As sequências das amostras foram comparadas com sequências previamente depositadas no BOLD (<https://www.boldsystems.org/>). Estas em seguida foram inseridas no *software Molecular Evolutionary Genetics Analysis v. 10* (MEGAX) para análise (Koichiro *et al.*, 2021).

4.4.4. MINI-DNA BARCODE

Para as reações com o mini-DNA *Barcode*, cada reação de amplificação continha 2μl de DNA (100 ng), 17,5μl de água ultrapura, 2,5μl de tampão de reação 10X, 1μl de MgCl₂ (50μM), 0,5μl de mistura de dNTPs (10 mM), 0,5μl do *primer forward* (10μM), 0,5μl do *primer reverse* (10μM) e 0,5 μl de polimerase *Platinum Taq da Invitrogen* (5U/μl) em um volume total de 25 μl. As condições de PCR foram iniciadas com uma tampa aquecida a 95°C por 5 minutos, seguida por um total de 35 ciclos de 94°C por 40 segundos, 51°C por 1 minuto e 72°C por 30 segundos, e extensão final em 72°C durante 5 minutos e mantidas a 4°C. As reações de PCR foram realizadas utilizando termocicladores *Veriti - 96-Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems™).

Para projetar os primers do mini-DNA Barcode, as sequências da região COI mitocondrial para 60 espécies de peixes de diferentes famílias de peixes foram alinhadas e comparadas com *software* MEGAX e *software* de alinhamento Clustal W (Rashid et al., 2015). Os locais-alvo foram escolhidos pela verificação de sequências com poucas incompatibilidades dentro das espécies de peixes. Quatro pares de primers foram construídos usando o *software* PRIMER 3 PLUS (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Um conjunto de primers eucarióticos universais relatados anteriormente (*Forward*: 5'-GGTAGTGACGAAAATAACAATACAGGAC-3' e *Reverse*: 5'-ATACGCTATTGGAGCTGGAATTACC-3') direcionado a um local de 141 bp de 18srRNA eucariótico foi usado como um controle interno (Hossain et al., 2016). Os primers foram sintetizados pela IDT (Integrated DNA Technologies, Singapura).

Tabela 1: Primers utilizados na amplificação por PCR e sequenciamento de mini-DNA Barcode em produtos de pescado processado.

Nome	Direção	Sequência 5' - 3'	Tamanho do Barcode (pb)
Fish_miniA_F	Forward	CACGACGTTGT AAGGAIGCCCAICAIAAAGAYAT YGGC	190
Fish_miniA_R	Reverse	GGAT AACAAT GGCCT AT AIGGAARAAAATYATAACRAGC	
Fish_miniB_F	Forward	CICGACGTTGT AGGGCACIIACIGGITGRACIGTITAYCCYCC	238
Fish_miniB_R	Reverse	GGIT AACAATTTGCGCGCGCTRATICCIGCIGCIAGIAC	
Fish_miniC_F	Forward	CACGACGTTGT AAAYAGGCCAGAAICAYAAAGAYATIGGCAC	127
Fish_miniC_R	Reverse	GGATAACAATTTTICAGAGGAARATCATAATGAAGGCATGIGC	
Fish_miniD_F	Forward	CACIACGTTGT AAAYAGGCATGGT ACCAT AAGAYATIGGCAC	292
Fish_miniD_R	Reverse	GGIT AACAACATTGT GGT GACCCTATATATAATGAAGGCATGIGC	

Em seguida os resultados das reações foram precipitados utilizando o mesmo protocolo para o DNA Barcode completo descrito anteriormente. Após esse processo, as placas foram inseridas no Sequenciador Capilar ABI 3500 (Applied Biosystems) e sequenciadas bidirecionalmente utilizando um dos primers da Tabela 2 por vez.

A edição da sequência e a montagem da fita consenso foram realizadas utilizando o *CodonCode Aligner v. 9.2.1* (CodonCode Corp., Dedham, MA, EUA). A identificação das amostras testadas foi conduzida usando *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) no NCBI, com um corte mínimo de 98% de identidade para uma correspondência.

As sequências de consenso foram alinhadas usando algoritmo ClustalW, pelo *software* MEGAX (Koichiro et al., 2021). As sequências COI de mini-DNA Barcode geradas foram comparadas à biblioteca de referência de sequências no BOLD. As principais espécies com

semelhança acima de 98% com a sequência de consulta foram registradas. As sequências que não puderam ser identificadas no BOLD foram comparadas às do *National Center for Biotechnology Information-NCBI* (www.ncbi.nlm.nih.gov) usando a BLAST para estabelecer a identidade mais provável dos espécimes.

Para a construção das árvores filogenéticas, aplicou-se o algoritmo de agrupamento *Neighbor-Joining* (NJ), utilizando o método de *bootstrap* com 1000 réplicas (Felsenstein, 1985) e modelo de substituição de nucleotídeos *Kimura-2-parameter* (K2P) (Kimura, 1980). As análises das árvores filogenéticas baseadas por esse método foram realizadas com o programa MEGAX (Koichiro *et al.*, 2021).

4.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O DNA foi extraído com sucesso de 114 produtos de pescado processado. No entanto, apenas 43 amostras mostraram amplificação por PCR e sequenciamentos bem-sucedidos do DNA *Barcode* completo. As amostras que falharam na amplificação por PCR e no subsequente sequenciamento foram extraídas novamente e a PCR e o sequenciamento foram repetidos para confirmar o resultado inicial. Entre aqueles sequenciados com sucesso para *Barcode* completo, o comprimento médio da sequência foi de 616 bp.

As sequências não apresentaram *indels* ou *stop códons*, os quais poderiam identificar a amplificação de fragmentos de DNA mitocondrial transmitidos para o genoma nuclear (NUMTs) e tiveram menos de 2% de bases ambíguas. As médias gerais das frequências nucleotídicas foram G=18,55%; C=28,66%; A=23,62%; e T=29,14%.

Todas as amostras sequenciadas com o DNA *Barcode* completo, apresentaram similaridade genética acima de 98% com outras amostras depositadas em nível de espécie no BOLD. Considerando o tipo de produto, o DNA *Barcode* completo foi bem-sucedido para todas as amostras de alimentos minimamente processados como pescados frescos e congelados, mas não foi eficaz para 65% dos produtos altamente processados (cozidos, defumados, salgados ou enlatados).

A falha na amplificação de DNA *Barcode* completo foi provavelmente devido à degradação do DNA em produtos processados. Como esses produtos tinham diferentes graus de processamento, a quantidade e a qualidade do DNA também foram afetadas de forma variável, e a degradação na maioria das amostras processadas impediria a amplificação por PCR de fragmentos com mais de 300 bp (Sarri *et al.*, 2014). Além disso, a degradação dos locais de

ligação dos *primers* também pode impedir a amplificação do COI (Wallace *et al.*, 2012), limitando assim a recuperação do DNA *Barcode* completo.

Para contornar as limitações dos *Barcode* completos de DNA, vários estudos apontaram a necessidade de direcionar fragmentos curtos de DNA para amplificação por PCR de produtos com material genético degradado (Günther *et al.*, 2017; Sarri *et al.*, 2014).

Todas as extrações de DNA para o mini-DNA *Barcode*, resultaram em produtos de PCR que eram visíveis como bandas únicas com o tamanho esperado no gel de agarose. Um total de 67 amostras, geraram sequências de mini-*Barcode* de DNA interpretáveis. O comprimento médio dos mini-DNA *Barcode* com sucesso no sequenciamento foi de 183 bp.

Tabela 2. Resultados comparativos dos sequenciamentos para os produtos de pescado processados utilizando os *primers* para mini-DNA *Barcode*.

Resultados do Mini-DNA <i>Barcode</i>				
Amostra	Fish_miniA_F	Fish_miniB_F	Fish_miniC_F	Fish_miniD_F
	Fish_miniA_R	Fish_miniB_R	Fish_miniC_R	Fish_miniD_R
1	✓	✓	-	✓
2	-	✓	✓	✓
3	✓	✓	✓	✓
4	-	✓	✓	-
5	-	✓	✓	✓
6	✓	✓	-	✓
7	✓	✓	✓	✓
8	✓	✓	✓	-
9	-	✓	-	✓
10	-	-	-	-
11	-	✓	✓	✓
12	✓	✓	✓	✓
13	✓	-	✓	✓
14	✓	✓	✓	✓
15	✓	✓	✓	✓
16	-	-	-	-
17	✓	✓	✓	✓
18	✓	✓	✓	✓
19	✓	-	✓	✓
20	-	✓	✓	✓
21	-	✓	✓	✓
22	✓	✓	✓	-
23	-	✓	✓	✓
24	✓	✓	-	✓
25	-	-	✓	✓
26	✓	✓	-	✓
27	✓	✓	✓	✓
28	✓	✓	-	-
29	✓	✓	-	✓
30	✓	✓	✓	✓
31	✓	-	-	✓
32	✓	✓	✓	✓
33	✓	✓	✓	✓
34	✓	✓	✓	-
35	✓	✓	-	✓
36	✓	✓	✓	✓
37	✓	-	✓	✓

38	✓	✓	✓	✓
39	✓	✓	✓	✓
40	✓	✓	-	✓
41	✓	-	✓	-
42	✓	✓	✓	✓
43	✓	✓	-	✓
44	✓	✓	✓	✓
45	✓	✓	✓	✓
46	✓	-	✓	-
47	✓	-	✓	✓
48	-	-	-	-
49	✓	✓	✓	✓
50	✓	✓	✓	✓
51	-	✓	✓	✓
52	✓	✓	✓	✓
53	✓	✓	✓	✓
54	-	-	-	-
55	✓	✓	✓	✓
56	✓	✓	✓	✓
57	✓	✓	✓	-
58	✓	✓	-	✓
59	✓	-	✓	✓
60	✓	✓	✓	✓
61	✓	✓	✓	-
62	✓	✓	✓	✓
63	✓	✓	✓	✓
64	✓	✓	✓	✓
65	✓	✓	✓	✓
66	✓	✓	✓	-
67	✓	✓	✓	✓
68	✓	✓	✓	✓
69	✓	✓	✓	✓
70	✓	-	✓	✓
71	✓	✓	✓	✓

A maioria das amostras sequenciadas mostraram similaridade genética em nível de espécie no BOLD ou no NCBI. Dessas 71 amostras, 65 apresentaram correspondências genéticas superiores a 98% para sequências de apenas uma espécie. Duas amostras: 60 - *Piaractus brachypomus* e *Piaractus mesopotamicus*, 61 - *Zungaro zungaro* e *Pseudoplatystoma corruscans*, apresentaram de similaridade genética superior 98% para duas espécies, o que pode indicar um erro de depósitos nos bancos de dados, pois o resultado de uma das espécies foi muito discrepante dos demais resultados. Quando várias espécies apresentam divergência de sequências insuficiente na região do *Barcode* selecionado, o DNA *Barcode* pode ser insatisfatório para a identificação da espécie (Ward *et al.*, 2008).

Este resultado demonstrou que o mini-DNA *Barcode* fornece uma contribuição significativa para a identificação de espécies com base em DNA *Barcode* em todos os alimentos derivados de pescado testados. Das espécies analisadas que puderam ser discriminadas sem ambiguidade pela abordagem do mini-DNA *Barcode*, algumas demonstraram a eficácia na diferenciação de espécies congêneres como por exemplo: *Oncorhynchus kisutch*,

Oncorhynchus mykiss e *Oncorhynchus keta*; também para *Pseudoplatystoma corruscans*, *Pseudoplatystoma fasciatum* e *Pseudoplatystoma reticulatum*.

O mini-DNA *Barcode*, foi capaz de identificar amostras no nível de espécie para a grande maioria de produtos processados. Todas as amostras de atum testadas foram identificadas como pertencentes ao gênero *Thunnus*, exceto as amostras 02, 03, 12 e 32, que foram identificadas como *Katsuwonus pelamis* (Bonito Listrado). Contudo, é importante notar que é um desafio discriminar entre espécies de atum intimamente relacionadas devido às grandes correspondências do gene COI para de espécies de *Thunnus* com nível acima de 98% de similaridade genética, mesmo com o DNA *Barcode* completo. O resultado, condiz com as identificações das espécies que estava declarado no rótulo para estes produtos (Rasmussen *et al.*, 2018).

Baseado nestes resultados, o mini-DNA *Barcode* pode ser usado para a identificação de atum em até nível de gênero, mas não é recomendado para a diferenciação confiável de espécies dentro do gênero *Thunnus*. Estudos anteriores também relataram dificuldades na diferenciação de espécies de *Thunnus* usando apenas o DNA *Barcode* completo como único marcador genético (Abe *et al.*, 2014, Lowenstein, 2019). Para estas espécies de alto interesse comercial e ecológico, análises baseadas em outros marcadores, por exemplo o gene do RNA ribossômico 16s (16SrRNA) ou marcadores nucleares suplementares devem ser considerados (Armani *et al.*, 2015; Lowenstein *et al.*, 2019).

Duas amostras, 25 - *Sphyræna picudilla* e 69 - *Leporinus obtusidens*, tiveram correspondências de espécies, mas com taxas pouco menores que 98% de similaridade genética. É possível que essas amostras sejam de espécies cujos dados de sequência ainda não foram depositados nos bancos de dados. Mas não houve dúvidas ou divergências quando comparado com outras respostas do BOLD ou NCBI. Portanto, a base de dados conseguiu identificá-los ao nível de espécie o que concorda com o descrito por Quinto *et al.* em 2016.

Dois produtos, amostras: 48 - molho Tailandês de anchova, 54 - molho concentrado de galeota, não produziram sequências legíveis. Ambas as amostras de molho não foram amplificadas com o conjunto de *primers* de mini-DNA *Barcode*. Isso provavelmente ocorreu porque um dos principais fatores que limitam a aplicação de técnicas baseadas em DNA para analisar alimentos processados, é o uso de aditivos como óleo ou ácido que levam à degeneração do DNA (Armani *et al.*, 2015).

Neste estudo, o mini-DNA *Barcode* exibiu um padrão relativamente alto de divergência entre as espécies. Assim, considerando seu preço e simplicidade, ao lado dos resultados do

DNA *Barcode* completo, o mini- DNA *Barcode* se mostra bastante eficaz para autenticação em nível de espécies em produtos processados.

Considerando todas as espécies e tipos de produtos, 88,7 % das amostras permitiram uma identificação específica. A Tabela 3 mostra os resultados dos produtos alimentícios de pescados processados que foram testados com o mini-DNA *Barcode*. Discrepâncias entre as espécies reais e as declaradas nos produtos foram classificadas nas três categorias a seguir:

I- 81,7% das amostras continham apenas uma única espécie animal que correspondia ao nome comercial na lista de ingredientes. Esses eram produtos de pescados puros e resultaram em apenas uma única sequência.

II- 7% das amostras apresentaram discrepâncias entre a rotulagem e o conteúdo: 08 - Ração para gatos, 39 - Moqueca de Surubim, 49 - Tilápia empanada, 50 – Hambúrguer de Tilápia, 56 - Sardinha frita.

III- Duas amostras, 10 - Manjuba enlatada e 16 - Surimi - Kani-kama, apresentaram múltiplos picos de sobreposição, impedindo de identificar a composição animal do produto. Os sinais de sobreposição foram provavelmente devido a co-amplificação de regiões de DNA não-alvo (Günther *et al.*, 2017; Shokralla *et al.*, 2012).

Tabela 3. Resultados detalhados para todos os produtos de pescado processados testados neste estudo usando mini-DNA *Barcode*.

Amostra	Produto	Espécie Informada	Processamento	Mini Dna Barcode
1	Atum assado	Atum	Assado	<i>Thunnus sp.</i>
2	Atum	Atum	Enlatado	<i>Katsuwonus pelamis</i>
3	Atum	Atum	Enlatado	<i>Katsuwonus pelamis</i>
4	Ovas tipo Caviar	Capelim	Salgado	<i>Mallotus villosus</i>
5	Ovas tipo Caviar	Capelim	Salgado	<i>Mallotus villosus</i>
6	Bacalhau	Bacalhau	Salgado	<i>Gadus macrocephalus</i>
7	Bacalhau	Bacalhau	Salgado	<i>Gadus macrocephalus</i>
8	Ração para gatos	Salmão	Cozimento	<i>Gallus gallus</i>
9	Peixe frito	Panga	Frito	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>
10	Manjuba	Manjuba	Enlatado	
11	Atum	Atum	Cozimento	<i>Thunnus sp.</i>
12	Atum	Atum	Grelhado	<i>Katsuwonus pelamis</i>
13	Atum	Atum	Enlatado	<i>Thunnus sp.</i>
14	Salmão	Salmão	Assado	<i>Oncorhynchus kisutch</i>
15	Bacalhau	Bacalhau	Salgado	<i>Gadus macrocephalus</i>
16	Surimi	Peixe branco	Cozimento	
17	Peixe Branco	Peixe Branco	Ácido	<i>Merluccius hubbsi</i>
18	Sardinha	Sardinha	Enlatado	<i>Sardina pilchadus</i>
19	Sardinha	Sardinha	Enlatado	<i>Sardina pilchadus</i>

20	Atum	Atum	Enlatado	<i>Thunnus sp.</i>
21	Atum	Atum	Enlatado	<i>Thunnus sp.</i>
22	Atum	Atum	Enlatado	<i>Thunnus sp.</i>
23	Carpaccio salmão	Salmão	Acido	<i>Oncorhynchus keta</i>
24	Piracui	Acari	Cozimento	<i>Hypostomus plecostomus</i>
25	Farinha de peixe	Peixe Branco	Cozimento	<i>Sphyræna picudilla</i>
26	Farinha de peixe	Tilápia	Cozimento	<i>Oreochromis niloticus</i>
27	Surimi	Peixe Branco	Surimi	<i>Micromesistius australis</i>
28	Ração para Peixes	Peixe ornamental	Cozimento	<i>Damia cancellata</i>
29	Empanados	Merluza	Frito	<i>Merluccius hubbsi</i>
30	Empanados	Merluza	Frito	<i>Merluccius hubbsi</i>
31	Ração para Peixes	Tilápia	Cozimento	<i>Oreochromis niloticus</i>
32	Farinha de peixe	Atum	Cozimento	<i>Katsuwonus pelamis</i>
33	Merluza	Merluza	Frito	<i>Merluccius hubbsi</i>
34	Pescada olhuda	Pescada	Assado	<i>Cynoscion guatucupa</i>
35	Truta Arco íris	Truta	Assado	<i>Oncorhynchus mykiss</i>
36	Ração Peixes	Peixe ornamental	Cozimento	<i>Hyphessobrycon eques</i>
37	Piramutaba	Piramutaba	Cozimento	<i>Brachyplatystoma vaillantii</i>
38	Hambúrguer de peixe	Tilápia	Assado	<i>Oreochromis niloticus</i>
39	Cachara	Surubim	Cozimento	<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>
40	Ovas de salmão	Salmão	Salgado	<i>Oncorhynchus keta</i>
41	Merluza	Merluza	Frito	<i>Merluccius hubbsi</i>
42	Pintado	Cachara	Cozimento	<i>Pseudoplatystoma reticulatum</i>
43	Truta Arco íris	Truta	Assado	<i>Oncorhynchus mykiss</i>
44	Cavalinha	Peixe branco	Ácido	<i>Decapterus tabl</i>
45	Ração para peixes	Peixe ornamental	Cozimento	<i>Gymnocorymbus ternetzi</i>
46	Cavalinha	Peixe branco	Frito	<i>Decapterus tabl</i>
47	Atum	Atum	Cozimento	<i>Thunnus sp.</i>
48	Molho Tailândes	Anchova	Fermentado	
49	Tilápia	Tilápia	Frito	<i>Merluccius hubbsi</i>
50	Hamburger de peixe	Tilápia	Frito	<i>Merluccius hubbsi</i>
51	Tilápia	Tilápia	Acido	<i>Oreochromis niloticus</i>
52	Tilápia	Tilápia	Defumado	<i>Oreochromis niloticus</i>
53	Tilápia	Tilápia	Enlatado	<i>Oreochromis niloticus</i>
54	Molho coreano	Galeota	Fermentado	
55	Atum	Atum	Frito	<i>Thunnus sp.</i>
56	Pate de Atum	Atum	Enlatado	<i>Thunnus sp.</i>
57	Atum	Atum	Acido	<i>Thunnus sp.</i>
58	Atum	Atum	Defumado	<i>Thunnus sp.</i>
59	Atum	Atum	Enlatado	<i>Thunnus sp.</i>
60	Empanados	Pacu	Frito	<i>Piaractus brachyomus/Piaractus mesopotamicus</i>
61	Pintado	Pintado	Cozido	<i>Zungaro zungaro/Pseudoplatystoma corruscans</i>
62	Salmão	Salmão	Assado	<i>Oncorhynchus kisutch</i>
63	Patê de salmão	Salmão	Enlatado	<i>Oncorhynchus kisutch</i>
64	Salmão	Salmão	Defumado	<i>Salmo Salar</i>
65	Salmão	Salmão	Enlatado	<i>Salmo Salar</i>
66	Quibe de peixe	Tilapia	Frito	<i>Oreochromis niloticus</i>

67	Cavala	Sardinha	Frito	<i>Decapterus punctatus</i>
68	Sardinha	Sardinha	Assado	<i>Sardina pilchardus</i>
69	Ração para peixes	Piau	Cozimento	<i>Leporinus obtusidens</i>
70	Sardinha	Sardinha	Defumado	<i>Sardina pilchardus</i>
71	Sardinha	Sardinha	Enlatado	<i>Sardina pilchardus</i>

No geral, este estudo confirmou que a maioria das amostras sequenciadas estão corretamente rotuladas, 7% das amostras foram determinadas como erroneamente rotuladas ou eram de espécies não declaradas e 5,6% das amostras eram espécies indeterminadas usando esta metodologia.

Nos casos em que os produtos foram identificados como amostras potencialmente erradas ou sequenciadas sem sucesso, uma segunda rodada de replicação foi conduzida para confirmar nossos resultados anteriores. A etiquetagem incorreta foi observada em vários tipos de produtos processados, por exemplo, cozidos, fritos e enlatados. Uma taxa de adulteração de 60% foi observada nos alimentos cozidos, enquanto os enlatados apresentaram a menor taxa de 20%.

As taxas de sucesso para cada conjunto de *primers* utilizado foram semelhantes: 81,7% para o Fish_miniA_F e Fish_miniA_R, 80,3% para o Fish_miniB_F e Fish_miniB_R, 81,7% para o Fish_miniC_F e Fish_miniC_R, 83,1% para Fish_miniD_F e Fish_miniD_R. Essas taxas não foram estatisticamente diferentes para o teste de qui quadrado (considerando o nível de significância 0,05).

Segundo Hellberg *et al.* (2017), para produtos alimentícios de origem animal processados, o processamento pode levar à adição de outras espécies que não são reveladas no rótulo. No entanto, a impossibilidade de identificar visualmente as espécies nesses produtos, cuja aparência e características sensoriais foram alteradas por técnicas de processamento, aliada a variações nos preços, aumenta o potencial de substituição de espécies.

Os resultados do presente estudo revelaram a ocorrência de produtos alimentares derivados de pescados erroneamente rotulados, confirmando assim os achados de outros estudos (Hui-ping *et al.*, 2016). Embora alguns regulamentos para segurança e qualidade alimentar existam, essa pesquisa mostra que a aplicação desses regulamentos requer melhorias adicionais, com novas emendas associadas à rotulagem clara e consistente de ingredientes alimentícios que ainda são necessárias para monitorar efetivamente o comércio de alimentos de origem animal. O sistema de mini-DNA *Barcode* desenvolvido fornece uma ferramenta útil para a identificação de espécies que é aplicável a produtos processados derivados de pescado e para rotulagem incorreta, usando a tecnologia de sequenciamento Sanger.

No entanto, como qualquer outra técnica, o mini-DNA *Barcode* tem vantagens e desvantagens. Com base no sequenciamento Sanger, o DNA *Barcode* é aplicável para produtos alimentícios de origem animal que contêm uma única espécie animal. No entanto, quando os produtos alimentícios contêm múltiplas espécies animais, estes não podem ser facilmente identificados pelo sequenciamento Sanger devido à presença de múltiplos segmentos de DNA, que podem causar picos ambíguos devido à dificuldade na determinação do par de bases.

Neste estudo duas amostras continham mais de uma espécie dentro do produto (010 - Manjuba enlatada e 016 - Surimi - Kani-kama), e outras duas amostras (048 - molho Tailandês de anchova, 054 - molho concentrado de galeota) foram fortemente processadas, o mini-DNA *Barcode* não foi suficiente para confirmar a identidade destas amostras. As eficiências de amplificação por PCR do DNA *Barcode* e do mini-DNA *Barcode* variaram devido aos diferentes pontos de atuação, conseqüentemente levando à identificação de diferentes espécies predominantes. Geralmente, produtos mistos não podem ser facilmente identificados por DNA *Barcode* com base no sequenciamento de Sanger, portanto devem ser analisados por outras abordagens (Günther *et al.*, 2017).

Nos resultados obtidos com o sequenciamento Sanger, as amostras contendo uma única espécie animal (amostras 38 e 68) apresentam picos únicos (A1 e A2 - Figura 1). Amostras contendo mais de uma espécie apresentam picos sobrepostos, mas não foram úteis para determinar a sequência de DNA predominante (amostras controladas com duas espécies com proporção 50%, B1 e B2 - Figura 2). Amostras contendo várias espécies (amostras 10 e 16) apresentam múltiplos picos de sobreposição, impedindo a identificação precisa das sequências (C1 e C2 - Figura 3).

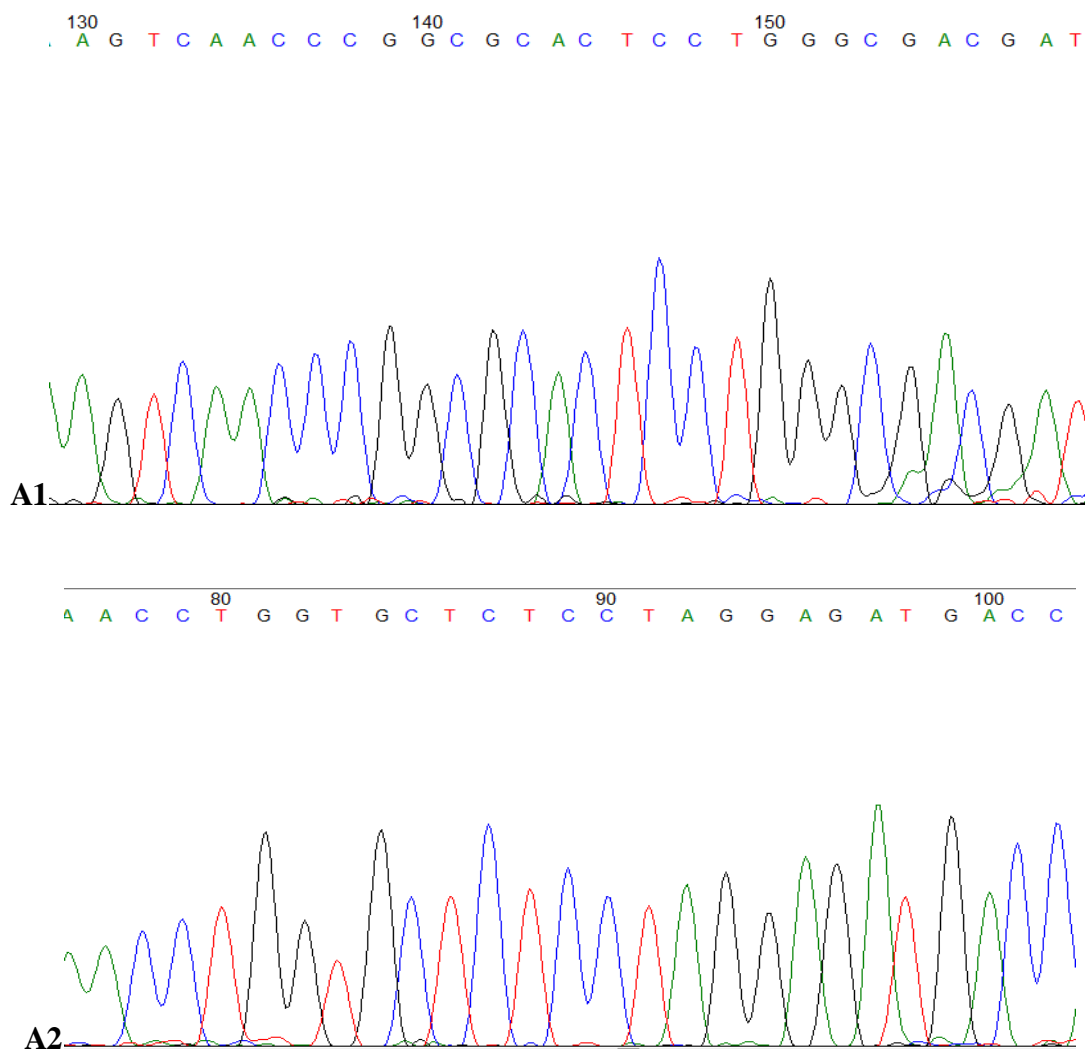


Figura 1: Sinais de sequenciamento de DNA obtidos com sequenciamento Sanger. Amostras contendo uma única espécie (amostras 38 e 68) apresentam picos únicos (A1 e A2, respectivamente).

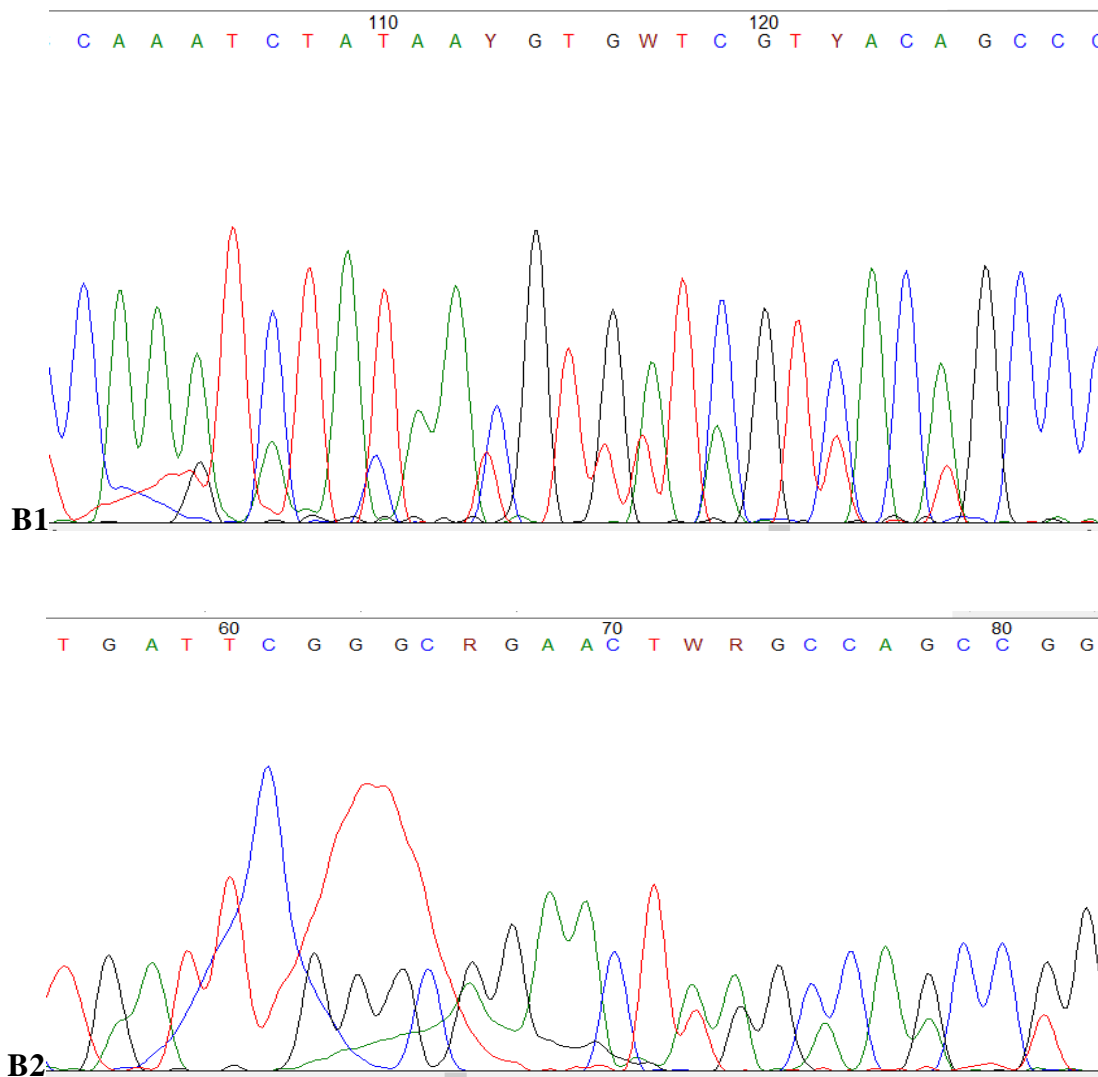


Figura 2: Sinais de sequenciamento de DNA obtidos com sequenciamento Sanger. Amostras controladas contendo misturas duas espécies na proporção de 50% apresentam picos sobrepostos (B1 e B2).

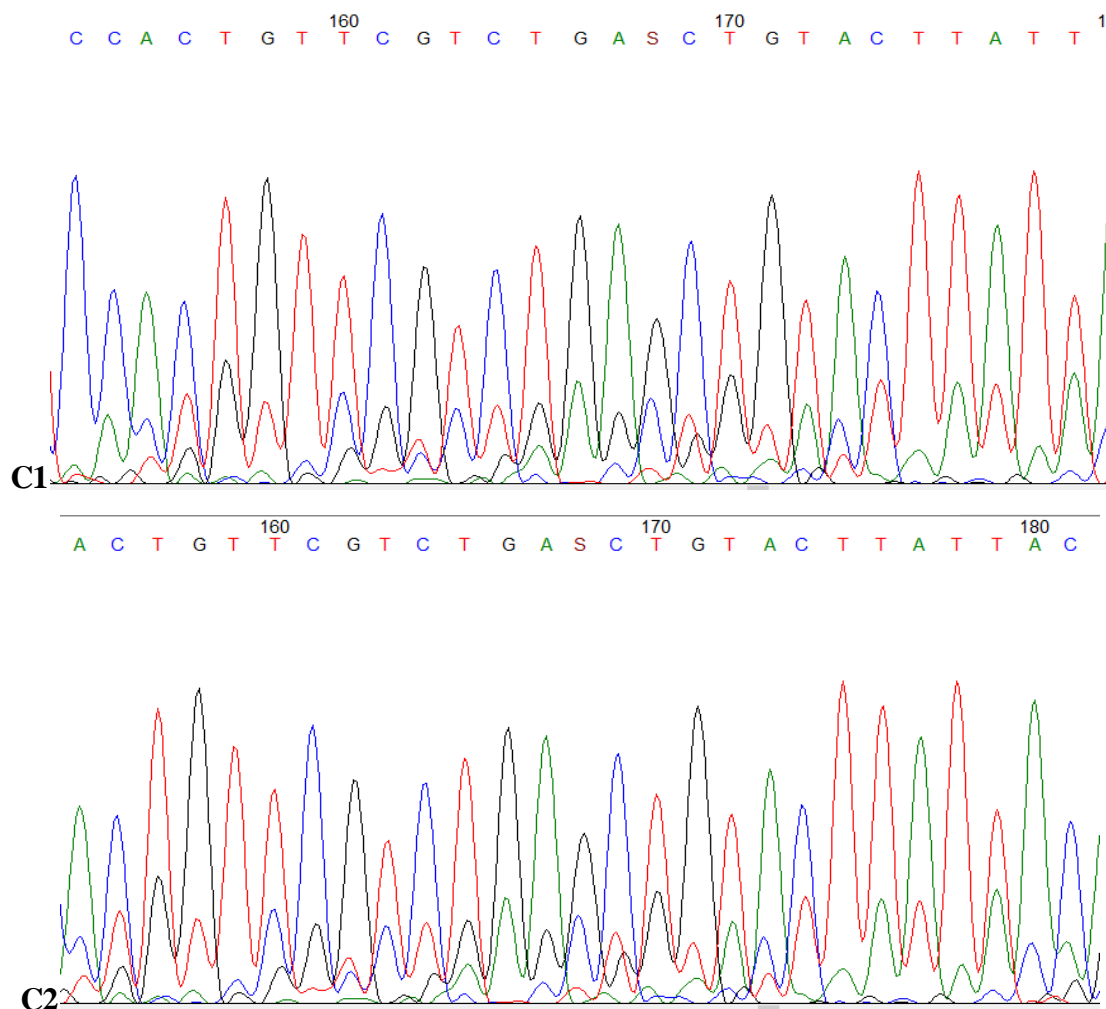


Figura 3: Sinais de sequenciamento de DNA obtidos com sequenciamento Sanger. Amostras contendo várias espécies (amostras 10 e 16) apresentam picos múltiplos (C1 e C2, respectivamente).

As árvores de *Neighbor-Joining* (Figura 4, Figura 5, Figura 6 e Figura 7) mostram que as amostras analisadas e determinadas como coespecíficos tendem a se agrupar em unidades relativamente próximas. A distância média geral de K2P dentro das espécies 1,22% foi cerca de 13 vezes inferior à distância média dentro de gêneros 15,86% com uma variação genética crescente nas categorias taxonômicas superiores.

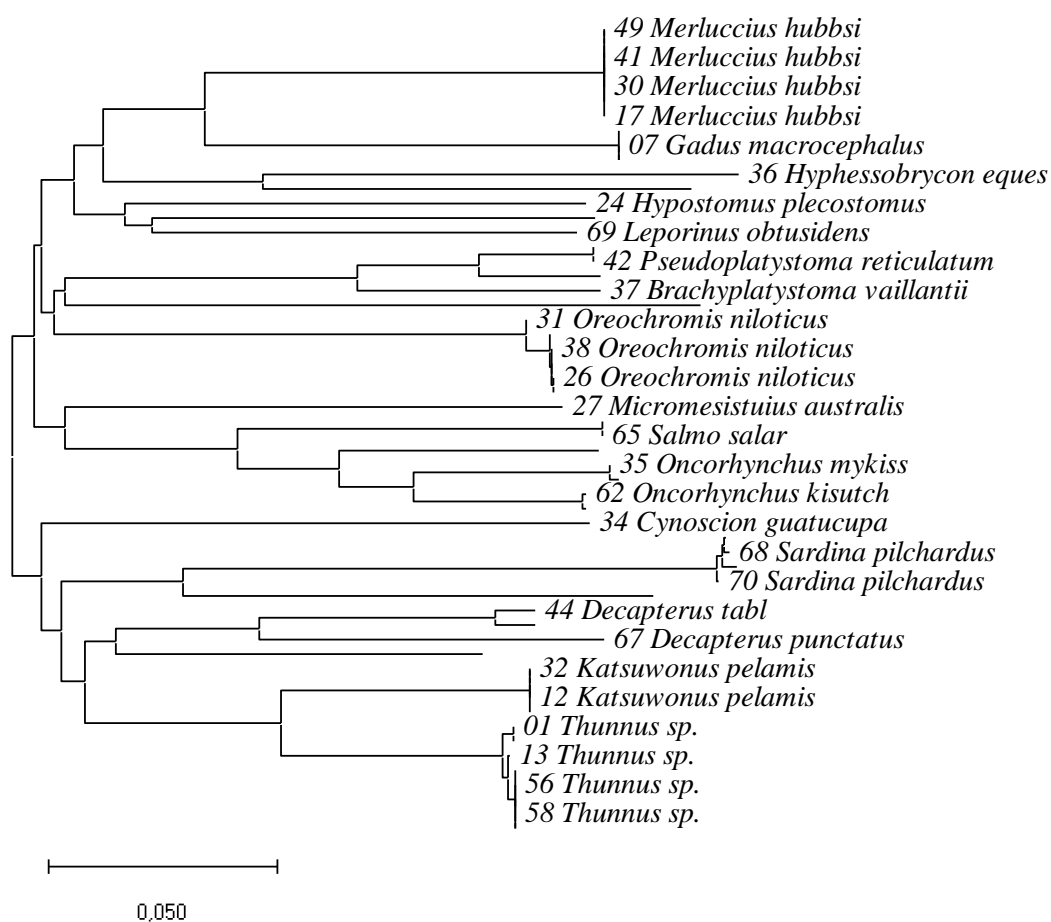


Figura 4: Árvore condensada de *Neighbor-Joining* das distâncias K2P entre fragmentos do gene COI das amostras amplificadas pelos primers Fish_miniA_F e Fish_miniA_R.

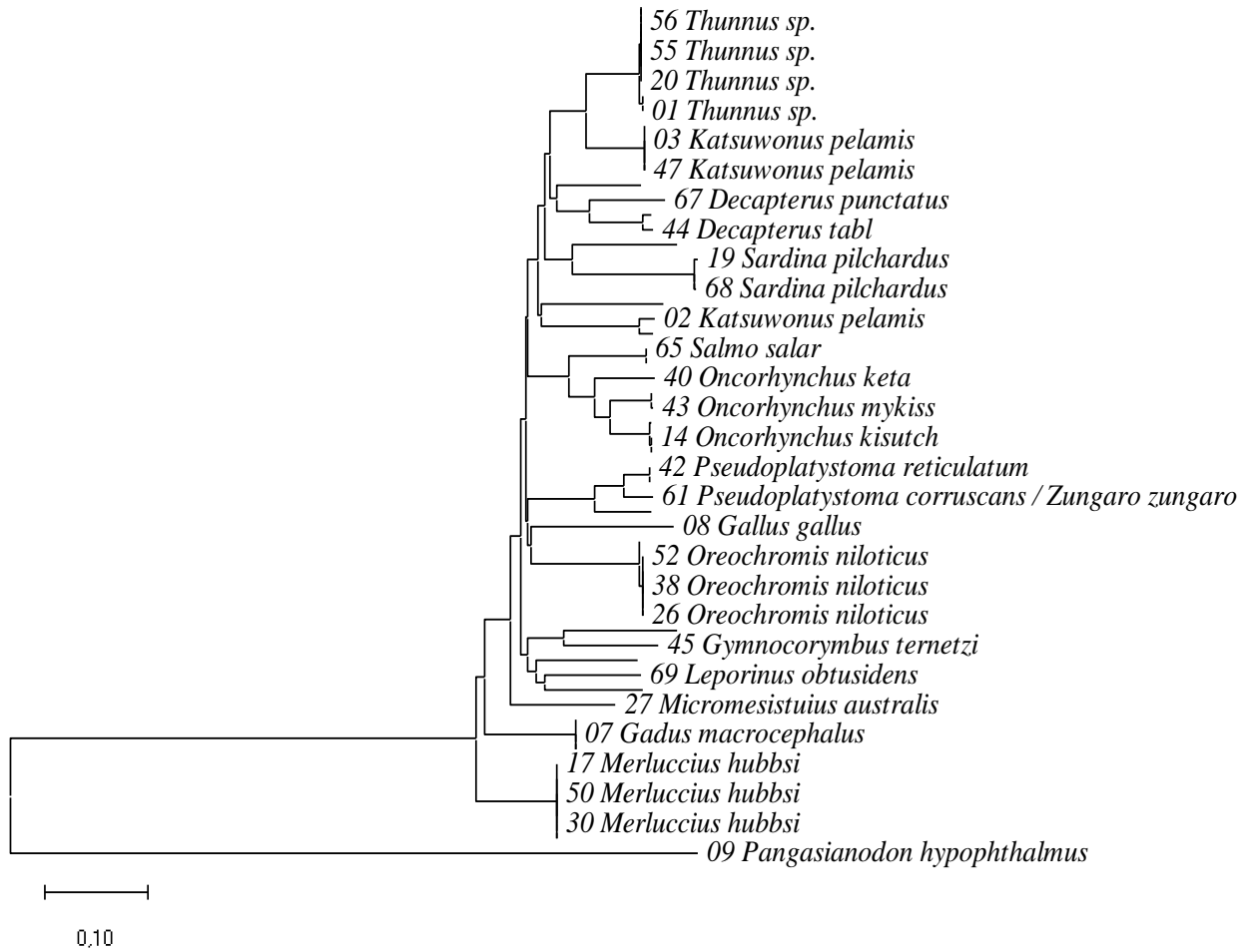


Figura 5: Árvore condensada de *Neighbor-Joining* das distâncias K2P entre fragmentos do gene COI das amostras amplificadas pelos *primers* Fish_miniB_F e Fish_miniB_R.

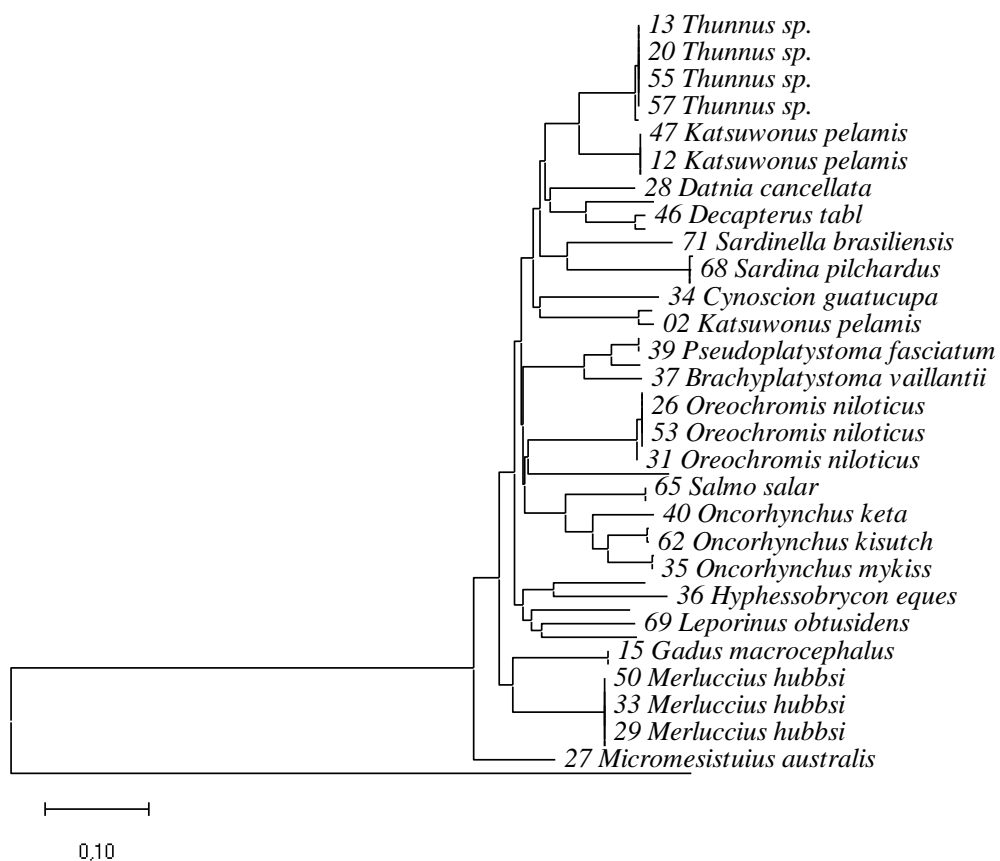


Figura 6: Árvore condensada de *Neighbor-Joining* das distâncias K2P entre fragmentos do gene COI das amostras amplificadas pelos *primers* Fish_miniC_F e Fish_miniC_R.

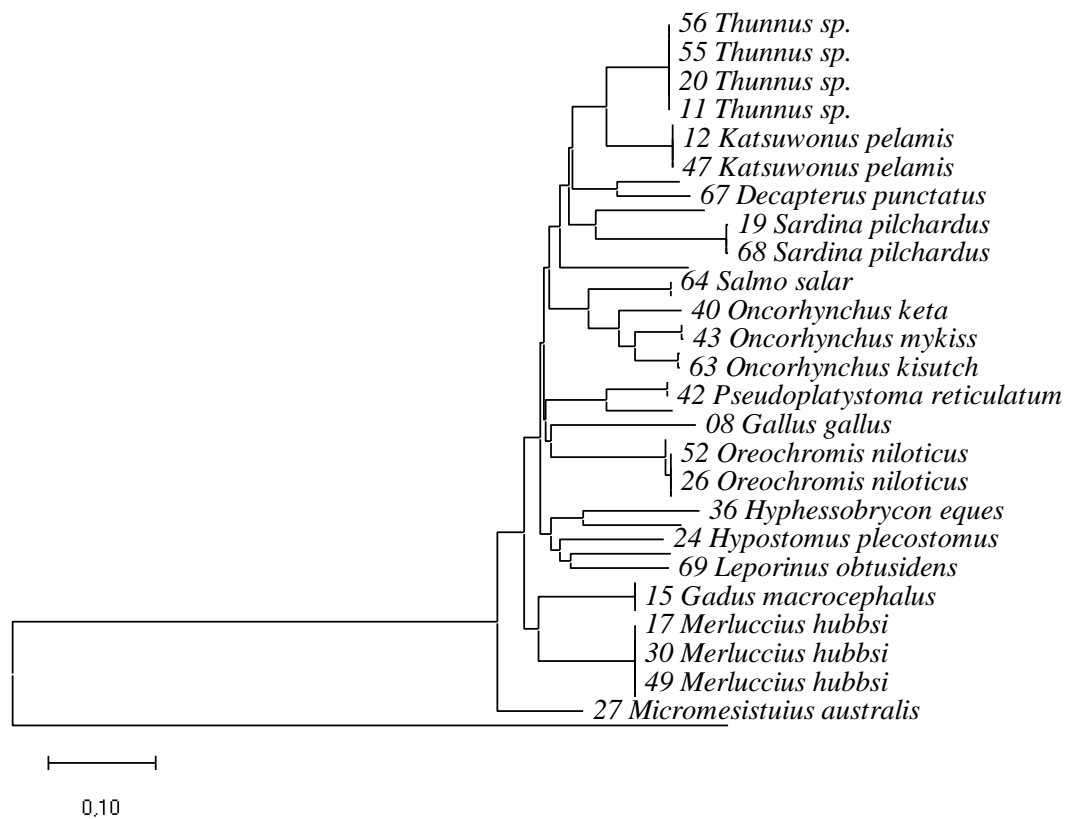


Figura 7: Árvore condensada de *Neighbor-Joining* das distâncias K2P entre as fragmentos do gene COI das amostras amplificadas pelos primers Fish_miniD_F e Fish_miniD_R.

Os dendogramas utilizados pelo DNA *Barcode* para demonstrar graficamente os resultados de distância genética podem gerar uma confusão entre o real propósito desta abordagem em identificar e delimitar espécies com a atividade de construção filogenética, na qual também são utilizados dendogramas para representar as relações de parentesco entre grupos. Isso porque apenas as sequências de DNA *Barcode* ou mini-DNA *Barcode* não têm elementos filogenéticos suficientes para determinar semelhanças evolutivas, especialmente em níveis mais profundos. Uma análise filogenética deve levar em consideração múltiplos *loci* para ter uma resolução verdadeira e evitar um resultado duvidoso que pode ocorrer quando é analisado apenas o comportamento evolutivo de um único gene (Hajibabaei *et al.*, 2007).

Em 2009, Austerlitz *et al.*, compararam o desempenho de diferentes métodos de construção de árvores em dados de DNA *Barcode* e concluíram que nenhum dos métodos testados pareceu melhor em todos os casos, dependendo do tempo de divergência entre grupos, o tamanho da sequência e número de espécies analisadas, por exemplo. Em relação a correção utilizada, K2P é considerado o melhor modelo de substituição para distâncias genéticas pequenas (Felsenstein, 2004).

Este trabalho confirma o conceito do DNA *Barcode* baseado no fragmento parcial do gene mitocondrial COI, que é um instrumento adequado para discriminar a maioria das espécies de animais. Desde que foi proposto como um sistema global para identificação de animais (Hebert *et al.*, 2003b), seu desempenho em discriminar com acurácia um grande número de espécies tem se mostrado positivo (Frezal e Leblois, 2012). Lane (2012) e Gershoni *et al.*, (2012) sugeriram uma razão para o desempenho do DNA *Barcode* baseado no COI, propondo que os genes mitocondriais são agentes intensos do processo de evolutivo de especiação.

A utilização do DNA *Barcode* para pescado processado agiliza o processo de identificação de espécies, diminuindo os riscos de erros causados pela taxonomia baseada apenas em características morfológicas (Sarri *et al.*, 2014). A tecnologia de mini-DNA *Barcode* usada neste estudo mostrou ser vantajosa na identificação de espécies em produtos alimentícios processados. Nos casos em que a amplificação do DNA *Barcode* completo falhou (62% das amostras, 71 de 114), os mini-DNA *Barcodes* podem ser amplificados e identificados com clareza em 89% desses produtos.

4.6. CONCLUSÕES

O presente estudo teve como objetivo autenticar alimentos de pescado processados utilizando o método de mini-DNA *Barcode*. Vários produtos processados foram testados pela amplificação de DNA *Barcode* completo e mini-DNA *Barcode*. Os mini-DNA *Barcodes* selecionados oferecem uma alternativa útil ao DNA *Barcode* completo para a determinação de espécies de produtos processados que geralmente contêm DNA degradado. Os resultados mostraram que 7% das amostras analisadas estavam erroneamente rotuladas ou continham espécies não declaradas.

Os quatro conjuntos de *primers* foram desenvolvidos, mostrando uma alta taxa de sucesso para identificação de produtos processados em nível de espécie e maior desempenho em comparação com *primers* de DNA *Barcode* completo. A técnica representa uma nova abordagem para a detecção e fiscalização da substituição de espécies no mercado.

4.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE K, MARIGUELA T. C., AVELINO, G., FORESTI, F., OLIVEIRA C. Systematic and historical biogeography of the Bryconidae (Ostariophysi: Characiformes) suggesting a new rearrangement of its genera and an old origin of Mesoamerican ichthyofauna. *BMC Evolutionary Biology*. v. 14, p. 152, 2014.

ALJANABI, S. M.; MARTINEZ, I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res.* v. 25, n. 22, p. 4692- 4693, 1997.

AMARAL, J., MEIRA, L., OLIVEIRA, M. B. P. P., MAFRA, I. Advances in authenticity testing for meat speciation. *Advances in food authenticity testing . Woodhead Publ Ser Biomater.* v. 9, p 369–414, 2016.

ARMANI, A., GUARDONE, L., CASTIGLIEGO, L., D'AMICO, P., MESSINA, A., MALANDRA, RGUIDI, A. DNA and Mini-DNA barcoding for the identification of Porgies species (family Sparidae) of commercial interest on the international market. *Food Control*, v. 50, p. 589-596, 2015.

BALLIN, N. Z. Authentication of meat and meat products. *Meat Sci.* v. 86, p. 577-587, 2010.

BELETE, A. A. E. Food adulteration: Its challenges and impacts. *Food Sci Technol Int*, v. 41, p. 50-56, 2015.

CARVALHO, D. C., PALHARES, R. M., DRUMMOND, M. G., GADANHO, M. Food metagenomics: Next generation sequencing identifies species mixtures and mislabeling within highly processed cod products. *Food Control*. v. 80, p. 183-186, 2017.

CARVALHO, D. C.; LEAL; C. G.; POMPEU, P. S. Aplicações da técnica de identificação genética - DNA Barcode - nos peixes da bacia do rio São Francisco. *Bol. Soc. Bras. Ictio.* n.104, 2011.

CORRADO, G. Advances in DNA typing in the agro-food supply chain. *J. Food Sci. Technol.* v. 52, p. 80-89, 2016.

D'AMICO, P., ARMANI, A., GIANFALDONI, D., GUIDI, A. New provisions for the 466 labelling of fishery and aquaculture products: Difficulties in the implementation of 467 Regulation (EU) n. 1379/2013. *M Policy*, v. 71, p. 147–156, 2016.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, v. 39, p. 783-791, 1985.

FELSENSTEIN, J. *Inferring Phylogenies*, Sinauer Assoc. 2004.

FIORINO, G. M., GARINO, C., ARLORIO, M., LOGRIECO, A. F., LOSITO, I., MONACI, L. J. J. Overview on untargeted methods to combat food frauds: A focus on fishery products. *J Food Qual.* v. 1581746, p. 1-13, 2018.

GÜNTHER, B., RAUPACH, M. J., KNEBELSBERGER, T. Full-length and mini-length DNA barcoding for the identification of seafood commercially traded in Germany. *Food Control*, v. 73, p. 922–929, 2017.

HAJIBABAEI, M., SINGER, G. A. C., HEBERT, P. D. N., e HICKEY, D. A. DNA barcoding: How it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends Genet*, v. 23(4), p. 167-172, 2007.

HAJIBABAEI, M., SMITH, M. A., JANZEN, D. H., RODRIGUEZ, J. J., WHITFIELD, J. B., HEBERT, P. D. N. A minimalist *Barcode* can identify a specimen whose DNA is degraded. *Mol Ecol Resour*, v. 6(4), p. 959–964, 2006.

HEBERT, P. D., CYWINSKA, A., BALL, S. L. Biological identifications through DNA Barcodes. *Proc. Royal Soc. B.*, v. 270, p. 313-321, 2003.

HELLBERG, R. S., HERNANDEZ, B. C., e HERNANDEZ, E. L. Identification of meat and poultry species in food products using DNA barcoding. *Food Control*, v. 80, p. 23-28, 2017.

HOSSAIN, M. M., ALI, M. E., ABD HAMID, S. B., ASING, MUSTAFA, S., MOHD DESA, M. N., SARKER, M. Z. I. Double Gene Targeting Multiplex PCR-RFLP Assay Discriminates Beef, Buffalo and Pork Substitution in Frankfurter Products. *J. Agric. Food Chem.* v. 14, p 1478-1487, 2016.

HUI-PING, T., YAN, Z., JING-HUI H. Analysis of beef and lamb products adulteration in Guangdong province. *J. Food Saf.* v.7, p. 1882-1886, 2016.

IAMMARINO, M., MARINO, R., ALBENZIO, M. How meaty? Detection and quantification of adulterants, foreign proteins and food additives in meat products. *International J. Food Sci. Technol.* v. 52(4), p. 851-863, 2016.

IVANOVA, N. V., CLARE, E. L., BORISENKO, A. V. DNA barcoding in mammal. DNA Barcodes. *Methods Mol. Biol.* v. 23, p. 153-182, 2012.

KANE, D. E., HELLBERG, R. S. Identification of species in ground meat products sold on the US commercial market using DNA-based methods. *Food Control.* v. 59, p. 158-163. 2016.

KAPPEL, K., HAASE, I., KÄPPEL, C., SOTELO, C. G., SCHRÖDER, U. Species identification in mixed tuna samples with next-generation sequencing targeting two short cytochrome b gene fragments. *Food Chem.* v. 234, p. 212-219, 2017.

KEARSE, M., MOIR, R., WILSON, A., STONES-HAVAS, S., CHEUNG, M., STURROCK, S. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *J. Bioinform.*, v. 28(12), p. 1647-1649, 2012.

KHAKSAR, R., CARLSON, T., SCHAFFNER, D. W., GHORASHI, M., BEST, D., JANDHYALA, S. Unmasking seafood mislabeling in U.S. markets: DNA barcoding as a unique technology for food authentication and quality control. *Food Control*, v. 56, p. 71-76. 2015.

KIANI, S., MINAEI, S., GHASEMI-VARNAMKHASTI, M. J. Fusion of artificial senses as a robust approach to food quality assessment. *J. Food Eng.* v. 171, p. 230-239. 2016.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol.* v. 16, p. 111–120, 1980.

KOICHIRO, T., GLEN S., SUDHIR K. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol. Biol. Evol.* v. 38, p. 3022–3027, 2021.

LO, Y. T., SHAW, P. C. DNA-based techniques for authentication of processed food and food supplements. *Food Chem.* v. 240, p. 767-774, 2017.

LOWENSTEIN, J. H., AMATO, G., KOLOKOTRONIS, S. O. The real maccoyii: identifying tuna sushi with DNA barcodes—contrasting characteristic attributes and genetic distances. *PLOS One*. v. 4, p. e7866, 2019.

MESSING, J. New M13 vectors for cloning. *Methods Enzymol*. v. 101(101), p. 20-78, 1983.

MUÑOZ-COLMENERO, M., MARTÍNEZ, J. L., ROCA, A., GARCIA-VAZQUEZ, E. NGS tools for traceability in candies as high processed food products: Ion Torrent PGM versus conventional PCR-cloning. *Food Chem*. v. 214, p. 631-636, 2017.

NICOLÈ, S., NEGRISOLO, E., ECCHER, G., MANTOVANI, R., PATARNELLO, T., ERICKSON, D. L., BARCACCIA, G. DNA barcoding as a reliable method for the authentication of commercial seafood products. *Food Technol Biotechnol*, v. 50(4), p. 387. 2012.

NICOLÈ, S., NEGRISOLO, E., ECCHER, G., MANTOVANI, R., PATARNELLO, T., ERICKSON, D. L. DNA barcoding as a reliable method for the authentication of commercial seafood products. *Food Technol. Biotechnol*. v. 50(4), p. 387-398, 2012.

OGLOBO, Rótulos de alimentos no Rio têm problemas de informação, 2020. Disponível em : <https://oglobo.globo.com/economia/defesa-do-consumidor/mais-de-60-dos-rotulos-de-alimentos-no-rio-tem-problemas-de-informacao-22568651>. Acesso em : 18 de maio de 2020.

OKUMA, T. A., HELLBERG, R. S. Identification of meat species in pet foods using a real-time polymerase chain reaction (PCR) assay. *Food Control*. v. 50, p. 9–17, 2015.

ORDUNA, R., HUSBY, A., YANG, C. E., GHOSH, T., BEAUDRY, F. D. Detection of meat species adulteration using high-resolution mass spectrometry and a proteogenomics strategy. *Analyst*, v. 34(7), p. 1110–1120, 2017.

PARVEEN, I., GAFNER, S., TECHEN, N., MURCH, S. J., KHAN, I. A. DNA barcoding for the identification of botanicals in herbal medicine and dietary supplements: Strengths and limitations. *Planta Med*. v. 82(14), p. 1225–1235, 2016.

PERESTAM, A. T., FUJISAKI, K. K., NAVA, O., HELLBERG, R. S. Comparison of realtime PCR and ELISA-based methods for the detection of beef and pork in processed meat products. *Food Control*, v. 71, p. 346–352, 2017.

PERIS, M., ESCUDER-GILABERT, L. Electronic noses and tongues to assess food authenticity and adulteration. *Trends Food Sci Technol.* v. 58, p. 40-54, 2016.

QUINTO, C. A., TINOCO, R., HELLBERG, R. S. DNA barcoding reveals mislabeling of game meat species on the U.S. commercial market. *Food Control*, v. 59(1), p. 386-392, 2016.

RASHID, N. R. A., ALI, M. E., HAMID, S. B. A., RAHMAN, M. M., RAZZAK, M. A., ASING., AMIN, M. A. A suitable method for the detection of a potential fraud of bringing macaque monkey meat into the food chain. *Food Addit Contam*, v. 32(7), p. 1013-1022, 2015.

RASMUSSEN, R. S., e MORRISSEY, M. T. DNA-based methods for the identification of commercial fish and seafood species. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf*, v. 7(3), p. 280-295, 2008.

RASMUSSEN-HELLBERG R. S., NAAUM, A. M., HANDY, S. M., HANNER, R. H., DEEDS, J. R., YANCY, H. F., MORRISSEY. T. M. Interlaboratory evaluation of a real-time multiplex polymerase chain reaction method for identification of salmon and trout species in commercial products. *J Agric Food Chem.* v. 59, p. 876-884, 2018.

SARRI, C., STAMATIS, C., SARAFIDOU, T., GALARA, I., GODOSOPOULOS, V., KOLOVOS, M. A new set of 16S rRNA universal primers for identification of animal species. *Food Control*, v. 43, p. 35-41, 2014.

SHOKRALLA, S., HELLBERG, R. S., HANDY, S. M., KING, I., e HAJIBABAEI, M. A DNA minibarcoding system for authentication of processed fish products. *Sci. Rep.* v. 5, p. 15894, 2015.

SHOKRALLA, S., SPALL, J. L., GIBSON, J. F., e HAJIBABAEI, M. Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Mol. Ecol.*, v. 21(8), p. 1794-1805, 2012.

SHOKRALLA, S., ZHOU, X., JANZEN, D. H., HALLWACHS, W., LANDRY, J. F., JACOBUS, L. M. Pyrosequencing for mini-barcoding of fresh and old museum specimens. *PLoS One*, v. 6(7), p. e21252, 2011.

SPINK, J., MOYER, D. C., SPEIER-PERO, C. Introducing the food fraud initial screening model (FFIS). *Food Control*, v. 69, p. 306-314, 2016.

TAMURA, K., STECHER, G., KUMAR, S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol. Biol. Evol.*, v. 38, p. 3022–3027, 2021.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - FDA, Requirements for specific standardized fish and shellfish:, canned tuna. Code of Federal Regulations, 2020. Disponível em: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?fr=161.190> Acesso em: 12 de julho de 2020.

VIÑAS, J., e TUDELA, S. A validated methodology for genetic identification of tuna 605 species (genus *Thunnus*). *PloS One*, v. 4(10), p. e7606, 2009.

WALLACE, L. J., BOILARD, S. M., EAGLE, S. H., SPALL, J. L., SHOKRALLA, S., e HAJIBABAEI, M. DNA *Barcodes* for everyday life: routine authentication of natural health products. *Int. Food Res. J.* v. 49(1), p. 446-452, 2012.

WARD, R. D., COSTA, F. O., HOLMES, B. H., e STEINKE, D. DNA barcoding of shared fish species from the North Atlantic and Australasia: Minimal divergence for most taxa, but *Zeus faber* and *Lepidopus caudatus* each probably constitute two species. *Aquat. Biol.* v. 3(1), p. 71-78, 2008.

WARD, R. D., ZEMLAK, T. S., INNES, B. H. DNA barcoding Australia's fish species. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* v.360, p.1847-1853, 2005.

WASSERMAN, A. E., SCIENCE, F. T. Organoleptic identification of roasted beef, veal, lamb and pork as affected by fat. *J. Food Sci.* v. 33(2), p. 219-223, 2010.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os consumidores de pescado dependem da rotulagem adequada do produto para obter informações do seu conteúdo, incluindo a espécie presente. Portanto, a rotulagem informativa garante a rastreabilidade, especialmente para produtos processados em que ocorre a perda da morfologia externa reconhecível. O aprimoramento futuro dos sistemas de autenticação de base molecular, como o mini-DNA *Barcode*, deve ser priorizado pelas autoridades globais de alimentos, o que ajudará a identificar fontes potenciais de fraude em peixes, bem como minimizar o risco de receber ingredientes fraudulentos ou adulterados.

No presente trabalho foi desenvolvido um método eficaz e confiável, para identificação da espécie presente em produtos de pescados processados. O teste também foi aplicado na análise de produtos comerciais e revelou que alguns destes não havia correspondência entre o seu conteúdo e rotulagem. Esses achados indicam, portanto, que há uma demanda e urgência pela metodologia desenvolvida e a necessidade do direcionamento de políticas públicas de controle da autenticidade de produtos de pescados.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADIBAHA, A. B., SYAZWANAM, S., HANIZA, Z., HANIMAM, Z., MUNIRBA. B., INTAN, G., FARAHAHM, N., AZIZAHD, S. Evaluation of DNA barcoding to facilitate the authentication of processed fish products in the seafood industry, *J. Food Sci*, v.45, p. 456-458, 2020

ARMANI, A., GUARDONE, L., LA CASTELLANA, R., GIANFALDONI, D., GUIDI, A., CASTIGLIEGO L. DNA barcoding reveals commercial and health issues in ethnic seafood sold on the Italian Market. *Food Control*, v. 55, p. 123-125, 2015.

BAKER, C. S., LENTO, G. M., CIPRIANO, F., PALUMBI, S. R. Predicted decline of protected whales based on molecular genetic monitoring of Japanese and Korean markets. *Proc R Soc Lond B*. v. 267, p. 1191–1199, 2020.

CARVALHO, D. C., NETO, D. A. P., BRASIL, B. S. A. F., OLIVEIRA, D. A. A. DNA barcoding unveils a high rate of mislabeling in a commercial freshwater catfish from Brazil. *Mitochondrial DNA*, v.22, p.97–105, 2011.

CHANG, C. H., LIN, H. Y., REN, Q., LIN, Y. S., SHAO K. T. DNA barcode identification of fish products in Taiwan: Government-commissioned authentication cases. *Food Control*. v. 66, p. 38-43, 2016.

CHAPELA, M. J., SOTELO C. G., PÉREZ-MARTÍN, PARDO, M. Á., PÉREZ-VILLAREAL, B., GILARDI P., RIESE J. Comparison of DNA extraction methods from muscle of canned tuna for species identification. *Food Control*. v. 18, p. 1211–1215, 2017.

CHIN, T. C., ADIBAH, A. B., HARIZ, Z. D., AZIZAH, M. S. Detection of mislabelled seafood products in Malaysia by DNA barcoding: Improving transparency in food Market. *Food Control*, v. 64, p. 247-256, 2016.

CIVERA, T. Species identification and safety of fish products. *Vet Res Commun*. v. 27 Suppl 1, p. 481-489, 2015.

COHEN, N. J., DEEDS, J. R., WONG, E. S., HANNER, R. H., YANCY, H. F., WHITE, K. D. Public health response to puffer fish (tetrodotoxin) poisoning from mislabeled product. *J. Food Prot*. v. 72, p. 810-817, 2009.

DAWNAY, N., OGDEN, R., MCEWING, R., CARVALHO, G. R., THORPE, R. S. Validation of the barcoding gene COI for use in forensic genetic species identification. *Forensic Sci Int.* v. 173, p. 1-6, 2017.

EUROPEAN PARLIAMENT. Report on the food crisis, fraud in the food chain and the control thereof. 2013. Disponível em: https://www.europarl.europa.eu/doceo/document/A-7-2013-0434_EN.html?redirect#_part1_defl. Acesso: 15 de abril de 2021.

GALAL-KHALLAF, A., ARDURA, A., MOHAMMED-GEBA, K., BORRELL, Y. J., GARCIA-VAZQUEZ E. DNA barcoding reveals a high level of mislabeling in Egyptian fish fillets. *Food Control*, v. 46, p. 441-445, 2014.

GLEASON, K., SHINEJ. P., SHOBNAM, N., ROKOFF, L. B., SUCHANDA, H. S., HASAN, I. Contaminated turmeric is a potential source of lead exposure for children in rural Bangladesh. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* v. 50, p. 1478-1489, 2014.

HAJIBABAEI, M., SINGER, G., HEBERT, P. D. e HICKEY, D. A. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends Genet.* v. 23, p. 167-172, 2007.

HAJIBABAEI, M., SMITH, A., JANZEN, D. H., RODRIGUEZ, J. J., WHITFIELD, J. B., HEBERT P. D. N. A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded. *Mol Ecol Notes.* v. 6, p. 959-964, 2006.

HANDY, S. M., DEEDS, J. R., IVANOVA, N. V., HEBERT, P. D. N., HANNER, R. H., ORMOS, A., WEIGT L. A., MOORE, M. M., YANCY. H. F. A single laboratory validated method for the generation of DNA barcodes for the identification of fish for regulatory compliance. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, v.94 (1) p. 201-210, 2011.

HANNER, S. R., BECKER, N., IVANOVA, V., STEINKE D. FISHBOL and seafood identification: Geographically dispersed case studies reveal systemic market substitution across Canada. *Mitochondrial DNA*, v. 22 Suppl. 1, p. 106-122, 2011.

HARRIS, D., ROSADO, D., XAVIER, R. DNA barcoding reveals extensive mislabeling in seafood sold in Portuguese supermarkets. *J. Aquat.* v. 25, p. 1375-1380, 2016.

HEBERT, P. D., CYWINSKA, A., BALL, S. L., DEWAARD, J. R. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc R Soc Lond B*. v. 270, p. 313–321, 2003.

HELLBERG, R. S., MORRISSEY, M. T. Advances in DNA-based techniques for the detection of seafood species substitution on the commercial market. *J Lab Autom.* v. 16, p. 308-321, 2018.

HUBERT, N., HANNER, R., HOLM, E., MANDRAK, N. E., TAYLOR, E., BURRIDGE, M., WATKINSON, D., DUMONT, P., CURRY, A., BENTZEN, P., ZHANG, J., APRIL, J., BERNATCHEZ, L. Identifying Canadian freshwater fishes through DNA barcodes. *PLOS One*. v. 3(6), p. e2490, 2018.

MARKO, P. B., LEE, S. C., RICE, A. M., GRAMLING, J. A., FITZHENRY, T. M., MCALISTER, J. S., HARPER, G. R., MORAN, M. L. Fisheries: mislabelling of a depleted reef fish. *Nature*. v. 430, p. 309-310, 2016.

MD-ZAIN, B. M., ABID-KAMAL, S. N. A., AIFAT, N. R., ABDUL-LATIFF, M. A. B., MOHD-HASHIM, A., AMPENG, A. Molecular identification of shark fins in Malaysian Borneo's local markets. *Biodiversitas*. v. 19, p. 1035-1043, 2018.

MEUSNIER, I., GREGORY, A., SINGER, C., LANDRY, J., HICKEY, D. A., HEBERT P. D. N., HAJIBABAEI, M. A universal DNA mini-barcode for biodiversity analysis. *BMC Genomics* v. 9, p. 214, 2018.

MILLER, D., JESSEL, A., MARIANI, S. Seafood mislabeling: Comparisons of two western European case studies assist in defining influencing factors, mechanisms and motives. *Fish Fish*, v. 13, p. 345-358, 2012.

NAGALAKSHMI, K., ANNAM, P. K., VENKATESHWARLU, G., PATHAKOTA, G. B., LAKRA W. S. Mislabeling in Indian seafood: An investigation using DNA barcoding *Food Control*, v. 59, p. 196-200, 2016.

NICOLÈ, S., NEGRISOLO, E., ECCHER, R., MANTOVANI, G., PATARNELLO, T., ERICKSON, D. L. W., KRESS, J., BARCACCIA G. DNA barcoding as a reliable method for the authentication of commercial seafood products. *Food Technol. Biotechnol.*, v. 50 (4), p. 387, 2012.

OCEANA. Deceptive dishes: Seafood swaps found worldwide Oceana USA. 2016. Disponível em: <http://usa.oceana.org/publications/reports/deceptive-dishes-seafood-swapsfound-worldwide>. Acesso: 18 de abril de 2021.

PARVEEN, F., JAAFAR, N. I., AININ, S. Social media's impact on organizational performance and entrepreneurial orientation in organizations. *J. Manag. Inf. Decis. Sci.*, v. 54(9), p. 2208-2234, 2016.

RASMUSSEN-HELLBERG R. S., NAAUM, A. M., HANDY, S. M., HANNER, R. H., DEEDS, J. R., YANCY, H. F., MORRISSEY. T. M. Interlaboratory evaluation of a real-time multiplex polymerase chain reaction method for identification of salmon and trout species in commercial products. *J Agric Food Chem.* v. 59, p. 876-884, 2018.

RASMUSSEN, R. S., MORRISSEY, M. T., HEBERT, P. D. DNA barcoding of commercially important salmon and trout species (*Oncorhynchus* and *Salmo*) from North America. *J Agric Food Chem.* v. 57, p. 8379 - 8385, 2019.

SHIVJI, M., CLARKE, S., PANK, M., NATANSON, L., KOHLER, N., STANHOPE M. Genetic identification of pelagic shark body parts for conservation and trade monitoring. *Conserv Biol.* v. 16, p. 1036 - 1047, 2014.

SHOKRALLA, S., SINGER, G. A., HAJIBABAEI, M. Direct PCR amplification and sequencing of specimens' DNA from preservative ethanol. *Biotechniques.* v. 48, p. 233–234 2010.

SHOKRALLA, S., ZHOU, X., JANZEN, D. H., HALLWACHS, W., LANDRY, J., JACOBUS, L. M., HAJIBABAEI M. Pyrosequencing for mini-barcoding of fresh and old museum specimens. *PLOS One.* v. 6(7), p. e21252, 2011.

STEINKE, D., ZEMLAK, T. S., GAVIN, H., HEBERT, P. D. DNA barcoding of Pacific Canada's fishes. *Mar Biol.* v. 156, p. 2641–2647, 2019.

TANABE, S., MIYAUCHI, E., MUNESHIGE, A., MIO, K., SATO, C., SATO. M. PCR method of detecting pork in foods for verifying allergen labeling and for identifying hidden pork ingredients in processed foods. *Biosci Biotechnol Biochem.* v. 71, p. 1663–1667, 2017.

TELETCHÉA, F. Molecular identification methods of fish species: reassessment and possible applications. *Rev Fish Biol Fisher.* v. 19, p. 265-293, 2009.

WALLACE, L., STEPHANIE, M. A. L., SHANNON, H. B, EAGLE, C., SPALL, J. L., SHOKRALLA, S., HAJIBABAEI, M., DNA barcodes for everyday life: routine authentication of Natural Health Products. *Food Res Int.* v. 49, p. 446-452, 2017.

WARD, R. D., HANNER, R., HEBERT, P. D. The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. *J Fish Biol.* v. 74, p. 329-356, 2009.

WARD, R. D., ZEMLAK, T. S., INNES, B. H., LAST, P. R. e HEBERT, P. D. DNA barcoding Australia's fish species. *Phil Trans R Soc B.* v. 360, p. 1847-1857, 2005.

WILLETTE, D. A., SIMMONDS, S. E., CHENG, S. H., ESTEVES, S., KANE, T. L., NUETZEL, H., PILAUD, N., RACHMAWATI, R., BARBER, P. G. Using DNA barcoding to track seafood mislabeling in Los Angeles restaurants. *Conserv. Biol.*, v. 31(5), p.1076-1085, 2017.

WONG, E. H. K., HANNER, R. H. DNA barcoding detects market substitution in North-American seafood. *Int. Food Res. J.*, v.41, p. 828-837, 2008.

WOOLFE, M., PRIMROSE, S. Food forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud. *Trends Biotechnol.* v.22, p.222-226, 2014.

XIONG, X., D'AMICO, P., GUARDONE, L., CASTIGLIEGO, L., GUIDI, A., GIANFALDONI, D. The uncertainty of seafood labeling in China: A case study on cod, salmon and tuna. *Mar Policy.* v. 68, p. 123-135, 2016.