



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – CCBS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Karoline Telles de Oliveira

Identificação molecular de *Euterpe edulis* Mart. (palmito juçara) através da técnica de *High Resolution Melting*: uma potencial contribuição para a conservação da Mata Atlântica



Rio de Janeiro

2017

KAROLINE TELLES DE OLIVEIRA

Identificação molecular de *Euterpe edulis* Mart. (palmito juçara) através da técnica de *High Resolution Melting*: uma potencial contribuição para a conservação da Mata Atlântica

Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação em Ciências Biológicas (Biodiversidade Neotropical) do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, como pré-requisito à obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas, sob a orientação do professor Fabiano Salgueiro e co-orientação da professora Camila Maistro Patreze.

Rio de Janeiro

2017

Catálogo informatizada pelo(a) autor(a)

| | |
|-----|---|
| T48 | <p>Telles de Oliveira, Karoline</p> <p>Identificação molecular de <i>Euterpe edulis</i> Mart. (palmito juçara) através da técnica de High Resolution Melting: uma potencial contribuição para a conservação da Mata Atlântica / Karoline Telles de Oliveira. -- Rio de Janeiro, 2017.</p> <p>57</p> <p>Orientador: Fabiano Salgueiro. Coorientadora: Camila Maistro Patreze. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2017.</p> <p>1. <i>Euterpe edulis</i>. 2. <i>Euterpe oleracea</i>. 3. <i>Bactris gasipaes</i>. 4. cpDNA. 5. High Resolution Melting. I. Salgueiro, Fabiano, orient. II. Maistro Patreze, Camila, coorient. III. Título.</p> |
|-----|---|



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – CCBS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Folha de aprovação

Karoline Telles de Oliveira

Dissertação submetida ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biodiversidade Neotropical) da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em 20 de fevereiro de 2017 pela banca examinadora:

Dr. Fabiano Salgueiro (Orientador)

Dra. Eliane Maria Ribeiro da Silva

Dr. Rogério Margis

Dedico este trabalho aos meus pais, Angela e Aloisio, pelo amor, dedicação, apoio e incentivos fundamentais à conclusão de mais essa etapa da minha vida acadêmica.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), por financiar e tornar possível o desenvolvimento da pesquisa.

Ao meu orientador, Professor Dr. Fabiano Salgueiro, pela coordenação do projeto, pela oportunidade e apoio. Sua dedicação, competência, generosidade, revisões e sugestões foram fundamentais para conclusão desta dissertação.

A coorientação da Professora Dr.^a Camila Maistro Patreze, pela dedicação, apoio, competência, generosidade e suas revisões e sugestões que também foram fundamentais para conclusão deste trabalho.

A todos os professores do mestrado que de alguma forma contribuíram positivamente para minha formação.

Aos amigos da turma 2014.1 do mestrado pelos momentos de descontração e apoio.

Aos amigos do laboratório que sempre ajudaram e apoiaram. Em especial à Fernanda D'Andrea e Vinícius Portella.

A ajuda da Raquel Fernandes nos testes com HRM.

Aos colaboradores que ajudaram na coleta de espécimes: Áthila Bertoncini, David, Denise Klein, Emilton, Marco Massao, Marlon, Odilon, Marcelo Barbosa, Ricardo Moura, Sergio, Igor Kessous, Wladimir Maia e em especial a Aline Diniz por sempre estar disposta a ajudar com qualquer tarefa e me fazer companhia no campo.

Ao Harri Lorenzi pela atenção dada a meus questionamentos.

Ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBIO) por conceder licenças para as coletas.

Ao Sítio Burle Marx, pela doação de espécimes.

Ao Horto Florestal de Guaratiba (RJ), pela doação de espécimes.

Não podemos ganhar a batalha de salvar as espécies e os ambientes, se não formarmos uma ligação emocional entre nós e a natureza... Temos de deixar espaço para a natureza em nossos corações.

Stephen J. Gould

RESUMO

O palmito é um dos Produtos Florestais Não Madeireiros (PFNMs) com maior importância socioeconômica. Possui grande aceitação no Brasil e no mundo. Três espécies de palmeiras se destacam na produção de palmito no Brasil: *Euterpe edulis* Mart, *Euterpe oleracea* Mart. e *Bactris gasipaes* Kunth. A *Euterpe edulis* é uma palmeira característica da Mata Atlântica ameaçada de extinção. Dela se extrai o palmito juçara. Diferentemente da *E. oleracea* (açazeiro) e da *B. gasipaes* (pupunha), a *E. edulis* possui estipe único, o que provoca a morte da palmeira quando usada para a extração do palmito. Os caracteres morfológicos são os principais meios de informação na identificação de plantas; e a identificação de palmeiras geralmente depende da interpretação do material vegetativo e reprodutivo. Desta forma, é difícil distinguir as espécies examinando apenas o palmito. Este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de uma metodologia que identifique o palmito proveniente das espécies *E. edulis*, *E. oleracea* e *B. gasipaes* através da técnica de *High Resolution Melting (HRM)*. O propósito é disponibilizar uma metodologia de certificação e autenticação molecular de palmitos *in natura* e em conserva proveniente de cada uma destas três espécies de palmeira e assim contribuir para a conservação e atuar como uma ferramenta de validação do produto que chega até o consumidor. Inicialmente *primers* universais foram usados para amplificar e sequenciar oito diferentes locos do DNA do cloroplasto a partir de amostras foliares destas três espécies de palmeira, oriundas de diferentes procedências. As sequências foram analisadas no programa MEGA 7 na busca por polimorfismos que permitissem a discriminação das espécies. Dos oito locos testados, em três foram observadas substituições de diferentes classes de *Single Nucleotide Polimorphisms (SNPs)*. Um novo par de *primers*, específico para uma destas regiões polimórficas, contendo três *SNPs*, foi desenhado e utilizado nas reações de *HRM* com amostras de palmito *in natura*, palmito em conserva e folhas. As análises de *HRM* foram realizadas no programa Bio-Rad Precision Melting Analysis®. O índice de confiabilidade com que cada amostra foi atribuída a um cluster variou de 97,7% a 98,9% e a Temperatura de melting (T_m) convencional de *E. edulis* e *B. gasipaes* foi de 76°C e de *E. oleracea* foi de 76,4°C. Nas análises por *HRM* foram formados três clusters, o que permitiu identificar as amostras provenientes das três espécies de palmeiras, independentemente do tecido analisado. Isto demonstra a sensibilidade e robustez da técnica empregada neste estudo e seu potencial uso na autenticação de palmitos.

Palavras chave: *Euterpe edulis*, *Euterpe oleracea*, *Bactris gasipaes*, cpDNA; *High Resolution Melting*; *SNPs*

ABSTRACT

Palm heart is one of the Non-Timber Forest Products (NTFPs) of major socioeconomic importance. It is widely accepted in Brazil and in the world. Three palm species stand out in the production of heart of palm in Brazil: *Euterpe edulis* Mart, *Euterpe oleracea* Mart. and *Bactris gasipaes* Kunth. The *Euterpe edulis* from it the 'palmito-juçara' is extracted it is a threatened of extinction. And is found principally at the Atlantic Forest As opposed to *E. oleracea* (açazeiro) and *B. gasipaes* (pupunha), the *E. edulis* has a unique stalk, and the extraction of heart of palm provoke, the death of an entire plant. Morphological characters are the main means of information in the identification of plants. The identification of palm trees depends on the interpretation of the reproductive or vegetative material. Thus it is difficult to distinguish the species by examining only the palm heart. This work aims to develop a methodology that identify the fresh palm heart and canned palm hearts from the species *E. edulis*, *E. oleracea* and *B. gasipaes* through the technique of High Resolution Melting (HRM). The purpose is to provide a methodology for certification and molecular authentication of fresh palm hearts from each of these three palm species and thus contribute to conservation and operate as a validation tool for the product that reaches the consumer. Initially universal primers were used for the amplification and sequencing eight different loci in the cpDNA from leaf samples of these three palm species, come from different places. The sequences were analyzed in the MEGA 7 program in the search for polymorphisms that allowed the discrimination of the species. Eight loci were tested, in three loci were observed substitutions of different classes of single nucleotide polymorphisms (SNPs). A new pair of primers, specific for one of these polymorphic regions, contains three SNPs, was designed and used in HRM reactions with samples of fresh palm heart, canned palm hearts and leaf. As HRM analyzes were performed in the Bio-Rad Precision Melting Analysis® program. The confidence index with which each sample being assigned to the cluster ranged from 97.7% to 98.9% and the conventional melting temperature (T_m) of the *E. edulis* and *B. gasipaes* was 76, 0°C and *E. oleracea* was 76, 4 °C. In HRM analyzes three clusters were formed, which allowed identify samples from the three palm species, independent of the analyzed tissue. This confirms the sensitivity and robustness of the technique used in this study and its potential use in the authentication of palm hearts.

Key words: *Euterpe edulis*, *Euterpe oleracea*, *Bactris gasipaes*, cpDNA; High Resolution Melting; SNPs

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Distribuição geográfica com ocorrências confirmadas de <i>Euterpe edulis</i> na Mata Atlântica e Cerrado..... | 4 |
| Figura 2. Diferentes estipes das três principais palmeiras produtoras de palmito..... | 4 |
| Figura 3. Distribuição geográfica com ocorrências confirmadas de <i>Euterpe oleracea</i> na Amazônia e Cerrado..... | 5 |
| Figura 4. Distribuição geográfica com ocorrências confirmadas de <i>Bactris gasipaes</i> na Amazônia..... | 6 |
| Figura 5. Alinhamento de sequências do loco <i>psbK-I</i> de dois espécimes de <i>E. edulis</i> , <i>E. oleracea</i> e <i>B. gasipaes</i> | 27 |
| Figura 6. Análise de <i>High Resolution Melting (HRM)</i> | 29 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Quantidade em toneladas dos principais PFNMS extraídos o Brasil de 2005 a 2015..... | 2 |
| Tabela 2. Locos do cpDNA e sequências dos <i>primers</i> utilizados na PCR e em reações de sequenciamento..... | 22 |
| Tabela 3. Procedência das amostras de <i>E. edulis</i> , <i>E. oleracea</i> e <i>B. gasipaes</i> , temperatura de <i>melting</i> e percentual de confiança..... | 28 |
| Tabela 4. Especificação das amostras por <i>cluster</i> | 30 |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. Introdução | 1 |
| 1.1. Produtos Florestais Não Madeireiros (PFNMs) | 1 |
| 1.2. Principais espécies de palmeiras produtoras de palmito no Brasil..... | 3 |
| 2. Objetivos..... | 9 |
| 2.1. Objetivo Geral | 9 |
| 2.2. Objetivos específicos..... | 9 |
| Referências Bibliográficas..... | 10 |
| Capítulo1..... | 16 |
| 1. Introdução..... | 18 |
| 2. Material e Métodos..... | 22 |
| <i>Detecção de SNPs capazes de diferenciar espécies de palmeiras produtoras de palmito.....</i> | <i>22</i> |
| <i>Desenho de primers para as reações de HRM.....</i> | <i>23</i> |
| <i>Análise de HRM.....</i> | <i>24</i> |
| 3. Resultados..... | 26 |
| <i>Seleção de locos polimórficos e desenho de primers para análise de HRM.....</i> | <i>26</i> |
| <i>Análises de HRM.....</i> | <i>27</i> |
| 4. Discussão..... | 31 |
| Referências Bibliográficas..... | 36 |
| 3. Conclusões gerais..... | 46 |

1. Introdução

1.1. Produtos Florestais Não Madeireiros (PFNMs)

O crescimento populacional humano é um fator agravante para os problemas do meio ambiente. A relação entre a população humana e a busca por recursos e espaço pressiona diretamente os ecossistemas, que são colocados em risco (MITTERMEIER *et al.* 2003; 2011; SCHNEIDER *et al.*, 2011). Os recursos com valor econômico são consumidos mais rápido do que podem ser regenerados pela natureza. O extrativismo predatório não sustentável é mais comum em regiões que possuem elevada urbanização (SIMÕES e LINO, 2003; RICKLEFS, 2012).

O processo de transformação de matéria prima florestal pode resultar em produtos madeireiros e não madeireiros. Os PFMNs são recursos ou produtos de origem vegetal, não lenhosos, obtidos das florestas para comercialização ou subsistência. Abrangem uma ampla gama de produtos como cipó, resina, óleo, gomas, sementes, castanhas, temperos, tinturas, bambu, palmito, dentre outros (SNIF, 2016a). Em 1992 foi aprovada pela Conferência das Nações Unidas sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento a Agenda 21, onde foi reconhecido o papel e a importância dos PFMNs na manutenção sustentável das florestas (FAO, 1995).

Os PFMNs são subdivididos de acordo com o tipo de uso: alimentícios, aromáticos, medicinais, tóxicos e corantes, borrachas, ceras, fibras e gomas não elásticas. Dentre os PFMNs brasileiros com fins alimentícios, destacam-se em quantidade a erva-mate, a castanha-do-pará, o açaí (fruto), o umbu (fruto) e o palmito (Tabela 1) (SNIF, 2016).

Tabela 1. Quantidade em toneladas (t) dos principais PFNMs extraídos no Brasil de 2005 a 2015.

| Tipo de Produto | 2005 | 2006 | 2007 | 2008 | 2009 | 2010 | 2011 | 2012 | 2013 | 2014 | 2015 |
|------------------|----------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | Quantidade (t) | | | | | | | | | | |
| Açaí (Fruto) | 104.874 | 101.341 | 108.033 | 120.890 | 115.947 | 24.421 | 215.381 | 199.116 | 202.216 | 198.149 | 216.071 |
| Castanha de Caju | 5.677 | 5.538 | 5.480 | 4.447 | 4.238 | 4.030 | 3.179 | 3.054 | 2.931 | 2.489 | 2.280 |
| Castanha-do-Pará | 30.975 | 28.806 | 30.406 | 30.815 | 37.467 | 40.357 | 42.152 | 38.805 | 38.300 | 37.499 | 40.643 |
| Erva mate | 238.869 | 233.360 | 225.957 | 219.773 | 218.102 | 227.462 | 229.681 | 252.700 | 300.128 | 333.017 | 338.801 |
| Mangaba | 811 | 824 | 773 | 711 | 699 | 722 | 680 | 677 | 639 | 685 | 663 |
| Palmito | 7.863 | 6.524 | 6.037 | 5.873 | 5.076 | 4.920 | 5.563 | 4.787 | 4.620 | 4.729 | 4.669 |
| Pinhão | 4.609 | 5.203 | 4.887 | 4.768 | 5.066 | 5.715 | 8.032 | 9.638 | 8.293 | 8.393 | 8.393 |
| Umbu (Fruto) | 9.070 | 8.891 | 8.619 | 9.268 | 9.428 | 9.804 | 9.323 | 7.980 | 7.561 | 8.094 | 8.094 |
| Total | 402.748 | 390.487 | 390.192 | 396.545 | 396.023 | 293.010 | 298.610 | 516.757 | 564.688 | 593.055 | 619.614 |

Adaptado de SNIF, 2016

O Brasil é o maior consumidor e produtor de palmito em termos de exportação de palmito industrializado, a Costa Rica e o Equador são países que se destacam (MODOLO, V. A *et al.* 2012).

Atualmente o cenário de produção do palmito no Brasil deixou de ser majoritariamente baseado no extrativismo predatório de espécies como a juçara (*Euterpe edulis* Mart.), o açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) e também da pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth.) e começou a se sustentar no cultivo de determinadas espécies ou no manejo sustentável das nativas (MODOLO, V. A *et al.* 2012).

No período de 2005 a 2014 o valor de palmito extraído no Brasil variou de 6 a 13 milhões de reais por ano aproximadamente. (IBGE, 2005-2015). E no período de 2005 a 2015 a quantidade de palmito extraída variou de 7.863 ton. a 4.620 ton. (Tabela 1). Tal redução pode estar relacionada ao ganho de mercado da venda de palmito *in natura* (*B. gasipaes*), tendo em vista que o mesmo pode proporcionar ao produtor taxas de retorno melhores, mais elevadas, quando comparada a venda de palmito em conserva, industrializado. O palmito *in natura* permite venda direta em feiras, supermercados ou restaurantes, a partir de um produto sem adição de conserva (ANEFALOS *et al.* 2010).

De acordo com o mercado internacional os principais importadores mundiais de palmitos são: França, Argentina, Estados Unidos, Espanha e Chile (RIBEIRO e ARAUJO, 2013). A Costa Rica e o Equador assumiram a liderança como maiores mercados de exportação de palmito devido principalmente aos plantios de pupunha (*Bactris gasipaes*), realizados de forma organizada, com ganhos em escala e como consequência preços mais baixos (GUERREIRO, 2002; SAMPAIO, 2007).

A existência de planos de manejo destas espécies tem permitido ganhos em padrão e qualidade dos produtos, o que favorece a consolidação do mercado interno. A retomada do mercado externo depende também do fornecimento regular do produto (SANTOS *et al.*, 2008).

1.2.Principais espécies de palmeiras produtoras de palmito no Brasil

O caule das palmeiras recebe o nome de estipe e é no ápice desta região que o palmito está localizado. Naturalmente todas as espécies de palmeiras produzem palmito. Contudo, devido às características organolépticas, algumas espécies não são aceitas pelo consumidor. No Brasil existem três espécies de palmeiras produtoras de palmito que se destacam: o açaí (*Euterpe oleracea*), a juçara (*Euterpe edulis*) e a pupunha (*Bactris gasipaes*) (DANIEL, 1997; LORENZI *et al.*, 2010).

Estas três espécies pertencem à família Arecaceae, que é composta por 183 gêneros com aproximadamente 2.400 espécies distribuídas principalmente em regiões tropicais (UHL e DRANSFIELD, 1987; BAKER *et al.*, 2011). O Brasil possui a maior diversidade de Arecaceae, tendo em vista que a Amazônia, Cerrado e Mata Atlântica possuem respectivamente 146, 81 e 59 espécies (FLORA DO BRASIL, 2020).

A espécie *Euterpe edulis*, conhecida popularmente como palmito juçara, juçara içara, palmito-doce, palmiteiro, ensarova ou ripeira (LORENZI *et al.*, 2010) é uma palmeira comumente encontrada no Cerrado e principalmente, na Mata Atlântica brasileira (Figura 1). A Mata Atlântica e o Cerrado estão entre os 35 *Hotspots* de biodiversidade mais importantes do mundo. Atualmente a Mata Atlântica encontra-se em terceiro lugar atrás apenas dos Andes e Tumbes-Choco-Magdalena e seguida do Cerrado (REIS *et al.*, 2000; MITTERMEIER *et al.*, 2011; FLORA DO BRASIL, 2020).



Figura 1. Distribuição geográfica com ocorrências confirmadas de *Euterpe edulis* na Mata Atlântica e Cerrado (FLORA DO BRASIL, 2020).

A palmeira-juçara possui estipe único (Figura 2), e a retirada do meristema apical, onde está contido o palmito, leva a morte de toda a palmeira. Tendo em vista essa característica, seu cultivo é menos viável economicamente e a comercialização indiscriminada da espécie pode aumentar o grau de ameaça da mesma.

Dentre a ampla gama de utilidades da palmeira juçara destacam-se a produção de sementes para artesanato, utilização dos frutos para produção de polpa, ripas para construção e, como principal produto fornecido, o palmito, que pode ser consumido em conserva ou *in natura* (SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE, 2007; LORENZI *et al.*, 2010).

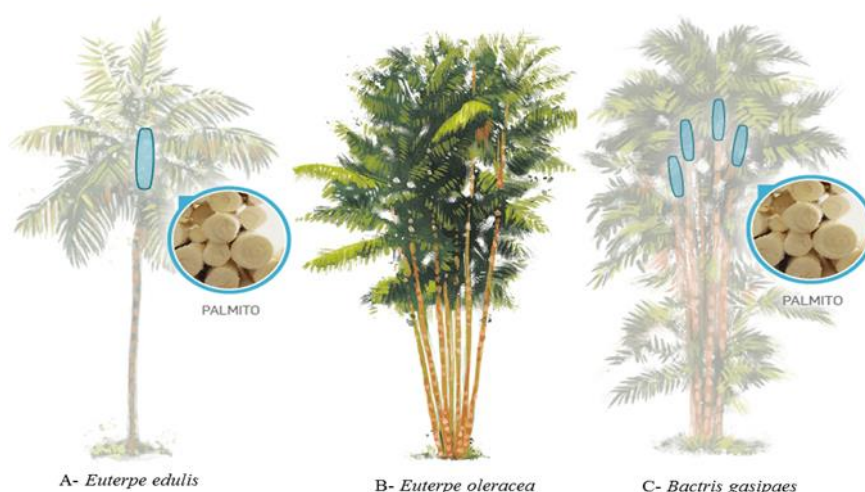


Figura 2. Diferentes estipes das três principais palmeiras produtoras de palmito. A - *Euterpe edulis* (Estipe único), B - *Euterpe oleracea* (Cespitosa) e C - *Bactris gasipaes* (Cespitosa). Adaptado de: <http://infograficos.estadao.com.br/public/cidades/palmeira-juçara>.

Euterpe oleracea é comumente chamada de açai-do-pará, açai, palmito-açai, açazeiro, palmiteiro ou açai. É uma palmeira cespitosa (Figura 2), característica que facilita sua exploração comercial tendo em vista que a retirada do meristema apical, onde está contido o palmito, não leva a morte de toda palmeira. Possui estatura média ou de grande porte (varia de 3 a 20m de altura). Possui como utilidades principais a produção do fruto (açai) e palmito, que é consumido principalmente em conserva (LORENZI *et al.*, 2010). É uma palmeira nativa da Amazônia e do Cerrado brasileiro (Figura 3) (FLORA DO BRASIL, 2020).



Figura 3. Distribuição geográfica com ocorrências confirmadas de *Euterpe oleracea* na Amazônia e Cerrado (FLORA DO BRASIL, 2020).

Bactris gasipaes é comumente chamada de pupunha ou pupunheira. É uma palmeira de grande porte (pode alcançar até 20m de altura) e cespitosa (Figura 2) como a *E. oleracea*, o que facilita a exploração comercial do seu palmito. Possui como utilidades principais a produção do fruto e do palmito que é consumido em conserva ou *in natura* (LORENZI, *et al.*, 2010). É nativa da região amazônica e América Central (Figura 4) (FLORA DO BRASIL, 2020).



Figura 4. Distribuição geográfica com ocorrências confirmadas de *Bactris gasipaes* na Amazônia (FLORA DO BRASIL, 2020).

A espécie *E. edulis* se constituiu ao longo dos anos como fornecedora de um dos mais importantes PFNMs da Mata Atlântica, o palmito-juçara, que possui elevado valor e importância econômica. Também possui elevado valor ecológico e é considerada uma palmeira chave para este bioma, servindo de alimento para diversas espécies de aves e mamíferos, por exemplo. No entanto, nas últimas décadas houve uma expressiva redução na sua área de ocorrência nativa devido principalmente à exploração predatória praticada pelo homem (REIS *et al.*, 2000; REIS *et al.*, 2003; BARROSO *et al.*, 2010; SOARES, 2015).

Euterpe edulis atualmente encontra-se na Lista Brasileira de espécies ameaçadas de extinção classificada como Vulnerável (VU) (LEITMAN *et al.*, 2013). O extrativismo é colocado como uma das principais causas da redução das populações naturais de *E. edulis*, no entanto a perda de habitat, fragmentação e destruição dos ambientes naturais são consideradas as maiores ameaças para a espécie (JOHNSON *et al.*, 1996; GALETTI *et al.*, 2006; STEFFLER *et al.*, 2008). A *International Union for Conservation of Nature (IUCN)* ainda não avaliou a espécie *E. edulis* e, portanto, não existe registro na lista vermelha de espécies ameaçadas em nível internacional.

O extrativismo predatório é fortalecido pela forte demanda por produtos extraídos de modo ilegal (SIMÕES e LINO, 2003). Entre os principais responsáveis pelo processo predatório está a facilidade de extração e comercialização. Os estados brasileiros de São Paulo, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Paraná, possuem legislação que respalda a exploração sustentável da palmeira juçara. Em São Paulo a Resolução SMA Nº 16 de 1994, estabelece normas para exploração da palmeira Juçara; Em Santa Catarina a

Resolução CONAMA Nº 294 de 2001 dispõe sobre o Plano de Manejo do Palmitreiro *Euterpe edulis*; No Rio Grande do Sul o Decreto Estadual nº 38.355 de 1998, prevê a possibilidade de manejo sustentável da palmeira Juçara nativa e implantada para palmito. E no Paraná a Resolução Nº 019 de 2010 estabelece normas e procedimentos para a proteção e utilização do palmito *Euterpe edulis* (JUÇARA, 2015).

Fábricas que produzem palmito legalmente são registradas no Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais (IBAMA). Entretanto, tal registro não garante que os palmitos sejam adquiridos de produtores que prezam pela produção sustentável do palmito. Sendo assim, nada as impede de adquirir palmitos clandestinos em meio aos palmitos extraídos de modo legal sob a justificativa de baixar os custos de produção, manter o produto competitivo no mercado e viabilizar o funcionamento constante da fábrica (FANTINI, A. C. *et al.* 1997; REIS *et al.*, 2003).

Vale lembrar que os fabricantes de alimentos não são apenas responsáveis pela autenticidade de seus produtos, mas também pela segurança dos mesmos. O Padrão de qualidade e apresentação de regularidade no fornecimento de palmito é exigido e esperado pelos clientes e pela cadeia produtiva (RODRIGUES e DURIGAN, 2007; DRUML *et al.*, 2015).

Os caracteres morfológicos são os principais meios de informação na identificação de plantas e a identificação de palmeiras geralmente depende da interpretação do material vegetativo e reprodutivo. No entanto, é difícil distinguir as espécies examinando apenas o palmito. Avanços nas técnicas de biologia molecular têm proporcionado novos controles analíticos para garantir a autenticidade dos alimentos como peixes, carnes, chás e frutos (PAPPALARDO e FERRITO, 2015; DRUML *et al.*, 2015; LÓPEZ-CALLEJA *et al.*, 2015; XANTHOPULOU *et al.*, 2016). A autenticação de gêneros alimentícios através da determinação de espécies baseada na análise do DNA é fundamental para garantir a integridade do fornecimento de alimentos, assim como a segurança (BALLIN, 2010; FAJARDO *et al.*, 2010).

Quanto à autenticação de palmitos produzidos a partir de diferentes espécies de palmeiras no Brasil (*E. edulis*, *E. oleracea* e *B. gasipaes*), o desenvolvimento de uma ferramenta analítica confiável, sensível e prática, que facilite o teste de controle da origem desses palmitos, tem grande importância socioeconômica e ambiental, embora ainda não esteja disponível.

Várias regiões do cpDNA (DNA de cloroplasto) possuem variação suficiente para identificar espécies de plantas por PCR e sequenciamento (CBOL *et al.*, 2009). Atualmente existem diferentes marcadores moleculares amplamente utilizados com este objetivo: *nrITS*, *nrITS2*, *accD*, *matK*, *ndhJ*, *rpoB*, *rpoC1*, *ycf5*, *atF-H*, *psbK-I*, *rbcLa*, *trnH-psbA* e *trnL* (HOLLINGSWORTH *et al.*, 2011).

A PCR quantitativa em tempo real (qPCR) é uma técnica derivada da PCR convencional. Possui maior sensibilidade, o que proporciona uma quantificação precisa dos genes a partir de quantidades mínimas de DNA molde. Não requer manuseio de amostras pós-PCR, o que evita a potencial contaminação dos produtos da reação e resulta em ensaios mais rápidos e com maior rendimento. Devido à sensibilidade da reação é comumente utilizada para identificar alimentos (HEID *et al.*, 1996; VANGUILDER *et al.*, 2008). Em palmitos, a qPCR vem sendo utilizada para outros fins, como por exemplo: na determinação da expressão gênica da neurotoxina de *Cloristridium botulinum* tipo A (OLIVEIRA, 2008) e detecção de *Trypanosoma cruzi* em polpa de açaí (*Euterpe oleracea*) (VIEIRA, 2015).

Associada à técnica de qPCR, a técnica de *HRM* envolve elevar a temperatura do produto da PCR, enquanto o software mede a fluorescência da reação. À medida que a amostra é aquecida, o produto da PCR começa a desnaturar e há a diminuição na fluorescência e a formação da curva de *melting*. A temperatura de *melting* (T_m) de um trecho do DNA depende da sua sequência de nucleotídeos e do tamanho em pares de base. A sensibilidade da técnica é alta e, mesmo com um curto produto de PCR, uma única mutação em um único nucleotídeo altera a T_m e isso permite a discriminação de dois ou mais genótipos ou alelos.

Portanto, a forma da curva de *melting* é uma excelente ferramenta para ser utilizada com caráter diagnóstico (VENTER *et al.*, 2001; WITTEWER *et al.*, 2003). A análise de HRM tem sido utilizada para diversos fins tais como: ferramenta para verificar adulteração em óleos vegetais (VIETINA *et al.*, 2013), autenticação de vinho (PEREIRA *et al.*, 2017) e autenticação de cultivares de azeitonas (MACKAY *et al.*, 2008).

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Desenvolver um método de identificação e discriminação de palmito *in natura* e em conserva provenientes das espécies: *E. edulis*, *E. oleracea* e *B. gasipaes*, através da técnica de *HRM*, usando regiões polimórficas do cpDNA.

2.2. Objetivos específicos

Detectar regiões polimórficas no cpDNA das três espécies de palmito; selecionar locos contendo SNPs diferenciais entre as três espécies; padronizar a técnica de *High Resolution Melting* usando folhas; aplicar a análise de *HRM* para palmitos *in natura* e em conserva; contribuir para a conservação da espécie ameaçada *E. edulis* e apresentar a técnica empregada no estudo como ferramenta adequada para uso na validação do produto que chega até o consumidor.

Referências Bibliográficas

ANEFALOS, LC *et al.* 2007. Uma visão sobre a pupunheira no contexto do mercado de palmito. *Análises e Indicadores do Agronegócio*, 2(7). Disponível em: <<http://www.iea.gov.br>>. Acesso em: 20 de nov. de 2016.

BAKER, W. J. *et al.* Phylogenetic relationships among arecoid palms (Arecaceae: Arecoideae). *Annals Of Botany*, [s.l.], v. 108, n. 8, p.1417-1432, 16 fev. 2011. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/aob/mcr020>.

BALLIN, N.z. Authentication of meat and meat products. *Meat Science*, [s.l.], v. 86, n. 3, p.577-587, nov. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.06.001>.

BARROSO, Renata Moreira; REIS, Ademir; HANAZAKI, Natalia. Etnoecologia e etnobotânica da palmeira juçara (*Euterpe edulis* Martius) em comunidades quilombolas do Vale do Ribeira, São Paulo. *Acta Bot. Bras.*, [s.l.], v. 24, n. 2, p.518-528, jun. 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-33062010000200022>.

CBOL Plant Working Group, 2009. A DNA barcode for land plants. *Proc Natl Acad Sci* 106: 12794–12797. doi: 10.1073/pnas.0905845106 PMID: 19666622.

DANIEL, O. Potencial da palmicultura em Mato Grosso do Sul. *In: SEMINÁRIO SOBRE SISTEMAS FLORESTAIS PARA O MATO GROSS DO SUL*, 1. 1997. Dourados. **Resumos...** Dourados: EMBRAPA-CPAO/Florasum, 1997. P. 63-77 (EMBRAPA-CPAO. Documentos, 10).

DRUML, Barbara *et al.* Development and validation of a TaqMan real-time PCR assay for the identification and quantification of roe deer (*Capreolus capreolus*) in food to detect food adulteration. *Food Chemistry*, [s.l.], v. 178, p.319-326, jul. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.003>.

DRUML, Barbara; CICHNA-MARKL, Margit. High resolution melting (HRM) analysis of DNA – Its role and potential in food analysis. *Food Chemistry*, [s.l.], v. 158, p.245-254, set. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.111>.

FÁBIO DE CASTRO (São Paulo). Estadão. **Espécie híbrida pode ser nova ameaça para palmeira juçara**. 2014. Disponível em: <<http://infograficos.estadao.com.br/public/cidades/palmeira-juçara/>>. Acesso em: 29 nov. 2016.

FAJARDO, Violeta *et al.* A review of current PCR-based methodologies for the authentication of meats from game animal species. *Trends In Food Science & Technology*, [s.l.], v. 21, n. 8, p.408-421, ago. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2010.06.002>.

FANTINI, A. C. *et al.* Estimativa da produção de palmito em plantas de palmitreiro (*Euterpe edulis* Martius) a partir de características fenotípicas. *RevistaÁrvore*, v. 21, n. 1, p. 49-57, 1997.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 1995 Non-wood Forest Products for Rural Income and Sustainable Forestry.NWFPs7. Rome: FAO.

FLORA DO BRASIL 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 07 Dez. 2016

GALETTI, M; DONATTI, C.I; PIRES, A.S.; GUIMARAES, P.R. & JORDANO, P. 2006. Seed Survival and Dispersal of an Endemic Atlantic Forest Palm: the Combined Effects of Defaunation and Forest Fragmentation. **Bot. Journ. Linn. Soc.** 151:141-149.

GUERREIRO, L. F. Palmito de Pupunha. 2002. Disponível em: <<https://www.desenbahia.ba.gov.br>>. Acesso em: 27 nov. 2016.

HEID, A, C *et al.* Real time quantitative PCR. **Genome Research**, [s.l.], v. 6, n. 10, p.986-994, 1 out. 1996. Cold Spring Harbor Laboratory Press. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.6.10.986>.

HOLLINGSWORTH, Michelle L. *et al.* Selecting barcoding loci for plants: evaluation of seven candidate loci with species-level sampling in three divergent groups of land plants. *Molecular Ecology Resources*, [s.l.], v. 9, n. 2, p.439-457, 20 Jan. 2009. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1755-0998.2008.02439.x>.

HOLLINGSWORTH, P. M, GRAHAM, S. W, LITTLE, D. P. 2011. Choosing and Using a Plant DNA Barcode. **PLoS ONE** 6(5): e19254. doi:10.1371/journal.pone.0019254

IBGE. **Produção da Extração vegetal e da Silvicultura**. 2005. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/74/pevs_2005_v20.pdf>. Acesso em: 26 nov. 2016.

IBGE. **Produção da Extração vegetal e da Silvicultura**. 2006. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/74/pevs_2006_v21.pdf>. Acesso em: 26 nov. 2016.

IBGE. **Produção da Extração vegetal e da Silvicultura**. 2007. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/74/pevs_2007_v22.pdf>. Acesso em: 26 nov. 2016.

IBGE. **Produção da Extração vegetal e da Silvicultura**. 2008. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/74/pevs_2008_v23.pdf>. Acesso em: 26 nov. 2016.

IBGE. **Produção da Extração vegetal e da Silvicultura**. 2009. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/74/pevs_2009_v24.pdf>. Acesso em: 26 nov. 2016.

IBGE. **Produção da Extração vegetal e da Silvicultura**. 2010. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/74/pevs_2010_v25.pdf>. Acesso em: 26 nov. 2016.

IBGE. **Produção da Extração vegetal e da Silvicultura**. 2011. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/74/pevs_2011_v26.pdf>. Acesso em: 26 nov. 2016.

IBGE. **Produção da Extração vegetal e da Silvicultura**. 2012. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/74/pevs_2012_v27.pdf>. Acesso em: 26 nov. 2016.

IBGE. **Produção da Extração vegetal e da Silvicultura**. 2013. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/74/pevs_2013_v28.pdf>. Acesso em: 26 nov. 2016.

IBGE. **Produção da Extração vegetal e da Silvicultura**. 2014. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/74/pevs_2014_v29.pdf>. Acesso em: 26 nov. 2016.

IBGE. **Produção da Extração vegetal e da Silvicultura**. 2015. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/74/pevs_2015_v30.pdf>. Acesso em: 26 nov. 2016.

JOHNSON, D. (ed.) and the IUCN/SSC Palm Specialist Group. 1996. Palms: Their Conservation and Sustained Utilization. Status Survey and Conservation Action Plan. Glans, Switzerland and Cambridge: IUCN, 116 + viii pp.

JUÇARA, Rede. **Legislação Ambiental e Sanitária**. 2015. Disponível em: <<http://www.redejucara.org.br/site/conteudo?pid=14&id;=>>. Acesso em: 03 dez. 2016.

LEITMAN, P.; JUDICE, M. D.; BARROS, M. S.; PRIETO, V. P. Arecaceae. *In*: MARTINELLI, G.; MORAES, M. A. **Livro Vermelho da Flora do Brasil**. 1 ed. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013. Parte II, p. 187-195.

LÓPEZ-CALLEJA, Inés María *et al.* Development of real-time PCR assays to detect cashew (*Anacardium occidentale*) and macadamia (*Macadamia intergrifolia*) residues in market analysis of processed food products. **Lwt - Food Science And Technology**, [s.l.], v. 62, n. 1, p.233-241, jun. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.01.023>.

LORENZI, H.; NOBLICK, R. L.; KAHN, F.; FERREIRA, E. **Flora Brasileira: Arecaceae (Palmeiras)**. 1 ed. São Paulo: Instituto Plantarum, 2010. 368p.

MACKAY, John F *et al.*; WRIGHT, Christopher D; BONFIGLIOLI, Roderick G. A new approach to varietal identification in plants by microsatellite high resolution melting analysis: application to the verification of grapevine and olive cultivars. **Plant Methods**, [s.l.], v. 4, n. 1, p.8-9, 2008. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1746-4811-4-8>.

MITTERMEIER, R. A. *et al.* Wilderness and biodiversity conservation. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 100, n. 18, p. 10309-10313, 20 ago. 2003. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1732458100>.

MITTERMEIER, Russell A. *et al.* Global Biodiversity Conservation: The Critical Role of Hotspots. **Biodiversity Hotspots**, [s.l.], p.3-22, 2011. Springer Science + Business Media.

MODOLO V.A.; ANEFALOS, L.C.; TUCCI, M.L.S. 2012. Situação atual e perspectivas do cultivo de palmeiras para a produção de palmito de alta qualidade. *In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA*, 52. Horticultura Brasileira 30. Salvador: ABH. S8473-S8481.

MULLIS, Kary Banks. **Polymerase Chain Reaction**. 1993. Disponível em: <<http://www.karymullis.com/pcr.shtml>>. Acesso em: 20 out. 2016.

OLIVEIRA, Erika de. Reação em cadeia de polimerase quantitativa para determinação da expressão gênica da neurotoxina de *Clostridium botulinum* tipo A em palmito. 2008. xiii, 33 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2008. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/103908>>.

PAPPALARDO, Anna M.; FERRITO, Venera. DNA barcoding species identification unveils mislabeling of processed flatfish products in southern Italy markets. **Fisheries Research**, [s.l.], v. 164, p.153-158, abr. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fishres.2014.11.004>.

PEREIRA, Leonor *et al.* High Resolution Melting (HRM) applied to wine authenticity. *Food Chemistry*, [s.l.], v. 216, p.80-86, fev. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.185>.

REIS, M. S., FANTINI, A. C., NODARJ, R. O, REIS, A., GUERRA, M. P. and MANTOVANI, A. *et al.* 2000. Management and Conservation of Natural Populations in Atlantic Rain Forest: The Case Study of Palm Heart (*Euterpe edulis* Martius). *Biotropica*, 32: 894–902. doi: 10.1111/j.1744-7429.2000.tb00627.x.

REIS, M. S.; CONTE, R.; FANTINI, A. C.; GUERRA, M. *Pet al.* Extrativismo e manejo de populações naturais do palmito (*Euterpe edulis* Martius) na Mata Atlântica. *In: SIMÕES, L. L.; LINO, C. F. Sustentável Mata Atlântica: A exploração de seus recursos florestais*. 2ed. São Paulo: Senac, 2003. p. 103-116.

RIBEIRO, C. C. e ARAUJO J. L. H. **Beneficiamento de produtos da pupunha para exportação**. Manaus: Escola SENAI Antônio Simões, 2013. 30 p. Dossiê técnico.

RICKLEFS, R.E. **A economia da Natureza**. Trad. Pedro Paulo de Lima e Silva. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. 546p.

RIRIE KM, RASMUSSEN RP, WITWER CT (1997) Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry*, 7, 154–60.

RODRIGUES, Aníbal dos Santos e DURIGAN, Maria Eliane. **O agronegócio do palmito no Brasil**. Paraná: Iapar, 2007. 130 p. (0100-3356).

SAMPAIO, L. C.; NETO, S. N. O.; LELES, P. S. S.; SILVA, J. A.; VILLA E. B. *et al.* Análise técnica e econômica da produção de palmito de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth.) e de palmeira real (*Archontophoenix alexandrae* Wendl. & Drude). *Revista Floresta e Ambiente*. v. 14, n. 1, 2007.

SANTOS, Álvaro Figueiredo dos; CORRÊA JÚNIOR, Cirino; NEVES, Edinelson José Maciel *et al.* **Palmeiras para produção de palmito: Juçara, Pupunheira e Palmeira Real**. Colombo: Embrapa Florestas, 2008. 188 p. (9788589281218).

SCHNEIDER, Uwe A. *et al.* Impacts of population growth, economic development, and technical change on global food production and consumption. **Agricultural Systems**, [s.l.], v. 104, n. 2, p.204-215, fev. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.agsy.2010.11.003>.

SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE. Fundação Florestal. **Alternativas para manejo sustentável da Palmeira Juçara**. São Paulo, 2007. 12p.

SIMÕES, Luciana Lopes; e LINO, Clayton Ferreira. **Sustentável Mata Atlântica: A exploração de seus Recursos Florestais**. 2. ed. São Paulo: Senac, 2003. 194 p. (85-7359-244-3).

SNIF (Sistema Nacional de Informações Florestais) [2016a] **Produção Florestal**. Disponível em: <<http://www.florestal.gov.br/snif/producao-florestal/producao>>. Acesso em: 17 de nov. 2016.

SOARES L.A.S.S *et al.*; FARIA D; VÉLEZ-GARCIA F; VIEIRA E.M., TALORA DC, CAZETTA E. 2015. Implications of Habitat Loss on Seed Predation and Early Recruitment of a Keystone Palm in Anthropogenic Landscapes in the Brazilian Atlantic Rainforest. *PLoS ONE* 10(7): e0133540. doi:10.1371/journal.pone.0133540.

STEFFLER, C.E. *et al*; DONATTI, C.I. &GALETTI, M. 2008.Seed Predation of *Attalea dubia* (Arecaceae) in an Island in the Atlantic Rainforest of Brazil. *Palms* 52:133-140.

UHL, N. W e DRANSFIELD. 1987. Genera Palmarum: a Classification of palms based on the work of Harold E. Moore Jr. Lawrence: Allen Press-L. H. Bailey Hortorium-International Palm Society. In: Lista de espécies da flora do Brasil. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB000053>>.

VANGUILDER, H. *et al* .eather; VRANA, Kent; FREEMAN, Willard. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. **Biotechniques**, [s.l.], v. 44, n. 4, p.619-626, abr. 2008. Informa UK (Informa Life Sciences). <http://dx.doi.org/10.2144/000112776>.

VENTER, J. C.*et al.* The Sequence of the Human Genome. **Science**, [s.l.], v. 291, n. 5507, p.1304-1351, 16 fev. 2001. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1058040>.

VIEIRA, A. R. A. Anderson Rodrigues Araujo. Desenvolvimento e padronização de métodos para detecção de *Trypanosoma cruzi* em polpa de açaí (*Euterpe oleracea*). 2015. xiii, 54 f., il. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologias em Saúde)—Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

VIETINA, Michelangelo *et al.*; AGRIMONTI, Caterina; MARMIROLI, Nelson. Detection of plant oil DNA using high resolution melting (HRM) post PCR analysis: A tool for disclosure of olive oil adulteration. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 141, n. 4, p.3820-3826, dez. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.075>.

WITTWER, C. T. *et al.* High-Resolution Genotyping by Amplicon Melting Analysis Using LCGreen. **Clinical Chemistry**, [s.l.], v. 49, n. 6, p.853-860, 1 jun. 2003. American Association for Clinical Chemistry (AACC). <http://dx.doi.org/10.1373/49.6.853>.

XANTHOPOULOU, Aliki *et al.* Multiplex HRM analysis as a tool for rapid molecular authentication of nine herbal teas. **Food Control**, [s.l.], v. 60, p.113-116, fev. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.07.021>.

Capítulo 1

Manuscrito a ser submetido à revista *Molecular Ecology Resources*

Título: Autenticação de palmitos através da técnica de *High Resolution Melting*.

Autores: ^{1,2}Karoline Telles de Oliveira; ^{1,2}Camila Maistro Patreze; ^{1,2}Fabiano Salgueiro.

Filiação:

1-Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

2- Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Neotropical, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

Resumo

O palmito é um Produto Florestal Não Madeireiro (PFNM) com grande aceitação no Brasil e no mundo. Existem três principais palmeiras produtoras de palmito: *Euterpe edulis* Mart, que produz o valioso palmito juçara e corre risco de entrar em extinção; *Euterpe oleracea* Mart., que produz o palmito açai; e *Bactris gasipaes* Kunth, que produz o palmito pupunha. A identificação morfológica do palmito *in natura* e em conserva não é fácil. O objetivo deste trabalho foi disponibilizar uma metodologia de certificação e autenticação molecular de palmitos *in natura* e em conserva proveniente de cada uma destas três espécies de palmeira, e assim contribuir para a conservação atuando como uma ferramenta de validação do produto que chega até o consumidor. Dos oito locos de cpDNA testados, em três foram observadas substituições de diferentes classes de *Single Nucleotide Polimorphisms* (SNPs). Um novo par de *primers*, específico para uma destas regiões polimórficas presentes no loco *psbK-I*, foi desenhado e utilizado nas reações de *HRM* com amostras de palmito *in natura*, palmito em conserva e folhas. As análises de *HRM* foram realizadas no programa Bio-Rad Precision Melting Analysis®. O índice de confiabilidade com que cada amostra foi atribuída ao *cluster* variou de 97,7% a 98,9% e a Temperatura de melting (T_m) de *E. edulis* e *B.gasipaes* foi de 76°C e de *E. oleracea* foi de 76,4°C. Nas análises por *HRM* foram formados três clusters, o que permitiu identificar as amostras destas espécies de palmeiras, independentemente do tecido analisado. Isto demonstra a sensibilidade e robustez da técnica empregada neste estudo e seu potencial uso na autenticação de palmitos.

Palavras chave: *Euterpe edulis*, *Euterpe oleracea*, *Bactris gasipaes*, cpDNA; *High Resolution Melting*; SNPs.

1. Introdução

O palmito é um produto alimentício aceito mundialmente que faz parte da categoria de Produtos Florestais Não Madeireiros (PFNMs), os quais correspondem a recursos ou produtos de origem vegetal, não lenhosos, obtidos das florestas para comercialização ou subsistência. Mais da metade dos PFMNs no mundo são comercializados sem que haja transformação (SNIF, 2016a). O Brasil é um dos principais produtores de palmito, juntamente com Equador e Costa Rica (RODRIGUES e DURIGAN 2007).

No período de 2005 a 2015, a quantidade de palmito extraída no Brasil variou de: 4.620 a 7.863 toneladas (IBGE, 2005-2015). Os principais importadores mundiais de palmitos são: França, Argentina, Estados Unidos, Espanha e Chile (RIBEIRO e JORGE, 2013). Nos últimos anos a Costa Rica e o Equador assumiram a liderança como maiores mercados de exportação de palmito devido principalmente aos plantios de pupunha, realizados de forma organizada, com ganhos em escala e como consequência, preços mais baixos (GUERREIRO, 2002; SAMPAIO, 2007).

No Brasil existem três espécies de palmeiras produtoras de palmito que se destacam: o açazeiro (*Euterpe oleracea*), a juçara (*Euterpe edulis*) e a pupunha (*Bactris gasipaes*), todas pertencentes à família Arecaceae. A *E. edulis* ocorre nos biomas; Cerrado e Mata Atlântica, que estão entre os 35 *Hotspots* de biodiversidade mais importantes do mundo. A Mata Atlântica ocupa o terceiro lugar nesta lista, e o Cerrado ocupa o quarto lugar do ranking mundial (REIS *et al.*, 2000; MITTERMEIER *et al.*, 2011; FLORA DO BRASIL, 2020). Esta palmeira possui estipe único e a retirada do meristema apical, onde está contido o palmito, leva a morte de toda a planta. Esta característica peculiar, somada ao extrativismo ilegal e à comercialização indiscriminada da espécie, pode aumentar o grau de ameaça da mesma.

Uma ampla gama de utilidades é destacada para a palmeira juçara: a produção de sementes para artesanato, polpa da fruta (para produção de sorvete e do açaí de juçara), ripas para construção e, como principal produto fornecido, o palmito, que pode ser comercializado em conserva ou *in natura* (SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE, 2007; LORENZI *et al.*, 2010). A *E. oleracea* é nativa da Amazônia e do Cerrado brasileiro. É cespitosa, característica que favorece a sua exploração, tendo em vista que a retirada do meristema apical, onde está contido o palmito não leva a morte de toda palmeira. Suas principais utilidades são a produção do fruto (açaí) e palmito, que é consumido principalmente em conserva (LORENZI *et al.*, 2010; FLORA DO BRASIL, 2020). A *B.*

gasipaes é nativa da Amazônia e América Central, é cespitosa o que facilita a exploração comercial do seu palmito, que é seu principal produto, seguido do fruto (LORENZI *et al.*, 2010; FLORA DO BRASIL, 2020).

A espécie *E. edulis* possui elevado valor ecológico, sendo considerada uma palmeira chave para a Mata Atlântica, tendo em vista que seu fruto serve de alimento para diversas espécies de aves e mamíferos (BARROSO; *et al.*, 2010; SOARES, 2015). Esta espécie constituiu-se ao longo dos anos como fornecedora de um dos mais importantes PFNM da Mata Atlântica, o palmito juçara, que possui elevado valor e importância econômica.

Apesar da sua importância ecológica e socioeconômica, nas últimas décadas houve uma expressiva redução na sua área de ocorrência nativa devido principalmente à exploração predatória praticada pelo homem (REIS *et al.*, 2000; REIS *et al.*, 2003). Atualmente *E. edulis* encontra-se na Lista Brasileira de espécies ameaçadas de extinção e é classificada como Vulnerável (VU) (LEITMAN *et al.*, 2013). Sendo o extrativismo uma das principais causas da redução das populações naturais de *E. edulis*. No entanto, a perda de habitat, fragmentação e destruição dos ambientes naturais são consideradas as maiores ameaças para a espécie (JOHNSON *et al.*, 1996; GALETTI *et al.*, 2006; STEFFLER *et al.*, 2008).

O extrativismo predatório e não sustentável é mantido pela demanda existente por produtos que possuem elevado valor comercial agregado. (SIMÕES e LINO, 2003). Entre as principais causas do processo predatório estão a facilidade de extração e comercialização do palmito juçara. No Brasil, os estados de: São Paulo, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Paraná, possuem legislação que apoia a exploração sustentável da palmeira juçara (JUÇARA, 2015). Tal registro não garante que os palmitos sejam adquiridos de produtores que prezem pela produção sustentável do palmito. Sendo assim, nada os impede de adquirir palmitos clandestinos em meio aos palmitos extraídos de modo legal sob a justificativa de baixar os custos de produção, manter o produto competitivo no mercado e viabilizar o funcionamento constante da fábrica (FANTINI, A. C. *et al.* 1997; REIS *et al.*, 2003).

É possível identificar palmeiras a partir da interpretação do material vegetativo e reprodutivo, no entanto, é difícil distinguir as espécies examinando apenas o palmito. Avanços nas técnicas de biologia molecular têm proporcionado novos controles analíticos para garantir a autenticidade dos alimentos como peixes, carnes, chás e frutos

(PAPPALARDO e FERRITO, 2015; DRUML *et al.*, 2015; LÓPEZ-CALLEJA *et al.*, 2015; XANTHOPULOU *et al.*, 2016). A autenticação de gêneros alimentícios, através da determinação de espécies baseada na análise do DNA é fundamental para garantir a integridade do fornecimento de alimentos, assim como a segurança (BALLIN, 2010; FAJARDO *et al.*, 2010). Quanto à autenticação de palmitos produzidos a partir de diferentes espécies de palmeiras no Brasil (*E. edulis*, *E. oleracea* e *B. gasipaes*), o desenvolvimento de uma ferramenta analítica confiável, sensível e prática que facilite o teste de controle da origem desses palmitos tem grande importância socioeconômica e ambiental, embora ainda não esteja disponível.

Atualmente existem diferentes marcadores moleculares amplamente utilizados para identificar plantas por PCR e sequenciamento: *nrITS*, *nrITS2*, *accD*, *matK*, *ndhJ*, *rpoB*, *rpoC1*, *ycf5*, *atF-H*, *psbK-I*, *rbcLa*, *trnH-psbA* e *trnL* (HOLLINGSWORTH *et al.*, 2011). A PCR quantitativa em tempo real (qPCR) é uma técnica derivada da PCR convencional. Devido à sensibilidade da reação, a técnica de qPCR é comumente utilizada para identificar alimentos (HEID *et al.*, 1996; VANGUILDER *et al.*, 2008; OSATHANUNKUL *et al.*, 2016). Em palmitos, a técnica vem sendo utilizada para determinar a expressão gênica da neurotoxina de *Cloristridium botulinum* tipo A (OLIVEIRA, 2008) e detectar *Trypanosoma cruzi* em polpa de açaí (*Euterpe oleracea*) (VIEIRA, 2015).

A qPCR aliada à técnica de *High Resolution Melting (HRM)* aplicada para identificar espécies e analisar alimentos é recente (DRUML e CICHNA-MARKL, 2014; RUGMAN-JONES e STOUTHAMER, 2016; SIMKO, 2016). A análise de *HRM* mostrou ser uma ferramenta eficiente para a varredura gênica de mutações desconhecidas ou *SNPs* na análise de alimentos para identificar a presença de microrganismos (DRUML e CICHNA-MARKL, 2014). A análise de *HRM* também foi realizada com o gene *trnL* do cpDNA, e foi possível a identificação da adulteração das principais espécies de feijão gregas e mediterrâneas (MADESIS *et al.*, 2012). As sequências utilizadas neste estudo possuíram variação capaz de produzir diferenças no *HRM*. Foram observadas duas deleções e sete *SNPs* responsáveis por diferenças nas curvas de melting entre o produto da PCR das diferentes espécies. A análise de *HRM* para identificação de uma variedade de lentilhas foi associada a cinco marcadores microssatélites (SSRs) em paralelo com o gene *rpoc1* do cpDNA. Foram observados três *SNPs* responsáveis pelas diferenças nas curvas de melting observadas entre as diferentes espécies e auxiliaram na identificação da variedade de lentilhas desejada (BOSMALI *et al.*, 2012).

A sensibilidade da técnica *HRM* é alta, pois uma única mutação em um único nucleotídeo pode alterar a T_m e isso permitir a discriminação de dois ou mais genótipos, ou alelos. A forma da curva de *melting* é uma excelente ferramenta para ser utilizada com caráter diagnóstico (RIRIE *et al.*, 1997; VENTER *et al.*, 2001; WITWERT *et al.*, 2003).

Este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de um método de identificação e discriminação de palmito *in natura* e em conserva provenientes das espécies *E. edulis*, *E. oleracea* e *B. gasipaes*, através da técnica de *HRM* usando regiões polimórficas do cpDNA. Assim, objetiva-se certificar a nível molecular a origem de palmitos provenientes de cada uma destas três espécies de palmeira, contribuindo para a conservação e também atuar como uma ferramenta de validação do produto que chega até o consumidor.

2. Material e Métodos

Detecção de SNPs capazes de diferenciar espécies de palmeiras produtoras de palmito.

As amostras foliares de *E. edulis*, *E. oleracea* e *B. gasipaes* foram obtidas de áreas naturais ou de produtores localizados nos estados do Ceará, Paraná, Rio de Janeiro e São Paulo, Brasil. O DNA das amostras, armazenadas em sílica gel, foi extraído de acordo com o protocolo estabelecido por Doyle e Doyle (1987) a partir de 50mg de folhas secas. A concentração de DNA foi estimada por fluorimetria utilizando-se o Qubit® 3.0 (Life Technologies). Para se avaliar o polimorfismo de marcadores moleculares de cloroplasto (cpDNA) nas espécies em questão, inicialmente oito locos de cpDNA (Tabela 2) foram amplificados e sequenciados em seis espécimes (dois espécimes de cada espécie).

Tabela 2. Locos do cpDNA e sequências dos primers utilizados na PCR e em reações de sequenciamento, visando à identificação de SNPs nas espécies *E. edulis*, *E. oleracea* e *B. gasipaes*.

| Loco | Sequência do Primer | Referência |
|---------------|--------------------------------|-----------------------------|
| <i>accD</i> | F: AGTATGGGATCCGTAGTA | Chase <i>et al.</i> , 2007; |
| | R: TCTTTTACCCGCAAATGCA | Ford <i>et al.</i> , 2009 |
| <i>atpF-H</i> | F: ACTGCACACACTCCCTTTCC | Pennisi, 2007 |
| | R: GCTTTTATGGAAGCTTTAACA | |
| <i>matK</i> | F: CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG | Pennisi, 2007; |
| | R: ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTTC | Lahaye <i>et al.</i> , 2008 |
| <i>ndhj</i> | F: TTGGGCTTCGATTACCAAGG | Chase <i>et al.</i> , 2007; |
| | R: TCAATGAGCATCTTGTATTTC | Ford <i>et al.</i> , 2009 |
| <i>psbK-I</i> | F: TTAGCCTTGTGTTGGCAAG | Pennisi, 2007 |
| | R: AGAGTTTGAGAGTAAGCAT | |
| <i>rbcLa</i> | F: ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC | Kress e Erickson, 2007 |
| | R: GTAAAATCAAGTCCACCG | |
| <i>rpoB</i> | F: ATGCAACGTCAAGCAGTTCC | Chase <i>et al.</i> , 2007; |
| | R: GATCCCAGCATCACAATTCC | Ford <i>et al.</i> , 2009 |
| <i>rpoC 1</i> | F: GTGGATACACTTCTTGATAATGG | Chase <i>et al.</i> , 2007; |
| | R: TGAGAAAACATAAGTAAACGGGC | Ford <i>et al.</i> , 2009 |

Os marcadores monomórficos foram descartados e os locos *atpF-H*, *psbK-I* e *rbcLa*, que apresentaram variabilidade entre as espécies analisadas, foram empregados em um segundo experimento onde um total de 29 amostras foi sequenciado. Duas amostras amplificaram apenas para um dos três locos: *E. edulis* (E02) obteve sucesso apenas no sequenciamento do loco *atpF-H* e *E. oleracea* (O13) obteve sucesso apenas no sequenciamento do loco *psbK* (Tabela S1).

O volume final da reação da PCR foi de 25µl, contendo 5µl de DNA molde (3ng/µl), 2,5 µl de 10x Taq Buffer contendo (NH₄)SO₄, 2,0 µl de MgCl₂(25mM), 0,4 µl de dNTP (5mM), 0,8 µl de cada primer (10mM), 0,2 µl de 5U *Taq* DNA polimerase e 12,9µl de água ultrapura (Milliq). A condição da PCR empregada para os oito locos do cpDNA foi: 94°C por 5 minutos, seguido por 40 ciclos a 94°C por 1 min, 45°C por 1 min, 72°C por 1 min; e uma etapa final a 72°C por 5 min.

Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose a 1,5% em tampão TAE 0,5X corado com GelRed®. Em seguida, os produtos da PCR foram purificados e sequenciados em ambas as direções (*forward* e *reverse*) pela empresa MacroGen® Inc utilizando os mesmos primers previamente utilizados nas reações da PCR. As sequências obtidas foram editadas e alinhadas no programa MEGA 7 (KUMAR *et al.*, 2016). O alinhamento múltiplo das sequências foi realizado utilizando-se o algoritmo Muscle (EDGAR, 2004) disponível no programa MEGA. Em seguida as sequências foram inspecionadas visualmente para que pudesse ser verificada a presença de sítios polimórficos capazes de distinguir as três espécies em questão através da técnica de HRM.

Desenho de primers para as reações de HRM

O loco *psbK-I*, contendo sete *SNPs*, foi selecionado para o desenho de primers específicos para análises de *HRM*. Os principais critérios para o desenho dos novos primers a serem utilizados nas análises de *HRM* foram: (i) o produto amplificado contendo sítios polimórficos que permitirão a discriminação entre as espécies *E. edulis*, *E. oleracea* e *B. gasipaes*; e (ii) o par de primers contendo pequenos produtos amplificados que maximizarão as diferenças entre as curvas de *melting* de sequências semelhantes (JUNG *et al.*, 2010). O programa *Primer 3* (v. 0.04.0) (UNTERGASSER. A. *et al.*, 2012) foi utilizado para desenhar o seguinte par de primers, específicos para as reações de HRM:

Palm_HRM_psbK_F 5'-GCTCACTGTAAGGTCAGAACGA-3' e Palm_HRM_psbK_R 5'-ATGAACCCTCGATTCAAAA-3'. Este par de primers amplifica um produto de 98pb contendo quatro *SNPs* capazes de distinguir as três espécies de palmeiras em questão.

Análise de HRM

Amostras de palmito *in natura* (n=6), palmito em conserva (n=6) e de folhas (n=10) das palmeiras *E. edulis*, *E. oleracea* e *B. gasipaes* foram utilizadas no presente estudo (Tabela 03). As amostras de palmito *in natura* das espécies *E. oleracea* e *B. gasipaes*, que são comumente comercializadas legalmente no Brasil, foram obtidas diretamente de produtores e do comércio local. Para aquisição de amostras de palmito *in natura* de *E. edulis* foram necessárias licenças de coleta, autorizadas por órgãos competentes, tendo em vista que esta espécie possui estipe único e está ameaçada de extinção, sendo protegida por lei. As amostras de palmito em conserva foram adquiridas diretamente de supermercados. As amostras de folhas foram obtidas de produtores e de áreas nativas, sendo utilizadas como referências no presente estudo.

A identificação morfológica destes espécimes de referência foi realizada de acordo com a descrição destas palmeiras por Lorenzi (2010). Uma exsicata de cada espécie foi depositada no herbário (HUNI) da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro sob os números 3987, 4609 e 4610. O padrão de *SNPs* destas amostras de referência foi confirmado através do sequenciamento do loco *psbK-I* utilizando-se os primers psbK_F5'-TTAGCCTTTGTTTGGCAAG-3' e psbK_R 5'-AGAGTTTGAGAGTAAGCAT-3' (PENNISI, 2007). O DNA das amostras de palmitos *in natura* e de folhas foi extraído conforme Doyle e Doyle (1987). O DNA das amostras de palmito em conserva foi extraído utilizando-se o DNeasy® Plant MiniKit (QIAGEN) de acordo com as instruções do fabricante.

As reações de HRM foram realizadas no CFX96 Real-time PCR system (Bio-rad). As reações foram realizadas em triplicata. As amostras que não apresentaram amplificação positiva, para, pelo menos duas réplicas foram descartadas. Oito amostras foram excluídas das análises (uma de folha, duas de palmito *in natura* e cinco de palmito em conserva). A reação (10µl) continha 5 µl do Precision Melt Supermix (Bio-Rad), 0,2 mM de cada primer e 40ng do DNA genômico. O protocolo de amplificação foi composto por desnaturação

inicial a 95°C por 2min seguido por 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 10s, 60°C por 30s; com um passo final de dissociação de 65°C a 95°C. A análise da temperatura de *melting* (T_m) foi realizada pelo programa CFX Manager™ (Ver. 2.0 Bio-Rad).

Os produtos de PCR foram aquecidos a 95 °C durante 30s, resfriados a 60°C por 2 min e então reaquecidos a 95 °C a uma taxa de 0,2°C por 10s. Foram consideradas nas análises apenas as amostras cujos Cqs apresentaram diferença de no máximo 0,5 entre as replicatas técnicas. A análise de agrupamento ou formação de *clusters* foi realizada no programa Precision Melt Analysis™ (Ver. 1.1, Bio-Rad) utilizando as configurações padrões do programa. O programa agrupa automaticamente os dados com perfis de *melting* semelhantes e atribuiu uma pontuação de confiança para cada amostra do cluster.

3. Resultados

Seleção de locos polimórficos e desenho de primers para análise de HRM

Oito locos do cpDNA de *E. edulis*, *E. oleracea* e *B. gasipaes*, compreendendo um total de 3.826 pares de base foram sequenciados e analisados quanto ao polimorfismo. A inspeção visual das sequências obtidas revelou haver polimorfismos entre as espécies analisadas para três dos oito locos estudados. Os locos *atpF-H*, *psbK-I*, e *rbcLa* apresentaram respectivamente nove, cinco e três sítios polimórficos. Nestes três locos foram observadas substituições de diferentes classes de *SNPs*, tais como C/T; G/A e C/A. A distribuição e posição dos *SNPs* em cada loco estão nas figuras S1, S2 e S3.

O loco *psbK-I* foi selecionado para as análises de *HRM* por apresentar três sítios com *SNPs* próximos (compreendendo 60 pb) que, quando combinados, diferenciam as espécies *E. edulis*, *E. oleracea* e *B. gasipaes* (Figura S1). O loco *atpF-H* não foi selecionado pois, apesar de possuir cinco *SNPs* em posições próximas (compreendendo 103 pb), as duas sequências de *B. gasipaes* (G24 e G18) apresentaram algumas variações na região destes *SNPs* que poderiam prejudicar as análises *HRM* (Figura S2). O loco *rbcLa* não foi utilizado por apresentar somente dois *SNPs* próximos (posições 333 e 336), os quais não diferenciariam as espécies de *E. edulis* e *E. oleracea* (Figura S3). Para o uso deste loco, os primers deveriam amplificar um fragmento maior que 223 pb, para que os três *SNPs* estivessem incluídos no mesmo.

O par de primer desenhado para as reações de *HRM* (*Palm_HRM_psbK_F* = 5'-ATGAACCCCTCGATTCAAAAA-3' e *Palm_HRM_psbK_R* = 5'-GCTCACTGTAAGGTCAGAACGA-3') amplificou um fragmento com 98 pb nas três espécies (Figura 5), contendo: uma substituição A/C na posição 22, uma substituição T/C na posição 29 e uma substituição T/C na posição 82, que permitem distinguir as sequências de *E. edulis* das sequências de *E. oleracea* e de *B. gasipaes*. Além destas, apresenta uma substituição G/A na posição 47 que permite distinguir as sequências de *B. gasipaes* das sequências das duas espécies do gênero *Euterpe*.

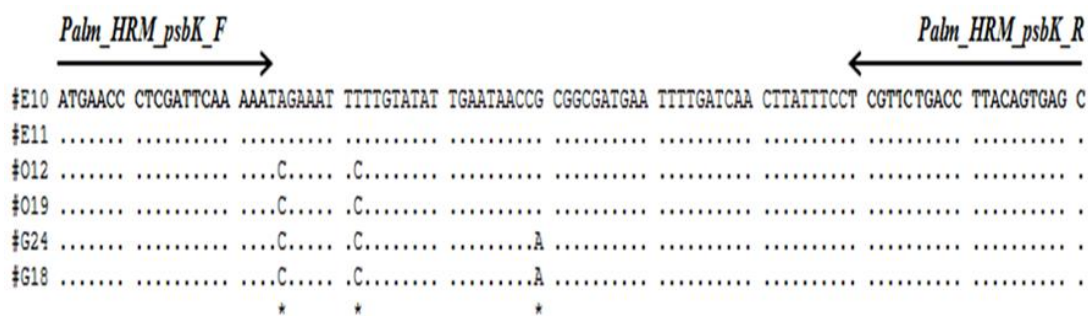


Figura 5. Alinhamento de seqüências do loco *psbK-I* de dois espécimes de *E. edulis* (E10, E11), *E. oleracea* (O12, O19) e *B. gasipaes* (G24, G18), indicando com a seta a região de anelamento do par de primers Palm_HRM_psbK e os três SNPs. A região mostrada na figura corresponde às posições 93 a 181 do alinhamento do loco e o fragmento amplificado apresenta 98pb.

Análises de HRM

A discriminação de amostras de folhas, palmito *in natura* e palmito em conserva das espécies *E. edulis*, *E. oleracea* e *B. gasipaes* foi avaliada no presente estudo analisando um fragmento de 98 pb do loco *psbK-I* através da técnica de *HRM*.

Para as quatorze amostras que atenderam ao critério de amplificação pré-estabelecido, os resultados da análise de *HRM* corroboraram com a identificação prévia das espécies oferecida pelos produtores e vendedores, exceto a amostra de folha G13, cujo sequenciamento e curva *HRM* revelaram a identidade da mesma como sendo *E. oleracea*, ao invés de *B. gasipaes*, conforme indicado pelo produtor (Tabela 3).

Três *clusters* foram formados e agruparam as amostras de folha e palmito *in natura* da espécie *E. edulis* (*cluster* verde); folha, palmito *in natura* e palmito em conserva da espécie *E. oleracea* (*cluster* vermelho), e folha e palmito *in natura* da espécie *B. gasipaes* (*cluster* azul) (Figura 6, Tabelas 3 e 4), mostrando a eficiência do método proposto para discriminar as espécies em questão.

O índice de confiabilidade com que cada amostra foi atribuída a um determinado cluster variou de 97,7% – 98,9% e o Cq médio de cada amostra variou de 17,36 à 23,65, não apresentando variação de Cq superior a 0,5 entre as replicatas técnicas das amostras de palmito em avaliação. A T_m de *E. edulis*, *E. oleracea* e *B. gasipaes* foi respectivamente de 76°C, 76,4°C e 76°C. Devido à T_m convencional de *E. edulis* e *B. gasipaes* serem a mesma, o uso da técnica de *HRM* foi fundamental para aumentar a resolução das análises de *melting* e obter curvas diferenciais entre estas espécies.

Tabela 3. Procedência das amostras de *E. edulis* (E), *E. oleracea* (O) e *B. gasipaes* (G), temperatura de melting e percentual de confiança no agrupamento em *clusters* após as análises de HRM usadas para autenticação das espécies de palmito.

| Código da amostra | Tipo da amostra | Origem da amostra | Espécies Putativas | T _m (°C) | Autenticação das espécies pelo HRM | Percentual de Confiança |
|-------------------|------------------|-------------------|--------------------|---------------------|------------------------------------|-------------------------|
| E14 | <i>In natura</i> | Área Natural/RJ | <i>E. edulis</i> | 76,0 | <i>E. edulis</i> | 97,7 |
| E30 | <i>In natura</i> | Área Natural/RJ | <i>E. edulis</i> | 76,0 | <i>E. edulis</i> | 97,7 |
| E12 | Conserva | Supermercado | <i>E. edulis</i> | NA | NA | NA |
| E28 | Conserva | Supermercado | <i>E. edulis</i> | NA | NA | NA |
| E06 | Folha | Área Natural/RJ | <i>E. edulis</i> | 76,0 | <i>E. edulis</i> | 98,1 |
| E29 | Folha | Produtor/RJ | <i>E. edulis</i> | 76,0 | <i>E. edulis</i> | 96,9 |
| E32 | Folha | Área Natural/RJ | <i>E. edulis</i> | 76,0 | <i>E. edulis</i> | 96,3 |
| O12 | <i>In natura</i> | Área Natural/RJ | <i>E. oleracea</i> | 76,4 | <i>E. oleracea</i> | 98,9 |
| O26 | <i>In natura</i> | Produtor/RJ | <i>E. oleracea</i> | NA | NA | NA |
| O05 | Conserva | Supermercado | <i>E. oleracea</i> | NA | NA | NA |
| O07 | Conserva | Supermercado | <i>E. oleracea</i> | 76,4 | <i>E. oleracea</i> | 97,9 |
| O03 | Folha | Produtor/CE | <i>E. oleracea</i> | 76,4 | <i>E. oleracea</i> | 97,2 |
| O04 | Folha | Área Natural/PA | <i>E. oleracea</i> | 76,4 | <i>E. oleracea</i> | 99,4 |
| O11 | Folha | Produtor/RJ | <i>E. oleracea</i> | 76,4 | <i>E. oleracea</i> | 99,7 |
| G21 | <i>In natura</i> | Produtor/RJ | <i>B. gasipaes</i> | 76,0 | <i>B. gasipaes</i> | 98,0 |
| G23 | <i>In natura</i> | Produtor/RJ | <i>B. gasipaes</i> | NA | NA | NA |
| G10 | Conserva | Supermercado | <i>B. gasipaes</i> | NA | NA | NA |
| G11 | Conserva | Supermercado | <i>B. gasipaes</i> | NA | NA | NA |
| G07 | Folha | Produtor/SP | <i>B. gasipaes</i> | 76,0 | <i>B. gasipaes</i> | 96,7 |
| G19 | Folha | Produtor/SC | <i>B. gasipaes</i> | 76,0 | <i>B. gasipaes</i> | 91,2 |
| G20 | Folha | Produtor/RJ | <i>B. gasipaes</i> | NA | NA | NA |
| G13* | Folha | Produtor/SP | <i>B. gasipaes</i> | 76,4 | <i>E. oleracea</i> | 99,1 |

Legenda: NA – Amostras que não amplificaram/ *Espécie encontrada que difere da espécie informada pelo produtor.

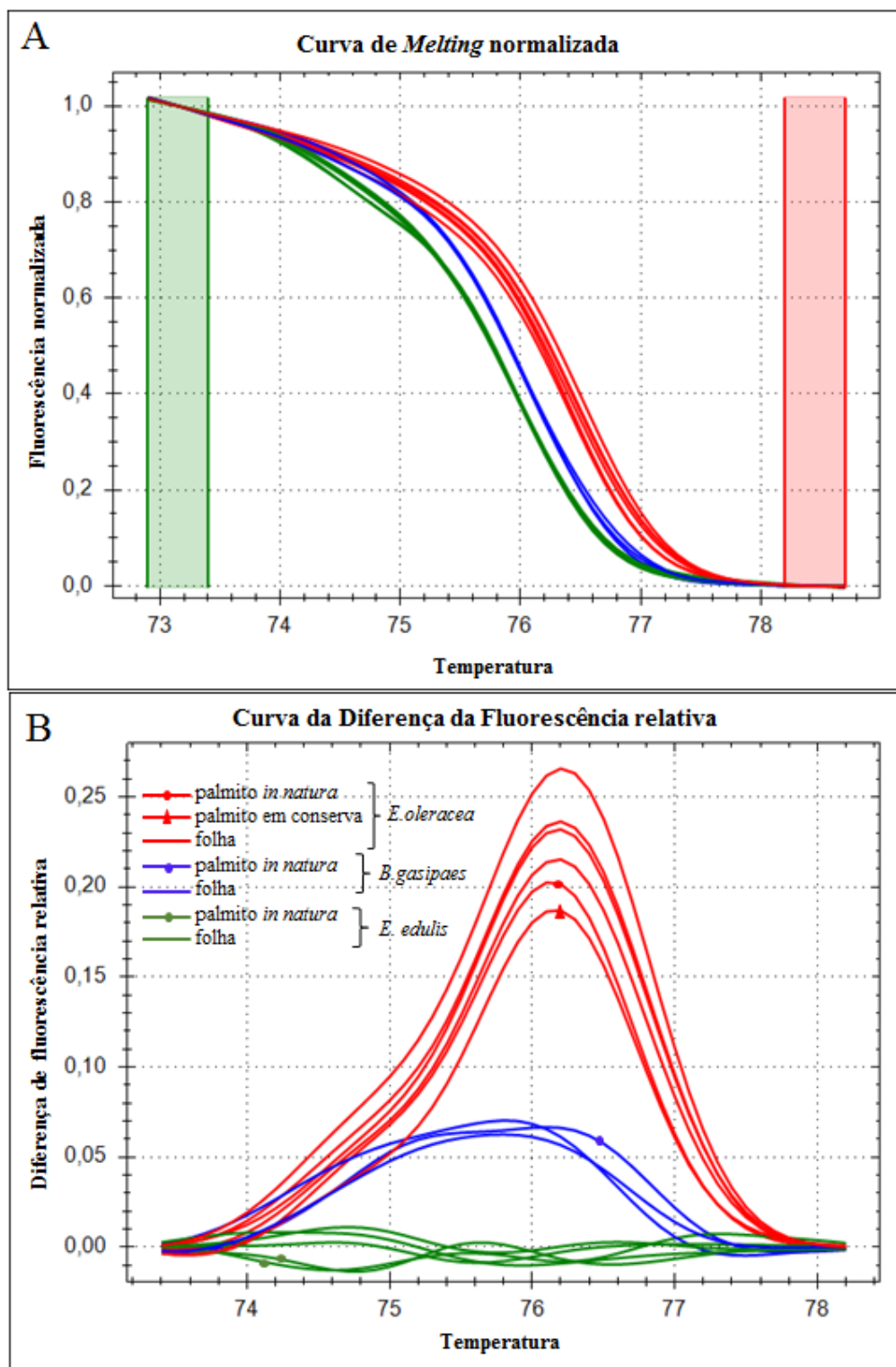


Figura 6. Análise de *High Resolution Melting* (HRM): A- Curvas de Melting após normalização e B- Curvas de amplificação referentes às amostras foliares, de palmito *in natura*, palmito em conserva e folha de *E. edulis*, *E. oleracea*, *B. gasipaes*.

Tabela 4. Especificação das amostras por *cluster*: *Cluster 1* (vermelho) agrupou amostras de *E. oleracea*; *Cluster 2* (azul) agrupou amostras de *B. gasipaes* e *Cluster 3* (verde) agrupou amostras de *E. edulis*.

| Espécimes | Amostras | Clusters | Cor do Cluster |
|--------------------|----------|------------------|----------------|
| <i>E. oleracea</i> | O7 | <i>Cluster 1</i> | Red |
| | O12 | <i>Cluster 1</i> | |
| | O3 | <i>Cluster 1</i> | |
| | G13 | <i>Cluster 1</i> | |
| | O4 | <i>Cluster 1</i> | |
| | O11 | <i>Cluster 1</i> | |
| <i>B. gasipaes</i> | G7 | <i>Cluster 3</i> | Blue |
| | G19 | <i>Cluster 3</i> | |
| | G21 | <i>Cluster 3</i> | |
| <i>E. edulis</i> | E6 | <i>Cluster 2</i> | Green |
| | E29 | <i>Cluster 2</i> | |
| | E32 | <i>Cluster 2</i> | |
| | E14 | <i>Cluster 2</i> | |
| | E30 | <i>Cluster 2</i> | |

4. Discussão

Existem limitações inerentes aos sistemas de identificação de plantas baseados na morfologia, como por exemplo, o número cada vez menor de taxonomistas, atrelada à necessidade da interpretação de partes vegetativas e reprodutivas das plantas (HEBERT *et al.*, 2003). Avanços nas técnicas de biologia molecular têm proporcionado novos controles analíticos para garantir a autenticidade dos alimentos, como; peixes, carnes, chá e frutos (PAPPALARDO e FERRITO, 2015; DRUML *et al.*, 2015; LÓPEZ-CALLEJA *et al.*, 2015; XANTHOPULOU *et al.*, 2016). A autenticação de gêneros alimentícios, através da determinação de espécies baseada na análise do DNA é fundamental para garantir a segurança do fornecimento de alimentos (BALLIN, 2010; FAJARDO *et al.*, 2010).

Palmitos das espécies *E. edulis*, *E. oleracea* e *B. gasipaes* são alvo de grande exploração e comercialização (GANEDERIA, 2007). A identificação destas palmeiras e conseqüentemente dos seus produtos não é simples do ponto de vista morfológico, tendo em vista que os toletes de espécies distintas são muito similares (PEREIRA e QUADROS, 2007). A análise do DNA destas espécies é uma alternativa. A metodologia de *HRM* empregada nesse estudo vem sendo amplamente utilizada em produtos do gênero alimentício para autenticar e identificar espécies de modo simples e rápido.

Análises desta natureza são realizadas com frequência para autenticação de diferentes espécies de frutas. Jaakola *et al.* (2010) realizaram a análise de *HRM* afim de, autenticar espécies de frutas vermelhas ("*berry species*") frequentemente misturadas no mercado. Oito espécies foram avaliadas e diferentes *primers* foram desenhados a partir da região *ITS*, e das regiões *trnL-F* e *rpl36-ps8* e amplificaram trechos do DNA de 188-359 pb, contendo uma variação de 17 a 227 *SNPs* em amplicons que variaram de 585 a 658 pb. Sucos em conserva com mistura de frutos também são encontrados com frequência em mercados. Faria *et al.* (2013) realizaram análises de *HRM* amplificando uma região com cerca de 500 pb a partir do loco *trnL*, contendo três *SNPs*, para autenticar sucos de frutas, a partir da identificação dos frutos (laranja, manga, pêssego, pera e abacaxi).

Outros estudos possuem como objetivo a análise *forense* de quantidades de adulterantes em produtos agroalimentares, tais como lentilhas, feijões e fava (BOSMALI *et al.*, 2012; MADESIS *et al.*, 2012; GANOPOULOS *et al.*, 2012). O estudo realizado por Bosmali *et al.* (2012) utilizou cinco marcadores *SSR* em paralelo com o loco *rpoC* onde

foram encontrados três *SNPs* responsáveis pela discriminação da variedade de lentilhas ‘Eglouvi’ através da técnica de *HRM*. Madesis *et al.* (2012) e Ganopoulos *et al.* (2012), obtiveram sucesso nas análises de *HRM* com o loco *trnL*. No estudo de Madesis *et al.* (2012) foi possível identificar e quantificar duas espécies de feijões a partir de cinco *SNPs* encontrados no fragmento amplificado. Já o estudo de Ganopoulos *et al.* (2012), permitiu discriminar espécies de leguminosas que potencialmente poderiam ser utilizadas como adulterantes em produtos comerciais de Fava. Foram identificados três *SNPs* e duas deleções de um e quatro nucleotídeos em uma das espécies.

A técnica de *HRM* é sensível à inserção ou deleção de pequenas variações de nucleotídeos – *SNPs*, que são abundantes no genoma (CABEZAS *et al.*, 2011; CRUZ *et al.*, 2013). Portanto, a identificação de regiões polimórficas é fundamental para a análise de *HRM*. Dentre as diferentes possibilidades de usos das regiões polimórficas, a escolha do melhor loco ou multilocos para qualquer estudo a ser desenvolvido deve ser baseada na quantidade de variação obtida através do sequenciamento e posterior alinhamento das famílias ou espécies de interesse (FAZEKAS *et al.* 2008). Diversas regiões do genoma nuclear e cloroplastidial possuem variação suficiente para identificar espécies vegetais. Dentre elas destacam-se algumas usadas com frequência em diferentes famílias botânicas: *nrITS*, *nrITS2*, *accD*, *matK*, *ndhj*, *rpoB*, *rpoC1*, *ycf5*, *atF-H*, *psbK-I*, *rbcLa*, *trnH-psbA* e *trnL* (HOLLINGSWORTH *et al.*, 2011).

Regiões do cpDNA foram comparadas, afim de, identificar um conjunto diversificado de gêneros dos principais clados de plantas terrestres da América do Norte temperada. Os gêneros incluíram grupos de gimnospermas e angiospermas, onde cada espécie foi representada por acessos de múltiplas populações. Nesta análise, o sequenciamento com o loco *psbK-I* das angiospermas resultou em 85% de sucesso, e foi indicado para eventuais trabalhos com vegetais superiores (FAZEKAS *et al.*, 2008).

Posteriormente sete principais regiões do genoma cloroplastidial: *rpoC1*, *rpoB*, *atpF-H*, *rbcL*, *matK*, *psbK-I* e *trnH-psbA* foram avaliadas nos grupos de angiospermas, gimnospermas e briófitas (HOLLINGSWORTH *et al.*, 2009; CBOL, 2009). O loco *psbK-I* apresentou 69% de sucesso na discriminação de espécies dos diferentes grupos, com destaque na identificação de *Inga*, uma árvore do grupo das angiospermas (HOLLINGSWORTH *et al.*, 2009; CBOL, 2009).

Neste trabalho, três locos do cpDNA - *atpF-H*, *psbK-I* e *rbcLa* foram testados e apresentaram substituições de diferentes classes de *SNPs* (C/T, G/A e C/A). Considerando

as espécies de Arecaceae, somente encontramos registro do uso do loco *psbK-I* (LAHAYE 2008; DOMENECH, 2014). O loco *rbcL* tinha sido utilizado na autenticação por *HRM* de três espécies de plantas medicinais da família Acanthaceae, a partir de um amplicon de 136 pb com oito *SNPs* de diferentes classes (C/T, G/A e C/G) (OSATHANUNKUL *et al.*, 2015). Rolland *et al.* (2016) utilizaram o loco *rbcL* para identificar sete espécies de plantas holoparasitas através da técnica de *HRM*. Um fragmento de 345-389 pb foi analisado e não foi determinado o número de *SNPs*. Até o presente estudo não há relatos na literatura do uso dos locos *atpF-H* e *psbK-I* aplicados à análise de *HRM*.

De acordo com Venter *et al.* (2011) os *SNPs* são classificados em quatro classes, de acordo com as mudanças de bases encontradas nas sequências. O *SNP* classe um é caracterizado pelas mudanças de bases C/T e G/A, *SNP* classe dois é caracterizado pelas mudanças de bases C/A ou G/T, *SNP* classe três é caracterizado pelas mudanças de bases C/G e *SNP* classe quatro é caracterizado pela mudança de base A/T. A classe do *SNP* está diretamente ligada a mudança da T_m e conseqüentemente nas curvas de *melt*. O *SNP* de classe quatro é raro e também o mais difícil de ser discriminado.

No presente estudo o amplicon de 98pb usado nas reações de *HRM* apresentou um *SNP* C/T da classe um, um *SNP* G/A da classe um e um *SNP* C/A da classe 2. Tais classes proporcionam as maiores mudanças de T_m . O estudo desenvolvido por Liew *et al.* (2004) comprovou que a divergência na T_m é maior que 0,8°C quando foram encontrados *SNPs* (C/T e G/A), no entanto a mudança de base (A/T) diminuiu a T_m para <0,2°C.

A metodologia de *HRM* desenvolvida aqui mostrou ser eficaz na autenticação com precisão das três principais espécies de palmeiras produtoras de palmito (*E. edulis*, *E. oleracea* e *B. gasipaes*). O maior sucesso de amplificação se deu em amostras de folhas e em amostras de palmito *in natura*. Resultado esperado, tendo em vista que o DNA destas amostras está melhor preservado.

O palmito em conserva passa por processos industriais, tais como a salmoura ácida e esterilização comercial que em conjunto diminuem a qualidade e a integridade do DNA destes palmitos (RESENDE *et al.*, 2009). Ou seja, o palmito em conserva possui como principal desvantagem associada a sua autenticação a natureza degradada do DNA presente nestas amostras.

A análise de *HRM* é realizada e aprimorada de acordo com o tecido analisado. No caso da aplicação da técnica na autenticação alimentar, alguns autores desenvolveram novos iniciadores para amplificar fragmentos curtos, focando em locais polimórficos das

sequências estudadas (JAAKOLA *et al.*, 2010). Enquanto outros autores optaram por utilizar tamanhos de fragmentos originais (200 pb no caso de microssatélites ou 600 pb em regiões de código de barras) previamente desenvolvidos e com aplicabilidade universal para diferentes espécies vegetais (BOSMALI *et al.*, 2012; GANOPOULOS *et al.*, 2012).

Autores como Jaakola *et al.* (2010) e Ganopoulos *et al.* (2012) optaram por amplificar fragmentos pequenos das suas sequências. Jaakola *et al.* (2010) amplificaram variações de: 212-291 pb (*ITS*), 242-312 pb (*trnL-F*) e 136-160 pb (*rpl36*) focadas em sítios polimórficos das sequências de cada espécie de frutas vermelhas. Ganopoulos *et al.* (2012) obtiveram sucesso na amplificação de sequências de leguminosas a partir do loco *trnL* com 89 pb. Em contrapartida, Faria *et al.* (2013) optaram por utilizar fragmentos maiores, com cerca de 500 pb, a partir do loco *trnL*, para autenticar sucos de frutas, a partir da identificação dos frutos (laranja, manga, pêssago, pera e abacaxi).

O presente estudo fez uso do Precision Melt Supermix (Bio-Rad) cujo manual recomenda que os amplicons estejam entre 70 e 150 pb, mas aceita amplicons de 50 a 250 pb. Os amplicons gerados no presente estudo a partir do loco *psbK-I* foram considerados pequenos, pois possuem 98 pb.

O estudo desenvolvido por Pereira *et al.* (2017) mostrou diferentes resultados na análise de amostras de vinho, mosto e folhas de uvas. O uso de fragmentos menores (119 pb) foi mais eficiente para se analisar amostras de vinho do que amplicons maiores (375 pb e 705 pb). Já para amostras de mosto e folhas, onde espera-se que o DNA esteja melhor preservado, fragmentos maiores (375 pb e 705 pb) aumentaram o poder de discriminação da análise, tendo em vista que são capazes de contemplar um maior número de ocorrência de *SNPs*. Assim como nas amostras de palmito em conserva, nas amostras de vinho o DNA está mais degradado. Já nas amostras do mosto e folhas de uvas, que não passaram por nenhum processo industrial, o DNA está mais íntegro, assim como em amostras de palmito *in natura* e de folhas de palmito. Com o DNA não degradado a amplificação tende a funcionar melhor.

O genoma plastidial é menos sujeito à fragmentação do DNA e facilita a amplificação e as análises de *HRM* mesmo em amostras em que o DNA não esteja íntegro, como em sucos de fruta em conserva (FARIA *et al.*, 2013) e em amostras de vinho (PEREIRA *et al.*, 2017), o que pode ter contribuído para a amplificação do palmito em conserva no presente estudo.

Neste sentido, o tamanho do amplicon analisado é de suma importância para as análises de *HRM*. Amplicons menores são mais adequados do que amplicons grandes quando amostras com baixa integridade de DNA são analisadas. Por outro lado, amplicons curtos geralmente contemplam um menor número de *SNPs* do que amplicons maiores, dificultando a diferenciação de amostras de diferentes espécies. No presente estudo, um amplicon curto, com trocas de bases das classes um e dois, foi adequado para diferenciar as três espécies de palmeiras e autenticar seus palmitos. A metodologia aplicada aqui é uma ferramenta analítica confiável, sensível e prática que facilitará a análise em larga escala da origem desses PFNMs, sendo recomendada para autenticar palmitos através da análise de DNA.

Referências Bibliográficas

BALLIN, N.z. Authentication of meat and meat products. **Meat Science**, [s.l.], v. 86, n. 3, p.577-587, Nov. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.06.001>.

BARROSO, Renata Moreira; REIS, Ademir; HANAZAKI, Natalia. Etnoecologia e etnobotânica da palmeira juçara (*Euterpe edulis* Martius) em comunidades quilombolas do Vale do Ribeira, São Paulo. **Acta Bot. Bras.**, [s.l.], v. 24, n. 2, p.518-528, jun. 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-33062010000200022>.

BOSMALI, Irene *et al.* Microsatellite and DNA-barcode regions typing combined with High Resolution Melting (HRM) analysis for food forensic uses: A case study on lentils (*Lens culinaris*). **Food Research International**, [s.l.], v. 46, n. 1, p.141-147, abr. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.12.013>.

CABEZAS, J. A., *et al.* (2011). A 48 SNP set for grapevine cultivar identification. **BMC Plant Biology**, 11, 153.

CRUZ, Maria Fernanda Antunes da *et al.* Identificação de SNPs para conteúdo de ácidos graxos em soja pela técnica HRM. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [s.l.], v. 48, n. 12, p.1596-1600, dez. 2013. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-204x2013001200009>.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L.A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v.19, p.11-15, 1987.

DRUML, Barbara *et al.* Development and validation of a TaqMan real-time PCR assay for the identification and quantification of roe deer (*Capreolus capreolus*) in food to detect food adulteration. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 178, p.319-326, Jul. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.003>.

DRUML, Barbara; CICHNA-MARKL, Margit. High resolution melting (HRM) analysis of DNA – Its role and potential in food analysis. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 158, p.245-254, set. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.111>.

EDGAR, Robert C. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. **Bmc Bioinformatics**, [s.l.], v. 5, n. 1, p.1-19, 2004.Springer Nature.

FAJARDO, Violeta *et al.* A review of current PCR-based methodologies for the authentication of meats from game animal species. **Trends In Food Science & Technology**, [s.l.], v. 21, n. 8, p.408-421, ago. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2010.06.002>.

FANTINI, A. C. *et al.* Estimativa da produção de palmito em plantas de palmiteiro (*Euterpe edulis* Martius) a partir de características fenotípicas. **Revista Árvore**, v. 21, n. 1, p. 49-57, 1997.

FARIA, M.A. *et al.* High resolution melting of *trnL* amplicons in fruit juices authentication. **Food Control**, [s.l], v. 33, n. 1, p.136-141, set. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.02.020>.

FAZEKAS, Aron J. *et al.* Multiple Multilocus DNA Barcodes from the Plastid Genome Discriminate Plant Species Equally Well. **Plos One**, [s.l], v. 3, n. 7, p.2802, 30 jul. 2008. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0002802>.

FLORA DO BRASIL 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 07 Dez. 2016

GALETTI, *et al.* 2006. Seed Survival and Dispersal of an Endemic Atlantic Forest Palm: the Combined Effects of Defaunation and Forest Fragmentation. **Bot. Journ. Linn. Soc.** 151:141-149.

GANOPOULOS, Ioannis *et al.* Barcode High Resolution Melting (Bar-HRM) analysis for detection and quantification of PDO “Fava Santorinis” (*Lathyrus clymenum*) adulterants. **Food Chemistry**, [s.l], v. 133, n. 2, p.505-512, jul. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.01.015>

GUERREIRO, L. F. Palmito de Pupunha. 2002. Disponível em: <<https://www.desenbahia.ba.gov.br>>. Acesso em: 27 nov. 2016.

HEBERT, P. D. N. *et al.* Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings Of The Royal Society B: Biological Sciences, [s.l], v. 270, n. 1512, p.313-321, 7 fev. 2003. The Royal Society. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>.

HEID.A, C *et al.* Real time quantitative PCR. **Genome Research**, [s.l], v. 6, n. 10, p.986-994, 1 out.1996.Cold Spring Harbor Laboratory Press.<http://dx.doi.org/10.1101/gr.6.10.986>.

HOLLINGSWORTH, P. M, GRAHAM, S. W, LITTLE, D. P. 2011. Choosing and Using a Plant DNA Barcode. PLoS ONE 6(5): e19254. doi:10.1371/journal.pone.0019254

IBGE. **Produção da Extração vegetal e da Silvicultura**. 2005. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/74/pevs_2005_v20.pdf>. Acesso em: 26 nov. 2016.

IBGE. **Produção da Extração vegetal e da Silvicultura**. 2006. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/74/pevs_2006_v21.pdf>. Acesso em: 26 nov. 2016.

IBGE. **Produção da Extração vegetal e da Silvicultura**. 2007. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/74/pevs_2007_v22.pdf>. Acesso em: 26 nov. 2016.

IBGE. **Produção da Extração vegetal e da Silvicultura**. 2008. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/74/pevs_2008_v23.pdf>. Acesso em: 26 nov. 2016.

IBGE. **Produção da Extração vegetal e da Silvicultura**. 2009. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/74/pevs_2009_v24.pdf>. Acesso em: 26 nov. 2016.

IBGE. **Produção da Extração vegetal e da Silvicultura**. 2010. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/74/pevs_2010_v25.pdf>. Acesso em: 26 nov. 2016.

IBGE. **Produção da Extração vegetal e da Silvicultura**. 2011. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/74/pevs_2011_v26.pdf>. Acesso em: 26 nov. 2016.

IBGE. **Produção da Extração vegetal e da Silvicultura**. 2012. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/74/pevs_2012_v27.pdf>. Acesso em: 26 nov. 2016.

IBGE. **Produção da Extração vegetal e da Silvicultura**. 2013. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/74/pevs_2013_v28.pdf>. Acesso em: 26 nov. 2016.

IBGE. **Produção da Extração vegetal e da Silvicultura**. 2014. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/74/pevs_2014_v29.pdf>. Acesso em: 26 nov. 2016.

IBGE. **Produção da Extração vegetal e da Silvicultura**. 2015. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/74/pevs_2015_v30.pdf>. Acesso em: 26 nov. 2016.

JAAKOLA, Laura; SUOKAS, Marko; HÄGGMAN, Hely. Novel approaches based on DNA barcoding and high-resolution melting of amplicons for authenticity analyses of berry species. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 123, n. 2, p.494-500, nov. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.04.069>.

JOHNSON, D. (ed.) and the IUCN/SSC Palm Specialist Group. 1996. *Palms: Their Conservation and Sustained Utilization Status Survey and Conservation Action Plan*. Glans, Switzerl and Cambridge: IUCN, 116 + viii pp.

JUÇARA, Rede. **Legislação Ambiental e Sanitária**. 2015. Disponível em: <<http://www.redejucara.org.br/site/conteudo?pid=14&id;=>>>. Acesso em: 03 dez. 2016.

JUNG, Jin-kee *et al.* Discovery of single nucleotide polymorphism in Capsicum and SNP markers for cultivar identification. **Euphytica**, [s.l.], v. 175, n. 1, p.91-107, 30 maio 2010. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10681-010-0191-2>.

KUMAR, S; STECHER, G; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Mol Biol Evol**, [s.l.], v. 33, n. 7, p.1870-1874, 22 mar. 2016. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msw054>.

LEITMAN, P.*et al.* Arecaceae. In: MARTINELLI, G.; MORAES, M. A. **Livro Vermelho da Flora do Brasil**. 1 ed. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013. Parte II, p. 187-195.

LIEW, M. *et al.* Genotyping of Single-Nucleotide Polymorphisms by High-Resolution Melting of Small Amplicons. **Clinical Chemistry**, [s.l.], v. 50, n. 7, p.1156-1164, 29 abr. 2004. American Association for Clinical Chemistry (AACC). <http://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2004.032136>.

LÓPEZ-CALLEJA, Inés María *et al.* Development of real-time PCR assays to detect cashew (*Anacardium occidentale*) and macadamia (*Macadamia integrifolia*) residues in market analysis of processed food products. **Lwt - Food Science And Technology**, [s.l.], v. 62, n. 1, p.233-241, jun. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.01.023>.

LORENZI, H. *et al.* **Flora Brasileira: Arecaceae (Palmeiras)**. 1 ed. São Paulo: Instituto Plantarum, 2010. 368p.

MADESIS, Panagiotis *et al.* The application of Bar-HRM (Barcode DNA-High Resolution Melting) analysis for authenticity testing and quantitative detection of bean crops (Leguminosae) without prior DNA purification. **Food Control**, [s.l.], v. 25, n. 2, p.576-582, jun. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.11.034>.

MITTERMEIER, Russell A. *et al.* Global Biodiversity Conservation: The Critical Role of Hotspots. **Biodiversity Hotspots**, [s.l.], p.3-22, 2011. Springer Science + Business Media. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-20992-5_1.

OLIVEIRA, Erika. **Reação em cadeia de polimerase quantitativa para determinação da expressão gênica da neurotoxina de *Clostridium botulinum* tipo A em palmito**. 2008. 37 f. Tese (Doutorado) - Curso de Microbiologia Agropecuária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

OSATHANUNKUL, M. *et al.* Identification of *Uvaria* sp by barcoding coupled with high-resolution melting analysis (Bar-HRM). **Genetics And Molecular Research**, [s.l.], v. 15, n. 1, p.1-3, 2016. Genetics and Molecular Research. <http://dx.doi.org/10.4238/gmr.15017405>.

OSATHANUNKUL, *et al.* Bar-HRM for Authentication of Plant-Based Medicines: Evaluation of Three Medicinal Products Derived from Acanthaceae Species. **Plos One**, [s.l.], v. 10, n. 5, p.0128476, 26 maio 2015. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0128476>.

PAPPALARDO, Anna M.; FERRITO, Venera. DNA barcoding species identification unveils mislabeling of processed flatfish products in southern Italy markets. **Fisheries Research**, [s.l.], v. 164, p.153-158, abr. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fishres.2014.11.004>.

PENNISI, E. 2007. Taxonomy. Wanted: a barcode for plants. *Science* 318: 190–191.

PEREIRA, Leonor *et al.* High Resolution Melting (HRM) applied to wine authenticity. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 216, p.80-86, fev. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.185>.

PEREIRA, Roberta Andressa; QUADROS, Karin Esemann. *Euterpe edulis* Mart. e *E. oleracea* Mart. (Arecaceae): identificação pela análise de palmitos em conserva. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, p.333-335, jul. 2007.

REIS, M. S., FANTINI, A. C. *et al.* 2000. Management and Conservation of Natural Populations in Atlantic Rain Forest: The Case Study of Palm Heart (*Euterpe edulis* Martius). *Biotropica*, 32: 894–902. doi: 10.1111/j.1744-7429.2000.tb00627.x.

REIS, M. S.; CONTE, R. *et al.* Extrativismo e manejo de populações naturais do palmito (*Euterpe edulis* Martius) na Mata Atlântica. In: SIMÕES, L. L.; LINO, C. F. **Sustentável Mata Atlântica: A exploração de seus recursos florestais**. 2ed. São Paulo: Senac, 2003. p. 103-116.

RESENDE, Joseane Maria *et al* (Ed.). **Palmito de Pupunha in natura e em conserva**. Brasília: Embrapa, 2009. 109 p. (ISBN 978-85-7383-444-4).

RIBEIRO, Cassiano Castro; JORGE, Lúcia Helena de Araújo. **Beneficiamento de produtos da pupunha para exportação**. Amazonas: Senai, 2013. 27 p. Disponível em: <<http://www.respostatecnica.org.br/dossie-tecnico/downloadsDT/Mjc2NjY=>>. Acesso em: 06 dez. 2016.

RIRIE KM, RASMUSSEN RP, WITWER CT (1997) Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry*, 7, 154–60.

RODRIGUES, Aníbal dos Santos; DURIGAN, Maria Eliane. **O agronegócio do palmito no Brasil**. Paraná: Iapar, 2007. 130 p. (0100-3356).

ROLLAND, Mathieu *et al.* Molecular Identification of Broomrape Species from a Single Seed by High Resolution Melting Analysis. **Frontiers In Plant Science**, [s.l.], v. 7, p.5-8, 12 dez. 2016. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2016.01838>.

RUGMAN-JONES, Paul F.; STOUTHAMER, Richard. High-resolution melt analysis without DNA extraction affords rapid genotype resolution and species identification. **Molecular Ecology Resources**, [s.l.], p.1-26, out. 2016. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/1755-0998.12599>.

SAMPAIO, L. C. *et al.* Análise técnica e econômica da produção de palmito de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth.) e de palmeira-real (*Archontophoenix alexandrae* Wendl. & Drude). *Revista Floresta e Ambiente*. v. 14, n. 1, 2007.

SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE. Fundação Florestal. **Alternativas para manejo sustentável da Palmeira Juçara**. São Paulo, 2007. 12p.

SIMKO, Ivan. High-Resolution DNA Melting Analysis in Plant Research. **Trends In Plant Science**, [s.l.], v. 21, n. 6, p.528-537, jun. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2016.01.004>.

SIMÕES, Luciana Lopes; LINO, Clayton Ferreira. **Sustentável Mata Atlântica: A exploração de seus Recursos Florestais**. 2. ed. São Paulo: Senac, 2003. 194 p. (85-7359-244-3).

SNIF (Sistema Nacional de Informações Florestais) [2016a] **Produção Florestal**. Disponível em: <<http://www.florestal.gov.br/snif/producao-florestal/producao>>. Acesso em: 17 de nov. 2016.

SOARES L.A.S.S.*et al.* 2015. Implications of Habitat Loss on Seed Predation and Early Recruitment of a Keystone Palm in Anthropogenic Landscapes in the Brazilian Atlantic Rainforest. *PLoS ONE* 10(7): e0133540. doi:10.1371/journal.pone.0133540.

STEFFLER, C.E.*et al.* 2008. Seed Predation of *Attalea dubia* (Arecaceae) in an Island in the Atlantic Rainforest of Brazil. *Palms* 52:133-140.

UNTERGASSER A, *et al.* 2012. Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* 40(15):e115.

VANGUILDER, Heather *et al.* Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques*, [s.l.], v. 44, n. 4, p.619-626, abr. 2008. Informa UK (Informa Life Sciences). <http://dx.doi.org/10.2144/000112776>.

VENTER, J. C. *et al.* The Sequence of the Human Genome. *Science*, [s.l.], v. 291, n. 5507, p.1304-1351, 16 fev. 2001. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1058040>.

VIEIRA, Anderson Rodrigues Araujo. **Desenvolvimento e padronização de métodos para detecção de *Trypanosoma cruzi* em polpa de açaí (*Euterpe oleracea*)**. 2015. 70 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências e Tecnologias em Saúde, Universidade de Brasília, Ceilândia, 2015.

WITTWER, C. T. *et al.* High-Resolution Genotyping by Amplicon Melting Analysis Using LCGreen. *Clinical Chemistry*, [s.l.], v. 49, n. 6, p.853-860, 1 jun. 2003. American Association for Clinical Chemistry (AACC). <http://dx.doi.org/10.1373/49.6.853>.

XANTHOPOULOU, Aliko *et al.* Multiplex HRM analysis as a tool for rapid molecular authentication of nine herbal teas. *Food Control*, [s.l.], v. 60, p.113-116, fev. 2016. Elsevier BV.

Material suplementar

```

#E10  ATGATTTAAT ACTTTGCTAA ATTCATGATT TATTCGATAA ATCAAAAATTC GAAAAATTGA TAAGACCAGA TAAGTCTTAC 80
#E11  .....T.....
#012  .....-...C.....-.....
#019  .....C.....
#G24  .....C.....A.....
#G18  .....C.....A.....
          *                *

#E10  ATTATGAACC CTCGATTCAA AAATAGAAAT TTTTGTATAT TGAATAACCG CGGCGATGAA TTTTGATCAA CTTATTTCTT 160
#E11  .....
#012  .....C...C.....
#019  .....C...C.....
#G24  .....C...C.....A.....
#G18  .....C...C.....A.....
          *      *                *

#E10  CGTTCGACC TTACAGTGAG CAAAGACTTT ATT-----AG GTTGCCTACA ATACCTAATT ATTCATATGA CAAGAAATTT 240
#E11  .....-----
#012  .....-----
#019  .....-----
#G24  .....TTATT...T.....
#G18  .....TTATT...

#E10  TTGATAACGA AGGAATCAAA ATCTTATTCC AAAGAAATTC GTGAAAATGA CTTTCTTTTC AAAAAACACT TCATTTTTTT 320
#E11  .....T.....A.....
#012  .....
#019  .....
#G24  .....
#G18  .....

#E10  TGGGGGTGTC ATGTCAAAAC AAAATAGTGT ATGTGGTAAA GTAAAAAATA AGTAACCTAT TCCCTTTCAA AAAAAA-- 398
#E11  .....-
#012  -.....TTC.....A
#019  -.....-
#G24  -.....-
#G18  -.....CA.....-

```

Figura S1. Alinhamento do loco *psbK-I* após sequenciamento de dois espécimes para cada uma das três espécies de palmitos *E.edulis* (E), *E.oleracea* (O) e *B.gasipaes* (B) mostrando os cinco *SNPs* parsimoniosos (asterisco). Os pontos se referem a nucleotídeos iguais à sequência referência (E10) e os traços indicam os *gaps*.

```

#E10 TATTAACCC AAAACTCCC GCGGATGGCC AGTGACCCAA GGAAAGGAAA GAATCGGTTT CATTTTTCAT ATGCTCTCCT 80
#E11 .....
#012 .....G.....
#019 .....G.....
#G24 .....G.....
#G18 .....
      *

#E10 CTTATAGATA GGACTAACAA AGAACAGAGT TCTTTTGTGA TCACTTCGTC GTCCTTTTT TGATCGATTT CTTTTTATTA 160
#E11 .....
#012 .....
#019 .....
#G24 .....
#G18 .....

#E10 TATAAATTTT ATTTCCATTT TTTTT--A ATGGGAGTAG ATTAAATCTA GTAATTTAAT TTGATAATTT TAAATTTCT 240
#E11 .....----
#012 .....T--
#019 .....T--
#G24 .....T--T
#G18 .....TTTT .G. .A. . . .A. .G.
      *

#E10 TACTTGAAGT TTCCAATCCA ATAAAAACT TATTAGGTTA AGTCTGGGT CTCATGTCAA TTGTGAAATA TCTCGTTTGT 320
#E11 .....
#012 .....
#019 .....
#G24 .....
#G18 ..... .A. .A. . . .G. .C. .G. .G.

#E10 TGAAACGATT CCTAAAAAAA GTAAAAAAA GGTTCCTATT GTACTAAGCT AAGGACGCGA AGGAAGAAAA CGAGCGGATC 400
#E11 .....
#012 .....C.....
#019 .....C.....
#G24 .....C.....A.....
#G18 .....A. .A. .C. . . .A. . . .A. .G.
      *

#E10 CAGTAATTAC TCATCCTCAA AACAACTCCTT CCTTCTCGG GGTATTGTCT CATCAACAAA TAAATAATTG TAGGAGTAAA 480
#E11 .....
#012 .....
#019 .....
#G24 .....T. .G. .C. . . .C. .---
#G18 .....C. .T. .G. .C. .G. .C. .---. A.
      * * *

#E10 GCGTTGATAT AATTAGAAGA AGCAAAACAGC AATTCTGAGT TAATAAAATA AGAAAAAAGT ATAGCGAGTT AAAAAAATA 560
#E11 .....
#012 .....
#019 .....
#G24 .....A.....
#G18 .....A. .A. .A. . . .T. . . .A. .T.
      *

#E10 GAAAAAA 567
#E11 .....
#012 .....
#019 .....
#G24 .....
#G18 A.....

```

Figura S2. Alinhamento do loco *atpF-H* após sequenciamento de dois espécimes para cada uma das três espécies de palmitos *E.edulis* (E), *E.oleracea* (O) e *B.gasipaes* (B) mostrando os nove SNPs parsimoniosos (asterisco). Os pontos se referem a nucleotídeos iguais à sequencia referência (E10) e os traços indicam os gaps.

```

#E10 CCAAAGATAC TGATATCTTG GCAGCATTCC GAGTAACTCC TCAACCCGGA GTTCCGCCTG AGGAAGCAGG GGCAGCGGTA 80
#E11 .....
#012 .....
#019 .....
#G24 .....
#G18 .....

#E10 GCTGCCGAAT CTTCTACTGG TACATGGACA ACTGTGTGGA CTGATGGACT TACCAGTCTT GATCGTTACA AAGGACGATG 160
#E11 .....
#012 .....C.....
#019 .....C.....
#G24 .....
#G18 .....
*

#E10 CTACCACATC GAAACCGTTG TCGGGGAGGA AAATCAATAT ATTGCATTATG TAGCTTATCC TTTAGACCTT TTTGAAGAAG 240
#E11 .....
#012 .....
#019 .....
#G24 .....
#G18 .....

#E10 GTTCTGTTAC TAACATGTTT ACTTCCATTG TGGGTAATGT ATTTGGTTTC AAAGCCCTAC GAGCTCTACG TCTGGAGGAT 320
#E11 .....
#012 .....
#019 .....
#G24 .....
#G18 .....

#E10 CTGCGAATTC CCACTTCTTA TTCCAAAAC T TCCAAGGCC CGCCTCATGG TATCCAAGTT GAAAGAGATA AGTTGAACAA 400
#E11 .....
#012 .....
#019 .....
#G24 .....C..A.....
#G18 .....C..A.....
* *

#E10 GTATGGTCGT CCTCTATTGG GATGTA CTAT TAAACCAAAA TTGGGATTAT CCGCAAAGAA CTACGGTAGA G 471
#E11 .....
#012 .....
#019 .....
#G24 .....
#G18 .....

```

Figura S3. Alinhamento do loco *rbcL* após sequenciamento de dois espécimes para cada uma das três espécies de palmitos *E.edulis* (E), *E.oleracea* (O) e *B.gasipaes* (B) mostrando os três SNPs parsimoniosos (asterisco). Os pontos se referem a nucleotídeos iguais à sequência referência (E10).

Tabela S1. Procedência das amostras de folhas de *E. edulis*, *E. oleracea* e *B. gasipaes* sequenciadas em três locos do cpDNA: *atpF-H*, *psbK-I* e *rbcLa*.

| Espécie Putativa | Código da amostra | Local | Georeferenciamento |
|-------------------------|-------------------|---|------------------------------|
| <i>Euterpe edulis</i> | E01 | PARNASO-RJ | 22°26'54.25"S/42°59'01.28" O |
| | E02 ¹ | PARNASO-RJ | 22°26'54.25"S/42°59'01.28" O |
| | E04 | Parque das Aves-PR | 25°36'49.13"S/54°28'56.32" O |
| | E06 | Parque das Aves-PR | 25°36'49.13"S/54°28'56.32" O |
| | E10 | PARNA Itatiaia-RJ | 22°22'11.23"S/44°37'42.57" O |
| | E11 | Santa Catarina-SC | 27°13'41.40"S/50°12'51.49"O |
| | E16 | PARNA Tijuca-RJ | 22°57'26.22"S/43°16'52.19" O |
| | E29 | Fazenda de águas Claras de Maratuã-RJ | 22°39'24.61"S/42°23'46.23" O |
| | E30* | Parque Arqueológico e Ambiental de São João Marcos-RJ | 22°47'59.12"S/44°01'48.85" O |
| | E32 | Jardim Botânico-RJ | 22°58'02.34"S/43°13'30.22" O |
| <i>Euterpe oleracea</i> | O01 | Praia Seca, Saquarema-RJ | 22°56'07.69"S/42°23'34.81" O |
| | O03 | Viveiro, Viçosa-CE | 3°34'01.10"/41°05'31.23" O |
| | O04 | Ilha de Cotejuba-PA | 1°13'00.49"S/48°31'57.91" O |
| | O10 | Sítio do Zico, Santo Aleixo, Magé-RJ | 22°33'21.47"S/43°02'56.76" O |
| | O11 | Fazenda de águas Claras de Maratuã-RJ | 22°39'24.61"S/42°23'46.23" O |
| | O12 | Sítio Burle Marx-RJ | 23°01'20.15"S/43°32'46.41" O |
| | O13 ² | Horto Vargem Garden-RJ | 22°58'28.85"S/43°29'09.55" O |
| | O14 | Chácara Santa Clara-RJ | 22°59'01.74"S/43°27'32.14" O |
| | O18 | Arditi plantas, vargem pequena-RJ | 22°58'58.22"S/43°27'36.99" O |
| | O19 | Chácara do Odilon, Vargem Grande-RJ | 22°57'32.76"S/43°28'18.93" O |
| <i>Bactris gasipaes</i> | G02 | Viveiro de Ibitinga-SP | 21°45'22.68"S/48°50'0029" O |
| | G03 | Viveiro de Ibitinga-SP | 21°45'22.68"S/48°50'0029" O |
| | G07 | Caçapava, Vale do Paraíba-SP | 23°05'59.78"S/45°42'29.10" O |
| | G09 | Sítio do Zico, Santo Aleixo, Magé-RJ | 22°33'21.47"S/43°02'56.76" O |
| | G13 | Viveiro de Ibitinga-SP | 21°45'22.68"S/48°50'0029" O |
| | G18 | Caçapava, Vale do Paraíba-SP | 23°05'59.78"S/45°42'29.10" O |
| | G19 | Massaranduba-SC | 26°36'43.10"S/49°00'26.63" O |
| | G20 | Fazenda de águas Claras de Maratuã-RJ | 22°39'24.61"S/42°23'46.23" O |
| | G24 | Chácara Santa Clara-RJ | 22°59'01.74"S/43°27'32.14" O |

Legenda: ¹ Amostra não amplificada nos locos *psbK-I* e *rbcL*; ² Amostra não amplificada nos locos *atpF-H* e *rbcL*; *Amostra sequenciada a partir de DNA de palmito *in natura*.

3. Conclusões gerais

- O loco *psbK-I* apresentou variações discriminatórias entre as espécies de palmeiras analisadas e por isso foi escolhido dentre os oito marcadores moleculares testados para as análises de HRM;
- O amplicon com 98 pb e três *SNPs* empregado nas análises de HRM se mostrou apropriado, permitindo a identificação das amostras analisadas;
- A análise de *HRM* se mostrou eficiente para a identificação das amostras de folhas e de palmito *in natura* das espécies *E. edulis*, *E. oleracea* e *B. gasipaes*;
- A análise de *HRM* de amostras de palmito em conserva apresentou menor sucesso quando comparada às análises realizadas a partir de amostras de folhas e de palmito *in natura*. Esta dificuldade provavelmente está relacionada à baixa integridade do DNA nas amostras de palmito em conserva;
- A metodologia desenvolvida neste trabalho para identificar estas espécies de palmeiras e seus palmitos, com elevada importância socioeconômica, se mostrou eficaz e fundamental para colaborar com a conservação das mesmas e também na segurança da origem do produto que chega ao consumidor.