

DNA barcoding e mini-barcoding na rotina forense: avaliação da viabilidade e da eficácia das técnicas na identificação de espécies animais em amostras degradadas

N.R.S. Costa ^{a*}, E. Gianni ^b, R.S.A. Faria ^c, C.B.V. Carvalho ^{d,e}

^a Instituto de Pesquisa de DNA Forense, Polícia Civil do Distrito Federal, Brasília (DF), Brasil

^b Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília (DF), Brasil

^c Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília (DF), Brasil

^d Instituto Nacional de Criminalística, Polícia Federal, Brasília (DF), Brasil

^e Academia Nacional de Polícia, Polícia Federal, Brasília (DF), Brasil

*Endereço de e-mail para correspondência: nelice.costa@pcdf.df.gov.br

Recebido em 28/08/2023; Revisado em 04/06/2024; Aceito em 05/06/2024

Resumo

Apesar de os protocolos e técnicas de identificação genética de espécies animais terem avançado muito rapidamente no meio acadêmico, sua aplicação pelos órgãos oficiais de criminalística brasileiros ainda é restrita. A fim de avaliar a viabilidade e a eficácia das técnicas de DNA *barcoding* e *mini-barcoding* na identificação genética de espécies animais no contexto forense, 23 amostras antigas, degradadas ou armazenadas de forma não ideal, de identidade conhecida, foram selecionadas para este estudo. As etapas de extração do DNA, amplificação e sequenciamento foram realizadas de forma linear e sem repetições para cada uma das duas técnicas. Foram utilizados *primers* universais de *barcode* e de *mini-barcode* do gene citocromo c oxidase I (COI), que permitissem ampla abrangência dos diversos grupos de vertebrados. As sequências obtidas foram confrontadas com aquelas depositadas no banco de dados do *Barcode of Life Data System* (BOLD). As técnicas permitiram a identificação de aproximadamente 78% (18 de 23) das amostras. A taxa de identificação correta foi mais elevada com o uso dos *mini-barcodes*, embora a eficácia das técnicas tenha variado de acordo com o tipo de material analisado. Os resultados obtidos contribuem para mostrar a viabilidade de incorporação das técnicas testadas nas rotinas dos laboratórios forenses brasileiros, uma vez que os equipamentos e grande parte dos insumos são os mesmos utilizados para a já habitual identificação humana.

Palavras-Chave: DNA *barcoding*; *mini-barcoding*; citocromo c oxidase I (COI); genética forense; identificação de espécies animais.

Abstract

Although protocols and methods for genetically identifying animal species have advanced quickly in academia, their application by official Brazilian criminalistics agencies remains limited. In order to assess the viability and efficacy of DNA *barcoding* and *mini-barcoding* methods for species identification in a forensic context, 23 old, degraded, or stored improperly samples, with known identity, were selected for this study. DNA extraction, amplification, and sequencing were carried out linearly and one single time for each of the two alternative strategies. Universal barcode and mini-barcode primers for cytochrome c oxidase I (COI) gene were used, covering several groups of vertebrates. The obtained sequences were compared to those in the Barcode of Life Data System (BOLD) database. Both techniques managed to correctly identify approximately 78% (18 of 23) of samples. The correct identification rate was higher for mini-barcodes, although the techniques showed variable effectiveness according to the material analyzed. Since the equipment and most of the laboratory consumables used in this study are the same as those used for standard human identification, the results obtained contribute to showing the feasibility of implementing those techniques in the routines of Brazilian forensic laboratories.

Keywords: DNA *barcoding*; *mini-barcoding*; cytochrome c oxidase subunit I (COI); forensic genetic; species identification.

1. INTRODUÇÃO

Por muito tempo, o tráfico de animais silvestres foi considerado um problema ambiental. Atualmente, é reconhecido como uma das mais importantes modalidades

de crime organizado transnacional, movimentando bilhões de dólares anualmente e capaz de impactar muitas espécies no Brasil [1-3]. Da mesma forma, tem crescido mundialmente o número de adulterações ou falsas indicações de produtos alimentícios: devido à diferença de

preço entre espécies, alimentos de origem animal são frequentemente propensos a adulteração para ganho econômico por parte dos fabricantes [4]. Produtos alimentares de origem animal como leite, carne, pescado e seus derivados são os principais alvos de fraudes e adulterações de alimentos no mercado brasileiro [5,6].

A perícia criminal, no seu papel de fornecer à Justiça provas técnicas objetivas e imparciais, tem como meta principal materializar o fato típico. Por exemplo, para caracterização dos crimes citados anteriormente, é necessária a correta indicação da espécie animal contida na amostra examinada. Sem essa informação, não é possível concluir a respeito da ilicitude ou não de uma conduta e, conseqüentemente, qualquer forma de punição é desautorizada [3,7].

A abordagem mais comum na identificação de espécies animais é a morfológica, na qual são avaliadas a anatomia ou partes peculiares do corpo para se estabelecer a sua identidade. Contudo, análises morfológicas não são suficientes para a identificação inequívoca de espécies crípticas (espécies morfológicamente muito similares), indivíduos imaturos (incluindo ovos) e partes ou produtos de origem animal, tais como, couro, chifres, ossos, penas, etc. [8]. Para determinar a espécie de amostras que perderam suas características morfológicas identificadoras têm sido utilizadas técnicas alternativas, entre as quais se destaca a identificação genética de espécies.

O sequenciamento de DNA pelo método de Sanger é o procedimento mais frequentemente aplicado para a identificação genética de animais. Tal método se baseia na amplificação prévia de uma região padronizada do DNA com o uso de *primers*, incluindo os universais (que podem ser utilizados em muitos táxons), e permite determinar a sequência nucleotídica que será utilizada para discriminar espécies. Para a correta diferenciação, é fundamental que a região genética alvo (ou marcador genético) mostre variabilidade entre espécies, mas seja conservada dentro da espécie [9].

Em animais, os marcadores mais comumente usados são regiões gênicas dentro do DNA mitocondrial (mtDNA) [10,11]. As principais vantagens do mtDNA estão relacionadas a: (1) múltiplas cópias por célula em comparação com apenas duas cópias de DNA nuclear (espécies diplóides), permitindo que uma maior quantidade de DNA seja recuperada de amostras vestigiais; (2) ausência de enzimas para corrigir bases adicionadas incorretamente durante a replicação do DNA, facilitando a ocorrência de mutações e a diferenciação das espécies; e (3) ausência de recombinação que reduz o fluxo gênico e contribui para que as espécies transmitam a mesma sequência de mtDNA por gerações [12].

Em 2003, Hebert et al. [10] demonstraram que sequências de aproximadamente 650 pares de bases (pb) do gene mitocondrial citocromo c oxidase I (COI) possuem

informações que funcionam como um “código de barras” (*barcode*, em inglês) taxonômico, altamente funcional na identificação de espécies, lançando, dessa forma, as bases da técnica que ficaria conhecida como *DNA barcoding*. Um pressuposto fundamental para sua utilização, no entanto, seria a existência do chamado *barcoding gap*, definido como o intervalo existente entre as variações intra e interespecíficas observadas. Este intervalo, ou *gap*, garantiria que as diferenças entre indivíduos pertencentes a uma mesma espécie fossem menores do que aquelas encontradas entre indivíduos de espécies distintas [13]. Embora exista variação entre grupos animais, um estudo com cerca de 13 mil pares de espécies congênicas, incluindo cordados, mostrou que mais de 98% desses pares apresentaram acima de 2% de divergência genética [11].

A fim de gerenciar dados relacionados a esses *barcodes*, foi criada uma plataforma informatizada denominada *Barcode of Life Data System* (BOLD – <https://boldsystems.org/>), que inclui, entre outras funcionalidades, um banco de dados com sequências de identidade conhecida e uma ferramenta de busca para fins de identificação. Com base em uma sequência informada, o banco constrói uma árvore filogenética e retorna os melhores resultados da sua biblioteca de referências após avaliar as que possuem maior similaridade com o *barcode* pesquisado [14,15]. O *DNA barcoding* mostrou-se eficiente para identificação, em nível de espécie, de vários grupos de animais, incluindo aves, mamíferos, peixes, anfíbios e répteis [16-21].

Apesar da comprovada utilidade do *DNA barcoding* na identificação de espécies, algumas situações podem se mostrar desafiadoras, especialmente quando se trata de material degradado. A degradação do DNA, que é a sua quebra em fragmentos menores, pode ocorrer por fatores ambientais, tais como a exposição à luz ultravioleta, ou à umidade e altas temperaturas, que favorecem o crescimento de microrganismos danosos. Tais organismos, como bactérias e fungos, produzem enzimas que degradam o DNA presente nos tecidos, diminuindo a quantidade de material genético disponível para as análises e, paralelamente, reduzindo o tamanho das moléculas, dificultando a amplificação por PCR dos marcadores de interesse [22,23]. O tempo de armazenamento não é um fator muito relevante para a degradação, desde que o DNA seja mantido em boas condições, incluindo baixas temperatura e umidade, embora algumas reações químicas, como a oxidação, não possam ser interrompidas mesmo sob condições ótimas [24].

A degradação do DNA em espécimes antigos e em material biológico processado, por exemplo, pode impedir a recuperação de fragmentos de PCR com mais de 200 pb, prejudicando a recuperação do *barcode*. Na tentativa de resolver essa restrição de amplificação de fragmentos mais longos, vários estudos exploraram a possibilidade de usar

trechos curtos de DNA (100–300 pb) como mini códigos de barras, ou *mini-barcode*s, para distinguir as espécies [17,25]. Em contraste com os códigos de barras regulares, os *mini-barcode*s se mostraram estáveis e foram facilmente recuperados a partir de DNA degradado [26]. Além disso, têm demonstrado eficácia superior a 90% na identificação de espécies [7,27-29]. Tendo em vista que amostras forenses muitas vezes não permitem a amplificação de fragmentos maiores que 250 pb [30], a utilização de *mini-barcode*s pode ser adequada à rotina forense.

Considerando o exposto, o objetivo principal deste trabalho foi utilizar protocolos de identificação genética baseados em *barcode*s e *mini-barcode*s na identificação de amostras forenses com algum grau de degradação, comparando os resultados das técnicas em termos de conteúdo informacional das sequências obtidas e sua eficácia. Apesar de os protocolos e técnicas de identificação genética de espécies animais terem avançado muito rapidamente no meio acadêmico, sua aplicação pelos órgãos oficiais de criminalística brasileiros ainda é restrita. Sendo assim, além do que já foi proposto, este trabalho também tem como objetivo divulgar a metodologia dessas técnicas de forma a contribuir para a ampliação da carta de exames disponíveis nas diversas instituições periciais do país.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Amostras

Para este estudo foram selecionadas 23 amostras de tecidos biológicos pertencentes à coleção do Setor de Genética Forense (SEPGF) do Instituto Nacional de Criminalística (INC) da Polícia Federal, em Brasília. Tais tecidos, com diferentes idades e em diferentes estados de conservação, foram obtidos de animais, ou suas partes, previamente identificados por especialistas com base em sua morfologia. Informações sobre as amostras selecionadas para o estudo estão detalhadas na Tabela 1. As análises laboratoriais se iniciaram no fim de 2022 e foram finalizadas no início de 2023.

2.2. Extração do DNA

O DNA das amostras foi extraído utilizando-se o equipamento AutoMate Express™ (Applied Biosystems) e os kits de extração PrepFiler® Express (Applied Biosystems), para tecidos moles, pelos, fluidos e suabes, e PrepFiler® Express BTA Forensic DNA (Applied Biosystems), para ossos, conforme as instruções do fabricante.

2.3. Amplificação e Sequenciamento

O segmento do gene COI foi amplificado com os *primers* LCO1490 e HC02198 [31] para obtenção de seu *barcode* completo (longo) e com os *primers*

FISHCOILBC_ts [19] e REVshort1 [32] para obtenção de *mini-barcode*s (Tabela 2).

Reações de PCR com 25 µl se deram em tubos contendo 15,6 µl de água MilliQ; 0,5 µl de solução de dNTP 10 mM; 1 µl de cada *primer* a 10 µM; 2,5 µl de tampão MgCl₂ 15 mM; 0,4 µl de Taq GOLD 5u/µl e 4 µl de DNA não quantificado. Os parâmetros de ciclagem para os *primers* LCO1490/HCO2198 foram: etapa inicial de 94 °C por 11 min, 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 50 °C por 30 s e 72 °C por 1 min e etapa final de 72 °C por 10 min. Para o segundo conjunto de *primers*, os parâmetros de ciclagem foram: etapa inicial de 94 °C por 11 min, 40 ciclos de 94 °C por 30 s, 51 °C por 40 s e 72 °C por 30 s e etapa final de 72 °C por 10 min.

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, com controles positivo e negativo, a fim de verificar o sucesso na amplificação dos fragmentos. Isso foi feito considerando a opinião de três observadores independentes, que avaliaram a presença de bandas, ou de sua ausência ou arraste, indicando degradação extrema do DNA. Para que as amostras fossem sequenciadas dois ou mais observadores deveriam apontar a existência de bandas.

Os produtos de amplificação foram purificados com 1 µl de Illustra™ Exonuclease I (GE Healthcare & Life Science) e 1 µl de FastAP™ (Thermo Fisher Scientific) para cada 5 µl de produto de amplificação. Os microtubos foram levados ao termociclador e a reação se deu de acordo com os seguintes parâmetros: 37 °C por 15 min e 85 °C por 15 min, seguida por manutenção da temperatura em 4 °C por tempo indeterminado.

O sequenciamento nos dois sentidos se deu com 4 µl do DNA purificado; 4 µl de água ultrapura; 4 µl do Big Dye™ Terminator v3.1 (Applied Biosystems); 4 µl do *primer forward* ou *reverse* 1 µM; e 4 µl do tampão Big Dye™ Terminator v3.1 (Applied Biosystems). Foram utilizados os seguintes parâmetros de ciclagem: etapa inicial de 96 °C por 1 min, 30 ciclos de 96 °C por 15 s, 50 °C por 15 s e 60 °C por 4 min e etapa final de manutenção da temperatura em 4 °C por tempo indeterminado.

Uma segunda etapa de purificação, com intuito de eliminar os resíduos de dideoxinucleotídeos (ddNTPs) após a reação de sequenciamento, foi feita com a adição de 1 µl de FastAP™ para cada 10 µl de produto de sequenciamento e os mesmos parâmetros de ciclagem utilizados na primeira purificação. Finalmente, realizou-se a lavagem/precipitação do DNA com etanol/EDTA, conforme estabelecido nas instruções do fabricante do kit de sequenciamento.

A eletroforese capilar foi realizada em analisador genético ABI 3500 com polímero POP4™ e arranjo de capilares de 36 cm (todos Applied Biosystems).

Tabela 1. Informações sobre as amostras selecionadas para o estudo.

	Animais morfológicamente identificados	Tipo de Amostra	Ano de Coleta	Condições de armazenamento após a coleta	Fração Utilizada
#1	Porco (<i>Sus domesticus</i>)	Suabe de cavidade oral de animal vivo	2013	Temperatura ambiente (23° C) em embalagem porta-suabe	Extremidade do suabe
#2	Tiziu (<i>Volatinia jacarina</i>)	Sangue de animal vivo	1999	Congelamento (-20°C) em tampão de extração	10 ml de sangue em tampão
#3	Jacaré-do-pantanal (<i>Caiman yacare</i>)	Sangue	2012	Congelamento (-20°C) em microtubo	20 mg de sangue coagulado
#4	Tucano-toco (<i>Ramphastos toco</i>)	Músculo	2002	Congelamento (-20°C) em microtubo	20 mg de músculo congelado
#5	Anta (<i>Tapirus terrestris</i>)	Fígado	2012	Congelamento (-20°C) em microtubo	20 mg de fígado congelado
#6	Capivara (<i>Hydrochoerus hydracheris</i>)	Músculo	2013	Congelamento (-20°C) em microtubo	20 mg de tecido muscular
#7	Gambá-da-orelha-branca (<i>Didelphis albiventris</i>)	Pelo de animal morto, recente ^a	2022	Congelamento (-20°C) em microtubo	4 a 6 fios com cerca de 1,5 cm cada
#8	Tilápia (<i>Oreochromis niloticus</i>)	Músculo de animal morto, recente	2013	Congelamento (-20°C) em microtubo	20 mg de músculo congelado
#9	Tatupeba (<i>Euphractus sexcintus</i>)	Músculo	2007	Congelamento (-20°C) em microtubo	20 mg de músculo congelado
#10	Coruja-orelhuda (<i>Pseudoscops clamator</i>)	Pena de animal vivo	2017	Temperatura ambiente (23° C) em envelope plástico	Fragmento de 3 mm do cálamo
#11	Papagaio-verdadeiro (<i>Amazona aestiva</i>)	Pena de animal vivo	2017	Temperatura ambiente (23° C) em envelope plástico	Fragmento de 3 mm do cálamo
#12	Arara-canindé (<i>Ara ararauna</i>)	Pena de animal vivo	2017	Temperatura ambiente (23° C) em envelope plástico	Fragmento de 3 mm do cálamo
#13	Periquito-rei (<i>Eupsittula aurea</i>) ou Periquitão-maracanã (<i>Psittacara leucophthalmus</i>) ^b	Pena de animal vivo	2017	Temperatura ambiente (23° C) em envelope plástico	Fragmento de 3 mm do cálamo
#14	Galo (<i>Gallus gallus</i>)	Músculo de animal morto recente	2013	Congelamento (-20°C) em microtubo	20 mg de tecido muscular
#15	Javali (<i>Sus scrofa</i>)	Músculo de animal morto recente	2013	Congelamento (-20°C) em microtubo	20 mg de músculo congelado
#16	Bovino doméstico (<i>Bos taurus</i>)	Músculo	2013	Congelamento (-20°C) em microtubo	20 mg de músculo congelado
#17	Ararajuba (<i>Guaruba guarouba</i>)	Músculo	2008	Congelamento (-20°C) em microtubo	20 mg de músculo congelado
#18	Jacaré-do-pantanal (<i>Caiman yacare</i>)	Suabe com sangue	2012	Congelamento (-20°C) em microtubo	Extremidade do suabe
#19	Quati (<i>Nasua nasua</i>)	Pelo de animal vivo	2012	Congelamento (-20°C) em microtubo	Uma porção de pelo
#20	Tico-tico-do-campo (<i>Ammodramus humeralis</i>)	Músculo de animal morto, recente	2017	Congelamento (-20°C) em etanol 70%	20 mg de músculo congelado
#21	Onça-pintada (<i>Panthera onca</i>)	Ossos (crânio)	indeterminado ^c	Temperatura ambiente (23° C)	20 mg de osso pulverizado
#22	Onça-pintada (<i>Panthera onca</i>)	Ossos (crânio)	indeterminado ^c	Temperatura ambiente (23° C)	20 mg de osso pulverizado
#23	Boi (<i>Bos taurus</i>) ou Cavallo (<i>Equus ferus caballus</i>) ^b	Ossos (tíbia)	2019 ^d	Congelamento (-20°C)	20 mg de osso pulverizado

^a Animal encontrado atropelado em via pública, exposto ao sol, em estado inicial de decomposição.

^b A morfologia da amostra não foi suficiente para a diferenciação entre as espécies indicadas.

^c Itens doados para instituição de pesquisa em data incerta. Submetidos à limpeza para remoção de tecidos moles e mantido em temperatura ambiente até a transferência ao Instituto Nacional de Criminalística, em 2022.

^d Osso de animal encontrado, durante as buscas por vítimas, em meio a lama consequente ao rompimento da barragem de rejeitos da mina do Córrego do Feijão em Brumadinho/MG. Permaneceu enterrado por cerca de três semanas.

Tabela 2. Informações sobre os primers de barcode completo e mini-barcode do gene COI utilizados.

Tipo de Primer	Primer	Sequência 5'-3'	Tamanho esperado do fragmento	Referência
Barcode completo (longo)	LCO1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	650 pb	Folmer, 1994
	HCO2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA		
Mini-barcode	FISHCOILBC_ts	TGTA AACGACGGCCAGTCTCAACYAATCAYAAAAGATATYGGCAC	150 pb	Handy, 2011
	REVshort1	CAGGAAACAGCTATGACGGYATNACTATRAAGAAAATTATTAC		Armani, 2015

2.4. Análise dos dados

As seqüências consenso foram montadas e tiveram a sua qualidade avaliada com os softwares SeqScape 3 (Applied Biosystems) e MEGA 11 [33]. As seqüências de *barcode* completo e *mini-barcode* do gene COI foram confrontadas com aquelas depositadas no banco de dados *Species Level Barcode Records* do BOLD, para obter valores de similaridade e verificar a identidade das amostras. Foram consideradas dentro do parâmetro ideal de identificação apenas seqüências com 98% ou mais de similaridade (até 2% de divergência) com seqüências do banco de dados pertencentes à mesma espécie da identificação morfológica, considerando estudo anterior que apresenta esse valor como adequado para discriminar muitas espécies [11]. Seqüências que não resultaram em valores de similaridade no banco mencionado (indicado pela expressão *no match*) também foram confrontadas no banco *All Barcode Records*, do próprio BOLD, e no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) [34], apenas para identificar grupos com maior similaridade (resultado meramente informativo).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As 23 amostras selecionadas para este estudo foram submetidas à extração semiautomatizada do seu DNA, seguida de amplificação com utilização de *primers* para obtenção do *barcode* completo do gene COI por PCR. Contudo, apenas 12 amostras (52%) apresentaram sucesso nesta amplificação (Figura 1).

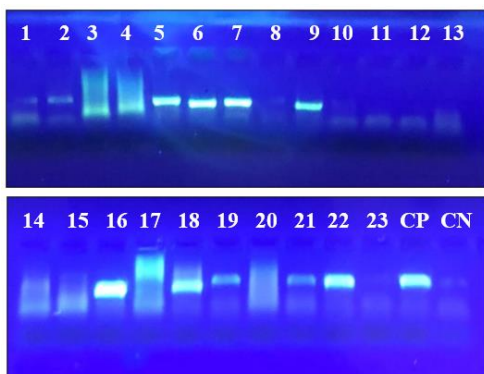


Figura 1. Eletroforese, em gel de agarose 1%, após amplificação do *barcode* completo do gene COI. As amostras estão representadas pelos seus números e as siglas CP (controle positivo) e CN (controle negativo). As amostras #3, #4, #8, #10, #11, #12, #13, #14, #15, #20 e #23 não apresentaram sucesso na amplificação, sendo que em algumas delas o arrasto indicativo de degradação ficou bastante evidente.

O mesmo DNA extraído foi submetido, posteriormente, à amplificação com *primers mini-barcode* do gene COI. Neste caso, verificou-se que 22 amostras (96%) obtiveram sucesso na amplificação (Figura 2).

Das amostras que apresentaram sucesso na amplificação do *barcode* completo do gene COI, duas apresentaram falhas no sequenciamento e outras duas resultaram em *no match* no banco *Species Level Barcode*

Records. Essas últimas apresentaram maior similaridade com invertebrados tanto no banco *All Barcode Records* como no GenBank, embora com valores de cerca de 80%, que de forma alguma podem ser considerados indicadores de sua identidade. Esses resultados apontam para uma possível amplificação preferencial de DNA contaminante ou uma amplificação inespecífica, incluindo pseudogenes. Além disso, foi obtida uma identificação com similaridade genética inferior a 98% (amostra #19). Por fim, foi possível obter a identificação positiva, dentro de parâmetros ideais, para sete (30%) das 23 amostras analisadas, conforme exposto na Tabela 3.

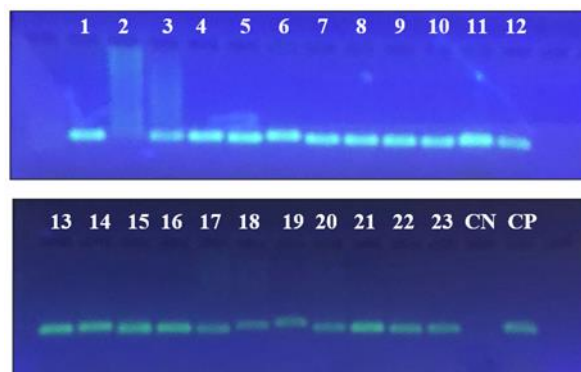


Figura 2. Eletroforese, em gel de agarose 1%, após amplificação de fragmento do gene COI com utilização de *primers mini-barcode*. As amostras estão representadas pelos seus números e as siglas CN (controle negativo) e CP (controle positivo). É possível observar, pela ausência da banda, que apenas a amostra #2 não apresentou sucesso na amplificação.

Já na análise das amostras amplificadas com utilização de *primers mini-barcode*, sete amostras apresentaram falhas no sequenciamento e uma das seqüências resultou em *no match*. Esta última também resultou em baixos valores de similaridade no *All Barcode Records* (cerca de 85% com invertebrado) e no GenBank (cerca de 80% com anfíbio), o que também aponta para uma amplificação inespecífica ou preferencial de contaminante. A análise das seqüências de *mini-barcode*s resultou em quatorze (61%) identificações positivas com similaridade genética maior ou igual a 98% (Tabela 4).

Embora tenham apresentado resultados bastante variáveis, e considerando o número limitado de amostras analisadas, os *primers* utilizados, de forma geral, foram úteis para a identificação de peixes, aves, répteis e mamíferos. Os resultados aqui obtidos reafirmam a sua utilidade na identificação de espécies de vertebrados, conforme já demonstrado em estudos anteriores [28,32,35,36], inclusive para fins forenses [7,30,37–40]. A universalidade dos *primers* testados é uma qualidade notável e significativa, que ampara a decisão por sua utilização na maioria das ocorrências em que se desconhece a origem dos materiais. Convém ressaltar, porém, que, na rotina forense, nem sempre essa abrangência é relevante e, por vezes, são necessários *primers* mais específicos para elucidação de um caso [38,39].

Tabela 3. Resultado da análise, comparação das sequências e identificação das amostras amplificadas com primers de barcode longo do gene COI.

	Animais morfológicamente identificados	Amplificação	Sequenciamento	Identificação	Similaridade
#1	Porco (<i>Sus domesticus</i>)	+	-	-	-
#2	Tiziu (<i>Volatinia jacarina</i>)	+	+	<i>Volatinia jacarina</i>	98%
#3	Jacaré-do-pantanal (<i>Caiman yacare</i>)	-	-	-	-
#4	Tucano-toco (<i>Ramphastos toco</i>)	-	-	-	-
#5	Anta (<i>Tapirus terrestris</i>)	+	+	<i>Tapirus terrestris</i>	100%
#6	Capivara (<i>Hydrochoerus hydracheris</i>)	+	+	<i>Hydrochoerus hydracheris</i>	100%
#7	Gambá-da-orelha-branca (<i>Didelphis albiventris</i>)	+	+	<i>Didelphis albiventris</i>	99,68%
#8	Tilápia (<i>Oreochromis niloticus</i>)	-	-	-	-
#9	Tatupeba (<i>Euphractus sexcintus</i>)	+	+	<i>Euphractus sexcintus</i>	98,79%
#10	Coruja-orelhuda (<i>Pseudoscops clamator</i>)	-	-	-	-
#11	Papagaio-verdadeiro (<i>Amazona aestiva</i>)	-	-	-	-
#12	Arara-canindé (<i>Ara ararauna</i>)	-	-	-	-
#13	Periquito-rei (<i>Eupsittula aurea</i>) ou Periquitão-maracanã (<i>Psittacara leucophthalmus</i>)	-	-	-	-
#14	Galo (<i>Gallus gallus</i>)	-	-	-	-
#15	Javali (<i>Sus scrofa</i>)	-	-	-	-
#16	Bovino doméstico (<i>Bos taurus</i>)	+	+	<i>Bos taurus</i>	100%
#17	Ararajuba (<i>Guaruba guarouba</i>)	+	-	-	-
#18	Jacaré-do-pantanal (<i>Caiman yacare</i>)	+	+	<i>Caiman yacare</i>	100%
#19	Quati (<i>Nasua nasua</i>)	+	+	<i>Nasua nasua</i>	97,71%
#20	Tico-tico-do-campo (<i>Ammodramus humeralis</i>)	-	-	-	-
#21	Onça-pintada (<i>Panthera onca</i>)	+	+	-	no match
#22	Onça-pintada (<i>Panthera onca</i>)	+	+	-	no match
#23	Boi (<i>Bos taurus</i>) ou Cavalo (<i>Equus ferus caballus</i>)	-	-	-	-

Tabela 4. Resultado da análise, comparação das sequências e identificação das amostras amplificadas com primers de mini-barcode do gene COI.

	Animais morfológicamente identificados	Amplificação	Sequenciamento	Identificação	Similaridade
#1	Porco (<i>Sus domesticus</i>)	+	-	-	-
#2	Tiziu (<i>Volatinia jacarina</i>)	-	-	-	-
#3	Jacaré-do-pantanal (<i>Caiman yacare</i>)	+	-	-	-
#4	Tucano-toco (<i>Ramphastos toco</i>)	+	+	<i>Ramphastos toco</i>	100%
#5	Anta (<i>Tapirus terrestris</i>)	+	+	<i>Tapirus terrestris</i>	99,27%
#6	Capivara (<i>Hydrochoerus hydracheris</i>)	+	+	<i>Hydrochoerus hydracheris</i>	100%
#7	Gambá-da-orelha-branca (<i>Didelphis albiventris</i>)	+	-	-	-
#8	Tilápia (<i>Oreochromis niloticus</i>)	+	+	<i>Oreochromis niloticus</i>	100%
#9	Tatupeba (<i>Euphractus sexcintus</i>)	+	+	<i>Euphractus sexcintus</i>	98,55%
#10	Coruja-orelhuda (<i>Pseudoscops clamator</i>)	+	+	<i>Pseudoscops clamator</i>	100%
#11	Papagaio-verdadeiro (<i>Amazona aestiva</i>)	+	+	<i>Amazona aestiva</i>	100%
#12	Arara-canindé (<i>Ara ararauna</i>)	+	+	<i>Ara ararauna</i>	100%
#13	Periquito-rei (<i>Eupsittula aurea</i>) ou Periquitão-maracanã (<i>Psittacara leucophthalmus</i>)	+	+	<i>Psittacara leucophthalmus</i>	100%
#14	Galo (<i>Gallus gallus</i>)	+	+	<i>Gallus gallus</i>	100%
#15	Javali (<i>Sus scrofa</i>)	+	-	-	-
#16	Bovino doméstico (<i>Bos taurus</i>)	+	+	<i>Bos taurus</i>	100%
#17	Ararajuba (<i>Guaruba guarouba</i>)	+	+	<i>Guaruba guarouba</i>	100%
#18	Jacaré-do-pantanal (<i>Caiman yacare</i>)	+	+	-	no match
#19	Quati (<i>Nasua nasua</i>)	+	-	-	-
#20	Tico-tico-do-campo (<i>Ammodramus humeralis</i>)	+	-	-	-
#21	Onça-pintada (<i>Panthera onca</i>)	+	-	-	-
#22	Onça-pintada (<i>Panthera onca</i>)	+	+	<i>Panthera onca</i>	100%
#23	Boi (<i>Bos taurus</i>) ou Cavalo (<i>Equus ferus caballus</i>)	+	+	<i>Bos taurus</i>	100%

A amplificação de sequências que apresentaram maior similaridade com invertebrados (amostras #18 de *mini-barcode* e #21 e #22 de *barcode* completo) pode ser consequência da variação nas afinidades dos *primers* [29]. No caso de amostras contaminadas, isso pode resultar na amplificação do contaminante, e não do DNA da espécie-alvo.

Essa variação de afinidade também pode ser observada quando se considera as identificações positivas, tendo em vista que a maioria dos itens foi identificada por apenas um dos pares de *primers* utilizado. Inclusive, em quatro casos, os animais puderam ser identificados apenas com base no *barcode* longo, o que descarta a possibilidade de degradação severa e leva a crer que os *primers* do *barcode* curto não se mostraram adequados para estes itens.

Uma limitação da técnica ainda é a detecção de misturas. Como a técnica de *DNA barcoding* se baseia no sequenciamento de Sanger, amostras contendo múltiplas espécies animais podem gerar picos ambíguos durante a eletroforese capilar, o que normalmente leva a sequências de baixa qualidade, que impossibilitam a sua identificação. Contudo, a evolução do sequenciamento de Sanger para o sequenciamento de nova geração já permite contornar essa limitação [35,41,42].

Picos ambíguos podem ser gerados, ainda, a partir de amostras com muita degradação ou com pouco DNA e a sua presença pôde ser verificada nas cinco amostras que não foram identificadas com nenhum dos dois *primers* (#1, #3, #15, #20, #21). Em casos reais, com uma maior disponibilidade de tempo de dedicação a amostras problemáticas, poderiam ser utilizados protocolos alternativos até que se esgotassem todas as possibilidades de identificação dos itens questionados. Novas amostragens, acompanhadas ou não de técnicas de limpeza específicas para remoção de contaminantes persistentes (por exemplo, lavagens com etanol), ou alterações nas metodologias de extração, amplificação e sequenciamento, por exemplo, seriam alguns dos procedimentos que poderiam ser adotados.

A amplificação de regiões inespecíficas do DNA, diferentes do marcador-alvo – tais como pseudogenes, que são cópias de baixa qualidade, não funcionais, de um gene codificante [43] – também pode ser uma explicação para a obtenção de algumas sequências sem qualidade. Novamente, em situações reais, é importante que sejam testados outros pares de *primers* para o mesmo marcador ou para marcadores diferentes que também possam levar à identificação da amostra.

Os resultados encontrados neste estudo corroboram achados anteriores [28] que demonstraram a superioridade dos *mini-barcodes*, no que se refere a eficiência da amplificação em amostras degradadas ou armazenadas de forma inadequada. Em nosso experimento, os *mini-barcodes* possibilitaram a identificação de amostras complexas, tais como a de *Ramphastos toco* (#4),

armazenada há 20 anos; a de *Panthera onca* (#22), cujos crânios foram limpos, possivelmente fervidos, e mantidos em temperatura ambiente por um longo período antes das análises; e a de *Bos taurus* (#23), encontrada inumada em lama de rejeito de mineração.

Os *mini-barcodes*, além de permitirem a identificação de todas as penas (amostras #10, #11, #12 e #13), o que é muito importante devido ao fato de as aves serem os animais mais traficados do Brasil [44–46], também viabilizaram a determinação das espécies relacionadas às amostras #13 e #23, cujas morfologias não eram suficientes para sua identificação inequívoca. A aplicabilidade em amostras contendo DNA de baixa qualidade ou em pouca quantidade amplia a funcionalidade desta técnica, que passa a ser útil também na identificação de amostras ainda mais transformadas, como alimentos processados [47] e até mesmo cachecóis, casacos e peles curtidas ou quimicamente tratadas [48,49].

4. CONCLUSÕES

As técnicas de *DNA barcoding* e *mini-barcoding*, em conjunto, foram eficientes para a identificação de 78% das amostras antigas, degradadas ou armazenadas de forma não ideal selecionadas para este estudo. Os resultados obtidos revelaram a superioridade dos *mini-barcodes* nas amostras testadas, pois estes foram capazes de dobrar o número de identificações positivas encontradas com a utilização de *barcodes* completos. Ressalta-se, no entanto, que parte dos materiais só foi identificada com os *primers* de *barcode* longo, o que mostra que os *primers* podem ter eficácia variável de acordo com o material analisado.

Durante os experimentos, verificou-se a viabilidade de incorporação das técnicas testadas nas rotinas dos laboratórios forenses brasileiros, já que a maioria dos equipamentos e grande parte dos insumos utilizados são os mesmos aplicados para a já habitual identificação humana. Apesar disso, ainda existem desafios a serem transpostos para que isso ocorra, incluindo a superação da baixa demanda por esse tipo de exame, que pode ser um reflexo da falta de conhecimento sobre suas aplicações, e o enfrentamento de questões estruturais, tais como a elevada carga de trabalho relacionada à outras análises, o baixo efetivo dos laboratórios e a falta de capacitação específica [50].

Há urgente necessidade de treinamento de mais laboratórios forenses em ferramentas de identificação de espécies animais, para que ocorrências que dependam desse tipo de exame não sejam negligenciadas. Espera-se que o presente trabalho possa colaborar para incentivar a implantação das técnicas aqui descritas nas diversas unidades de criminalística do país. Uma perícia criminal capacitada e atualizada com as melhores técnicas disponíveis se torna forte ferramenta contra a criminalidade e a impunidade.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Setor de Genética Forense do Instituto Nacional de Criminalística da Polícia Federal, por disponibilizar os recursos necessários à realização dos experimentos; ao Instituto de Pesquisa de DNA Forense da Polícia Civil do Distrito Federal, por apoiar o desenvolvimento do projeto; à Academia Nacional de Polícia por promover o II Curso de Especialização em Genética Forense, no qual este estudo foi apresentado como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Especialista em Genética Forense; aos Peritos Criminais Federais Gustavo Chemale e Renato Teodoro Ferreira de Paranaíba, cujas contribuições possibilitaram o aprimoramento deste trabalho; e ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação da Fundação de Peritos em Criminalística Ilaraine Acácio Arce em associação com a Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal pelas bolsas concedidas. Os autores também agradecem os comentários construtivos dos revisores anônimos da Revista Brasileira de Criminalística, que melhoraram de forma significativa o manuscrito.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] UNODC. *World Wildlife Crime Report 2020: Trafficking in Protected Species*. 134 (2020).
- [2] Charity, S., Ferreira, J. M. *Wildlife Trafficking in Brazil. Traffic International* (TRAFFIC International, Cambridge, United Kingdom, 2020).
- [3] Smart, U., Cihlar, J. C., Budowle, B. International Wildlife Trafficking: A perspective on the challenges and potential forensic genetics solutions. *Forensic Science International: Genetics* **54**, (2021).
- [4] Sultana, S. et al. Universal mini COI barcode for the identification of fish species in processed products. *Food Res Int* **105**, 19–28 (2018).
- [5] Carvalho, D. C., Palhares, R. M., Drummond, M. G., Frigo, T. B. DNA Barcoding identification of commercialized seafood in South Brazil: A governmental regulatory forensic program. *Food Control* **50**, 784–788 (2015).
- [6] Tibola, C. S., da Silva, S. A., Dossa, A. A., Patrício, D. I. Economically Motivated Food Fraud and Adulteration in Brazil: Incidents and Alternatives to Minimize Occurrence. *Journal of Food Science* **83**, 2028–2038 (2018).
- [7] Gouda, S., Kerry, R. G., Das, A., Chauhan, N. S. Wildlife forensics: A boon for species identification and conservation implications. *Forensic Science International* **317**, 110530 (2020).
- [8] *Wildlife Trafficking: The Illicit Trade in Wildlife, Animal Parts, and Derivatives*. (Carl Grossmann Verlag, Berlin, 2020). doi:10.24921/2020.94115945.
- [9] Ogden, R., Dawnay, N., McEwing, R. Wildlife DNA Forensics – Bridging the Gap Between Conservation Genetics and Law Enforcement. *Endangered Species Research* **9**, 179–195 (2009).
- [10] Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., DeWaard, J. R. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **270**, 313–321 (2003).
- [11] Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S., deWaard, J. R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc Biol Sci* **270**, S96–S99 (2003).
- [12] Linacre, A., Tobe, S. An overview to the investigative approach to species testing in wildlife forensic science. *Investigative genetics* **2**, 2 (2011).
- [13] Chapple, D. G., Ritchie, P. A. A Retrospective Approach to Testing the DNA Barcoding Method. *PLoS ONE* **8**, e77882 (2013).
- [14] Ratnasingham, S., Hebert, P. D. N. bold: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular Ecology Notes* **7**, 355–364 (2007).
- [15] Carvalho, C. B. V. de. DNA Barcoding in Forensic Vertebrate Species Identification. *Brazilian Journal of Forensic Sciences, Medical Law and Bioethics* **4**, 12–23 (2014).
- [16] Hebert, P. D. N., Stoeckle, M. Y., Zemplak, T. S., Francis, C. M. Identification of Birds through DNA Barcodes. *PLoS Biol* **2**, e312 (2004).
- [17] Meusnier, I. et al. A universal DNA mini-barcode for biodiversity analysis. *BMC Genomics* **9**, 4–7 (2008).
- [18] Ferri, G., Alù, M., Corradini, B., Licata, M., Beduschi, G. Species identification through DNA ‘barcodes’. *Genetic testing and molecular biomarkers* **13**, 421–426 (2009).
- [19] Handy, S. M. et al. A Single-Laboratory Validated Method for the Generation of DNA Barcodes for the Identification of Fish for Regulatory Compliance. *Journal of AOAC INTERNATIONAL* **94**, 201–210 (2011).
- [20] Vences, M., Nagy, Z. T., Sonet, G., Verheyen, E. DNA Barcoding Amphibians and Reptiles. in *DNA Barcodes* (eds. Kress, W. J., Erickson, D. L.) vol. 858 79–107 (Humana Press, Totowa, NJ, 2012).
- [21] Ivanova, N. V., Clare, E. L., Borisenko, A. V. DNA Barcoding in Mammals. in *DNA Barcodes* (eds. Kress, W. J., Erickson, D. L.) vol. 858 153–182 (Humana Press, Totowa, NJ, 2012).
- [22] Elwick, K., Mayes, C., Hughes-Stamm, S. Comparative sensitivity and inhibitor tolerance of GlobalFiler® PCR Amplification and Investigator® 24plex QS kits for challenging samples. *Legal Medicine* **32**, 31–36 (2018).
- [23] Freitas, J. M. Estratégias para análises de amostras críticas de DNA. in *Introdução à Genética Forense* 277–300 (Millenium Editora, Campinas, 2020).
- [24] Burger, J., Hummel, S., Herrmann, B., Henke, W. DNA preservation: A microsatellite-DNA study on ancient skeletal remains. *ELECTROPHORESIS* **20**, 1722–1728 (1999).

- [25] Hajibabaei, M. *et al.* A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded. *Molecular Ecology Notes* **6**, 959–964 (2006).
- [26] Srirama, R. *et al.* Are mini DNA-barcodes sufficiently informative to resolve species identities? An in silico analysis using phyllanthus. *Journal of Genetics* **93**, 823–829 (2014).
- [27] Sarri, C. *et al.* A new set of 16S rRNA universal primers for identification of animal species. *Food Control* **43**, 35–41 (2014).
- [28] Wu, Y. *et al.* Applying COI Barcode to Identify Animal Origin of Food. *Journal of Food Science* **84**, 1256–1265 (2019).
- [29] Xing, R. R., Hu, R. R., Han, J. X., Deng, T. T., Chen, Y. DNA barcoding and mini-barcoding in authenticating processed animal-derived food: A case study involving the Chinese market. *Food Chemistry* **309**, 125653 (2020).
- [30] 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 Science International* **173**, 1–6 (2007).
- [31] Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular marine biology and biotechnology* **3**, 294–9 (1994).
- [32] Armani, A. *et al.* DNA and Mini-DNA barcoding for the identification of Porgies species (family Sparidae) of commercial interest on the international market. *Food Control* **50**, 589–596 (2015).
- [33] Tamura, K., Stecher, G., Kumar, S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution* **38**, 3022–3027 (2021).
- [34] Benson, D. A. *et al.* GenBank. *Nucleic Acids Res* **41**, D36-42 (2013).
- [35] Palumbo, F., Scariolo, F., Vannozi, A., Barcaccia, G. NGS-based barcoding with mini-COI gene target is useful for pet food market surveys aimed at mislabelling detection. *Sci Rep* **10**, 17767 (2020).
- [36] Santos, C. S., Pie, M. R., Da Rocha, T. C., Navarro-Silva, M. A. Molecular identification of blood meals in mosquitoes (Diptera, Culicidae) in urban and forested habitats in southern Brazil. *PLoS ONE* **14**, e0212517 (2019).
- [37] Gonçalves, P. F. M., Oliveira-Marques, A. R., Matsumoto, T. E., Miyaki, C. Y. DNA Barcoding Identifies Illegal Parrot Trade. in *Journal of Heredity* vol. 106 560–564 (Oxford University Press, 2015).
- [38] Oury, N. *et al.* Forensic genetic identification of sharks involved in human attacks. *Forensic Sci Int Genet* **54**, 102558 (2021).
- [39] Kraft, D. *et al.* Development and successful real-world use of a transfer DNA technique to identify species involved in shark bite incidents. *J Forensic Sci* **66**, 2438–2443 (2021).
- [40] Tremori, T. M. *et al.* Forensic genetics associated with hair analysis as a tool for jaguar (*Panthera onca*) identification. *Global Ecology and Conservation* **52**, e02956 (2024).
- [41] Staats, M. *et al.* Advances in DNA metabarcoding for food and wildlife forensic species identification. *Anal Bioanal Chem* **408**, 4615–4630 (2016).
- [42] Cottenet, G., Blancpain, C., Chuah, P. F., Cavin, C. Evaluation and application of a next generation sequencing approach for meat species identification. *Food Control* **110**, (2020).
- [43] Mighell, A. J., Smith, N. R., Robinson, P. A., Markham, A. F. Vertebrate pseudogenes. *FEBS Letters* **468**, 109–114 (2000).
- [44] RENCITAS. 1º Relatório nacional sobre o tráfico de fauna silvestre. *Rede Nacional de Combate ao Tráfico de Animais Silvestres* 108 (2001).
- [45] Oliveira, E. S. de, Torres, D. de F., Alves, R. R. da N. Wild animals seized in a state in Northeast Brazil: Where do they come from and where do they go? *Environ Dev Sustain* **22**, 2343–2363 (2020).
- [46] De Souza, N. F., De Moura, F. B. C., De Oliveira, R. A., Rocha, N. S. *Wildlife Trafficking in North and Southeast of Brazil: 5 Years of Study*. <https://www.ssrn.com/abstract=4407967> (2023) doi:10.2139/ssrn.4407967.
- [47] Sarmiento, K. P., Pereda, J. M. R., H, M. F., Santos, M. D. Not fish in fish balls: fraud in some processed seafood products detected by using DNA barcoding. *Philippine Science Letters* **11**, 30–36 (2018).
- [48] Janjua, S., Fakhar-I-Abbas, William, K., Malik, I. U., Mehr, J. DNA Mini-barcoding for wildlife trade control: a case study on identification of highly processed animal materials. *Mitochondrial DNA. Part A, DNA mapping, sequencing, and analysis* **28**, 544–546 (2017).
- [49] Khan, F. M., William, K., Aruge, S., Janjua, S., Shah, S. A. Illegal product manufacturing and exportation from Pakistan: Revealing the factuality of highly processed wildlife skin samples via DNA mini-barcoding. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **37**, 179–185 (2018).
- [50] Alves, R., Carvalho, C. Uso do DNA barcoding pelos órgãos de perícia oficial do Brasil. *Rev. Bras. Crimin.* **12**, 145–151 (2023).