



## Padronização de uma PCR para a autenticação do *Salmo salar* em pratos da culinária japonesa

[Standardization of a PCR for the authentication of *Salmo salar* in dishes of Japanese cuisine]

E.P.M. Gonçalves<sup>1</sup>, M.C.S. Barros<sup>1</sup>,  
M.C. Pessôa<sup>1</sup>, D.J. Cardilli<sup>2</sup>, T.B. Roos<sup>1</sup>, C.M. Moraes<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Federal do Pará - Castanhal, PA

<sup>2</sup>Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Belém, PA

E.P.M. Gonçalves<sup>1</sup>  
<https://orcid.org/0000-0001-5561-2766>  
M.C.S. Barros<sup>1</sup>  
<https://orcid.org/0000-0002-4216-2353>  
M.C. Pessôa<sup>1</sup>  
<https://orcid.org/0000-0001-9550-9368>  
D.J. Cardilli<sup>2</sup>  
<https://orcid.org/0000-0002-0158-1332>  
T.B. Roos<sup>1</sup>  
<https://orcid.org/0000-0003-4630-1194>  
C.M. Moraes<sup>1</sup>  
<https://orcid.org/0000-0002-7111-8159>

### RESUMO

O objetivo deste trabalho foi padronizar uma PCR para a detecção do *Salmo salar*, a qual possa ser usada na autenticação do salmão utilizado em pratos da culinária japonesa e do pescado comercializado *in natura*. Para isso, dois lotes de *sushi* foram produzidos experimentalmente. Além disso, foram visitados 38 estabelecimentos que comercializam comida japonesa e 10 peixarias na região metropolitana de Belém, visando à coleta do *sushi*, do *temaki* e do pescado pertencente à espécie *Salmo salar*. Os dados demonstraram que a técnica foi eficiente para a autenticação de *Salmo salar*, visto que a espécie foi detectada tanto nas amostras de *sushis* preparados experimentalmente quanto nas alíquotas de pescados isolados, utilizados para a preparação do *sushi*. Em contrapartida, a espécie *Salmo trutta* não foi detectada nas amostras de *sushis* preparados com esta espécie nem nas alíquotas de pescado isolado. Além disso, foi possível a confirmação da utilização da espécie *Salmo salar* no preparo das amostras de *sushi*, *temaki* e de pescado. Portanto, concluiu-se que a técnica foi capaz de amplificar o DNA da referida espécie e não gerou identificação inespecífica quando a espécie *Salmo trutta* foi analisada, podendo ser uma ferramenta adequada para a autenticação do *Salmo salar*.

Palavras-chave: *sushi*, pescado, *temaki*, identificação, DNA

### ABSTRACT

The objective of this work was to standardize a PCR for the detection of *Salmo salar*, which can be used in the authentication of salmon used in Japanese dishes and fish commercialized *in natura*. For this, two batches of *sushi* were produced experimentally. In addition, 38 establishments that sell Japanese food and 10 fishmongers in the metropolitan area of Belém were visited, aiming to collect *sushi*, *temaki* and fish belonging to the species *Salmo salar*. The data demonstrated that the technique was efficient for the authentication of *Salmo salar*, since the species was detected in both the experimentally prepared *sushi* samples and the isolated fish aliquots used for the preparation of *sushi*. In contrast, the species *Salmo trutta* was not detected in the *sushi* samples prepared with this species nor in the isolated fish aliquots. In addition, it was possible to confirm the use of the *Salmo salar* species in the preparation of *sushi*, *temaki* and fish samples. Therefore, it was concluded that the technique was able to amplify the DNA of this species and did not generate nonspecific identification when the species *Salmo trutta* was analyzed, being able to be a suitable tool for the authentication of *Salmo salar*.

Keywords: *sushi*, fish, *temaki*, identification, DNA

---

Recebido em 31 de agosto de 2017

Aceito em 2 de julho de 2018

E-mail: carinamoraes@ufpa.br

## INTRODUÇÃO

A demanda pelo pescado vem aumentando nos últimos anos, impulsionada principalmente pelo crescimento da população e pela tendência mundial em busca de alimentos saudáveis e indicados para a saúde humana (Andrade e Yasui, 2003). Em tal contexto, esse produto de origem animal se destaca quanto à qualidade e quantidade de suas proteínas, vitaminas A e D, minerais como cálcio, fósforo, ferro, cobre, selênio e, no caso dos peixes de água salgada, iodo, além de ser fonte de ácidos graxos essenciais (Sartori e Amancio, 2012).

Entre os peixes cujo consumo como alimento cru tem aumentado gradativamente, está o salmão, que é comumente utilizado para produção de pratos de origem japonesa (Huss *et al.*, 2000; Sato *et al.*, 2005), como o *sushi*, o *temaki* e o *sashimi*. Esses alimentos surgiram de forma mais frequente na mesa dos brasileiros nas duas últimas décadas, aumentando não somente a abertura de restaurantes de culinária japonesa, como também de estabelecimentos que diversificaram seu cardápio, oferecendo a comida tipo japonesa como mais uma opção (Cwiertka, 2007).

O salmão pertence à família Salmonidae e é comercialmente classificado como salmão-do-atlântico (gênero *Salmo*, espécie *S. salar*) ou salmão-do-pacífico (gênero *Oncorhynchus*, espécies *O. kisutch*, *O. keta*, *O. gorbuscha*, *O. tshawytscha* e *O. masou*) (Carrera *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2007; Herrero *et al.*, 2011; Hafsa *et al.*, 2016; Brasil, 2016) e, devido às dificuldades para obtenção desse pescado, restaurantes especializados buscam alternativas para a produção de pratos que o utilizam como ingrediente.

Esse fato pode propiciar o surgimento de substituições de espécies, o que torna a não autenticidade dos alimentos um problema global e, por conseguinte, estabelece como cada vez mais importante a detecção da introdução no mercado de produtos que, por razões econômicas ou de saúde pública, não correspondem à especificação da rotulagem e são de qualidade inferior (Veloso, 2002). Para tal, ferramentas genéticas de identificação do DNA, como a PCR, vêm sendo estudadas e recomendadas, devido a sua rapidez e eficiência, tornando possível a

identificação de espécies em diferentes produtos alimentares (Darwish *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2015). Porém, embora alguns autores tenham buscado identificar as espécies de salmão em produtos alimentícios (Carrera *et al.*, 1999; Carrera *et al.*, 2000; Hellberg *et al.*, 2010; Herrero *et al.*, 2011; Hird *et al.*, 2012), poucos artigos analisaram a presença de substituição do pescado utilizado em *sushis* ou outros alimentos da culinária tipo japonesa.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi padronizar uma PCR para a autenticação do *Salmo salar*, por meio da produção experimental de *sushi* e da análise de amostras comercialmente disponíveis de pratos da culinária tipo japonesa e de amostras de pescado *in natura*, comercializados como salmão.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização do presente trabalho, dois lotes de *sushi* do tipo *makizushi* foram produzidos experimentalmente no Laboratório de Higiene e Qualidade de Alimentos, do Instituto de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Pará (UFPA) – *Campus* Castanhal, situado na região metropolitana de Belém. Para isso, primeiramente arroz apropriado foi cozido e misturado a tempero para *sushi* disponível comercialmente, de acordo com a orientação do fabricante. Em seguida, a referida mistura foi disposta em esteira adequada sobre alga marinha (*nori*), e salmão da espécie *Salmo salar* ou truta da espécie *Salmo trutta* foi acrescentado.

Após a produção experimental, foram coletadas cinco amostras de cada lote de *sushi* produzido, dos seguintes componentes: a) amostra de *Salmo salar* utilizado para a preparação; b) amostra de truta da espécie *Salmo trutta* utilizada para a preparação (visando testar a sensibilidade da técnica); c) *sushi* finalizado com *Salmo salar*; d) *sushi* finalizado com truta da espécie *Salmo trutta*. As amostras coletadas foram conservadas sob congelamento para posterior extração de DNA.

Além disso, foram visitados 38 estabelecimentos que comercializavam comida japonesa e 10 peixarias para a coleta de amostras de *sushis*, *temakis* e pescado fresco, respectivamente, comercializados como pertencentes à espécie *Salmo salar*, na região metropolitana de Belém.

Foram adquiridas 32 amostras de *sushi* do tipo *makizushi* (à base de salmão), seis amostras de *temaki* e 10 amostras de pescado *in natura*. As peças foram coletadas, devidamente identificadas e transportadas em caixas isotérmicas, sob refrigeração, até o Laboratório de Higiene e Qualidade de Alimentos, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Pará, onde elas foram congeladas para futura extração do DNA.

A extração de DNA foi realizada segundo o protocolo previamente descrito por Darwish *et al.* (2009), com modificações, sendo as alterações realizadas na etapa inicial do protocolo, em que frações de 0,03g da amostra foram umedecidas e maceradas com 350µL de tampão de lise STES (0,2M de Tris base, 0,5M de cloreto de sódio, 0,1% de dodecil sulfato de sódio e 0,01M de ácido etilenodiamino tetra-acético). Posteriormente, o material foi homogeneizado em agitador orbital e incubado em banho-maria a 56°C, durante a noite, com 10µL de proteinase K (20mg/mL). O restante do processamento das amostras foi realizado de acordo com o protocolo original de Darwish *et al.* (2009), sendo o DNA extraído e diluído em 25µL de tampão Tris-EDTA (TE), pH= 8,0.

A PCR para detecção da espécie *Salmo salar*, tanto no DNA extraído das amostras experimentais quanto das comercialmente disponíveis, foi realizada por meio da utilização de *primers* específicos, desenhados previamente por Hellberg *et al.* (2010), que amplificam sequências de 219pb (*primer* Forward: 5' AGCAGAACTCAGCCAGCCT 3' e *primer* Reverse: 5' AGAAGAAAGGAGGGAGGGAGA 3'). Os *primers* foram preparados de acordo com a instrução do fabricante, sendo diluídos em tampão TE pH 8,0, até a concentração de 100pmol/µL. O protocolo da técnica foi realizado para um volume final de 25µL para cada reação. Para tal, foram utilizados 50mM de MgCl e 10mM Tris-HCl (tampão 10x), 10mM de desoxinucleotídeo trifosfato (DNTP), aproximadamente 80ng de DNA molde, 1U Taq DNA Polimerase e 10pmol de cada *primer*, sendo o volume completado com água

ultrapura esterilizada. O termociclador (Applied Biosystems VERITI® 96) foi programado para 35 ciclos. As temperaturas e os tempos utilizados para desnaturação, anelamento e extensão foram, respectivamente, 94°C/30 seg, 62°C/40 seg e 72°C/1min, acrescidos de desnaturação inicial a uma temperatura de 94°C/2 min e extensão final a 72°C/10 min. Em todas as reações, foi utilizado um controle negativo, por meio da substituição da amostra por água ultrapura e um controle positivo, em que foi utilizado DNA de *Salmo salar* previamente extraído segundo a metodologia descrita anteriormente.

Por fim, os *amplicons* obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% e, em seguida, o gel foi imerso em brometo de etídeo na concentração de 5µg/mL, durante 30 minutos. A análise dos resultados da eletroforese foi realizada com auxílio de um equipamento de fotodocumentação sobre luz ultravioleta associado ao *software* Total Lab. TL 100v. 2006.

## RESULTADOS

Na Fig. 1, estão demonstrados os resultados obtidos após a execução da PCR em amostras de diferentes componentes de *sushis* produzidos experimentalmente. Os dados alcançados demonstraram que a técnica proposta foi eficiente para a autenticação de *Salmo salar*, visto que a espécie foi detectada tanto nas 10 amostras de *sushis* preparados experimentalmente, quanto nas alíquotas de pescado isolado, utilizados para a sua preparação. Em contrapartida, a espécie *Salmo trutta* não foi amplificada pelos *primers* para identificação de *Salmo salar* nas 10 amostras de *sushis* preparados com essa espécie nem nas alíquotas de pescado isolado, o que demonstra a sensibilidade dos *primers* utilizados.

Na Fig. 2, estão demonstrados os resultados obtidos por meio da execução da PCR em amostras de *sushi*, *temaki* e *Salmo salar* comercialmente disponíveis, nas quais foi possível a confirmação da utilização da espécie *Salmo salar* no preparo de todos os *sushis* e *temakis* analisados e nas amostras de pescado *in natura* comercializados na região.

Padronização de uma PCR...

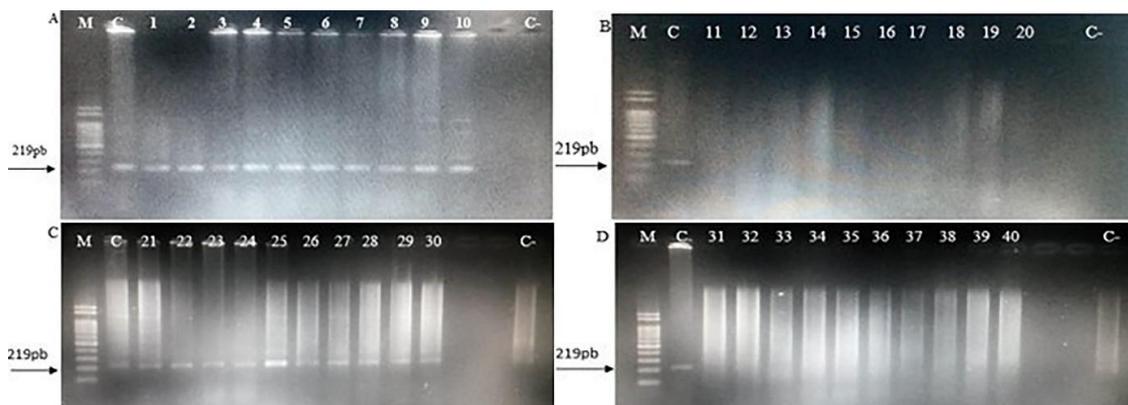


Figura 1. Gel de agarose 1,5%, obtido por meio de eletroforese, demonstrando os resultados alcançados mediante o emprego da reação em cadeia da polimerase (PCR), em que: A: amostras 1 a 5 de *Salmo salar* e 6 a 10 de *sushis* preparados com *salmo salar*; B: amostras 11 a 15 de *Salmo trutta* e 16 a 20 de *sushis* preparados com *Salmo trutta*; C: amostras 21 a 25 de *Salmo salar* e 26 a 30 de *sushis* preparados com *Salmo salar*; D: amostras 31 a 35 de *Salmo trutta* e 36 a 40 de *sushis* preparados com *Salmo trutta* (M: marcador de peso molecular de 100pb; C+: controle positivo de *Salmo salar* de 219pb; e C-: controle negativo da reação).

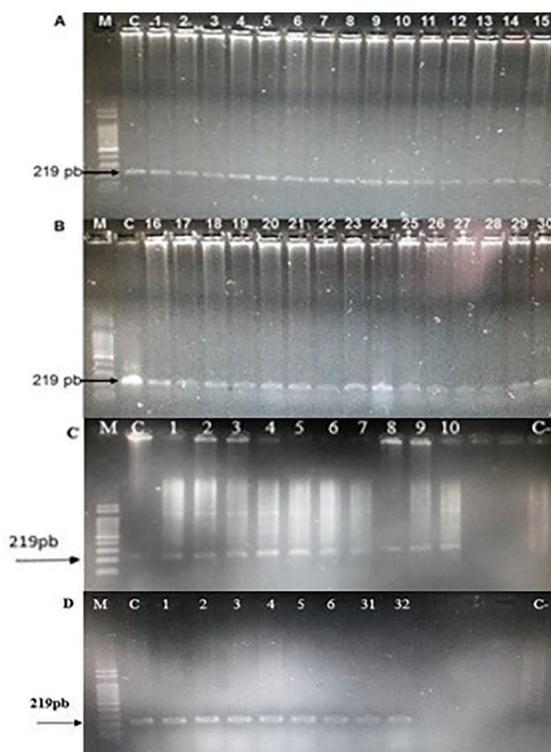


Figura 2. Gel de agarose 1,5%, obtido por meio de eletroforese, demonstrando os resultados alcançados mediante o emprego da reação em cadeia da polimerase (PCR), em que: A e B: amostras 1 - 30 de *sushi* adquiridas em diferentes estabelecimentos comerciais (M: marcador de peso molecular de 100pb; C+: controle positivo de *Salmo salar* de 219pb); C: amostras 1 - 10 de *pescado in natura* adquiridas em peixarias; D: amostras 1 - 6 de *temaki* e amostras 31 - 32 de *sushis* adquiridos em diferentes estabelecimentos comerciais (M: marcador de peso molecular de 100pb; C+: controle positivo de *Salmo salar* de 219pb; C-: controle negativo da reação).

## DISCUSSÃO

Na atualidade, o consumo de filé de peixe cru vem aumentando com o recente hábito alimentar de consumo de *sushis* e *sashimis*. Além disso, existem poucos trabalhos que aplicam a metodologia proposta para a autenticação do salmão (*Salmo salar*) disponível comercialmente ou em pratos da culinária tipo japonesa no Brasil. Os dados apresentados tornam-se de grande relevância, pois visam oferecer uma alternativa válida para a detecção de possíveis substituições da espécie *Salmo salar*.

Os resultados demonstraram que o conjunto de iniciadores proposto anteriormente por Hellberg et al. (2010) e utilizado neste trabalho é específico e sensível para a detecção de DNA da espécie *Salmo salar* também em alimentos preparados à base de pescado cru, visto que foi capaz de amplificar o DNA da referida espécie e não gerou identificação inespecífica quando a espécie *Salmo trutta* foi analisada.

Hellberg et al. (2010) desenvolveram uma PCR *multiplex* tanto em tempo real (q PCR) quanto em tempo convencional, a qual permitiu a identificação de sete espécies comercialmente importantes de salmão e truta. Os iniciadores da espécie *Salmo salar* se destacaram, mostrando êxito na diferenciação da espécie-alvo, pois, mesmo combinados com diferentes espécies em uma mistura de DNA, os resultados indicaram a sensibilidade na identificação da espécie. A eficiência descrita pelo autor pode ser reproduzida na presente pesquisa, visto que amostras de pescado *in natura* foram analisadas.

Da mesma forma, outros autores também propuseram diferentes *primers*, visando à identificação de espécies de salmão. Dalvin et al. (2010) utilizaram conjuntos de *primers* para amplificar fragmentos de DNA curtos dentro do DNA mitocondrial de tecidos severamente degradados de salmão-do-atlântico (*Salmo salar*) e truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). Dos nove conjuntos de *primers* testados, seis foram específicos para as espécies (quatro para o salmão-do-atlântico e dois para a truta arco-íris). Concluiu-se que os *primers* apresentados pelos pesquisadores podem ser usados com sucesso para a finalidade prevista. Embora estes autores tenham comprovado a eficiência dos *primers*

utilizados, estes ainda não foram testados em pratos de origem japonesa.

Assim como constatado neste trabalho com as amostras experimentais, os produtos comerciais analisados apresentaram autenticidade no que se refere ao pescado utilizado, já que se pôde comprovar a presença do *Salmo salar* em sua composição, ratificando a informação de venda repassada pelos estabelecimentos no momento da compra dos produtos. Esse fato é relevante, uma vez que vários autores destacam a dificuldade de se obter resultados mediante a utilização de PCR em amostras de produtos de origem animal *in natura* ou processados, pelos possíveis inibidores presentes nesse tipo de matéria-prima (Hassan et al., 2004; Hellberg et al., 2010). Segundo Souza et al. (2014), existem interferentes que podem comprometer a análise, como, por exemplo, o nível de processamento, contaminantes oriundos do processo de extração do material genético, o excesso de proteínas e polissacarídeos.

Com base nisso, Hassan et al. (2004) destacam que a técnica de PCR é considerada promissora para detecção e identificação molecular em uma variedade de amostras, mas que o método é limitado por vários parâmetros físicos e químicos. Os pontos usualmente mais críticos são a qualidade do DNA molde ou a presença de inibidores da reação (Freitas et al., 2006).

Os resultados da presente pesquisa também apontam que o conjunto de *primers* empregado mostrou-se eficaz para a autenticação da espécie-alvo, uma vez que se revelou confiável para utilização nesses tipos de produtos, o que reforça que a PCR pode ser uma ferramenta importante para a diferenciação de espécies em amostras de peixes crus da culinária tipo japonesa, já que as características morfológicas do pescado são perdidas durante o processamento, inviabilizando uma adequada identificação do produto pelo consumidor.

Além disso, a metodologia de extração de DNA empregada revelou-se apropriada para ser utilizada como etapa essencial de execução da PCR. O protocolo descrito já havia sido utilizado por alguns autores para a extração de DNA de produtos de origem animal e seus derivados, como leite e queijo (Darwish et al., 2009; Silva et al., 2015). Portanto, os dados da presente pesquisa demonstram que o protocolo

apresentado pode ser uma alternativa a ser utilizada para a obtenção de material genético proveniente dos pescados e dos produtos da culinária japonesa.

Mesmo que poucos trabalhos demonstrem a utilização da PCR para detecção de espécies de salmão em *sushis* e afins, alguns autores comprovaram a eficiência dessa técnica para a identificação do pescado (Carrera *et al.*, 1999; Hellberg *et al.*, 2010; Dalvin *et al.*, 2010; Herrero *et al.*, 2011; Hird *et al.*, 2012). Hellberg *et al.* (2010) propuseram uma PCR *multiplex* para a identificação de espécies de salmão e truta comerciais e demonstraram que a metodologia desenvolvida foi sensível na identificação da espécie-alvo, mostrando êxito na diferenciação das espécies. Já Herrero *et al.* (2011) sugeriram o uso de uma qPCR para a autenticação de *Salmo salar* e apontaram que ela pode ser uma alternativa para a análise de várias apresentações do pescado (resfriado, congelado, entre outros), concluindo que a técnica é adequada para a detecção de substituições da espécie.

Ainda, Carrera *et al.* (1999) e Hird *et al.* (2012) reforçam os dados acima expostos, sugerindo a utilização da referida técnica para a identificação de espécies de peixe que são utilizadas na troca do salmão. Um avanço em uma PCR tradicional foi proposto por Dalvin *et al.* (2010), visando à identificação de pequenos fragmentos de DNA em tecidos severamente degradados de salmão-do-atlântico (*Salmo salar*) e truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), e os autores concluíram que a técnica pode ser aplicada com sucesso para esse propósito.

Embora as informações aqui apresentadas sejam importantes, os dados expostos reforçam a necessidade de maiores estudos sobre a autenticação do pescado utilizado no *sushi* disponível comercialmente, como os que envolvam a pesquisa das espécies do salmão-do-atlântico ou do salmão-do-pacífico, utilizadas nos pratos da culinária tipo japonesa, bem como a aplicação técnica aqui proposta em outras variedades de produtos, com diferentes níveis de processamento. Além disso, a identificação de outras espécies de pescado, como a truta salmonada (*Oncorhynchus mykiss*), deve ser realizada, já que esta é a principal espécie envolvida na substituição do salmão.

## CONCLUSÃO

Concluiu-se que a PCR proposta é sensível e específica e pode ser uma ferramenta importante para a investigação de substituição da espécie tanto em amostras de *Salmo salar in natura*, quanto em amostras de *sushi* comercialmente disponíveis. Além disso, com base nas análises realizadas, pode-se comprovar a autenticidade do salmão da espécie *Salmo salar* utilizado na produção do *sushi* comercializado na região metropolitana de Belém.

## REFERÊNCIAS

- ANDRADE, D.R.; YASUI, G.S. O manejo da reprodução natural e artificial e sua importância na produção de peixes no Brasil. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.27, p.166-172, 2003.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de inspeção para identificação de espécies de peixes e valores indicativos de substituições em produtos da pesca e aquicultura. Brasília, 2016. 188 p.
- CARRERA, E.; GARCÍA, T.; CÉSPEDES, A. *et al.* Identification of smoked Atlantic Salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using PCR-restriction fragment length polymorphism of the *p 53* gene. *J. AOAC. Int.*, v.83, p.341-346, 2000.
- CARRERA, E.; GARCÍA, T.; CÉSPEDES, A. *et al.* Salmon and trout analysis by PCR-RFLP for identity authentication. *J. Sci.*, v.64, p.410-413, 1999.
- CHEN, S.; ZHANG, J.; CHEN, W. *et al.* Rapid method for identifying species of grouper using real-time PCR. *Food Control.*, v.27, p.108-112, 2012.
- CWIERTKA, K.J. From ethnic to hip: circuits of Japanese cuisine in Europe. *Food Foodways*, v.4, p.241-272, 2007.
- DALVIN, S.; GLOVER, J.A.; SORVIK, A.G.E. *et al.* Forensic identification of severely degraded atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) tissues. *Invest. Genet.*, v.1, p.1-9, 2010.

- DARWISH, S.F.; ALLAN, H.A.; AMIM, A.S. Evaluation of PCR assay for direction of cow's milk in water buffalo's milk. *World Appl. Sci. J.*, v.7, p.461-467, 2009.
- FREITAS, E.I.; LEMOS, A.A.; MARIN, V.A. Validação de métodos alternativos qualitativos na detecção de patógenos alimentares. *Cienc. Saúde Colet.*, v.11, p.1073-1083, 2006.
- HAFSA, A.B.; NABI, N.; ZELLAMA, M.S. et al. A new specific reference gene based on growth hormone gene (GH1) used for detection and relative quantification of Aquadvantage GM salmon (*Salmo salar* L.) in food products. *Food Chem.*, v.190, p.1040-1045, 2016.
- HASSAN, S.R.U.; VERMA, V.; QAZI, G.N. Rapid detection of Salmonella by polymerase chain reaction. *Mol. Cell. Probes*, v.18, p.333-339, 2004.
- HELLBERG, R.S.R.; MORRISSEY, M.T.; HANNER, R.H. A multiplex PCR method for the identification of commercially important salmon and trout species (*Oncorhynchus* and *Salmo*) in North America. *J. Food Sci.*, v.75, p.595-606, 2010.
- HERRERO, B.; VIEITES, J.M.; ESPINEIRA, M. Authentication of atlantic salmon (*Salmo salar*) using real-time PCR. *Food Chem.*, v.27, p.1268-1272, 2011.
- HIRD, H.J.; CHISHOLM, J.; KAYE, J. et al. Development of real-time PCR assays for the detection of atlantic cod (*Gadus morhua*), atlantic salmon (*Salmo salar*) and european plaice (*Pleuronectes platessa*) in complex food samples. *Eur. Food Res. Technol.*, v.234, p.127-136, 2012.
- HUSS, H.H.; REILLY, A.; EMBAREK, P.K.B. Prevention and control of hazards in seafood. *Food Control.*, v.11, p.149-156, 2000.
- SARTORI, A.G.O.; AMANCIO, R.D. Pescado: importância nutricional e consumo no Brasil. *Seg. Aliment. Nutr.*, v.19, p.83-93, 2012.
- SATO, N.H.; USUI, K.; KOBAYASHI, T. et al. Raw quality assurance based on HACCP concept. *Food Control.*, v.16, p.301-307, 2005.
- SILVA, C.L.; SALES, G.A.; SANTOS NETO, J.G. et al. Detecção de fraude em amostras comerciais de queijo bubalino por adição de leite bovino por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) multiplex. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, v.74, p.21-29, 2015.
- SOUZA, A.G.; ALVES, P.T.; VIEIRA, C.U.; GOULARD, V.A. Comparação de métodos de extração de DNA e detecção de organismos geneticamente modificados em alimentos processados derivados de milho. *Saúde Tec.*, v.11, p.17-22, 2014.
- VELOSO, A.C.A. Detecção de adulterações em produtos alimentares contendo leite e/ou proteínas lácteas. *Quím. Nova*, v.25, p.609-615, 2002.
- ZHANG, J.; WANG, H.; CAI, Z. The application of DGGE and AFLP-derived SCAR for discrimination between atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Food Control.*, v.18, p.672-676, 2007.