

APLICACIÓN DEL ADN *BARCODING* PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES ANIMALES EN LOS ALIMENTOS: REVISIÓN SISTEMÁTICA

Application of DNA *barcoding* for the identification of animal species in food: systematic review

Parra Ruiz P., Rubio Lozano, R.M., Ortiz Cervantes, A.S.

Departamento de Zoología y Antropología Física. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia.

Autor para correspondencia: A.S. Ortiz, aortiz@um.es

Tipo de artículo: Trabajo Fin de Grado (Veterinaria)

Recibido: 10/09/2025

Aceptado: 24/09/2025

RESUMEN

El etiquetado de los alimentos permite a los ciudadanos obtener información completa sobre el contenido y la composición de los productos alimenticios. La sustitución de alimentos por otros y su etiquetado incorrecto es uno de los fraudes más comunes a nivel mundial causando problemas de salud como alergias e intoxicaciones y pérdidas económicas. Una técnica de identificación de especies para la detección de fraude alimentario es el ADN *barcoding* del gen citocromo-oxidasa I. Este gen mitocondrial está presente en todas las especies y presenta una composición única en cada una, permitiéndonos diferenciar las especies animales. Las etapas de esta técnica son la extracción y amplificación del gen citocromo-oxidasa I procedente de una muestra de pescado o carne seguido de su secuenciación. Estas secuencias conforman el código de barras genético que es comparado con los códigos almacenados en las bibliotecas de GenBank y BOLD permitiendo calcular el porcentaje de similitud entre las secuencias. GenBank y BOLD son plataformas públicas digitales que recopilan y analizan todas las secuencias realizadas de todos los organismos a nivel mundial. El ADN *barcoding* del gen COI es una técnica eficaz para la detección de fraude alimentario, pero puede presentar limitaciones durante las etapas de laboratorio. En los productos que incluyen una mezcla de diferentes especies se detecta principalmente la especie que se encuentra en mayor proporción. El procesamiento de las muestras puede complicar el proceso debido a la desnaturalización del ADN. La técnica permite la identificación de especies crípticas, pero

no de subespecies. Ciertas especies no se pueden identificar por presentar problemas en su taxonomía o por ser especies cuyas secuencias no han sido incorporadas a las bases de datos de GenBank o BOLD. La identificación de las especies se puede complementar secuenciando otros genes o secuencias cortas del gen citocromo-oxidasa I (minicódigos o *minibarcoding*).

Palabras clave: Fraude alimentario, código de barras genético, identificación de especies, citocromo-oxidasa I

ABSTRACT

Food labeling allows citizens to obtain complete information about the content and composition of food products. The substitution of foods for others and their incorrect labeling is one of the most common types of fraud worldwide, causing health problems such as allergies and poisoning, as well as economic losses. One species identification technique for detecting food fraud is DNA *barcoding* of the cytochrome oxidase I gene. This mitochondrial gene is present in all species and has a unique composition in each one, allowing us to differentiate between animal species. The stages of this technique are the extraction and amplification of the cytochrome oxidase I gene from a fish or meat sample, followed by its sequencing. These sequences make up the genetic *barcode*, which is compared with the codes stored in the GenBank and BOLD libraries, allowing the percentage of similarity between the sequences to be calculated. GenBank and BOLD are public digital platforms that collect and analyze all sequences from all organisms worldwide. DNA *barcoding* of the COI gene is an effective technique for detecting food fraud, but it can have limitations during the laboratory stages. In products that include a mixture of different species, the species found in the highest proportion is mainly detected. Sample processing can complicate the process due to DNA denaturation. The technique allows the identification of cryptic species, but not subspecies. Some species cannot be identified due to problems with their taxonomy or because their sequences have not been incorporated into the GenBank or BOLD databases. Species identification can be supplemented by sequencing other genes or short sequences of the cytochrome oxidase I gene (*minibarcoding*).

Keywords: Food fraud, DNA *barcoding*, species identification, cytochrome-oxidase I.

INTRODUCCIÓN

El gen de la enzima citocromo-oxidasa I es una unidad de información en un locus de ácido desoxirribonucleico (ADN) que codifica un producto génico, almacena información genética y permite transmitirla a la descendencia. Este gen está presente en las mitocondrias (orgánulo celular que participa en la producción de ATP) y fue seleccionado para la identificación de especies porque es uno de los responsables de la cadena respiratoria celular y, por lo tanto, está presente en todos los seres vivos (Lafuente, 2024).

La obtención del código de barras de ADN de un animal, en adelante ADN *barcoding*, es el resultado de aplicar diferentes técnicas de extracción, amplificación, secuenciación, identificación y diagnóstico genético. La re-

gión genética conocida como ADN *barcoding* se compone de una pequeña parte del gen que codifica la enzima citocromo oxidasa I, un fragmento de ADN de menos de 1.000 pares de bases (bp) de las 16.000 bp que componen en total el material genético mitocondrial. Para secuenciar a nivel molecular ese fragmento de 1.000 bp se utiliza un marcador de ADN corto y estandarizado, llamado cebador. Cuando se secuencia el fragmento génico de la especie con estos cebadores se obtiene el ADN *barcoding* que pueden utilizarse para la identificación de esa especie y luego compararlo con los depositados en las bases de datos genéticas para comprobar si coinciden con la especie esperada (Montenegro, 2018).

La razón de que el ADN de un orgánulo de aproximadamente 0,5 y 1 μm para esta técnica

es mejor en comparación con el ADN nuclear se debe a varios factores. El primero es porque el ADN mitocondrial presenta replicación semi-conservativa, es decir, en cada replicación una molécula de ADN recién sintetizada conserva una de las cadenas originales y la otra es complementaria. En segundo lugar, el ADN mitocondrial presenta ausencia de histonas (proteínas básicas que se unen al ADN en la cromatina de las células eucariotas) e intrones (secuencias no codificantes de ADN que forman parte de un gen pero que no se traducen a proteínas) en el caso de mamíferos por lo que los genes no se repiten. En tercer lugar, los genes mitocondriales son generalmente haploides y presentan una frecuencia muy baja o incluso nula de recombinación. No presenta las regiones largas no codificantes al contrario que en el ADN nuclear y el orden de los genes es estable a lo largo de tiempos evolutivos pequeños. Además, las inserciones y deleciones son raras en los genes mitocondriales que codifican para proteínas, siendo estos últimos más fáciles de alinear. Lo más importante es que tiene una tasa evolutiva más alta que otras secuencias de ADN lo que permite una distinción precisa a nivel de especie a diferencia de los genes nucleares (Montenegro, 2018).

Dentro del material genético mitocondrial, hay trece genes mitocondriales que codifican proteínas. Se propuso el gen que codifica la enzima citocromo oxidasa I (COI) como ADN *barcode* para animales por dos razones. Por un lado, la disponibilidad de cebadores universales que hacen posible la amplificación del gen COI en un amplio espectro de filos. Por otro, el porcentaje de sustitución nucleotídica en este gen es suficientemente alto como para distinguir entre especies estrechamente relacionadas en todos los grupos de animales (Sánchez Barrado, 2015).

Actualmente, el gen COI es reconocido por el CBOL (*The Consortium for the Barcode of Life Project*) como el marcador genético para animales. El objetivo es recopilar *barcodes* de

todas las especies del planeta y registrarlas en una base de datos con la que posteriormente podríamos identificar a cualquier especie animal extrayendo su ADN y comparándolo con la información recogida en estas bases (Sánchez Barrado, 2015).

A pesar de que la metodología de este trabajo se realizó mediante una revisión bibliográfica, es importante conocer y entender el procedimiento para la obtención del ADN *barcoding* (Figura 1):

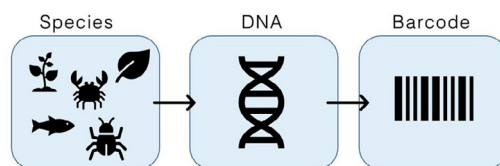


Figura 1. Secuencia del proceso para la obtención de la secuencia de identificación de la especie (Imagen de Larissa Fruehe, CC BY-SA 4.0, vía Wikimedia Commons).

1. Obtención de tejido del animal objeto de investigación donde haya mitocondrias (principalmente muestras musculares).
2. Extracción del ADN mitocondrial. Esta extracción se puede realizar mediante diferentes métodos y protocolos como el de HotSHOT descrito por Truett et al. (2000) o el protocolo de Dellaporta et al. (1983) utilizado para la extracción de ADN de matrices alimentarias complejas. Un paso adicional es la eliminación de las proteínas en la muestra de trabajo que pueden interferir en este análisis de ADN. Este último paso mencionado consiste en añadir proteinasa K cloroformo (alcohol isoamílico) para una degradación efectiva de las proteínas.
3. Cuantificación y estimación de la pureza del ADN obtenido. Se debe determinar la concentración de ADN mediante el uso de un espectrofotómetro de microvolúmenes.

4. Amplificación del fragmento de ADN mediante *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Esta amplificación se realiza con un termociclador y consiste en la duplicación del fragmento de ADN del gen mitocondrial que codifica la subunidad I de la enzima citocromo oxidasa. Para ello es necesario el uso de cebadores que son secuencias cortas de ADN que se unen al ADN de la muestra para seleccionar y amplificar un fragmento muy concreto de ADN. Este paso emplea el uso de un cebador directo y universal para todas las especies y cebadores reversos especie-específicos. En el caso del ADN *barcoding* se utilizarán los cebadores específicos para amplificar la secuencia del gen citocromo oxidasa I (Lafuente, 2024). Este trozo de ADN amplificado recibe el nombre de amplicón.
 5. Evaluación del producto de la PCR. Esta etapa consiste en la visualización de los amplicones obtenidos mediante electroforesis en geles de agarosa para comprobar qué productos de PCR se han amplificado correctamente.
 6. Purificación de los productos obtenidos de la PCR. La purificación de los productos de la PCR se puede realizar usando kits de purificación comerciales. Esta purificación consiste en un proceso de eliminación de componentes no deseados de la reacción como enzimas, nucleótidos y cebadores para obtener un ADN de alta pureza. Este es un paso previo necesario para el éxito en el proceso de secuenciación.
 7. Secuenciación. Se seleccionan las muestras que han presentado fragmentos del gen COI en los ensayos de electroforesis y los que presentan un tamaño adecuado (menos de 1.000 pares de bases). Una vez seleccionadas, se secuencian para determinar el orden exacto de las cuatro bases que componen el ADN: adenina (A), citosina (C), guanina (G) y timina (T). Las muestras deben ser enviadas para secuenciar en servicios universitarios o empresas que prestan este servicio o utilizar secuenciadores de laboratorio. La secuencia de ADN está formada por dos cadenas complementarias por lo que es necesario secuenciar ambos fragmentos. El nombre que reciben estos dos fragmentos son fragmento forward (en la dirección 3'-5') y reverse (en dirección 5'-3'). La secuencia forward corresponde al cromatograma obtenido desde el principio del fragmento hasta el final, mientras que la reverse va del final al principio. Puesto que son complementarias, la información que no se puede leer en una de ellas, se puede completar a partir de la cadena complementaria.
 8. Tratamiento de datos. Tras realizar la secuenciación se obtienen archivos con cromatogramas donde podemos encontrar las secuencias de nucleótidos de nuestros fragmentos. Las secuencias de nucleótidos obtenidos se pueden editar con diferentes programas de acceso libre y gratuito como SnapGene Viewer (www.snapgene.com), BioEdit (www.bioedit.software.informer.com), etc.
- Estos programas permiten ensamblar las secuencias, editarlas y obtener una secuencia consenso definitiva que será el ADN *barcode* donde cada base nitrogenada estará representada por una línea del código de barras. Las secuencias consenso se alinean mediante el sistema BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) y comparan con las existentes en las bases de datos del *Barcode of Life Database* (BOLD), una plataforma digital que gestiona y analiza códigos de barras, y en GenBank, otra plataforma digital que tiene almacenadas todas las secuencias génicas existentes. De esta forma se pueden conseguir la identificación de la especie

a partir de las secuencias de nucleótidos del gen COI obtenidas de cada muestra y el porcentaje de similitud con las secuencias registradas en estas bases de datos genéticas, determinando así la especie de la que se trata o la más próxima taxonómicamente.

A lo largo de este trabajo, el término “secuenciación” se utiliza para referirse al proceso en el que se determina el orden exacto de las bases nitrogenadas en una molécula de ADN, mientras que el término “codificación” se referirá a la interpretación de la información genética contenida en la secuencia de bases (A, T, C, G) que formarán los códigos de barras.

La legislación de la Unión Europea no ofrece una definición de “fraude” en la cadena agroalimentaria. Sin embargo, el Reglamento (UE) 2019/1715 de la Comisión lo define como “un incumplimiento relativo a cualquier presunta acción intencionada por parte de empresas o particulares, con el fin de engañar a los compradores y obtener una ventaja indebida”. El etiquetado permite a los ciudadanos

obtener información completa sobre el contenido y la composición de los productos alimenticios que adquieren. No obstante, existen diversos tipos de fraude alimentario que hacen peligrar la salud y confianza de los consumidores (Figura 2). Entre los diferentes tipos de fraude estaría la sustitución de un ingrediente por otro de menor valor incluyendo adición de compuestos desconocidos o no autorizados para mejorar la calidad de ese producto. Este tipo de fraudes puede llevar a la ocultación, etiquetado incorrecto e imitación fraudulenta en el que se intenta esconder el origen de los componentes del producto y, por lo tanto, presentar un producto aparentemente de buena calidad, pero con una naturaleza distinta de la etiquetada.

El objetivo de este trabajo es valorar mediante una revisión sistemática de literatura la utilidad de la técnica de ADN *barcoding* mediante secuenciación del gen citocromo oxidasa I en la identificación de especies y la detección de fraude alimentario.



Figura 2. Diferentes tipos de fraude alimentario. Adaptado de la web de Seguridad Alimentaria de la Comisión Europea (https://commission.europa.eu/topics/food-safety_es).

MATERIAL Y MÉTODOS

Este trabajo se ha realizado mediante la revisión bibliográfica sistemática de estudios redactados por otros autores sobre la técnica ADN *barcoding* del gen COI. Las revisiones sistemáticas son un proceso metódico de análisis y síntesis de la literatura existente sobre un tema específico que permite identificar, evaluar y presentar de forma crítica los conocimientos ya publicados, con el fin de comprender mejor el contexto de una investigación (Urrútia y Bonfill, 2010).

La presente revisión se ha realizado siguiendo las recomendaciones del método PRISMA (*Preferred Reporting Items for Systematic reviews and MetaAnalyses*) propuesta para la correcta realización de revisiones sistemáticas (Page et al., 2021).

PRISMA es una herramienta para identificar, seleccionar, evaluar y sintetizar estudios, proporcionando una síntesis del estado del conocimiento en un área determinada. De esta forma, se indica el proceso de identificación y

selección de información apta para llevar a cabo la investigación del tema elegido, describiendo los métodos, fuentes utilizadas, y resultados obtenidos (Page et al., 2021).

Toda esta información se puede presentar en un diagrama de flujo que incluiría las citas que se han empleado para las búsquedas en cada una de las diferentes bases de datos, número total de registros una vez eliminados los estudios duplicados o fuera de contexto y termina con los estudios individuales incluidos en la síntesis cualitativa y cuantitativa.

En este trabajo, de acuerdo con la metodología PRISMA, se utilizaron tres fuentes principales para buscar estudios sobre ADN *barcoding* para la detección de fraude alimentario: ScienceDirect, Pubmed y Google Academic.

Al usar las fuentes de datos ScienceDirect y Pubmed se utilizaron las palabras clave, “DNA *barcoding*”, “food control”, “fish”, “pork meat” y “beef meat” para la búsqueda de artículos relacionados con fraude alimentario.

El diagrama de flujo siguió este orden (Figura 3):

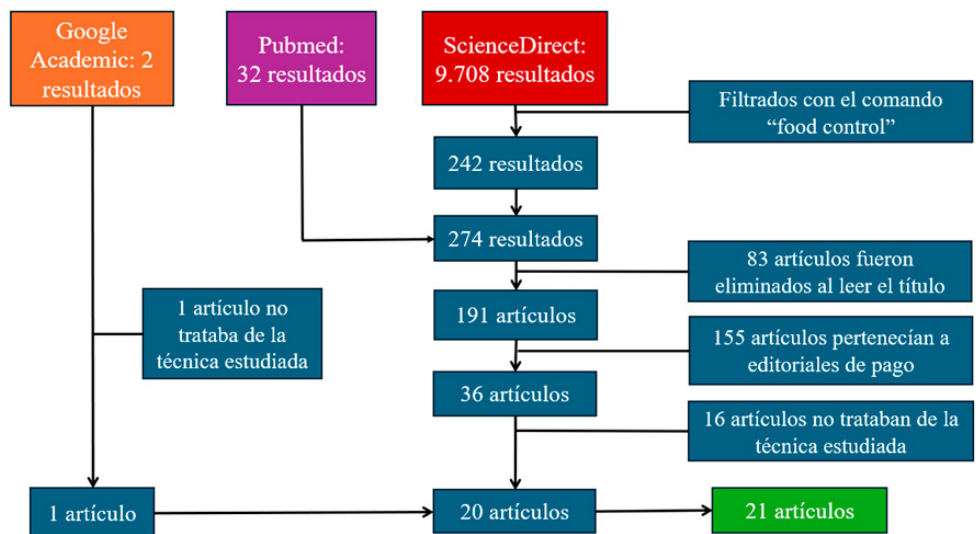


Figura 3. Diagrama de flujo PRISMA representante de las fuentes de datos utilizadas y número de artículos eliminados y seleccionados.

- Al utilizar estas palabras clave se obtuvieron 9.708 resultados en ScienceDirect y 32 en Pubmed.
- En la base de datos ScienceDirect se filtraron esos 9.708 resultados para determinar cuales estaban relacionados con la detección de fraude alimentario gracias a las palabras clave “*food control*”. Al seleccionar esta opción se obtuvieron 242 artículos, por lo que 9.466 fueron suprimidos para su uso en este trabajo. Mientras tanto, los artículos encontrados en Pubmed seguían siendo un total de 32 al no tener la opción de selección de “*food control*”. Por lo tanto, teníamos un total de 274 artículos de ScienceDirect y Pubmed.
- Tras leer el título de estos artículos, 83 artículos fueron eliminados pues no trataban de la técnica investigada o sobre la detección de fraude. El número de artículos descendió a 191.
- De los 191 artículos restantes se excluyeron 155 artículos al pertenecer a editoriales de pago que no permitían su lectura completa, dejándonos un número de 36 artículos aptos para realizar la investigación.
- De estos 36 artículos, 16 fueron eliminados, pues al comenzar a leerlos no trataban de la técnica estudiada, por lo tanto, el número de artículos descendió a 20 artículos.
- Se buscaron más artículos en Google Academic con las citas “ADN *barcoding*”, “fraude carne” y “fraude pescado” y se encontraron 2 artículos con un título compatible con el tema a tratar, pero 1 de ellos no trataba de este tema en su desarrollo.
- Finalmente, se obtuvieron 21 artículos que hablaban sobre la detección de fraude alimentario mediante ADN *barcoding*.

Para la presente revisión bibliográfica se han establecido una serie de criterios de inclu-

sión y exclusión destinados a la selección de los artículos para el trabajo (Tabla 1).

Tabla 1. Criterios de inclusión y exclusión para la selección de artículos mediante el método PRISMA (Page et al., 2021).

Criterios de inclusión	Artículos de carácter científico
	Estudios relacionados con fraude alimentario
	Fraude alimentario en cualquier especie
	Acceso gratuito
Criterios de exclusión	Artículos incompletos
	Artículos pertenecientes a una editorial de pago
	Estudios enfocados a la identificación de especies en medios naturales
	Estudios cuya investigación utilizaba otras técnicas de identificación de especies

Adicionalmente, se realizó una búsqueda discrecional y se encontraron varias noticias generales en medios de comunicación (e.g., El País, ABC, El Mundo) sobre supuestos fraudes en productos como albóndigas de la marca internacional Ikea, lasañas de la marca Nestlé, hamburguesas vegetales o cocinadas por franquicias de restaurantes de comida rápida estadounidense como McDonald’s, pero estos no estaban contrastados o relacionados con estudios científicos o técnicos.

RESULTADOS

Las ventajas e inconvenientes del uso del *barcoding* del gen COI para detectar fraude en los alimentos se ha revisado en un total de 21 artículos obtenidos a partir del método PRISMA.

Los resultados de esta revisión indicaron que había dos opiniones centrales sobre la eficiencia de esta técnica. Por un lado, se determinó que la técnica es útil para la identificación de especies en la detección de fraude alimentario (Pappalardo et al., 2021; Carreiro et al., 2022; Zhang et al., 2023b; Valiente-Díaz et al., 2024; Willette et al., 2024).

Sin embargo, los autores restantes concluyeron que esta técnica es útil para la detección de fraude alimentario, pero tiene limitaciones a la

hora de obtener resultados con ciertos productos y especies (Quinto et al., 2015; Hellberg et al., 2017; Naaum et al., 2017; Paracchini et al., 2017; Paracchini et al., 2019; Blanco-Fernandez et al., 2021; Kappel et al., 2021; Scales et al., 2021; Currò et al., 2023; Goymer et al., 2023; Ortiz-Moriano et al., 2023; Zhang et al., 2023a; Zuccolo et al., 2023; Saravia-Sánchez et al., 2024; y Shum et al., 2024; Zhang et al., 2024).

Las peculiaridades de cada artículo están resumidas en la Tabla 2.

Tabla 2. Peculiaridades de cada artículo

AUTOR	MUESTRA	METODOLOGÍA
Blanco-Fernandez et al. (2021)	Atún, bacaladilla, anchoa y merluza.	- La extracción y la amplificación de ADN no fue exitosa en todas las muestras. - Dificultad para distinguir diferentes especies pertenecientes al género <i>Thunnus</i>.
Carreiro et al. (2022)	Atún patudo, aleta amarilla y listado	Algunas de las secuencias generadas no tenían la calidad suficiente para ser codificadas.
Currò et al. (2023)	<i>“Seppia Bianca di Chioggia”</i> . Producto italiano en el que las sepias son sometidas a un baño con agua de laguna tratada, y a una insuflación con aire.	- Se identificó la presencia (<i>Sepia officinalis</i>). - Se secuenciaron todas las muestras con éxito. - No se pudo determinar si las sepias habían sido sometidas a este tratamiento. - La realización in situ de esta técnica no es posible.
Goymer et al. (2023)	Anguilas y congrio	- Secuenciación adicional gen de mini-códigos de barras. - Se obtuvieron códigos de barras completos en la mayoría de las muestras. - GenBank falló.
Hellberg et al. (2017)	Fiambres procesados de carne y carne avícola (fiambres, salchichas, hamburguesas, carne molida, salchichas de Frankfurt, tocino, cecina, carnes enlatadas y alimentos para mascotas).	- Secuenciación adicional gen de mini-códigos de ADN. - La secuenciación no fue exitosa en todas las muestras. - No es posible la realización in situ de esta técnica. - No identifica diferentes especies en una misma muestra. - No detecta híbridos, subespecies ni especies de muestras enlatadas.

AUTOR	MUESTRA	METODOLOGÍA
Kappel et al. (2021)	Camarón tigre gigante y camarón patiblanco.	· Secuenciación adicional gen ADNr 16S. · La técnica conllevaba un proceso de larga duración. · Útil para determinar especies crípticas.
Naaum et al. (2017)	Embutidos de carne cruda etiquetados como productos de una sola especie (res, cerdo, pollo o pavo).	· La secuenciación fue exitosa en todas las muestras. · Solo se detectó la especie predominante presente en la muestra. · No se pudieron identificar ni cuantificar diferentes especies a la vez.
Ortiz-Moriano et al. (2023)	Camarones y langostinos	· Secuenciación adicional gen ADNr 16S. · La secuenciación no fue posible en algunas muestras.
Pappalardo et al. (2021)	Sushi	· La extracción de ADN no fue exitosa en todas las muestras. · La identificación de especies fue posible en todas las muestras. · No detecta la presencia de múltiples especies en una misma muestra.
Paracchini et al. (2017)	Peces planos (lenguado común, senegalés, limón, fletán, platija europea, rodaballo, rémol, salmón y pez cebra) y mezclas.	· No detecta más de una especie a la vez ni especies que han sido procesadas
Paracchini et al. (2019)	Bacalao nórdico, palitos de pescado y hamburguesas de abadejo congeladas. Bacalao seco y salado, merlán, abadejo, carbonero y surimi.	· Solo se detectó la especie predominante de la muestra. · No se identificaron las especies en muestras procesadas.
Quinto et al. (2015)	Productos de caza: Cocodrilo, alpaca, antílope, castor, oso negro, gato montés, búfalo, camello, coyote, alce, emú, canguro, león, rata almizclera, perdiz, faisán, mapache, ciervo, tortuga, jabalí, yak y lobo.	· La amplificación y secuenciación fue exitosa en todas las muestras. · No se identificó especies híbridas. · 13 muestras mostraron coincidencias con más de una especie. · No se identificaron tres especies.
Saravia-Sánchez et al. (2024)	Peces pico (pez espada, pez vela, marlín blanco, marlín rosado en filetes) conservados en hielo.	· No se pudieron secuenciar todas las muestras.
Scales et al. (2021)	Hamburguesas de carne molida cruda, cocidas, filetes crudos y perritos calientes de bison americano y vacuno.	· La amplificación y secuenciación fue exitosa en todas las muestras. · La identificación de una especie en una muestra fue errónea.

AUTOR	MUESTRA	METODOLOGÍA
Shum et al. (2024)	Teleósteos	· La calidad del ADN no fue homogénea. · No se pudo identificar las especies de peces <i>Sebastes</i> del Atlántico Norte.
Valiente-Diaz et al. (2024)	Salmónidos congelados, pescado fresco, sin cabeza y eviscerado.	· Se identificaron con éxito todas las especies en cada muestra.
Willette et al. (2024)	Sushi	· Se identificaron todas las especies en cada muestra.
Zhang et al. (2023a)	Surimi	· Secuenciación adicional gen cytb. · Amplificación y secuenciación no fue posible en todas las muestras. · Solo se detectó la especie principal presente en la muestra. · No se pudieron identificar las especies en muestras procesadas. · No fue posible la identificación de cefalópodos ni la cuantificación de cada especie.
Zhang et al. (2023b)	Productos de pescado fileteados a la parrilla y preenvasados.	· Secuenciación adicional gen cytb. · La amplificación no fue exitosa en todas las muestras.
Zhang et al. (2024)	Pargo, huevas de arenque y atún patudo.	· Secuenciación adicional gen cytb. · La secuenciación fue exitosa en todas las muestras. · No identificó subespecies, híbridos, ni especies en muestras procesadas.
Zuccolo et al. (2023)	Cazón	· Secuenciación adicional gen de mini-códigos de ADN. · No se consiguió el código de barras completo de COI en el 75% de las muestras. · La secuencia de <i>Carharodon carcharias</i> se identificó incorrectamente en GenBank.

DISCUSIÓN

La técnica de ADN *barcoding* se ha mostrado como una técnica eficaz en la identificación de especies cuyas muestras se han obtenido directamente de los organismos. Sin

embargo, cuando estas especies son procesadas para su conservación o manipuladas para ser utilizadas en alimentación, el éxito de conseguir su identificación puede variar y esta revisión bibliográfica ha permitido destacar cuales son los problemas de la metodo-

logía del ADN *barcoding* en la identificación de fraude alimentario.

Extracción, amplificación, secuenciación e identificación

El primer paso para obtener una secuencia de ADN es la extracción de material genético de las muestras. En este sentido Blanco-Fernandez et al. (2021) y Pappalardo et al. (2021) refirieron problemas en el proceso de extracción de ADN en algunas muestras mientras que Shum et al. (2024) comprobaron que la calidad del ADN variaba una vez extraído.

El segundo paso de esta técnica es la amplificación del material genético. Blanco-Fernandez et al. (2021), Zhang et al. (2023a) y Zhang et al. (2023b) no consiguieron amplificar el gen COI en todas las muestras de forma correcta.

Hellberg (2017), Carreiro et al. (2022), Ortiz-Moriano et al. (2023), Zhang et al. (2023a), Zuccolo et al. (2023) y Saravia-Sánchez et al. (2024) tuvieron dificultades en completar sus investigaciones durante el proceso de la secuenciación ya que no obtuvieron el número suficiente de pares de bases para conseguir los *barcodes* completos de todas las especies estudiadas.

Zhang et al. (2023b) y Saravia-Sánchez et al. (2024) sugirieron que el cocinado y la forma con la que se manipulan las muestras pudo disminuir la calidad del ADN ya que todos los productos que analizaron estaban congelados, procesados a altas temperaturas o conservados en etanol al 95% y 96%. Aunque determinadas muestras de ADN no sirvieron para su amplificación y secuenciación otras muestras con ADN con calidad suficiente se pudieron analizar.

El tiempo empleado para la realización de la extracción, amplificación y secuenciación de ADN es variable dependiendo del equipamiento disponible y carga de trabajo en el laboratorio, así como de las condiciones de la empresa don-

de se envíen las muestras. Hellberg et al. (2017) y Currò et al. (2023) destacaron que esta técnica no es un procedimiento que se pueda realizar in situ mientras que Hellberg et al. (2017) indicaron, además, que los tiempos de espera en la extracción y ciclado de las muestras no permitían tener resultados de forma rápida y poder ofrecer estos resultados a los demandantes de información.

El último paso para concluir una investigación de fraude alimentario es la identificación de la especie a partir del código de barras que ha generado las secuencias de ADN de la muestra y posterior comparación en las bibliotecas de referencia como Boldsytem y GenBank. Quinto et al., (2015), Zhang et al. (2023a) y Shum et al. (2024) concluyeron que el ADN *barcoding* no era eficaz para la identificación de ciertas especies. Zhang et al. (2023a) indicaron que el gen COI no había demostrado ser eficaz para la identificación de cefalópodos; Shum et al. (2024) señalaron que no pudieron identificar algunas especies ya que su taxonomía no estaba claramente resuelta como en el caso de especies de peces del género *Sebastes* del Atlántico Norte; Quinto et al. (2015) tuvieron problemas ya que dos canguros relacionados con una misma especie (*Macropus fuliginosus*) y una especie de perdiz aún no habían sido secuenciadas ni añadidas a las diferentes bases de datos. Por el contrario, Currò et al. (2023) pudieron identificar cefalópodos en sus muestras, siendo *Sepia officinalis* la única especie identificada. La razón por la que Zhang et al. (2023a) no pudo identificar cefalópodos en comparación con Currò et al. (2015) podría deberse a varios factores. En primer lugar, Zhang et al. (2023a) investigaron fraude alimentario en surimi, un producto compuesto por varias especies de pescado picado y congelado. Sin embargo, Currò et al. (2015) muestrearon sepias frescas que habían pasado por un ligero baño de etanol. El bajo porcentaje de cefalópodos en las muestras de surimi y su posterior congelado pudo evitar su correcta

identificación. Por último, Scales et al. (2021) detectaron un error al identificar una muestra en la que el ADN *barcode* correspondía a carne de ganado doméstico (*Bos taurus*) mientras que en realidad estaba compuesta por carne de bisonte americano (*Bison bison*), denominado erróneamente y de forma común como búfalo. La razón de este error es que algunas poblaciones de bisontes americanos conservan ADN ancestral de ganado doméstico, ya que, a finales del siglo XIX, en Norteamérica, una gran cantidad de bisontes fueron sacrificados hasta casi la extinción. Ante esta situación, se cruzaron bisontes con vacuno doméstico para intentar que la especie no se perdiera y en consecuencia provocaron una incorporación de ambos ADNs. Aunque los cruces se cortaron, la diferencia entre ambas carnes en cuanto a su contenido en vitamina B12, proteínas, grasas y hierro es notable y se exige saber la diferencia entre ambas especies.

Productos compuestos por varias especies

La posibilidad de fraude alimentario es mucho mayor en productos donde hay una mezcla de diferentes especies y donde su presentación, por ejemplo, el picado de los productos imposibilita la visualización de diferentes componentes. En cuanto a las muestras utilizadas en los estudios a partir de productos elaborados con más de una especie, los estudios de Hellberg (2017), Naaum et al. (2017), Paracchini et al. (2017), Paracchini et al. (2019), Pappalardo et al. (2021) y Zhang et al. (2023a) que analizaron muestras como fiambres, embutidos, mezclas de peces planos, hamburguesas de pescado, sushi y surimi, respectivamente, determinaron que el ADN *barcoding* no es válido para la detección de múltiples especies en una misma muestra. De acuerdo con los resultados, esta técnica solo detecta la especie predominante presente en la muestra a investigar. Esto quiere decir que los resultados fueron fiables cuando existió una sustitución completa de la única es-

pecie presente en la muestra y declarada en el etiquetado. Además, esta técnica tampoco es capaz de cuantificar el porcentaje de cada especie presente en la muestra como indicaron Naaum et al. (2017) y Zhang et al. (2023a).

Productos procesados

Los productos procesados a temperaturas o presiones extremas y con una presentación completamente alterada son más susceptibles de fraude alimentario. Hellberg et al. (2017), Paracchini et al. (2017), Paracchini et al. (2019), Zhang et al. (2023a), Zhang et al. (2023b) y Zhang et al. (2024) concluyeron que el ADN *barcoding* no sirve para la identificación de especies en muestras que han sido tratadas. Los productos que fueron sometidos a altas presiones, salazón, temperaturas de congelación, cocción o secado en estos estudios no fueron válidos para la identificación de especies ya que sufrieron desnaturalización del material genético. Saravia-Sánchez et al. (2024) sugirieron que una incorrecta manipulación del producto antes de su selección o procesado podría provocar degradación de ADN y por lo tanto la imposibilidad de identificar la especie. No obstante, Hellberg et al. (2017) determinaron que los únicos productos procesados en los que no se pudo identificar la especie eran los enlatados. Esto podría deberse a que los alimentos enlatados son sometidos a altas temperaturas durante un tiempo determinado a la hora de su esterilización provocando así la degradación de ADN.

En adición a las alteraciones que sufren las muestras antes de la extracción, amplificación y secuenciación, Currò et al. (2023) indicaron que ADN *barcoding* no revela cambios ambientales, periodos de recolección ni procesos de fábrica. Su investigación para conocer si las sepias "*Bianca di Chioggia*" habían pasado verdaderamente por un procesamiento de baño e insuflación demostró que solo se puede identificar la especie y que este proceso culinario de sepias no afectó a los resultados de ADN *barcoding*.

Identificación de especies crípticas y subespecies

A nivel biológico todas las especies presentan un cambio gradual y continuo que acaba diferenciando unas especies a partir de otras siguiendo el proceso de evolución. Las especies crípticas, descritas como dos o más especies morfológicamente indistinguibles, pero que están reproductivamente aisladas, se pueden identificar con esta técnica según Kappel et al. (2021) como ocurrió en el caso de especies de crustáceos como *Metapenaeus dobsoni* y *Xiphopenaeus kroyeri*. Las secuencias obtenidas a partir de muestras que contenían supuestamente estas especies mostraron un porcentaje de similitud con las secuencias de *Metapenaeus dobsoni* y *Xiphopenaeus kroyeri* en GenBank de entre 95,96 a 96,69%, un porcentaje demasiado bajo para identificarlos como esas especies.

En segundo lugar, el término subespecie se utiliza para hacer referencia a cada uno de los grupos en que se divide una especie y que se componen de individuos que muestran variaciones morfológicas, fisiológicas o de comportamiento pero que se pueden reproducir entre sí. Según Hellberg et al. (2017), el ADN *barcoding* probablemente no sea adecuado para la detección de subespecies ya que las muestras de cerdo y jabalí que analizaron en su estudio se identificaron ambas como *Sus scrofa*. Al igual que ocurrió con Zhang et al. (2024), declarando ineficaz esta técnica para identificar especies dentro del género *Thunnus* ya que estaban estrechamente relacionadas.

Técnicas de identificación de refuerzo

Según Goymer et al. (2023) y Zuccolo et al. (2023), la obtención de códigos de barras completos del gen COI no es siempre posible y en algunas muestras pueden ser sustituidas por los minicódigos de barras del gen COI (*minibarcodes*). Los *minibarcodes* tienen una longitud de 127 pares de bases y permiten, al igual que los

códigos de barras completos del gen COI, la identificación de especies. De esta forma Goymer et al. (2023) y Zuccolo et al. (2023) consiguieron identificar todas las especies presentes en todas las muestras con el uso combinado de ambas cadenas de ADN.

Acceso a GenBank y BOLD

Las dos bases de datos donde se realizan las búsquedas de especies son GenBank y Boldsystm (BOLD). GenBank es la plataforma donde se encuentran todas las secuencias genéticas de los animales hasta ahora registrados. Por otro lado, Boldsystm es otra plataforma digital donde se almacenan, organizan, validan, visualizan y publican códigos de barras de ADN. Zuccolo et al. (2023) destacaron, tras obtener los códigos de barras de cinco muestras de elasmobranchios, que la secuencia de *Carharodon carcharias* (tiburón blanco) se había identificado incorrectamente en GenBank. A la hora de añadir secuencias nuevas a bases de datos como GenBank, es necesario enviar las secuencias genéticas a estas bases de datos y una vez recibidas se asignan a un número de acceso único, se validan y se publican en la base de datos, donde están disponibles para su consulta y descarga. Por otro lado, el término “accesiones” se utiliza para referirse a muestras específicas de ADN que se utilizan para construir y mantener la base de datos de referencia para identificar especies usando códigos de barras de ADN. Estas accesiones son el fundamento para comparar muestras desconocidas y determinar a qué especie pertenecen. Según Goymer et al. (2023) dos accesiones figuraban como *Anguilla anguilla* en GenBank, pero presentaban una similitud de secuencia del 100 % con *Anguilla rostrata* en BOLD. Estas dos situaciones pueden deberse a que en GenBank no hay ningún control sobre las secuencias que son publicadas, habiendo secuencias de ADN que no corresponden verdaderamente con la especie indicada y pudiendo llevar a conclusiones incorrectas. Por

último, Quinto et al. (2015) observaron que trece especímenes identificados mediante BOLD presentaron coincidencias con múltiples especies con una similitud genética superior al 98%, indicando que una misma muestra pertenecía a dos especies diferentes. Una muestra etiquetada como coyote se identificó como coyote (*Canis latrans*) y lobo gris (*Canis lupus*), con un 100 % de similitud con cada especie. Cuatro productos etiquetados como alce presentaron una coincidencia del 100 % con dos especies, ciervo rojo (*Cervus elaphus*) y alce americano (*Cervus canadensis*). Estas coincidencias se pueden deber a que, en América del Norte, existe una distribución continua de coyotes y lobos, lo que permite el mestizaje entre ambas especies y, por lo tanto, impide una distinción completa basada en el ADN *barcoding*. Además, debido a la falta de consenso sobre las prácticas de clasificación de las especies de *Cervus*, algunos autores han incluido a *Cervus canadensis* como una subespecie de *Cervus elaphus*, mientras que otros las clasifican como dos especies distintas. Esto puede producir diferentes interpretaciones según el autor que realice la investigación.

CONCLUSIONES

El ADN *barcoding* del gen citocromo oxidasa I es una técnica eficaz para la identificación de especies y la detección de fraude alimentario en productos que contienen carne y pescado, pero puede tener limitaciones durante las diferentes fases de trabajo de laboratorio.

En los productos que incluyen una mezcla de diferentes especies se detecta principalmente la especie que se encuentra en mayor proporción mientras que la identificación de algunas especies en muestras o alimentos procesados puede ser complicada debido a la desnaturalización del ADN o la presencia de aditivos.

La técnica permite la identificación de especies crípticas, pero no de subespecies, aunque algunas muestras no se pueden identificar por presentar problemas en su taxonomía o por ser

especies cuyas secuencias no han sido incorporadas todavía a las bases de datos de GenBank o BOLD.

La secuenciación del COI se puede complementar estudiando otros genes o las secuencias cortas de ADN (*minibarcodes*) que permiten reforzar la comparación e identificación de determinadas especies.

REFERENCIAS

1. Blanco-Fernandez, C., Ardura, A., Masiá, P., Rodriguez, N., Voces, L., Fernandez-Raigo, M., Roca, A., Machado-Schiaffino, G., Dopico, E., & García-Vazquez, E. (2021). Fraud in highly appreciated fish detected from DNA in Europe may undermine the Development Goal of sustainable fishing in Africa. *Scientific Reports*, 11, 11423. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91020-w>
2. Carreiro, A. R., Ramos, J. A., Mata, V., Almeida, N. M., Paiva, V. H., & Lopes, R. J. (2023). DNA sequencing shows that tropical tuna species misidentification can be an underestimated issue in fish landings. *Food Control*, 145, 109473. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109473>
3. Currò, S., Babbucci, M., Carletti, P., Fasolato, L., Novelli, E., & Balzan, S. (2024). The globalized fish industry: Employing DNA-*barcoding* and NIRS technology to combat counterfeiting and safeguard traditional agro-food products. *Food Control*, 158, 110327. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2024.110327>
4. Espinoza, T., Mesa, F. R., Valencia, E., & Quevedo, R. (2015). Tipos de fraudes en carnes y productos cárnicos: Una revisión. *Scientia Agropecuaria*, 6(3), 223–233. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2015.03.09>
5. Goymer, A., Steele, K., Jenkins, F., Burgess, G., Andrews, L., Baumgartner, N., Gubili, C., & Griffiths, A. M. (2023). For R-eel?! Investigating international sales of critically

- endangered species in freshwater eel products with DNA barcoding. *Food Control*, 150, 109752. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.109752>
6. Hellberg, R. S., Hernandez, B. C., & Hernandez, H. L. (2017). Identification of meat and poultry species in food products using DNA barcoding. [Manuscrito no publicado].
 7. Kappel, K., Fafińska, J., Fischer, M., & Fritsche, J. (2021). A DNA microarray for the authentication of giant tiger prawn (*Penaeus monodon*) and whiteleg shrimp (*Penaeus (Litopenaeus) vannamei*): A proof-of-principle. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 413, 4837–4846. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03440-2>
 8. Lafuente, A. (2024). Cómo hacer *barcoding* genético. La aventura de aprender, Instituto Nacional de Tecnologías Educativas y de Formación del Profesorado. https://doi.org/10.4438/LADA027_2024
 9. Montenegro, S. P. (2018). Uso del gen citocromo oxidasa I (COI) y código de barras en estudios de genética y biología molecular para la identificación de especies animales. Universidad Nacional Abierta y a Distancia.
 10. Naaum, A. M., Shehata, H. R., Chen, S., Li, J., Tabujara, N., Awmack, D., Lutze-Wallace, C., & Hanner, R. (2018). Complementary molecular methods detect undeclared species in sausage products at retail markets in Canada. *Food Control*, 84, 339–344. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.07.040>
 11. Ortiz-Moriano, M. P., Machado-Schiaffino, G., Garcia-Vazquez, E., & Ardura, A. (2024). Traceability challenges and heavy metal risks in commercial shrimp and prawn. *Food Control*, 157, 110193. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.110193>
 12. Page, M. J., McKenzie, J. E., Bossuyt, P. M., Boutron, I., Hoffmann, T. C., Mulrow, C. D., Shamseer, L., Tetzlaff, J. M., Akl, E. A., Brennan, S. E., Chou, R., Glanville, J., Grimshaw, J. M., Hróbjartsson, A., Lalu, M. M., Li, T., Loder, E. W., Mayo-Wilson, E., McDonald, S., McGuinness, L. A., Stewart, L. A., Thomas, J., Tricco, A. C., Welch, V. A., Whiting, P., & Moher, D. (2021). Declaración PRISMA 2020: Una guía actualizada para la publicación de revisiones sistemáticas. *Revista Española de Cardiología*, 74(9), 790–799. <https://doi.org/10.1016/j.recesp.2021.06.016>
 13. Pappalardo, A. M., Raffa, A., Calogero, G. S., & Ferrito, V. (2021). Geographic pattern of sushi product misdescription in Italy—A crosstalk between citizen science and DNA barcoding. *Foods*, 10(4), 756. <https://doi.org/10.3390/foods10040756>
 14. Paracchini, V., Petrillo, M., Lievens, A., Puertas Gallardo, A., Martinsohn, J. T., Hofherr, J., Maquet, A., Barbosa Silva, A. P., Kagkli, D. M., Querci, M., Patak, A., & Angers-Loustau, A. (2017). Novel nuclear *barcode* regions for the identification of flatfish species. *Food Control*, 79, 297–308. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.04.009>
 15. Paracchini, V., Petrillo, M., Lievens, A., Kagkli, D. M., & Angers-Loustau, A. (2019). Nuclear DNA *barcodes* for cod identification in mildly treated and processed food products. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 36(1), 1–14. <https://doi.org/10.1080/19440049.2018.1556402>
 16. Quinto, C. A., Tinoco, R., & Hellberg, R. S. (2015). DNA *barcoding* reveals mislabeling of game meat species on the U.S. commercial market. [Datos de publicación incompletos].
 17. Sánchez Barrado, M. L. (2015). Aplicación del código de barras de ADN: Propuesta de aplicación didáctica en Bachillerato [Trabajo de fin de grado, Universitat de les Illes Balears].
 18. Saravia-Sánchez, R. F., Molina-Quirós, J. L., Chaves-Campos, J., Elizondo-Sancho, M., Martínez-Fernández, D., Marrarri, M., & Hernandez Muñoz, S. (2025). Molecular identification of billfish (*Osteichthyes*, families Xiphiidae and Istiophoridae) products

- in Costa Rica as a tool to reduce mislabeling and fraudulent sales of fish. *Food Control*, 168, 110961. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2024.110961>
19. Scales, Z. M., Narbay, E., & Hellberg, R. S. (2021). Use of DNA *barcoding* combined with PCR-SFLP to authenticate species in bison meat products. *Foods*, 10, 347. <https://doi.org/10.3390/foods10020347>
 20. Shum, P., Cusa, M., & Mariani, S. (2024). Nanopore sequencing facilitates screening of diversity and provenance of seafood and marine wildlife. *Food Control*, 161, 110382. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2024.110382>
 21. Urrútia, G., & Bonfill, X. (2010). Declaración PRISMA: Una propuesta para mejorar la publicación de revisiones sistemáticas y metaanálisis. *Medicina Clínica*, 135(11), 507–511. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2010.01.015>
 22. Valiente-Díaz, C., Alonso-Llamazares, C., Machado-Schiaffino, G., Soto-López, V., & García-Vázquez, E. (2025). A study investigating heavy metals in salmonids products marketed in Spain. *Food Control*, 168, 110891. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2024.110891>
 23. Willette, D. A., Andrade, K., Fitzpatrick, B., & Wilson, K. (2025). Outreach & DNA-based monitoring facilitate 3-fold reduction in seafood mislabeling in Los Angeles over 10 years. *Food Control*, 168, 110913. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2024.110913>
 24. Zhang, X., Giusti, A., Sun, Z., Li, Y., Guo, J., Deng, W., Chen, Y., He, A., Peng, H., Tinacci, L., Armani, A., & Wen, J. (2024). Molecular authentication of surimi-based products (fish cakes, 鱼糕) sold on the Chinese e-commerce: Traditional (DNA barcoding) and innovative techniques (metabarcoding) to tackle seafood fraud. *Food Control*, 155, 110110. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.110110>
 25. Zhang, X., Lara, T., Sun, Z., Li, Y., Guo, J., Deng, W., Chen, Y., He, A., Peng, H., Armani, A., & Jing, W. (2024). Labelling compliance assessment and molecular authentication of grilled fish products sold on Chinese e-commerce: Traceability issues related to the use of umbrella trade names. *Food Control*, 155, 110043. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.110043>
 26. Zhang, X., Malloggi, C., Giusti, A., Deng, W., Sun, Z., Li, Y., Guo, J., Peng, H., Tinacci, L., Gao, L., Armani, A., & Wen, J. (2024). Label analysis and molecular identification of Japanese seafood products purchased on Chinese e-commerce. *Food Control*, 161, 110373. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2024.110373>
 27. Zuccolo, V., Moreira Rego, F., Hughes, E., & Griffiths, A. M. (2023). Endangered shark species traded as “caçãõ” in São Paulo during the COVID-19 lockdown: DNA-*barcoding* a snapshot of products. *Molecular Biology Reports*, 50, 9985–9992. <https://doi.org/10.1007/s11033-023-08876-6>