

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA  
(Associação Ampla entre a UNICENTRO e a UEPG)

IDENTIFICAÇÃO DE ANIMAIS SILVESTRES DE INTERESSE CRIMINAL DA FAUNA  
MATOGROSSENSE POR MEIO DE DNA MITOCONDRIAL

REGINALDO ROSSI DO CARMO

Guarapuava

2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA  
(Associação Ampla entre a UNICENTRO a UEPG)

IDENTIFICAÇÃO DE ANIMAIS SILVESTRES DE INTERESSE CRIMINAL DA FAUNA  
MATOGROSSENSE POR MEIO DE DNA MITOCONDRIAL

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual do Centro-Oeste em associação com a Universidade Estadual de Ponta Grossa, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração em Biologia Evolutiva)

Guarapuava

2011

Carmo, Reginaldo Rossi do  
C287i Identificação de animais silvestres de interesse criminal da fauna matogrossense por meio de dna mitocondrial / Reginaldo Rossi do Carmo. -- Guarapuava, 2011  
xv, 86 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Evolutiva, 2011

Orientador: Rogério Pincela Mateus

Co-orientadora: Flávia Galindo Silvestre Silva

Banca examinadora:

#### Bibliografia

1. Animais silvestres. 2. Genética. 3. DNA mitocondrial. 4. Crimes ambientais. 5. Tráfico de animais silvestres. 6. Biologia evolutiva. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

CDD 591.15

Orientador

Prof. Dr. Rogério Pincela Mateus

Co-orientadora

Prof(a). Dr(a). Flávia Galindo Silvestre Silva

*Ninguém pode ser escravo de sua identidade:  
quando surge uma possibilidade de mudança é  
preciso mudar.*

Elliot Gould

Dedico este trabalho à pessoa que nos múltiplos sentidos da palavra tem tornado a minha vida mais doce, que me fez dar outro sentido ao tempo em que nos dedicamos a simplesmente fazer companhia e ao qual muitas vezes de forma pejorativa chamamos de ócio. Dedico este trabalho à minha filha MEL.

## Agradecimentos

Ao meu orientador Rogério Mateus, por depositar em mim a confiança de que eu seria capaz de desenvolver este trabalho e também por ter demonstrado com sabedoria que orientar é guiar, conduzir algo ou alguém a uma posição determinada.

À Flávia Galindo Silvestre, que de forma magistral me co-orientou em todos os passos deste trabalho, podendo dizer até que foi a responsável pela existência dele, pois atuou desde a sua concepção até a conclusão.

À POLITEC, especialmente à Diretoria de Laboratório Forense representada por sua Diretora Alessandra Paiva Puertas Alves, que disponibilizou toda a estrutura laboratorial necessária.

Ao Zoológico da Universidade Federal de Mato Grosso, onde me surpreendi com a prontidão e competência com que fui atendido pelos profissionais: Raul, Itamar, Rondon e Luís Carlos. Mas quero dar enorme destaque a todo trabalho de coleta realizado pela Médica Veterinária Cristina Helena Alves, essa foi incrível.

Às técnicas do Laboratório de genética do Hospital Universitário da Universidade de Cuiabá – UNIC, que nos socorreram em várias situações de apuros.

Aos meus pais Vera e Estevino e aos irmãos e amigos que, nos momentos em que já estava insuportável falar sobre identificação animal, me brindaram com outros assuntos que me fazia descansar e prosseguir novamente.

Aos colegas de trabalho da POLITEC que fazem do Laboratório Forense o melhor lugar do mundo para se trabalhar. Vou representá-los nominalmente através das minhas colegas de sala: Ana Cristina, Tatiane, Rose e Zilda.

Ainda na POLITEC tenho especial agradecimento aos Peritos da seção de Meio

Ambiente, pois vieram deles praticamente todas as amostras questionadas, além da ajuda imensurável dadas pelos Peritos Elke, Elaíse e Fabiano.

À estagiária Patrícia Almeida cuja ajuda foi imprescindível em todas as etapas da execução do trabalho, valeu mesmo.

À Claudinéia Araújo que com muita paciência se dispôs a ler este trabalho e dar sua preciosa colaboração.

Ao colega Marcelo Pádua que colaborou na revisão do abstract.

Aos professores do curso de mestrado, que eu gostaria de representar pelo nome da professora Luciana Machado, estes, além de nos brindar com toda uma bagagem de conhecimento, foram grandes incentivadores do curso.

Finalmente aos colegas do curso de mestrado Katy, Dani, Cristiano, Talissa, Norbert, Renan, Paulo e Luís Gustavo, grandes companheiros de estudos, mas também daquelas horas de lazer a que todos nós temos direito.

## Resumo

O Brasil possui uma importância inquestionável no cenário da biodiversidade global o que o torna um dos países mais visados para este que é o terceiro maior comércio ilícito do mundo, o tráfico de animais silvestres. No combate ao crime o Brasil vem aprimorando sua legislação ambiental e o trabalho pericial ganhou especial relevância na quantificação dos danos e na identificação das espécies envolvida nos ilícitos. A maioria dos peritos utiliza-se de comparativos morfológicos no trabalho de identificação, no entanto, é comum a apreensão de apenas fragmentos de espécimes e, nestes casos, uma identificação confiável só se torna possível pela técnica de sequenciamento genético. Mesmo com o reconhecimento da técnica como importante ferramenta na identificação, ainda paira uma discussão sobre qual o melhor segmento de DNA a ser utilizado (Cytb ou COI) e se estes são efetivos para amostras degradadas, como é o caso das amostras forenses. Assim o objetivo desta pesquisa é contribuir para dissolução destes questionamentos e depositar no banco de dados GenBank as sequências de DNA mitocondrial geradas. As amostras foram divididas em dois grupos, chamadas de amostras referência (coletadas de animais do Zoológico da UFMT) e amostras questionadas (encaminhadas ao laboratório da POLITEC para identificação da espécie). Após extração, amplificação e seqüenciamento, as sequências resultantes foram confrontadas com sequências já depositadas no GenBank. Para os parâmetros adotados neste estudo, os melhores resultados foram obtidos para as sequências mais curtas do Cytb. Em apenas 10% das espécies conseguiu-se sucesso no sequenciamento do segmento COI. As sequências resultantes das amostras referências, quando confrontados com as sequências depositadas no GenBank apresentou similaridade entre 93,9% a 100%, com exceção da amostra de *Leopardus pardalis* que resultou em 91,9% de similaridade com a espécie *Prionailurus bengalensis*. Para as sequências resultantes das amostras questionadas obtivemos índice de similaridade superior a 97% para as espécies de *Hydrochoerus hydrochaeris*, *Tapirus terrestris* (inicialmente tida como *Dasyprocta aguti*) e *Euphractus sexcinctus*. O confronto direto entre a amostra referência e a amostra questionada da espécie *Leopardus pardalis* apresentou índice de similaridade superior a 99%. Para as sequências obtidas das espécies *Pecari tajacu*, *Rhynchotus rufescens*, *Leptotila sp.* e *Tupinambis sp.*, o índice de similaridade foi de 94,3% com *Pecari tajacu*, 96,5% com *Ramphasto toco*, 96,1% com *Amazona guildingii* e 98,3% com a espécie *Tupinambis merianae*, respectivamente. Desta forma este trabalho contribuiu para padronizar e mostrar a eficiência da técnica e a necessidade de se realizar um grande projeto de seqüenciamento de toda a fauna silvestre brasileira para disponibilizá-los nos bancos de dados públicos.

**Palavras-chave:** DNA mitocondrial, identificação forense, GenBank

### Abstract

Brazil has an undeniable importance in the scenario of global biodiversity, what turns it one of the most sought countries for this is the third largest illicit trade of the world, the traffic of wild animals. To cope with the criminal assaults Brazil has been improving its environmental legislation and the expert work has gained special importance in quantifying the damage and identifying the species involved in criminal activities. Most of the experts are used of comparative morphological identification of the work, however, it is common for the seizure of only fragments of specimens and, most often in these cases the identification is only possible by the technique of gene sequencing. Even with the recognition of technology as an important tool for identification, it still hangs a discussion about the best DNA segment to be used (Cytb or COI) and if these are effective for degraded samples, as forensic samples. Aiming to contribute to dissolution of these questions and to deposit in the international database GenBank, the mitochondrial DNA sequences generated. The samples were divided in two groups, calls of reference samples (collected from animals in the UFMT's zoo) and questioned samples (sent to the POLITEC laboratory for specific identification). After extraction, amplification and sequencing, the resulting sequences were compared with sequences already deposited in GenBank. For the parameters used in this study, the best results were obtained for the shortest Cytb sequences. In only 10% of species could be successful in sequencing of the COI segment. The resulting sequences of sample references, when confronted with sequences deposited in database presented similarity among 93.9% to 100% except for the *Leopardus pardalis* sample that resulted in 91.9% of similarity with the species *Prionailurus bengalensis*. For the resulting sequences of the questioned samples we obtained similarity index above 97% for species of *Hydrochoerus hydrochaeris*, *Tapirus terrestris* (initially taken as *Dasyprocta agouti*) and *Euphractus sexcinctus*. The direct confrontation between the reference and the questioned sample of the species *Leopardus pardalis* presented index of superior similarity of 99%. For the obtained sequences of the species *Pecari tajacu*, *Rhynchotus rufescens*, *Leptotila* sp. and *Tupinambis* sp., the similarity index was of 94.3% with *Pecari tajacu*, 96.5% with *Ramphastos toco*, 96.1% with *Amazon guildingii* and 98.3% for the species *Tupinambis merianae*, respectively. Thus, this study contributes to show the efficiency of the technique and also exposes the need to undertake a great project to sequence the whole Brazilian wild fauna to make available them in the public databases.

**Key words:** mitochondrial DNA, forensic identification, GenBank

## Lista de Figuras

- Figura 1.** Mapa do Brasil destacando os principais biomas brasileiros e suas proporções dentro do território nacional. Fonte: www.wwf.org.br.....1
- Figura 2.** Fluxo de atuação do JUVAM. Fonte: Teixeira (2002). .....7
- Figura 3.** Arcada dentária de um vertebrado superior (cateto), demonstrando a disposição dos dentes em grupos com funções diferentes e evidenciando o espaço entre os caninos e a região dos molares (seta). Fonte: Bengtson (2010)..... 11
- Figura 4.** Esquemas das etapas do processo de identificação forense por meio de sequência de DNA. .23
- Figura 5.** Desenho esquemático do espaço de pesquisa e alinhamento.....25
- Figura 6.** Grupo de aves da família Psittacidae do Zoológico da UFMT, taxonomicamente identificados, dos quais foram extraídos amostras de sangue para análise da sequência de DNA (amostras referências). a) *Brotogeris versicolurus* (periquito verde); b) *Pionus menstruus* (maritaca da cabeça azul); c) *Amazonas aestiva* (papagaio verdadeiro); d) *Ara chloropterus* (arara vermelha); e) *Ara ararauna* (arara Canindé); f) *Anodorhynchus hyacinthinus* (arara azul); g) *Ara macao* (araracanga).....31
- Figura 7.** Grupo de mamíferos do Zoológico da UFMT, taxonomicamente identificados, dos quais foram extraídos amostras de sangue para análise da sequência de DNA (amostras referências). a) *Myrmecophaga tridactyla* (tamanduá bandeira); b) *Leopardus pardalis* (jaguatirica); c) *Mazama gouazoubira* (veado catingueiro); d) *Nasua nasua* (quati).....32
- Figura 8.** Coleta de sangue da região interna da asa das aves.....32
- Figura 9.** Amostras apreendidas pela fiscalização ambiental do Estado de Mato Grosso e encaminhadas à perícia com suspeita de serem provenientes de animais silvestres. a) Tatu peba (*Euphractus sexcinctus*); b) Cutia (*Dasyprocta aguti*); c) Cateto (*Pecari tajacu*); d) Capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*); e) Teiú (*Tupinambis sp.*); f) Juruti (*Leptotila sp.*); g) Perdiz (*Rhynchotus rufescens*); h) Couro de Jaguatirica (*Leopardus pardalis*). .....34
- Figura 10.** Arvore consenso de Neighbor-Joining, produzida a partir de matriz de distância genética construída pelo método de Tamura-Nei (1993) para a sequência de 360 pb de bases do segmento do Cytb. A espécie *Leptotila megalura* foi considerado grupo externo nesta análise. Os números abaixo dos ramos são valores de bootstrap baseados em 1000 réplicas.....44
- Figura 11.** Arvore consenso de Neighbor-Joining, produzida a partir de matriz de distância genética construída pelo método de Tamura-Nei (1993) para a sequência de 360 pb de bases do segmento do Cytb da espécie *Leopardus pardalis*. .....48
- Figura 12.** Arvore consenso de Neighbor-Joining, produzida a partir de matriz de distância genética construída pelo método de Tamura-Nei (1993) para a sequência de 360 pb de bases do segmento do Cytb da espécie *Myrmecophaga tridactyla*.....51
- Figura 13.** a) Esquema mostrando a relação entre 59 haplótipos de veados, derivados de fragmento de 934 pares de bases do Cytb gerados em trabalhos com veados sul-americanos (DUARTE, et al., 2008). b) Arvore consenso de Neighbor-Joining, produzida a partir de matriz de distância genética construída pelo método de Tamura-Nei (1993) para a sequência de 474 pb do segmento do Cytb da espécie *Mazama gouazoubira*. .....53

- Figura 14.** Arvore consenso de Neighbor-Joining, produzida a partir de matriz de distância genética construída pelo método de Tamura-Nei (1993) para a sequência de 360 pb de bases do segmento do Cytb da espécie *Nasua nasua*.....55
- Figura 15.** Resultado das 10 primeiras sequencias, ordenadas por ordem decrescentes de valores de Bit-Score, geradas a partir da interface blast integrada ao programa Geneious v5.3 para o segmento de sequência do gene Cytb da espécie *Ara ararauna*.....69
- Figura 16.** Resultado das 10 primeiras sequencias, ordenadas por ordem decrescentes de valores de Bit-Score, geradas a partir da interface blast integrada ao programa Geneious v5.3 para o segmento de sequência do gene Cytb da espécie *Ara chloropterus*. .....69
- Figura 17.** Resultado das 10 primeiras sequencias, ordenadas por ordem decrescentes de valores de Bit-Score, geradas a partir da interface blast integrada ao programa Geneious v5.3 para o segmento de sequência do gene Cytb da espécie *Ara macao*. .....70
- Figura 18.** Resultado das 10 primeiras sequencias, ordenadas por ordem decrescentes de valores de Bit-Score, geradas a partir da interface blast integrada ao programa Geneious v5.3 para o segmento de sequência do gene Cytb da espécie *Amazona aestiva*. .....70
- Figura 19.** Resultado das 10 primeiras sequencias, ordenadas por ordem decrescentes de valores de Bit-Score, geradas a partir da interface blast integrada ao programa Geneious v5.3 para o segmento de sequência do gene Cytb da espécie *Anodorhynchus hyacinthinus*.....70
- Figura 20.** Resultado das 11 primeiras sequencias, ordenadas por ordem decrescentes de valores de Bit-Score, geradas a partir da interface blast integrada ao programa Geneious v5.3 para o segmento de sequência do gene Cytb da espécie *Brotogeris versicolurus*. .....71
- Figura 21.** Resultado das 10 primeiras sequencias, ordenadas por ordem decrescentes de valores de Bit-Score, geradas a partir da interface blast integrada ao programa Geneious v5.3 para o segmento de sequência do gene Cytb da espécie *Pionus menstruus*.....71
- Figura 22.** Resultado das 14 primeiras sequencias, ordenadas por ordem decrescentes de valores de Bit-Score, geradas a partir da interface blast integrada ao programa Geneious v5.3 para o segmento de sequência do gene Cytb da espécie *Leopardus pardalis*. .....71
- Figura 23.** Resultado das 10 primeiras sequencias, ordenadas por ordem decrescentes de valores de Bit-Score, geradas a partir da interface blast integrada ao programa Geneious v5.3 para o segmento de sequência do gene Cytb da espécie *Mazama gouazoubira*. .....72
- Figura 24.** Resultado das 10 primeiras sequencias, ordenadas por ordem decrescentes de valores de Bit-Score, geradas a partir da interface blast integrada ao programa Geneious v5.3 para o segmento de sequência do gene Cytb da espécie *Myrmecophaga tridactyla*.....72
- Figura 25.** Resultado das 10 primeiras sequencias, ordenadas por ordem decrescentes de valores de Bit-Score, geradas a partir da interface blast integrada ao programa Geneious v5.3 para o segmento de sequência do gene Cytb da espécie *Nasua nasua*. .....73
- Figura 26.** Resultado das 14 primeiras sequencias, ordenadas por ordem decrescentes de valores de Bit-Score, geradas a partir da interface blast integrada ao programa Geneious v5.3 para o segmento de sequência do gene Cytb da espécie encaminhada como sendo jaguatirica (*Leopardus pardalis*). .....73
- Figura 27.** Resultado das 10 primeiras sequencias, ordenadas por ordem decrescentes de valores de Bit-Score, geradas a partir da interface blast integrada ao programa Geneious v5.3 para o segmento de sequência do gene Cytb da espécie encaminhada como sendo capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*). 73

**Figura 28.** Resultado das 11 primeiras sequencias, ordenadas por ordem decrescentes de valores de Bit-Score, geradas a partir da interface blast integrada ao programa Geneious v5.3 para o segmento de sequência do gene Cytb da espécie encaminhada como sendo cutia (*Dasyprocta aguti*).....74

**Figura 29.** Resultado das 12 primeiras sequencias, ordenadas por ordem decrescentes de valores de Bit-Score, geradas a partir da interface blast integrada ao programa Geneious v5.3 para o segmento de sequência do gene Cytb da espécie encaminhada como sendo teiú (*Tupinambis sp.*) .....74

**Figura 30.** Resultado das 11 primeiras sequencias, ordenadas por ordem decrescentes de valores de Bit-Score, geradas a partir da interface blast integrada ao programa Geneious v5.3 para o segmento de sequência do gene Cytb da espécie encaminhada como sendo juriti (*Leptotila sp.*) .....74

**Figura 31.** Resultado das 10 primeiras sequencias, ordenadas por ordem decrescentes de valores de Bit-Score, geradas a partir da interface blast integrada ao programa Geneious v5.3 para o segmento de sequência do gene Cytb da espécie encaminhada como sendo perdiz (*Rhynchotus rufescens*).....75

**Figura 32.** Resultado das 10 primeiras sequencias, ordenadas por ordem decrescentes de valores de Bit-Score, geradas a partir da interface blast integrada ao programa Geneious v5.3 para o segmento de sequência do gene Cytb da espécie encaminhada como sendo cateto (*Pecari tajacu*).....75

**Figura 33.** Resultado das 10 primeiras sequencias, ordenadas por ordem decrescentes de valores de Bit-Score, geradas a partir da interface blast integrada ao programa Geneious v5.3 para o segmento de sequência do gene Cytb da espécie encaminhada como sendo tatu peba (*Euphractus sexcinctus*).....75

### Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Número de sequências dos genes Cytb e COI dos grupos Mammalia e Sauropsida depositadas no GenBank em 2005 e 2010.....	14
<b>Tabela 2.</b> Amostras questionadas apreendidas pelos órgãos de fiscalização ambiental e encaminhadas ao Laboratório Forense da POLITEC.....	33
<b>Tabela 3.</b> Sequências dos primers utilizados na amplificação dos diferentes genes. ....	35
<b>Tabela 4.</b> Análise de abundância, nos bancos dados de DNA, da ocorrência de sequências dos segmentos dos genes mitocondriais Cytb e COI para as espécies estudadas neste trabalho. ....	39
<b>Tabela 5.</b> Resumo dos segmentos de DNA mitocondrial em que se obteve amplificação para cada uma das espécie estudadas.....	42
<b>Tabela 6.</b> Análise de distância genética realizada pelo método de Tamura-Nei (1993) para a sequência de 360 pb de bases do segmento do Cytb dos psitacídeos. ....	43
<b>Tabela 7.</b> Tabela de frequência de bases purínicas e pirimidínicas nos segmentos do Cyt b.....	46
<b>Tabela 8.</b> Análise de distância genética realizada pelo método de Tamura-Nei (1993) para a sequência de 360 pb de bases do segmento do Cytb da espécie <i>Leopardus pardalis</i> . ....	48
<b>Tabela 9.</b> Análise de distância genética realizada pelo método de Tamura-Nei (1993) para a sequência de 360 pb de bases do segmento do Cytb da espécie <i>Myrmecophaga tridactyla</i> .....	50
<b>Tabela 10.</b> Análise de distância genética realizada pelo método de Tamura-Nei (1993) para a sequência de 474 pb de bases do segmento do Cytb da espécie <i>Mazama gouazoubira</i> . ....	53
<b>Tabela 11.</b> Análise de distância genética realizada pelo método de Tamura-Nei (1993) para a sequência de 470 pb de bases do segmento do Cytb da espécie <i>Nasua nasua</i> .....	54

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1	BIODIVERSIDADE BRASILEIRA	1
1.2	LEGISLAÇÃO AMBIENTAL BRASILEIRA	3
1.3	EXTRATIVISMO ILEGAL E TRÁFICO DE ANIMAIS SILVESTRE NO BRASIL	5
1.4	TÉCNICAS DE IDENTIFICAÇÃO ANIMAL	7
1.4.1	Identificação por pelos e penas	8
1.4.2	Identificação por morfologia dos dentes e ossos	10
1.4.3	Cristais de hemoglobina	11
1.4.4	Identificação a partir do Sequenciamento do DNA	12
1.5	BANCO DE DADOS	15
1.5.1	DNA Data Bank Japan - DDBJ	16
1.5.2	European Nucleotide Archive - ENA	17
1.5.3	GenBank	17
1.5.4	BOLD – Barcode Of Life Data Systems	20
1.5.5	Entrada dos dados nos bancos de dados	22
1.5.6	BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)	24
1.5.7	CLUSTALW	25
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>28</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>29</b>
3.1	MATERIAIS BIOLÓGICOS	29
3.1.1	Amostra Referência	29
3.1.2	Amostra Questionada	33
3.2	MÉTODOS	35
3.2.1	Isolamento do DNA genômico	35
3.2.2	Reação de amplificação	35
3.2.3	Visualização do DNA amplificado em gel de agarose	36
3.2.4	Reação de sequenciamento	36
3.2.5	Purificação do produto de sequenciamento	37
3.2.6	Alinhamento e edição das sequências obtidas	37
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>39</b>
4.1	ANÁLISE DA ABUNDANCIA DAS SEQUÊNCIAS DOS GENES MITOCONDRIAIS CYTB E COI NO BANCO DE DADOS GENBANK	39
4.2	SEQUÊNCIAS DOS GENES CYTB E COI	41
4.3	GENE CITOCROMO B (CYTB)	43
4.3.1	Amostra Referência	43
4.3.1.1	Família Psitacidae	43
4.3.1.2	Ordem Mammalia	46
4.3.1.2.1	Leopardus pardalis	47
4.3.1.2.2	Mymercophaga tridactyla	49
4.3.1.2.3	Mazama gouazoubira	51
4.3.1.2.4	Nasua nasua	54
4.3.2	Amostra Questionada	55

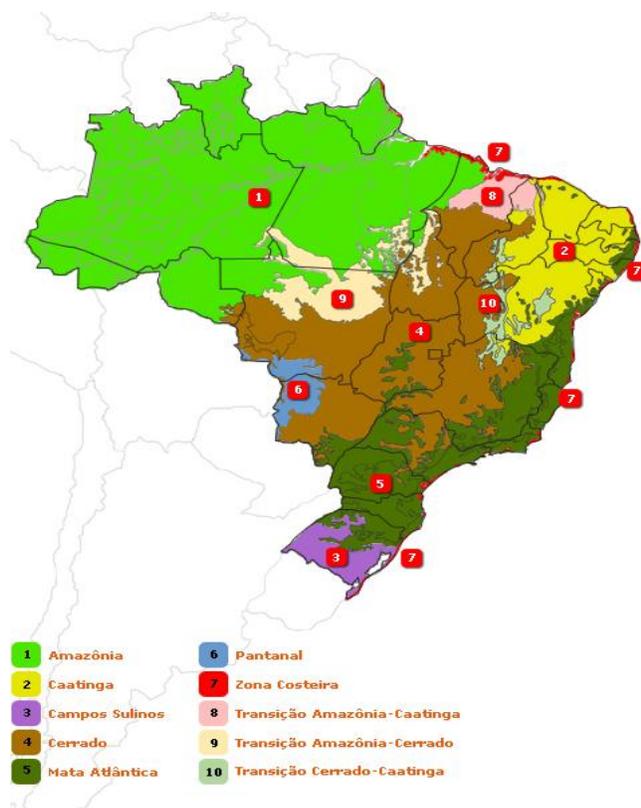
---

<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>58</b>
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>59</b>
<b>7</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>60</b>
<b>8</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>69</b>
8.1	LISTA DE FIGURAS COM RESULTADOS “BLAST” DAS SEQUÊNCIAS CONSENSO DAS AMOSTRAS REFERENCIA E QUESTIONADA .....	69
8.2	SEQUÊNCIAS DE BASES DOS SEGMENTOS DOS GENES MITOCONDRIAIS CYTB E COI DAS ESPÉCIES PESQUISADAS .....	76
8.3	PROTÓCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO .....	80
8.3.1	<i>Extração de DNA com Kit Axyprep<sup>TM</sup> Multisource Genomic DNA miniprep (Axygen Biosciences®)</i> .....	80
8.3.2	<i>Extração de DNA com fenol clorofórmio</i> .....	81
8.4	<i>REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO</i> .....	82
8.5	<i>VISUALIZAÇÃO DO DNA AMPLIFICADO EM GEL DE AGAROSE</i> .....	83
8.6	<i>REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO</i> .....	84
8.7	<i>PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DE SEQUENCIAMENTO</i> .....	85
8.8	<i>ALINHAMENTO E EDIÇÃO DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS</i> .....	86

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Biodiversidade Brasileira

O Brasil possui uma importância inquestionável no cenário da biodiversidade global, pois apresenta uma das maiores diversidades de mamíferos e aves do mundo, incluindo exemplares não encontrados em nenhum outro lugar, tais como peixe boi, boto-rosa e a arara-azul-de-lear (PORTAL BRASIL, 2010). Segundo dados apresentados pelo Ministério do Meio Ambiente (MMA) estima-se que existam no país mais de 11 mil espécies de vertebrados, mais de 30 mil espécies de insetos e aproximadamente 30 mil espécies de outros invertebrados (PORTAL BRASIL, 2010). Dentro do cenário nacional, o Estado de Mato Grosso tem especial importância ambiental, pois reúne três dos principais biomas brasileiros: o pantanal, o cerrado e a floresta amazônica (Figura 1).



**Figura 1.** Mapa do Brasil destacando os principais biomas brasileiros e suas proporções dentro do território nacional. Fonte: [www.wwf.org.br](http://www.wwf.org.br)

O Pantanal é uma grande área alagável de aproximadamente 147.574 Km<sup>2</sup> no Brasil (partes menores do Pantanal encontram-se ao norte da Bolívia e ao Sul do Paraguai), caracterizado por inundação sazonal que a cada ano faz com que cerca de 80% de sua área passe de ambiente terrestre a ambiente aquático, contrastando com um período de estiagem onde grande parte das áreas inundadas secam (ALHO, 2008). Grande parte da fauna brasileira está representada no bioma Pantanal, tendo sido catalogadas até então, aproximadamente 263 espécies de peixes, 41 de anfíbios, 177 de répteis, 463 de aves e 132 de mamíferos (TUBELIS *et al.*, 2003; FENANDES *et al.*, 2010). Dentre estas espécies, muitas estão ameaçadas, como é o caso da onça pintada (*Panthera onca*), anta (*Tapirus terrestris*) e jaguatirica (*Leopardus pardalis*) (BRASIL, 2003).

Cerrado é um termo cunhado para caracterizar um conjunto de ecossistemas (savanas, matas, campos e matas de galeria) que ocorrem no Brasil Central. O cerrado apresenta uma elevada biodiversidade, alguns levantamentos da diversidade faunística apontaram a ocorrência de aproximadamente 199 espécies de mamíferos, 837 de aves, 180 de répteis, 150 de anfíbios e 1.200 de peixes (KLINK *et al.*, 2005). Assim como outros biomas brasileiros, o cerrado vem sofrendo sérias ameaças à sua biodiversidade, principalmente pela degradação do solo em decorrência do seu uso extensivo para a agricultura e a consequente destruição dos ecossistemas nativos. Iniciativas de Organizações Não Governamentais (ONG's) nacionais e internacionais foram dadas no sentido de reverter os danos que o cerrado vem sofrendo, promovendo a adoção de práticas para o uso sustentável dos recursos naturais (FUNATURA, 2000) e estabelecendo corredores de biodiversidade e reservas ambientais (WWF-BRASIL, 1994).

O Bioma Amazônia se estende por nove países da América do Sul, sendo 69% de sua área dentro do território brasileiro (MÉIO *et al.*, 2003). No Brasil ela se estende pelos estados do Pará, Amazonas, Maranhão, Goiás, Acre, Amapá, Rondônia, Roraima e Mato Grosso, totalizando 4.871.000 Km<sup>2</sup> (INPE, 2004). A degradação ambiental, a qual vem atualmente sofrendo a Amazônia, teve início no modelo adotado para a sua ocupação a partir da década de 60, quando o governo federal, com o objetivo de povoar a região, ofereceu fortes incentivos para produtores de todo o Brasil.

Neste contexto, o desmatamento teve início com a abertura oficial (e clandestina) de estradas que permitiram a expansão humana e a ocupação irregular de terras, levando à exploração de madeiras nobres, posteriormente convertendo-se a floresta explorada em agricultura familiar e pastagem para a criação de gado, sendo este o fator responsável por cerca de 80% das florestas desmatadas na Amazônia legal. Segundo Ferreira *et al.* (2005), os estados do Pará, Rondônia, Maranhão e Mato Grosso juntos foram responsáveis por 90% do desmatamento ocorrido entre os anos de 2001 e 2003.

O cenário exibido anteriormente mostra a pressão a que vem sendo submetida toda a fauna silvestre destes biomas, sofrendo, dentre outros, com a diminuição regular do seu habitat natural e com a caça para o consumo da carne e seus subprodutos. Em decorrência disto, a extinção local de grandes mamíferos, tais como *Tapirus terrestris* (anta), *Panthera onca* (onça) e *Tayassu pecari* (porco-do-mato) tem sido relatada.

## 1.2 Legislação Ambiental Brasileira

A legislação ambiental brasileira é uma das mais abrangentes e detalhadas, por si só, as 17 leis ambientais mais importantes já proveriam mecanismos que garantiriam a proteção e preservação de todo patrimônio ambiental brasileiro, isto se fossem devidamente cumpridas (PLANETA ORGÂNICO, 2008). No contexto de crime contra a fauna, merece destaque a Lei da Fauna Silvestre de nº 5.197 de 03/01/1967. Esta foi um marco no combate ao crime contra a fauna por ser a primeira a tipificar como crime a utilização, perseguição, destruição ou caça de animais silvestre. Em seu artigo primeiro assim define:

Art. 1º - Os animais de quaisquer espécies, em qualquer fase do seu desenvolvimento e que vivem naturalmente fora do cativeiro, constituindo a fauna silvestre, bem como seus ninhos, abrigos e criadouros naturais, são propriedades do Estado, sendo proibido a sua utilização, perseguição, destruição, caça ou apanha (BRASIL, 1967) .

Apesar de ter sido um marco na legislação ambiental, a lei n. 5.197 não delineava atos humanos importantes, lesivos aos espécimes e trazia referenciais

duvidosos quanto à caracterização da fauna silvestre (SINDIPOL-BRASIL, 2006).

Mais recentemente, com o objetivo de aprimorar e unificar a legislação ambiental brasileira, caracterizadas por normas jurídicas dispersas, foi promulgada a lei de crimes ambientais de nº 9.605 de 12 de fevereiro de 1998. A lei tipificou como crimes diversas condutas antes tidas apenas como ilícitos administrativos ou civis, ou mesmo que não eram objeto de regulamento, e adequou as sanções penais à realidade, adotando o princípio da proporcionalidade, da significância e do resultado dos delitos (SINDIPOL-BRASIL, 2006).

A nova lei de crimes ambientais discorre que é passivo de pena de detenção e multa aquele que matar, perseguir, caçar, apanhar, vender, expor à venda, exportar ou adquirir, guardar, ter em cativeiro ou depósito, utilizar ou transportar ovos e larvas de espécimes da fauna silvestre, nativos ou em rota migratória, bem como produtos e objetos dela oriundos, provenientes de criadouros não autorizados ou sem a devida permissão, licença ou autorização da autoridade competente. Em seu art. 29 - §3º - Dos Crimes contra o Meio Ambiente – a lei de crimes ambientais trás uma definição complementar que ajuda na caracterização dos animais da fauna silvestre:

§ 3º. São espécimes da fauna silvestre todos aqueles pertencentes às espécies nativas, migratórias e quaisquer outras, aquáticas ou terrestres, que tenham todo ou parte de seu ciclo de vida ocorrendo dentro dos limites do território brasileiro, ou em águas jurisdicionais brasileiras (BRASIL, 1998).

A lei de crimes ambientais modernizou a legislação ambiental na medida em que possibilitou aos órgãos de defesa e ao Ministério Público contar com um instrumento que baliza de forma clara, eficiente e na gradação compatível com o impacto causado, o enquadramento criminal das ações deletérias ao meio ambiente. O enquadramento legal na nova legislação ambiental além de levar em consideração a intensidade do impacto causado, previu um incremento na pena quando se tratar de espécies raras ou ameaçadas de extinção.

Dois documentos são particularmente importantes para complementar as informações quanto ao nível de ameaça de extinção a que está submetida a espécie: a Lista Nacional da Fauna Brasileira de Animais Ameaçados de Extinção (BRASIL, 2003)

e a Convenção sobre o comércio Internacional de Espécies da Flora e Fauna selvagens em Perigo de Extinção (BRASIL, 2000).

O primeiro documento lista os animais da fauna brasileira que estão em ameaça de extinção, sendo, por isso, de consulta obrigatória quando se objetiva constatar se o espécime envolvido no ilícito é parte deste grupo. O segundo é um documento internacional, firmado em 1973, que congrega 173 países do qual o Brasil é um dos signatários. Este documento regulamenta a exportação, importação e reexportação de animais e plantas e suas partes e derivados, por meio de um sistema de emissão de licenças e certificados.

### **1.3 Extrativismo Ilegal e Tráfico de Animais Silvestre no Brasil**

O tráfico de animais silvestres constitui o terceiro maior comércio ilícito do mundo, perdendo apenas para o tráfico de narcóticos e armas. Estima-se que o comércio ilegal gire em torno de US\$ 10 a 20 bilhões/ano e a participação do Brasil seria de aproximadamente 5% a 15% deste total, correspondendo à retirada, por ano, entre 12 a 38 milhões de animais silvestres das matas brasileiras (RIBEIRO *et al.*, 2007).

Em muitas regiões brasileiras, a população usa como complemento da renda familiar atividades de caça, venda e tráfico de peles, couros ou artefatos provenientes de animais silvestres. Organismos inteiros, partes ou seus subprodutos são rotineiramente utilizados na medicina popular (MOURA *et al.*, 2008). Estas atividades se concentram em poucas espécies de organismos, em geral naqueles já afetados por outras atividades predatórias, colocando, assim, em risco a sobrevivência de espécies de alto valor econômico tanto para o ecoturismo como para o manejo, tais como: onça, anta, veado campeiro, veado do pantanal, araras, entre outros (RENCTAS, 2000).

A confecção de peças de artesanatos é uma forma de manifestação cultural particularmente comum entre os povos indígenas brasileiros e sobre tudo na região mato-grossense. No município de Parintins/AM o IBAMA identificou em um único ano mais de trinta mil peças de artesanatos confeccionados com subprodutos da fauna (penas, plumas, peles, couro, ossos e dentes), sendo estimado que, para tal, tenha sido

abatido cerca de 6.500 animais, sendo metade deles araras (IBAMA, 2003).

Em operação nacional realizada em 2007 pelo IBAMA, em 25 estados e no Distrito Federal, foram apreendidas 8.567 peças de artesanatos que utilizavam ilegalmente partes de animais da fauna silvestre brasileira. Entre os artesanatos apreendidos encontravam-se brincos de penas de araras e papagaios, perfumes feitos a partir de testículos de boto e tampas de vasos sanitários com borboletas (IBAMA, 2007).

Como está exemplificado, os sistemas de segurança nacional e estadual têm atuado fortemente na repressão aos crimes ambientais, principalmente nos que tem causado forte impacto nas populações de animais silvestres, sobretudo nas espécies ameaçadas de extinção. No entanto, a apreensão é apenas o início de um longo processo até a condenação do autor do delito.

Com o intuito de coibir as ações delituosas contra o meio ambiente, o estado de Mato Grosso implantou, em agosto de 1996, o primeiro juizado volante ambiental (JUVAM) do país (TEIXEIRA, 2002). O juizado ambiental funciona como uma equipe volante que recebe as denúncias e se desloca até o local, com a finalidade de fazer a constatação *in loco*, quantificar o dano ambiental e apresentar sugestões para reparação (quando for o caso). Na figura 02 é apresentado um fluxo processual para melhor entendimento do trabalho do JUVAN. Nesse contexto cabe à Perícia Oficial do Estado a elaboração de laudo técnico de constatação e quantificação dos danos causados e, quando envolver crime contra a fauna, a devida identificação das espécies envolvidas.

A Lei de Crimes Ambientais, a Convenção Internacional sobre Comércio de Espécies da Fauna e da Flora Ameaçada de Extinção e a Lista nacional das Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção, que são as três principais normas brasileiras sobre crimes contra a fauna, utilizam o conceito de espécie para determinação do ato criminoso. As duas principais categorias para classificação de espécies, na esfera penal, consistem em (1) espécie pertencente a fauna silvestre (em contraposição com as espécies domésticas) e (2) espécie incluída em lista de espécie ameaçada. Assim, é crucial para a justiça brasileira a correta e rápida identificação da espécie animal vítima de crime e a sua classificação em categorias definidas, para o devido enquadramento

legal, julgamento do infrator e definição de sua pena.

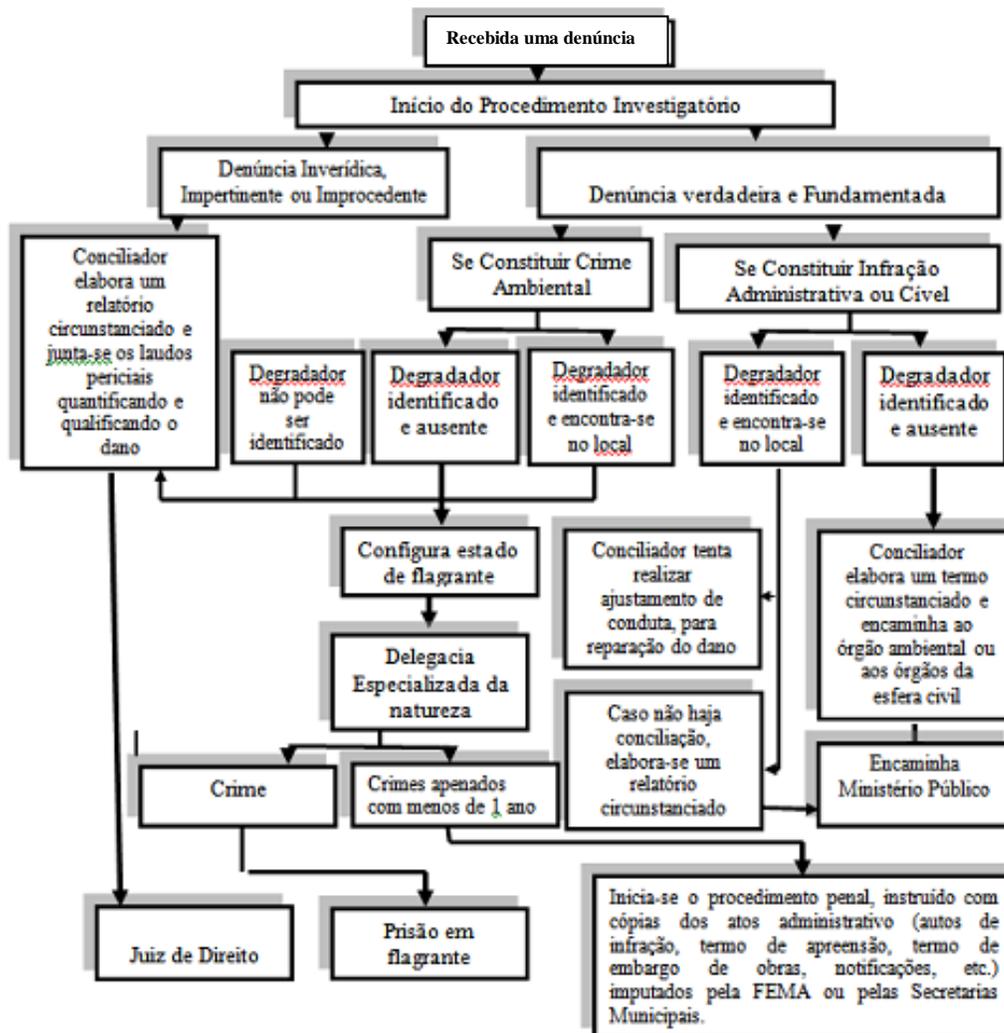


Figura 2. Fluxo de atuação do JUVAM. Fonte: Teixeira (2002).

#### 1.4 Técnicas de Identificação Animal

Todos os fundamentos clássicos de comparação, identificação e classificação de espécies e demais grupos taxonômicos baseiam-se nas características morfológicas, muitas vezes presentes apenas nos indivíduos adultos. Técnicas inusitadas, como a que utiliza do conhecimento de populações indígenas e locais para a identificação de restos orgânicos deixados pelos animais (tais como fezes e restos de tecidos), apesar

de terem se mostrado eficientes e na maioria das vezes servirem como primeiro direcionamento para a identificação da espécie, não são completamente aceitas por cientistas como uma forma de identificação (ZUERCHER *et al.*, 2003). A maioria dos peritos utiliza-se de comparativos morfológicos na solução de crimes contra a fauna brasileira, o que tem se mostrado uma ferramenta extremamente eficiente, principalmente quando se tem o espécime inteiro. Normalmente avalia-se a disposição e padrão de cor da pelagem, estrutura óssea, estrutura dentária e estrutura dos pelos e penas. Nos casos em que o objeto a ser identificado não passa de pequenos fragmentos do animal, a biologia molecular tem sido a técnica de eleição.

#### 1.4.1 Identificação por pelos e penas

A identificação animal através de pelos e penas pode ser realizada de duas formas: através da avaliação morfológica do padrão de disposição e de coloração e através das análises micro-estruturais.

Apesar de estar mais relacionado ao ambiente a que a espécie está adaptada do que à uma herança filogenética (ORTOLANI *et al.*, 1996), em alguns grupos o padrão de coloração dos pelos e penas fornece ótimos indicativos para a identificação da espécie, como ocorre, por exemplo, com os felinos e psitacídeos (ALLEN *et al.*, 2010).

A pelagem ou revestimento de pelos varia em comprimento, densidade, textura e cor nas diferentes espécies. É mais densa em mamíferos árticos, mas fina e curta em espécies tropicais. Elefante, rinoceronte e hipopótamo são, como os humanos, esparsamente cobertos de pelos. A pelagem em muitos mamíferos é diferenciada em uma densa e fina lanugem que atua no isolamento do corpo e um número menor de pelos de guarda mais pesados e longos, que atuam protegendo contra o desgaste (NYBAKKEN *et al.*, 2002).

Assim como ocorre com os pelos no caso dos mamíferos, para as aves o padrão de coloração das penas tem determinante importância na classificação específica. No entanto, nestes casos devem ser tomados cuidados especiais, pois é muito comum nas aves o dimorfismo sexual baseado no padrão de plumagem e a sua diferenciação de acordo com a idade do espécime (GONÇALVES, 2009).

Inúmeros métodos para estudo de pelos tem sido desenvolvidos e aperfeiçoados por tricólogos de vários países, produzindo bons resultados, com suas vantagens e desvantagens, mas sempre caracterizado por ser uma técnica de baixo custo. A identificação de animais silvestres pode ser feita utilizando características microestruturais dos pelos. Segundo ORR (1986), os pelos são formados por três camadas concêntricas de células queratinizadas, sendo o núcleo interior, chamado de medula, consiste de células, cuboidais. Por fora da medula, está a camada cortical. A extensão relativa desta camada externa varia de espécie para espécie. A camada externa é composta de cutícula. A cutícula consiste de células achatadas em forma de escama. Estas escamas variam muito na forma e disposição, nas diferentes espécies de mamíferos.

Tal identificação permite a comparação das características de cada pelo, associando-os às espécies, contribuindo assim para as pesquisas taxonômicas, ecológicas, paleontológicas, arqueológicas e forenses.

Estruturalmente, as três camadas que formam os pelos apresentam padrões morfológicos que, combinados entre si, conferem a uma determinada espécie características diagnósticas específicas, sendo, portanto, estruturas anatômicas de grande valia na identificação das espécies (QUADROS *et al.*, 2006).

Na ciência forense, o método de identificação por pelos e penas em soluções de crimes contra a fauna tem suas vantagens por ser econômico, normalmente utilizando somente lâminas e microscópio para a análise, de fácil identificação por existir estudos prévios fornecendo uma referência para comparação, e também por ser rápido. Porém a identificação por este método é inviabilizada se o material apreendido não contiver pelos, se as características morfológicas não forem suficientemente diferenciadas para permitir a identificação específica ou se o mesmo apresentar pelos que não estejam infiltrados na pele de forma natural, pois, com isso, a hipótese de que o pelo encontrado na amostra não seja do referido animal torna a identificação questionável.

#### 1.4.2 Identificação por morfologia dos dentes e ossos

Quando é solicitada perícia em animal que esteja em estado de putrefação ou até mesmo já decomposto, é comum encontrar apenas a arcada dentária e/ou restos do esqueleto ósseo. Nestes casos, essas estruturas podem ser as únicas fontes de informações para a identificação do animal. Delas pode-se obter, dentre outras informações, a diferenciação da disposição dos dentes, sendo proporcional aos hábitos alimentares de cada indivíduo, formato e medidas dos ossos torácicos, craniano e membros pélvicos (ARAUJO, 2003).

Os especialistas em mamíferos fazem as identificações através das medições do comprimento total do animal, sendo as principais: da ponta do focinho à última vértebra caudal, o comprimento da cauda (da base à última vértebra), o comprimento da pata posterior (do calcanhar à ponta da garra mais longa) e o comprimento da orelha. Estes dados obtidos são extremamente úteis para se determinar a média das dimensões extremas do corpo (HILDEBRAND e GODLOW, 1995).

Segundo Hildebrand e Godlow (1995), muitas outras medidas cranianas são usadas por especialistas para identificação de vários grupos. Por exemplo, entre os roedores, o comprimento do diastema, ou espaço entre os incisivos mais extremos e os primeiros dentes molariformes, é uma medida, muitas vezes, valiosa (Figura 3). Estes autores ainda afirmam que os dentes possuem uma importância desproporcional para a morfologia dos vertebrados quando se considera sua contribuição para a massa corpórea. A grande variação de detalhes estruturais entre os grupos de vertebrados, combinada com a relativa estabilidade estrutural dentro dos grupos, faz com que os dentes apresentem inestimável importância para a sistemática; os especialistas são capazes de identificar a maioria das espécies de mamíferos a partir de um único molariforme.



**Figura 3.** Arcada dentária de um vertebrado superior (cateto), demonstrando a disposição dos dentes em grupos com funções diferentes e evidenciando o espaço entre os caninos e a região dos molares (seta). Fonte: Bengtson (2010).

Os métodos de identificação morfológica são muito eficientes, no entanto só podem ser utilizados quando se tratar de organismos completos ou que contenha, ao menos, as principais estruturas utilizadas em cada um dos métodos. Segundo informações do Delegado João Henrique de Brito Santos (Comunicação pessoal), que integra o grupo da Delegacia Especializada do Meio Ambiente do estado de Mato Grosso (DEMA/MT), aproximadamente 17% das apreensões realizadas pelos órgãos de fiscalização ambiental do Estado são compostos por apenas fragmentos de espécimes, tais como sangue, penas, dentes, pelos, ossos, etc. Nestes casos a identificação com bases nos caracteres morfológicos se torna particularmente difícil ou muitas vezes impossível, tornando a utilização forense de sequências gênicas, no momento, a única ferramenta que permitiria a identificação da espécie.

#### 1.4.3 Cristais de hemoglobina

Na ciência forense as técnicas de cristais de hemoglobina são normalmente empregadas em pesquisas de manchas de sangue provenientes de local de crime com o objetivo de determinar a origem da mancha, se animal ou humana. A técnica consiste na reação do sangue com diferentes reagentes (dependendo da técnica adotada utiliza-

se uréia, oxalato de Amônia, piridina, etc.) e observação desses cristais em microscópio óptico. Segundo alguns autores, o padrão óptico do arranjo estrutural dos cristais de hemoglobina é característico em algumas espécies animais. Os dois testes de cristalização de sangue mais comuns são os Testes de Teichman e Takayama (ROLIM, 2009). O teste de Teichman é baseado na formação de hematina por aquecimento da mancha de sangue na presença de um haleta de ácido acético glacial, formando cristais rômnicos marrons. O Teste de Takayama é baseado na formação de hemocromogêneo por aquecimento da mancha de sangue na presença de piridina e glicose sob condições alcalinas (VIRKLER, 2009).

Francesquini-Júnior *et al.* (2002) testaram o uso da técnica de cristais de hemoglobina na identificação de capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*), no entanto os resultados encontrados não foram conclusivos quanto a eficácia da técnica para identificação animal.

#### 1.4.4 Identificação a partir do Sequenciamento do DNA

Desde a descrição de sua estrutura por Francis Crick e James Watson em 28 de fevereiro de 1953 (WADE, 2003), o DNA tem sido reportado como a molécula da vida. A primeira aplicabilidade do conhecimento sobre o DNA na área forense se deu em 1986, na solução de um assassinato de duas garotas em Leicestershire – Inglaterra.

Após este fato muitas aplicabilidades foram dadas aos conhecimentos sobre essa molécula. Aqui cabe ressaltar a utilidade que vem tendo o DNA na identificação de espécies animais.

A importância dessa ferramenta fica evidente principalmente quando é considerada a dificuldade de se classificar diferentes organismos que são muito semelhantes, mas que se tratam de espécies diferentes, ou organismos de mesma espécie que apresentam extremo dimorfismo sexual, o que poderia levar a acreditar que se tratam de organismos diferentes, ou caso de formas juvenis (larvas ou ovos) que nem mesmo especialistas conseguem diferenciar, ou ainda espécies que foram fragmentadas e que, por isso, é impossível a sua identificação morfológica.

Estudos envolvendo a utilização de marcadores moleculares na identificação de

espécies têm sido relatados em diversos trabalhos. Silvério (2010) descreve o uso do sequenciamento do gene citocromo C oxidase na identificação de tubarões no litoral de São Paulo. Herbert *et al.* (2009) e Chang *et al.* (2009) relataram sucesso no uso de sequências do gene citocromo oxidase I (COI) para a identificação de 1327 espécies de lepidópteros e 47 espécies de minhocas, respectivamente. Rach *et al.* (2010) usaram sequência de gene mitocondrial da região ND1, obtendo êxito na identificação de 833 indivíduos de Odonatas. Trabalhando com sequências do gene do citocromo oxidase B (Cytb), Meganathan *et al.* (2009) identificaram seis espécies de crocodilos. Na área forense, também utilizando sequência do gene do citocromo oxidase B, Jacques (2005) chegou à identificação específica de 58 ovos apreendidos pela Polícia Federal em aeroporto do nordeste brasileiro. Caniglia *et al.* (2010), utilizando 12 microssatélites autossômicos, identificaram a origem de 10 dentes caninos utilizados na confecção de um colar.

Em trabalho que envolveu a identificação de espécies presentes em amostras que continham misturas de carnes, Chen *et al.* (2010) utilizaram uma técnica que consistia na “quebra” das sequências, obtidas dos genes do Cytb, por enzimas de restrição. Neste caso foram utilizadas as enzimas AluI, BsaJI, RsaI, MseI e BstUI. Ao invés de sequências gênicas, foi obtido um padrão de bandas de DNA em gel de agarose, resultante da quebra da molécula em diferentes tamanhos por diferentes enzimas nas diferentes espécies.

Outra técnica, diferenciada das relatadas até então, foi utilizada para a autenticação da origem de amostras biológicas em materiais encaminhados para análise de cavalo de corridas e a sua possível mistura com material biológico humano. Neste caso foi utilizada a técnica de STR (*Short Tandem Repeat*), com conjuntos de primers específicos para genotipagem de DNA de origem equina e de origem humana (Chen *et al.*, 2010).

Com relação a utilização de sequenciamento como ferramenta de identificação de material biológico, entre os genes mais comumente sequenciados estão os genes mitocondriais. O interesse pelo estudo de gênese localizado neste DNA extranuclear se deve a particularidades encontradas em seu genoma, como sua herança quase que exclusivamente materna e por ser haplóide, o que impede (ou torna muito raro) os

eventos de recombinação. Ainda, as taxas de evolução dos genes mitocondriais são diferentes da do DNA nuclear. Por exemplo, a taxa em que o DNA mitocondrial humano acumula mutações foi estimada em 4-2% por milhões de anos, o que representa uma taxa mais que dez vezes superior àquela observada para o gene nuclear da globina (LEWIN, 1994).

Ainda assim, não há um consenso sobre qual sequência gênica do DNA mitocondrial deve servir de padrão para a identificação específica. Em 2003 surgiu um movimento para se criar uma espécie de código de barra da vida (*Barcode life* ou *DNA barcoding*), onde cada organismo teria a sua sequência de DNA depositada num banco de dados (BOLD) e, em teoria, seria então possível identificar a qual espécie pertence um determinado indivíduo baseada na comparação entre a sequência obtida e aquela depositada nesse Banco de Dados (RATNASINGHAM *et al.*, 2007). O DNA Barcoding emprega uma sequência curta de 648 pares de bases do citocromo C oxidase I (COI) como sequência padrão para a identificação das espécies (HEBERT *et al.*, 2003a; SAVOLAINEN *et al.*, 2005).

Ainda que o padrão de código de barras que tem sido utilizado seja o do gene citocromo c oxidase I (COI), o gene mitocondrial do citocromo *b* (*cytb*) também tem sido utilizado há bastante tempo em estudos sobre a biologia evolutiva dos animais (KOCHER *et al.*, 1989), o que gerou uma quantidade não desprezível de sequências nucleotídicas já depositadas nos bancos de dados. Comparando sequência de Mammalia e Sauropsida depositadas no *Genbank*, Jacques (2005) encontrou quatro vezes mais sequências do *Cytb* que do COI. Números semelhantes foram encontrados para o grupo Mammalia em consulta realizada por este autor em 2010 (Tabela 1).

**Tabela 1.** Número de sequências dos genes *Cytb* e COI dos grupos Mammalia e Sauropsida depositadas no GenBank em 2005 e 2010.

ANO	GRUPO	<i>Cytb</i>	COI
2005	Mammalia	15.308	4.402
	Sauropsida	13.555	2.912
2010	Mammalia	41.157	10.001
	Sautopsida	31.612	12.614

A identificação específica por sequências de DNA funciona de forma

comparativa, ou seja, normalmente compara-se o perfil da amostra questionada (o qual procura-se identificar) com um perfil referência da mesma espécie (devidamente identificado), que normalmente estará depositado em um banco de dados. Um banco que contenha as sequências de interesse para o seu objetivo é crucial para o sucesso da identificação.

### 1.5 Banco de dados

Por definição, podemos considerar um banco de dados como uma coleção de dados inter-relacionados, projetado para suprir a necessidade de um grupo específico de aplicações e usuários (PROSDOCIMI *et al.*, 2010). A combinação de baixo custo e rapidez no sequenciamento tem levado à multiplicação dos dados de sequências, destacando aqui o completo sequenciamento do genoma humano, levando a um expressivo aumento do número de bancos de dados Biológicos. O relatório da 18ª Edição Anual de Banco de Dados descreve aproximadamente 180 Bancos de dados *online* e recursos de Banco de Dados que congregam uma variedade de dados de Biologia molecular, como frequências de genes Imunogenéticos na população mundial (Allele Frequency Net, disponível em <http://www.allelefrequencias.net>), Dados de bases de genoma bovino (Bovine Genome, disponível em <http://BovineGenome.org>) e Fator de Transcrição de *Drosophila* e seus Ligantes Específicos (Fly Factor survey, disponível em <http://pgfe.umassmed.edu/TFDBS/>). A grande maioria destes bancos não estão interligados, porém há exceções, tais como o *International Nucleotide Sequence Database collaboration* (INSDC), grupo que conta com a participação de três banco de dados colaboradores: o *DNA Data Bank of Japan* (DDBJ), o *European Nucleotide Archive* (ENA) do *European Bioinformatics Institute* (EMBL – EBI) e o *GenBank* do *US National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (GALPERIN, 2011).

Os bancos de dados envolvendo sequências de nucleotídeos, de aminoácidos ou estruturas protéicas podem ser classificados em banco de dados de sequências primárias e secundárias. Os primeiros são formados pela submissão direta de sequências de nucleotídeos, aminoácidos ou estrutura protéica, sem qualquer processamento ou análise. Os principais bancos de dados primários são o *GenBank*, o EBI (*European Bioinformatics Institute*), o DDBJ (*DNA Data Bank of Japan*), o BOLD

(*Barcode of Life Data system*) e o PDB (*Protein Data Bank*). Os Bancos de dados secundários derivam dos primários, usando as informações inicialmente depositadas nestes bancos. Temos como exemplos de bancos secundários o PIR (*Protein Information Resource*) e o SWISS-PROT, este último é um banco de dados onde as informações das sequências de proteínas são anotadas e associadas às informações sobre função, domínios funcionais, proteínas homólogas e outros.

Como neste trabalho temos especial interesse pelos bancos de dados que congregam informações de sequências primárias de nucleotídeos, uma vez que será esta a matéria prima das nossas análises, serão apresentadas a seguir as principais características dos bancos de dados que serão utilizados como referência: o INSDC (que integra o *DNA Data Bank of Japan*, o *European Nucleotide Archive* e o *GenBank*) e o BOLD (*Barcode of Life Data System*).

#### 1.5.1 *DNA Data Bank Japan - DDBJ*

O *DNA Data Bank Japan* (DDBJ, disponível em [HTTP://www.ddbj.nig.ac.jp](http://www.ddbj.nig.ac.jp)) é um dos três bancos que compõe o *International Nucleotide Sequence Database* (INSD). Ele é administrado pelo *Center for Information Biology* do *National Institutes of Genetics*, com financiamento do Ministério Japonês de Educação, Cultura, Esporte, Ciência e Tecnologia. Uma avaliação das informações depositadas entre o período de julho de 2009 e junho de 2010 mostrou que das 14.296.738 entradas de arquivos simples no INSD, representando 10.572.329.252 pares de bases, o DDBJ contribuiu com 25,4% das entradas e 21,5% das adições de pares de bases. A maioria dos dados de nucleotídeos originou-se principalmente de trabalhos submetidos por pesquisadores japoneses, chineses, coreanos e tailandeses (KAMINUMA *et al.*, 2011). O DDBJ também mantém bases de dados secundários a partir da reanálise ou modificação de arquivos de sequências de nucleotídeos depositados no INSD, como perfis gravados de aminoácidos extraído dos arquivos de sequências de nucleotídeos do INSD (KOSUGE *et al.*, 2006).

### 1.5.2 *European Nucleotide Archive* - ENA

O *European Nucleotide Archive* (ENA, disponível em [www.ebi.ac.uk/en](http://www.ebi.ac.uk/en)), assim como o DDBJ, faz parte do INSD e é financiado pela *European Molecular Biology Laboratory*, *European Commission* e *Wellcome Trust*. Ele opera como um arquivo público de sequências nucleotídicas que armazena as bases de dados de sequências brutas, informação de *Assembly* e anotações funcionais. Em outubro de 2010, o ENA (na base colaborativa do INSDC) continha aproximadamente 500 bilhões de perfis, consistindo de aproximadamente 50 trilhões de pares de bases (LEINONEN *et al.*, 2011). O ENA trabalha com três bases de dados principais: o *Sequence Read Archive* (SRA), o *Trace Archive* e o *EMBL-Bank*.

O SRA é uma base de dados de leitura de sequências brutas que aceita submissões das plataformas de sequenciamento de última geração. Ela possui um serviço para suporte de submissão de dados confidenciais, tipicamente de amostras clínicas que são submetidas para a *European Genome-phenome Archive* (EGA, disponível em <http://www.ebi.ac.uk/ega>). Dados submetidos ao EGA não fazem parte da base de dados pública do SRA e são excluídos do INSDC.

*EMBL-Bank* é uma base de dados de nucleotídeo associada a anotações biológicas e anotações bibliográficas. Ela contém uma grande diversidade de dados de patentes, TAG expressado da sequência (EST) e genomas completos (LEINONEN *et al.*, 2010).

O *Trace Archive* é um repositório de sequências brutas geradas a partir de sequenciamento de grandes dimensões. Ela é a única fonte de dados de sequências de projetos que necessitam do genoma completo. Usuários podem pesquisar o arquivo pelo BLAST ou por outras opções como arquivo *fasta*, índices de qualidade e de dados auxiliares (NSDL).

### 1.5.3 *GenBank*

O *GenBank* é um banco de dados público de sequências de nucleotídeos e proteínas, formulado e distribuído pelo *National Center of Biotechnology Information* (NCBI), uma divisão do *National Library of Medicine* (NLM), localizado no campus do

*US National Institute of Health* (NIH) em Bethesda (BENSON *et al.*, 2002). O GenBank, assim como os outros colaboradores do INSDC, dispunham, até meado de setembro de 2010, de 500 bilhões de perfis consistindo de 50 trilhões de pares de bases. Em termos de submissão de Pares de bases, os maiores contribuidores incluem o *Broad Institute*, *Washington University* em *St Louis*, o *Wellcome Trust Sanger Institute* e *Baylor College of Medicine* com 34, 15, 13 e 12% de contribuição, respectivamente. A recomendação para submissão dos dados é que seja nos formatos SRF (*Sequence Read Format*) ou SFF (*Standard Flowgram Format*), dependendo da plataforma usada para gerá-los (LEINONEN *et al.*, 2010).

Cada entrada do *GenBank* inclui uma descrição concisa da sequência, nome científico, taxonomia do organismo pesquisado e referências bibliográficas. A ela é atribuído um número de adesão que é único, não muda mesmo quando houver uma mudança na sequência ou anotações. A fim de acompanhar as modificações nos dados da sequência original, o NCBI adicionalmente atribui a cada sequência um identificador único, chamado de número "GI". Quando uma mudança ocorre em uma sequência, um número "GI" novo é atribuído à nova versão da sequência.

Por acordo entre os bancos de dados de sequência de DNA colaborativo, um terceiro identificador foi introduzido em fevereiro de 1999, consolidando as informações presentes nos números "GI" e de adesão, é o registro "Version". Ele equivale ao número de adesão seguido por ".1" na primeira versão. Por exemplo, uma entrada que aparece no banco de dados, pela primeira vez tem um número equivalente de versão para o número de adesão, seguido de ".1" para refletir que esta é a primeira versão da sequência nesta entrada. Por exemplo:

ACCESSION AF000001

VERSION AF000001.1 GI: 987654321

Se houver mudanças na sequência nucleotídica, então assim ocorrerá para os números "GI" e o *Version*, mas o número de *Accession* permanecerá o mesmo.

Os dados no *Genbank*, assim como dos outros colaboradores do INSDC, são oriundos de duas fontes: pesquisadores individuais que submetem dados diretamente para uma das bases de dados e submissões em grandes volumes de Centros de pesquisas. Independente da origem, toda submissão recebe uma sistemática revisão

de qualidade incluindo checagem para contaminação por vetores, verificando correta tradução da região codificante, checagem da correta taxonomia e citações bibliográficas. A maioria das submissões são feitas via web e o *GenBank* oferece algumas ferramentas que auxiliam neste trabalho:

1. *Bankit* – com o *Bankit* o autor entra com a informação da sequência diretamente em um formulário, edita como necessário e adiciona anotações biológicas. O *Bankit* antes de validar as submissões sinaliza a ocorrência de erros comuns e verifica se há contaminações por vetores, usando uma variante do *Blast* chamado de *Vecscreem* (BENSON *et al.*, 2002).
2. *Sequim* - é um programa *stand-alone* multiplataforma que serve à manipulação de sequências simples, longas e entradas segmentadas, para os quais o *Bankit* e outras ferramentas de apresentação baseada na web não são adaptados. O *Sequim* possui convenientes recursos de edição e capacidade de anotações mais complexas, assim como recursos de funções de validação que ajudam a assegurar maior qualidade das sequências submetidas. Ele foi desenvolvido para facilitar a submissão de informações de estudos de filogenia, estudos de populações, estudos de mutação e amostras ambientais, e pode incorporar dados de alinhamento.

As ferramentas discutidas até então, dão uma idéia de como inserir as informações nos bancos de dados, mas as recuperações desses dados também fazem uso de sistemas específicos. As duas principais plataformas de recuperação de dados são o *Entrez* e o *Blast*.

1. *Entrez* – é uma base de dado integrada ao sistema de recuperação de dados que acessam dados de sequências de DNA e proteínas, dados de mapeamento genômico, grupos de populações, grupos filogenéticos, grupos de amostras ambientais, dados de expressão gênica, taxonomia, informações de domínio da proteína, estruturas de proteínas da base de dados de modelagem molecular (MMDB) e referências via PubMed (MEDLINE).
2. *Blast* – Um dos mais frequentes tipo de uso dos dados do *GenBank* é para pesquisa de similaridade para uma sequência “*Query*” (sequência consulta). Para isso o sistema *Blast* é a melhor ferramenta disponível. A família de programas

*Blast* localiza o melhor alinhamento entre uma sequência “*Query*” e sequências da base de dados. Como foi esta a ferramenta mais utilizada neste trabalho, faremos uma discussão mais aprofundada dela em capítulo próprio.

#### 1.5.4 BOLD – *Barcode Of Life Data Systems*

O BOLD é um banco de dados administrado pelo *Consortium for the Barcode of Life* (CBOL). O CBOL foi lançado em maio de 2004 e já inclui mais de 120 organizações de 45 nações. O CBOL é responsável por promover o desenvolvimento da Aliança Internacional de Pesquisa, a qual objetiva construir, nos próximos 20 anos, uma biblioteca *barcode* para todos os eucariotos vivos, iniciando com as 1,7 milhões de espécies catalogadas até então e posteriormente inserindo as espécies ainda desconhecidas cuja previsão é que variem entre 10 e 20 milhões de espécies (RATNASINGHAM, 2007). Uma campanha global, iniciada já em 2004, objetiva realizar sequenciamento do código de barra de todas as aves e peixes conhecidos até 2012 (MARSHALL, 2005).

Como já mencionado, o *barcoding* emprega uma região de 648 pb da sequência do COI como padrão para o código de barras, vários estudos demonstraram a efetividade dessa sequência na identificação de mais de 95% das espécies animais (HERBERT, et al., 2009). Apesar disso, alguns grandes obstáculos permanecem, um deles é a própria técnica: não há unanimidade na afirmação de que um simples e único segmento de DNA possa servir de padrão para todas as espécies animais, e no caso das plantas já se tem praticamente certo que não podem ser rastreadas pelo gene COI (nesse caso propõe-se utilizar genes do cloroplasto). Os anfíbios também representam um desafio, pois em muitos indivíduos o gene COI varia tanto de um indivíduo para outro que não podem ser utilizados de forma confiável para marcar espécies (MARSHALL, 2005).

Alguns desafios, como a necessidade de organização dos grandes volumes de dados gerados e a necessidade de estabelecer e cumprir normas de padronização destes dados, fez com o CBOL inicia-se um diálogo com os grandes repositórios genômicos (Ex.: NCBI), Organizações sobre biodiversidade (Ex.: *Global Biodiversity Information Facility* – GBIF), grandes centros *barcoding* e comunidades taxonômicas.

Estas consultas já levaram à criação formal de orientações que devem ser cumpridas para que os registros ganhem a designação de *Barcode*. As sequências de genes devem derivar de uma designada região do gene, deve atender aos padrões de qualidade e deve derivar de um modelo cuja atribuição taxonômica possa ser revista (MILLER, 2006).

Embora o BOLD realize a montagem dos dados *barcode* e as mantenham armazenadas, uma cópia de todas as sequências e dados de espécimes chaves também migram para o NCBI ou outros bancos (EMBL e DDBJ) logo que os resultados estejam prontos para a consulta pública.

Qualquer pesquisador pode se tornar um usuário BOLD e submeter seus projetos, bastando para isso apenas o preenchimento de um formulário (disponível em [www.barcodinglife.org/views/newuserapp.php](http://www.barcodinglife.org/views/newuserapp.php)). Quando um projeto é criado, obrigatoriamente dois elementos são combinados a cada espécie gravada: um número ID da amostra e uma atribuição taxonômica. No entanto, o registro da espécie não irá receber um código *barcode* formal até que sete elementos de dados estejam em vigor:

1. Nome da espécie;
2. Dados do Voucher;
3. Dados da coleta (coletor, data da coleta e localização com coordenadas GPS);
4. Identificador da amostra;
5. Sequência COI de ao menos 500pb;
6. Primers da PCR usado para gerar o amplicon;
7. Arquivos de rastreio.

Embora esses critérios devam ser satisfeitos para receber o status formal de sequência *Barcode*, dados que faltarem um ou mais desses campos poderão ser recebidos no BOLD, por exemplo: embora o *barcode* demande um padrão com ao menos 500pb, com menos de 1% Ns (nucleotídeos ambíguo), o BOLD permite a injeção de sequências mais curtas, sem o limite máximo de Ns.

O BOLD aplica algumas ferramentas para identificar anomalias de dados ou registros de baixa qualidade. Todas as sequências apresentadas são primeiramente traduzidas em aminoácidos e são comparados contra um modelo oculto de Markov para

verificar se eles realmente derivam do COI. Sequências que passam por esta checagem são então examinados para códons de paradas (para detectar possíveis pseudogene) e são também comparadas com um grupo de sequências de possíveis contaminante (sequência do genoma humano, por exemplo).

#### 1.5.5 Entrada dos dados nos bancos de dados

O processo de identificação forense tem início com a apreensão das amostras, normalmente pedaços de carne, pelos, pele, penas, dentes ou outras amostras biológicas. Após o devido registro, descrições de suas características macroscópicas, medidas e fotografias, o material é então encaminhado para o processo laboratorial (Figura 4). Depois de todo tratamento laboratorial, quando já se têm em mãos a sequência gênica da amostra questionada, são realizadas as análises e edições necessárias para submissão da sequência à base de dados para a pesquisa de similaridade.

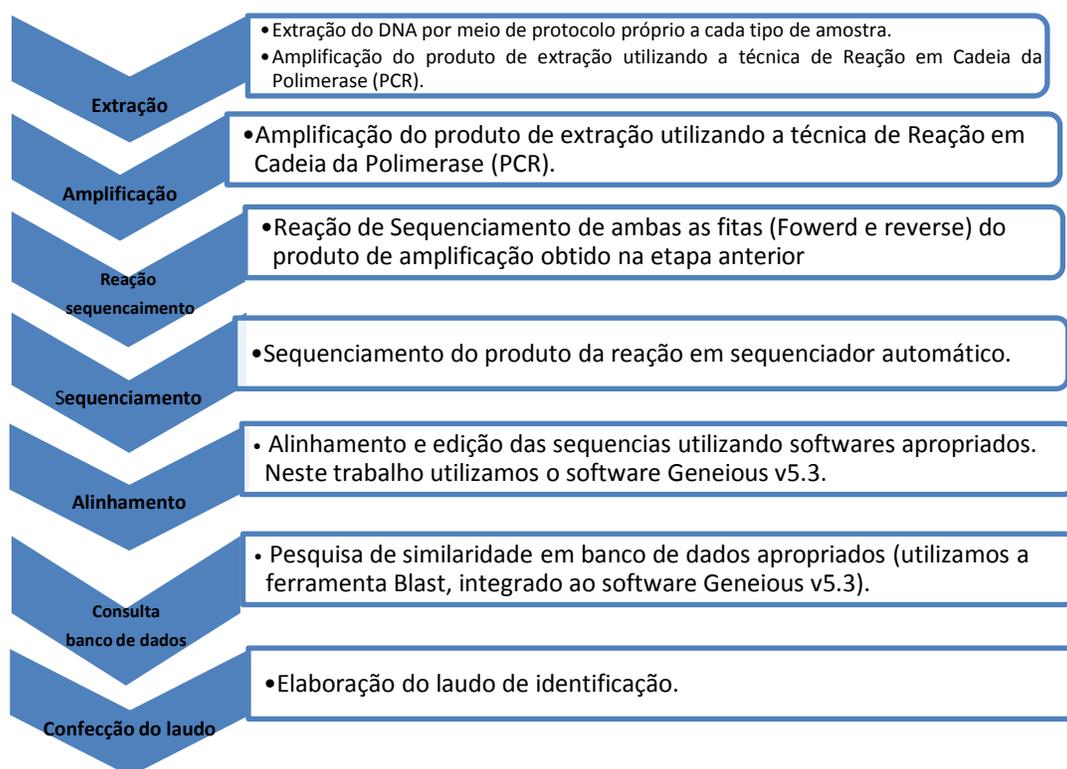
Os dados brutos provenientes do sequenciador, chamado de *base calling*, normalmente são submetidos a um programa de *base calling*. No mercado há vários programas de *base calling* (exemplos o Sequence análise, o Bioedit e o Geneious) e muitos deles já trazem integrados outros programas de edição e alinhamento. O arquivo *base calling* carrega os dados do sequenciador e a identificação da sequência gerada, atribuindo um valor de qualidade para cada posição do nucleotídeo. Cada tipo de sequenciador traz associado um programa de *base calling*, no entanto o mais comum deles é o programa PHRED.

De acordo com Prosdocimi *et al.* (2010) o PHRED interpreta dados de sequencias a partir de arquivos SCF (*standard Chromatogram Format*), arquivos de cromatograma dos analisadores automáticos de DNA ABI e arquivos Mega Bace ESD, a partir dos dados brutos do sequenciador reconhece a sequência de nucleotídeos, atribui valores de qualidade às bases constituintes e gera arquivo de saída contendo informações sobre o *base call* e os valores de qualidade.

As pontuações de qualidade inseridas nos arquivos de saída do PHRED representam a probabilidade logarítmica negativa em escala de erro de um *base call*, ou seja, quanto maior o valor de qualidade do PHRED, menor a probabilidade de ter

ocorrido um erro na identificação da base. Só para se ter um parâmetro, um valor de PHRED 20 para uma determinada posição nucleotídica significa que ela apresenta uma chance em 100 de estar errada e um valor de PHRED 30 representa uma chance em 1000.

Outra etapa importante na análise de sequência é o alinhamento. Existem vários programas disponíveis para realizar o alinhamento e a comparação entre sequências biológicas, entretanto entre a comunidade forense os programas *ClustalW* (disponível em <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) e o *Blast* (disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.) são extensivamente os mais usados, entre outras vantagens pelo fato de terem sido projetados para serem executados em plataformas com baixo custo computacional e também por incluírem técnicas para acelerar os processos de comparação. Por estes motivos, foram estas as ferramentas de eleição para a etapa de análises e submissão dos dados.



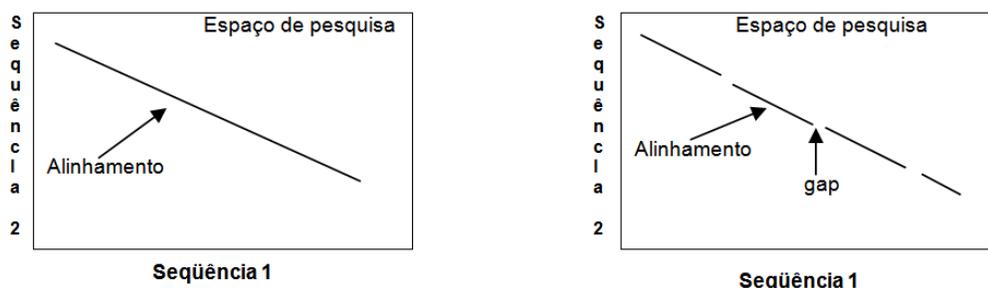
**Figura 4.** Esquemas das etapas do processo de identificação forense por meio de sequência de DNA.

### 1.5.6 *BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)*

O *Blast* é na verdade uma família de programas que pode ser acessado por meio do programa *Blastall*. Entre os membros que compõe a família *Blast* temos:

1. *BLASTP* – compara uma sequência *query* de aminoácidos contra um banco de dados de sequências de proteínas;
2. *BLASTN* – compara uma sequência *query* de nucleotídeos contra um banco de dados de sequências de nucleotídeos;
3. *BLASTX* – compara uma sequência *query* de nucleotídeos traduzidas em todas as seis fases de leitura contra um banco de dados de sequência de proteínas;
4. *TBLASTN* – compara uma sequência *query* de proteínas contra um banco de dados de sequência de nucleotídeos dinamicamente traduzido em todas as fases de leitura;
5. *TBLASTX*- compara as traduções das seis fases de uma sequência *query* de nucleotídeos contra as traduções das seis fases de leitura de um banco de dados de sequência de nucleotídeo.

A principal utilidade do *Blast* neste trabalho foi para a comparação entre uma sequência de nucleotídeo fornecido pelo usuário (*query*) com inúmeras outras contidas no banco de dados. A comparação das sequências ocorre por alinhamento par a par, onde cada par de letras semelhantes recebem um *score* que é determinado por uma matriz de *score*, na qual os valores são determinados empiricamente. Essa sequência de letras pareadas pode conter *gaps*, que são espaços de não pareamento. Analogamente esse alinhamento pode ser imaginado como um espaço de pesquisa entre duas sequências, estando uma no eixo X e a outra no eixo Y, cada ponto neste espaço representando o pareamento entre duas letras e os *gaps* aparecendo como espaços interrompidos. Sendo assim, quando em uma sequência não houver *gap*, esta seria representada por uma linha diagonal contínua, caso contrário esta linha estaria interrompida uma ou mais vezes (CRUZ, 2006) (Figura 5).



**Figura 5.** Desenho esquemático do espaço de pesquisa e alinhamento.

Quando houver a ocorrência de *gaps* em uma seqüência, o seu *score* será a soma dos *scores* dos pares de letras menos os “custos” para os *gaps*.

Sabidamente algumas substituições são mais prováveis de ocorrer que outras, como foi citado anteriormente, no caso das mutações pontuais, onde há troca de um único nucleotídeo por outro, a ocorrência de uma transversão (troca de uma base purínica por uma pirimidínica ou o inverso - C/T ↔ A/G) é menos comum que a ocorrência de uma transição (troca de uma base purínica ou pirimidínica por outra do mesmo grupo - A ↔ G / C ↔ T) (FREESE, 1959). Nas seqüências de proteínas, a substituição de uma isoleucina por uma valina ou de uma serina por uma treonina, causam menos alterações danosas à função da proteína, sendo desta forma observada com maior frequência. Considerando esse panorama é estabelecido um esquema de *score* onde alinhamentos idênticos recebem um *score* que é maior do que uma substituição conservativa e, por conseguinte, este último receberá um *score* que é maior que o de uma substituição não conservativa (CRUZ, 2006). A esse sistema de *score*, na qual cada substituição possível recebe um *score* baseado na frequência observada em alinhamentos, recebe o nome de matriz de substituição ou matriz de *score*.

### 1.5.7 CLUSTALW

Quanto à região analisada, o alinhamento de seqüências pode ser classificado em alinhamento global ou alinhamento local. No alinhamento global, as duas seqüências devem ser alinhadas de um extremo ao outro, enquanto que no alinhamento local procura-se alinhar apenas as regiões mais conservadas,

independente da posição relativa de cada região em relação à sua sequência. O ClustalW é uma ferramenta que se presta com excelência à tarefa de alinhamento global de múltiplas sequências e para isso utiliza o método progressivo, o que possibilita maior velocidade das análises (TUIMALA, 2004).

Então, de forma geral, o ClustalW pode ser definido como uma ferramenta de alinhamento múltiplo de sequências de DNA ou proteínas que calcula a melhor opção para a entrada de sequência com base nos parâmetros introduzidos e gera um relatório, de fácil visualização e compreensão, que mostra os melhores alinhamentos baseado em um *score* e uma árvore guia das relações evolutivas das sequências alinhadas (SIMGENE, 2010).

O ClustalW pode reconhecer diversos formatos de arquivos, mas devido à facilidade de download dos banco de dados o formato FastA é o mais utilizado. Diferentes formatos de saída podem ser escolhidos, entre eles o *Clustal format*, *NBRF/PIR format*, *GCG/MSF format*, *GDE format* e o *PHYLIP format*. A opção pelo formato de saída dependerá do que se pretende fazer com os dados nas próximas etapas. Caso a opção seja continuar a construir uma árvore filogenética com o pacote Phylip, o formato Phylip deve ser o escolhido, caso se planeje publicar as sequências a melhor opção é o formato *numbering on* (*NBRF/PIR format*).

Qualquer método de identificação deve obedecer a determinados critérios que os tornem meios seguros de análises (SILVA e PASSOS, 2002). O método de DNA é uma ferramenta extremamente poderosa na repressão do tráfico ilegal de animais silvestres, traz a vantagem de tornar possível a identificação mesmo quando são apreendidas apenas partes do animal, tais como penas, pelos, ossos, dentes e músculo ou ainda quando o espécime alvo encontra-se numa fase de desenvolvimento onde é difícil sua identificação específica, tais como ovos, larvas e pupas (cabe salientar que estes são os tipos de amostras mais comuns na identificação forense). Não resta dúvida sobre o poder do sequenciamento genético como ferramenta para a identificação específica de animais silvestre, mas será que o sequenciamento de regiões curtas do citocromo oxidase b (Cyt b) ou da subunidade I do citocromo oxidase c (COI) são efetivos na identificação específica de amostras degradadas, como ocorre com as amostras forenses?

O presente trabalho se insere num projeto geral de padronização de técnicas de identificação de animais silvestre por meio de sequências de DNA mitocondrial na Perícia Oficial do Estado de Mato Grosso – POLITEC e de qualificação técnica de profissionais para atuar na identificação de animais vítimas de crimes. Com o propósito de contribuir na busca da resposta para esta pergunta e assim auxiliar no trabalho do Perito Criminal e/ou outros pesquisadores que se utilizam do conhecimento genético para a identificação específica ou filogenia animal é que o presente estudo foi desenvolvido.

## **2 OBJETIVOS**

### **Objetivo Geral**

Num contexto geral, estas ações irão contribuir com o conhecimento do perfil molecular das espécies silvestres da região, dar celeridade aos processos que necessitem da identificação específica de espécimes da fauna silvestre e, conseqüentemente, disponibilizar uma ferramenta a mais para evitar que atos delituosos contra a fauna fiquem impunes por falta de provas materiais.

### **Objetivo específico**

1. Testar a eficiência dos segmentos das sequências dos genes mitocondriais do citocromo b e da subunidade I do citocromo C oxidase na identificação específica de animais da fauna silvestre de interesse criminal;
2. Inserir, no banco de dados internacional GenBank, os perfis de sequências de DNA mitocondrial geradas durante a elaboração da pesquisa;

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Materiais Biológicos

O critério para seleção das amostras foi a ocorrência de apreensão e encaminhamento (para a POLITEC) dos animais silvestres na rotina de fiscalização ambiental dentro do estado de Mato Grosso, durante o período de coleta das amostras, que foi de janeiro a junho de 2010 e, também, a disponibilidade de alguns animais de interesse criminal, taxonomicamente identificados, no Zoológico da Universidade Federal de Mato Grosso - UFMT. Deliberadamente classificamos como animais de interesse criminal aqueles que, segundo informações não oficiais dos órgãos de fiscalização do Estado, são os mais visados em crimes ambientais. As amostras estudadas foram divididas em dois grupos, os quais foram chamados de amostras referências e amostras questionadas.

##### 3.1.1 Amostra Referência

As amostras referências consistiram de materiais biológicos oriundos dos seguintes animais, taxonomicamente identificados, do Zoológico da Universidade Federal de Mato Grosso – UFMT: *Brotozeris versicolorus* (Periquito verde), *Pionus menstruus* (Maritaca da cabeça azul), *Amazona aestiva* (Papagaio verdadeiro), *Ara chloroptera* (Arara vermelha), *Ara ararauna* (Arara Canindé), *Anodorhynchus hyacinthinus* (Arara Azul grande), *Ara Macao* (Araracanga), *Mazama gouazoubira* (veado catingueiro), *Nasua nasua* (Quati), *Myrmecophaga tridactyla* (Tamanduá bandeira), *Leopardus pardalis* (Jaguaritica) (Figuras 6 e 7). O Zoológico da UFMT está localizado dentro do *Campus* da Universidade (15°36'26" S, 56°03'51" O) e abriga aproximadamente 469 animais, incluindo répteis, aves e mamíferos dos três ecossistemas regionais: Amazônia, Cerrado e Pantanal. Atualmente o Zoológico da UFMT é a única referência no estado para a guarda de animais apreendidos pelos órgãos fiscalizadores, como a Secretaria Estadual do Meio Ambiente (SEMA), Instituto

Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA), Polícia Florestal e Juizado Volante Ambiental (JUVAN) (UFMT, 2008). Para o tratamento e identificação dos animais, o Zoológico conta com uma equipe exclusiva de biólogos e médicos-veterinários, além de poder contar com professores especialistas do Instituto de Biociências da UFMT, órgão ao qual está subordinado.

Para este trabalho foram coletadas amostras de sangue de três indivíduos de cada espécie, sendo, em seguida, impregnado amostra do material coletado em papel “FTA” (MGM<sup>®</sup>) (Figura 8). As coletas foram realizadas pela equipe Médica-veterinária do Zoológico.



a) *Brotogeris versicolurus* (Periquito verde).



b) *Pionus menstruus* (maritaca da cabeça azul).



c) *Amazona aestiva* (papagaio verdadeiro)



d) *Ara chloropterus* (arara vermelha).



e) *Ara ararauna* (Arara Canindé).



f) *Anodorhynchus hyacinthinus* (Arara Azul)



g) *Ara macao* (Araracanga).

**Figura 6.** Grupo de aves da família Psittacidae do Zoológico da UFMT, taxonomicamente identificados, dos quais foram extraídos amostras de sangue para análise da sequência de DNA (amostras referências). a) *Brotogeris versicolurus* (periquito verde); b) *Pionus menstruus* (maritaca da cabeça azul); c) *Amazonas aestiva* (papagaio verdadeiro); d) *Ara chloropterus* (arara vermelha); e) *Ara ararauna* (arara Canindé); f) *Anodorhynchus hyacinthinus* (arara azul); g) *Ara macao* (araracanga).



a) *Myrmecophaga tridactyla* (tamanduá bandeira).



b) *Leopardus pardalis* (jaguatirica).



c) *Mazama gouazoubira* (veado catigreiro).



d) *Nasua nasua* (quati).

**Figura 7.** Grupo de mamíferos do Zoológico da UFMT, taxonomicamente identificados, dos quais foram extraídos amostras de sangue para análise da sequência de DNA (amostras referências). a) *Myrmecophaga tridactyla* (tamanduá bandeira); b) *Leopardus pardalis* (jaguatirica); c) *Mazama gouazoubira* (veado catigreiro); d) *Nasua nasua* (quati).



**Figura 8.** Coleta de sangue da região interna da asa das aves.

### 3.1.2 Amostra Questionada

As amostras questionadas consistiram de partes de animais silvestres apreendidos pelos órgãos de fiscalização ambiental e encaminhados ao Laboratório Forense da POLITEC (Tabela 2). A denominação citada neste grupo como provável nome da espécie corresponde ao nome popular constante no ofício da autoridade solicitante e ao respectivo nome científico da espécie de maior ocorrência na região para aquele nome popular (Figura 9).

**Tabela 2** - Amostras questionadas apreendidas pelos órgãos de fiscalização ambiental e encaminhadas ao Laboratório Forense da POLITEC.

<b>Nome científico da Provável Espécie</b>	<b>Nome Popular da Provável espécie</b>	<b>Tipo de amostra</b>
<i>Pecari tajacu</i>	Cateto	Tecido muscular
<i>Euphractus sexcinctus</i>	Tatu peba	Tecido muscular
<i>Dasyprocta aguti</i>	Cutia	Tecido muscular
<i>Leopardus pardalis</i>	Jaguaritica	Fragmento da pele
<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	Capivara	Tecido muscular
<i>Leptotila sp.</i>	Juriti	Tecido muscular
<i>Rhynchotus rufescens</i>	Perdiz	Tecido muscular
<i>Tupinambis sp.</i>	Teiú	Tecido muscular

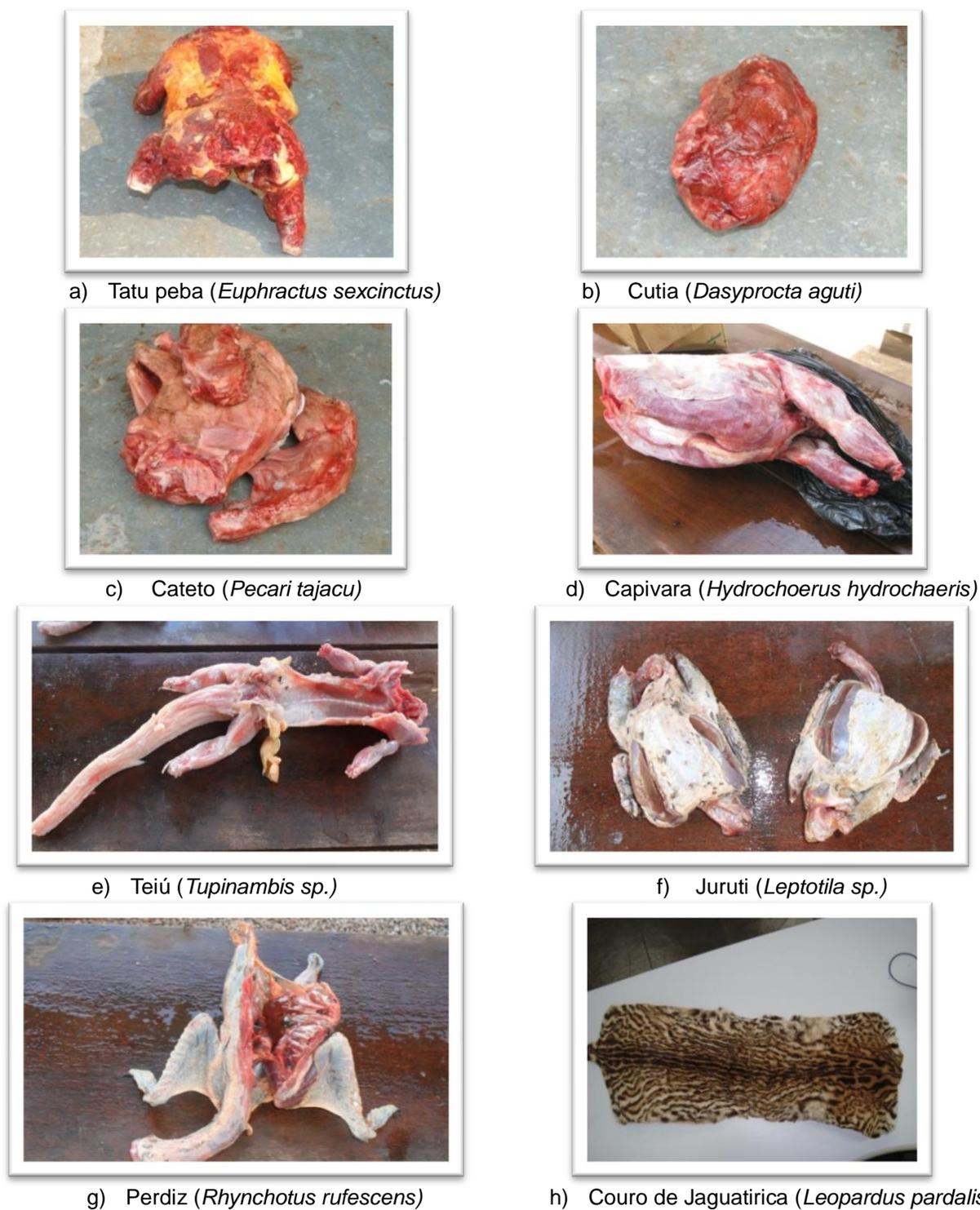


Figura 9 - Amostras apreendidas pela fiscalização ambiental do Estado de Mato Grosso e encaminhadas à perícia por suspeita de serem provenientes de animais silvestres. a) Tatu peba (*Euphractus sexcinctus*); b) Cutia (*Dasyprocta aguti*); c) Cateto (*Pecari tajacu*); d) Capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*); e) Teiú (*Tupinambis sp.*); f) Juruti (*Leptotila sp.*); g) Perdiz (*Rhynchotus rufescens*); h) Couro de Jaguarica (*Leopardus pardalis*).

## 3.2 MÉTODOS

Todos os métodos utilizados no desenvolvimento deste trabalho estão descritos em detalhes na seção “Anexos”. Abaixo seguem as descrições resumidas de cada método utilizado.

### 3.2.1 Isolamento do DNA genômico

O DNA genômico foi extraído a partir de amostras de sangue impregnado em papel FTA (MGM<sup>®</sup>) e fragmentos de tecidos musculares ou pele, utilizando-se as técnicas de extração de DNA com Kit Axyprep<sup>™</sup> Multisource Genomic DNA miniprep (Axygen Biosciences<sup>®</sup>) (conforme manual do fabricante) e Extração de DNA com fenol clorofórmio.

### 3.2.2 Reação de amplificação

Para amplificação dos genes mitocondriais utilizou-se a tecnologia da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando-se quatro conjuntos de primers universais, descritos por Branick *et al.* (2003), Kocher *et al.* (1989), Verma e Singh (2003) e Folmer *et al.* (1995) (Tabela 3).

**Tabela 3.** Sequências dos primers utilizados na amplificação dos diferentes genes.

GENE	Nome	SEQUÊNCIA DO PRIMER*	Referência
<b>Cytb</b>	cytbF	CCATCCAACATCTCCGCATGATGAAA	<b>Branicki <i>et al.</i>, 2003</b>
	cytbR	CCCCTCAGAATGATATTTGGCCTCA	
<b>Cytb</b>	L14724	CGAAGCTTGATATGAAAAACCATCGTTG	<b>Kocher <i>et al.</i>, 1989</b>
	H15149	AAACTGCAGCCCCTCAGAATGAATATTTGTCCTCA	
<b>Cytb</b>	Mcb398	TACCATGAGGACAAATATCATTCTG	<b>Verma e Singh, 2003</b>
	Mcb869	CCTCCTAGTTTGTAGGGATTGATCG	
<b>Col</b>	LCO 1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	<b>Folmer <i>et al.</i>, 1994</b>
	HCO 2198	TAAACTTCAGGTGACCAAAAAATCA	
• Sentido 5' → 3'			

A amplificação dos fragmentos de DNA dos genes mitocondriais Cytb e COI foi realizada em termociclador BioRad MyCycler™ Plus (BioRad®), utilizando as seguintes concentrações para cada 25 µL de reação: 10,5 µL de PCR mix [22mM Tris-HCL, 55mM KCl, 1,65 mM MgCl<sub>2</sub>, 220µM dGTP, 220µM dATP, 220µM dTTP, 220µM dCTP, , 22U recombinant Taq DNA Polymerase/mL, stabilizers (Invitrogen®)], 2 µL de tampão 10X, 2 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 2,5 unidades Taq DNA polimerase (Invitrogen®), 2 µL de cada primer (10 nmol), 5ng de DNA molde, H<sub>2</sub>O q.s.p. 25 µL.

As condições do ciclo de amplificação seguiram os seguintes parâmetros descritos no Manual de Treinamento Applied Biosystems (2009): uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 11 minutos; seguido por 36 ciclos a 95°C por 10 segundos, 56°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos; finalizando com uma etapa a 72°C por 7 minutos para extensão da cadeia.

Antes da reação de sequenciamento os produtos da reação de amplificação foram purificados com as enzimas exonuclease I (EXO I) e fosfatase alcalina de camarão (SAP) (WERLE *et al.*, 1994). Aplicou-se cinco unidades de SAP e duas unidades de EXOI a cada 15 µL de amostra, em seguida incubando a 37°C por uma hora e a 80°C por dois minutos.

### 3.2.3 Visualização do DNA amplificado em gel de agarose

A visualização do produto de amplificação se deu em gel de agarose a 1% com tampão TBE1X (1,0 M tris, 0,9 M ácido bórico, 0,01M EDTA), preparado em cuba de eletroforese Labnet GelXL ENDURO e visualizado em transiluminador Cienlab,

### 3.2.4 Reação de sequenciamento

Para garantir a acurácia das seqüências obtidas foram sequenciados os dois sentidos da fita de DNA (*Forward* e *Reverse*). Na reação de sequenciamento utilizou-se o Kit Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems®) seguindo as seguintes

concentrações para cada 20 µL de reação: 4 µL de Big Dye Mix (Applied Biosystems®), 2 µL de tampão de sequenciamento 5X (Applied Biosystems®), 3 pmoles de primer, 5 ng amostra template, H<sub>2</sub>O q.s.p. 20 µL.

Para cada amostra foram utilizados os *primers Forward e Reverse* de cada par de *primer* estudado. Para o processo de amplificação foi utilizado o termociclador BioRad MyCycler™ Plus (BioRad®), seguindo os seguintes parâmetros descritos no Manual de Treinamento Applied Biosystems (2009): uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 1 minutos, seguido por 30 ciclos a 95°C por 30 segundos, 55°C por 15 segundos e 60°C por 4 minutos.

### 3.2.5 Purificação do produto de sequenciamento

O produto de sequenciamento foi purificado seguindo o protocolo de precipitação de DNA com isopropanol/isopropanol constante no POP 38 do manual de Treinamento regular em Sequenciamento de mtDNA (2009), conforme descrito na seção “Anexos”.

Antes do sequenciamento, ressuspendeu-se as amostras com 10 µL de formamida Hi-Di, agitando-a no vortex, desnaturando-a 95 °C por 2 minutos, e colocando-a no gelo por 2 minutos.

As amostras amplificadas e purificadas foram analisadas em sequenciador automático ABI 3130 DNA Sequence (Applied Biosystems®).

### 3.2.6 Alinhamento e edição das sequências obtidas

As visualizações, edições e alinhamentos das sequências nucleotídicas obtidas foram realizadas através da interface virtual do programa ClustalW (THOMPSON *et al.*, 1994) integradas ao programa Geneious v5.3 (DRUMMOND *et al.*, 2010).

As sequências nucleotídicas obtidas dessas análises foram comparadas com as sequências nucleotídicas dos genes citocromo oxidase b e subunidade I do citocromo oxidase c disponíveis no *GenBank* (BENSON *et al.*, 2000), utilizando a interface virtual

do programa *Blast – Basic Local Alignment Search Tool* (ALTSCHUL *et al.*, 1990) integrada ao programa Geneious v5.3 (DRUMMOND *et al.*, 2010).

Após o alinhamento, as sequências foram submetidas à análise de distância genética pelo método Tamura-Nei (1993), a partir da qual foram construídas as árvores filogenéticas para os grupos de espécies.

## 4 RESULTADOS e DISCUSSÃO

### 4.1 Análise da abundância das sequências dos genes mitocondriais Cytb e COI no Banco de Dados Genbank

Woese e Fox (1997), trabalhando com sequências conservadas de RNA ribossômico, foram os primeiros a utilizar diferenças de sequências de nucleotídeo para investigar as relações evolutivas (HERBERT *et al.*, 2009). No entanto Avise *et al.* (1987) foi o primeiro a reconhecer que as divergências na sequência de mtDNA fornecem um registro da história evolutiva dentro da espécie, ligando assim genética de populações e sistemática. Hoje, a análise genética em animais tem sido utilizada com vários objetivos, tais como em estudos do processo de especiação, análise de parentesco, identificação de registro de raça e identificação específica (BUDOWLE *et al.*, 2005). O mais trivial para o sucesso na identificação de uma espécie, baseando-se em um banco de dados, é que sua sequência esteja depositada nesse banco para ser comparada. O Genbank, apesar de deter muitas sequências, estas decorrem de várias regiões do gene (HERBERT *et al.*, 2004), o que pode levar a uma comparação entre regiões não homólogas.

Inicialmente foi realizado no Genbank, com auxílio da ferramenta de busca do software Geneious v5.3, uma análise da abundância dos genes mitocondriais Cytb e COI das espécies aqui estudadas. Os resultados encontrados estão reunidos na (Tabela 4).

**Tabela 4.** Análise de abundância, nos bancos dados de DNA, da ocorrência de sequências dos segmentos dos genes mitocondriais Cytb e COI para as espécies estudadas neste trabalho.

AMOSTRAS	NOME CIENTIFICO	NOME POPULAR	Cyt b			COI		
			Menor sequência	Maior sequência	N°. de sequências	Menor sequência	Maior sequência	N°. de sequências
REFERENCIA	<i>Amazona aestiva</i>	Papagaio verdadeiro	595	1138	7	506	694	98
	<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>	Arara azul grande	820	2636*	8	460	460	2
	<i>Ara ararauna</i>	Arara Canindé	888	2647*	4	460	570	4
	<i>Ara chloroptera</i>	Arara vermelha	307	928	2	505	505	1

	<i>Ara Macao</i>	Araracanga	255	993	5	570	570	1
	<i>Brotogeris versicolurus</i>	Periquito verde	1023	1140	7	460	460	1
	<i>Leopardus pardalis</i>	Jaguatirica	63	165	5	0	0	0
	<i>Mazama gouazoubira</i>	Veado catingueiro	277	1131	16	587	587	1
	<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	Tamanduá bandeira	307	307	4	0	0	0
	<i>Nasua nasua</i>	Quati	397	1140	3	0	0	0
	<i>Pionus menstruus</i>	Maritaca da cabeça azul	1002	1140	19	561	622	3
QUESTIONADA	<i>Dasyprocta aguti</i>	Cutia	395	1140	31	0	0	0
	<i>Euphractus sexcinctus</i>	Tatu peba	476	476	6	0	0	0
	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	Capivara	336	1140	2	0	0	0
	<i>Leopardus pardalis</i>	Jaguatirica	63	165	5	0	0	0
	<i>Leptotila sp.</i>	Juriti	1017	1045	9	379	694	16
	<i>Pecari tajacu</i>	Cateto	226	16839**	42	684	684	1
	<i>Rhynchotus rufescens</i>	Perdiz	0	0	0	693	694	4
	<i>Tupinambis sp.</i>	Teiú	298	695	18	0	0	0
<b>TOTAL</b>					<b>196</b>			<b>134</b>

\* segmentos do Cytb + tRNA.

\*\*gene mitocondrial completo

Diferentemente dos valores encontrados por Jacques (2005) para ocorrências de genes mitocondriais Cytb e COI nas classes Mammalia e Sauropsida (aproximadamente quatro vezes mais sequências do Cytb), neste estudo foi verificado uma proporção inferior a 2:1 na comparação para estes grupos de espécies. Uma análise qualitativa destes dados revelou que esta distorção está relacionada, principalmente, aos valores de COI encontrados para a espécie *Amazona aestiva* (98 sequências), oriundas de um grande número de sequências depositadas pela Universidade Católica de Brasília, com aproximadamente 80% das sequências encontradas (78 sequências), e pelo Departamento de Genética e Biologia Evolutiva da Universidade de São Paulo, responsável pelo depósito de pouco mais de 12% das sequências (12 sequências). Muitas das sequências depositadas por autores destas

Instituições a princípio parecem se tratar de repetidas inserções da mesma sequência, publicadas em trabalhos diferentes.

Outro dado importante a se notar é que para oito das dezenove espécies pesquisadas não foi encontrada nenhuma ocorrência de sequência de segmentos do gene mitocondrial COI. Como o princípio básico para a identificação específica por DNA é a ocorrência da sequência estudada no banco de dados, isto implicaria em afirmar que no momento, neste grupo de amostras, 40% das espécies não poderiam ser identificadas baseadas apenas na análise deste segmento.

O tamanho da sequência depositada variou muito no segmento do gene *Cytb*, variando, nas maiores sequências, de 165 pb na espécie *Leopardus pardalis* à 1140 pb em algumas espécies, como a *Pionus menstruus*. Para o segmento COI, essa variação foi menor, ocorrendo de 460 pb (*Brotogeris versicolurus*) à 694 pb (*Amazona aestiva*). Este saldo tem uma implicância direta sobre o resultado das buscas para a identificação das espécies. Considerando que diferentes pares de primers podem sequenciar diferentes fragmentos do gene alvo, mesmo que haja a ocorrência da espécie pesquisada no banco poderá ocorrer um resultado negativo em decorrência da não homologia entre as sequências comparadas. Outra consequência do tamanho da sequência depositada está relacionada ao valor do *core* recebido na busca por similaridade no banco de dados. A definição do DNA *Barcoding* em empregar uma sequência curta padronizada de 648 pares de bases (SAVOLAINEN, *et al.*, 2005), a princípio, resolve este problema para o segmento COI.

## 4.2 Sequências dos genes *Cytb* e COI

Considerando que a base da identificação específica incida na comparação entre sequências, é razoável concluir que o ideal é que estes sejam realizados sobre os mesmos padrões. Assim, é importante que se siga um conjunto de orientações mínimas para se assegurar da qualidade das sequências obtidas. O controle de qualidade deve seguir por todos os passos do trabalho a iniciar na coleta da amostra. Especificamente aqui, foi observado controle de qualidade da sequência, adotando padrão de qualidade Phred superior a 20 para a sequência consenso, o que significa

que a chance de uma base ter sido erroneamente nomeada é de 1/100 (PROSDOCIMI, 2006). Por não ter atingido este grau de qualidade, grande parte das sequências COI e de segmentos maiores do Cytb não foram considerados neste trabalho.

Com o objetivo de uniformizar o sequenciamento numa única reação para os segmentos Cytb e COI, tentou-se padronizar os parâmetro de PCR para ambas as sequências, o que se mostrou pouco eficiente, principalmente para a amplificação do gene COI. Para os parâmetros adotados neste estudo, os melhores resultados foram obtidos para as sequências mais curtas do Cytb (segmento de 360 pb - *primer* Cytb descrito por Branicki *et al.*, 2003) (Tabela 5). Em apenas duas espécies conseguiu-se sucesso no sequenciamento do segmento COI, o que corresponde a aproximadamente 10% de eficiência.

O alinhamento final e a correção manual dessas sequências resultaram nas sequências consensos apresentadas na seção “Anexos”.

**Tabela 5.** Resumo dos segmentos de DNA mitocondrial em que se obteve amplificação para cada uma das espécie estudadas.

AMOSTRAS	NOME CIENTIFICO	NOME POPULAR	Cyt b			COI
			Branicki <i>et al.</i> , 2003 (360pb)	Kocher <i>et al.</i> , 1989 (470pb)	Verma e Singh, 2003 (470pb)	Folmer <i>et al.</i> , 1994 (650pb)
REFERENCIA	<i>Amazona aestiva</i>	Papagaio verdadeiro	X			
	<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>	Arara azul grande	X			
	<i>Ara ararauna</i>	Arara canindé	X			
	<i>Ara chloroptera</i>	Arara vermelha	X			
	<i>Ara Macao</i>	Araracanga	X			
	<i>Brotogeris versicolurus</i>	Periquito verde	X			
	<i>Leopardus pardalis</i>	Jagatirica	X	X		
	<i>Mazama gouazoubira</i>	veado catingueiro		X		
	<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	Tamanduá bandeira	X			
	<i>Nasua nasua</i>	Quati			X	
<i>Pionus menstruus</i>	Maritaca cabeça azul	X				
QUESTIONADA	<i>Dasyprocta aguti (Tapirus terrestris)</i>	Cutia (anta)		X		X
	<i>Euphractus sexcinctus</i>	Tatu peba	X	X	X	X
	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	Capivara	X			
	<i>Leopardus pardalis</i>	Jagatirica	X			
	<i>Leptotila sp.</i>	Juriti	X			
	<i>Pecari tajacu</i>	Cateto	X		X	
	<i>Rhynchotus rufescens</i>	Perdiz	X			
<i>Tupinambis sp.</i>	Teiú	X		X		

### 4.3 Gene citocromo b (cytb)

#### 4.3.1 Amostra Referência

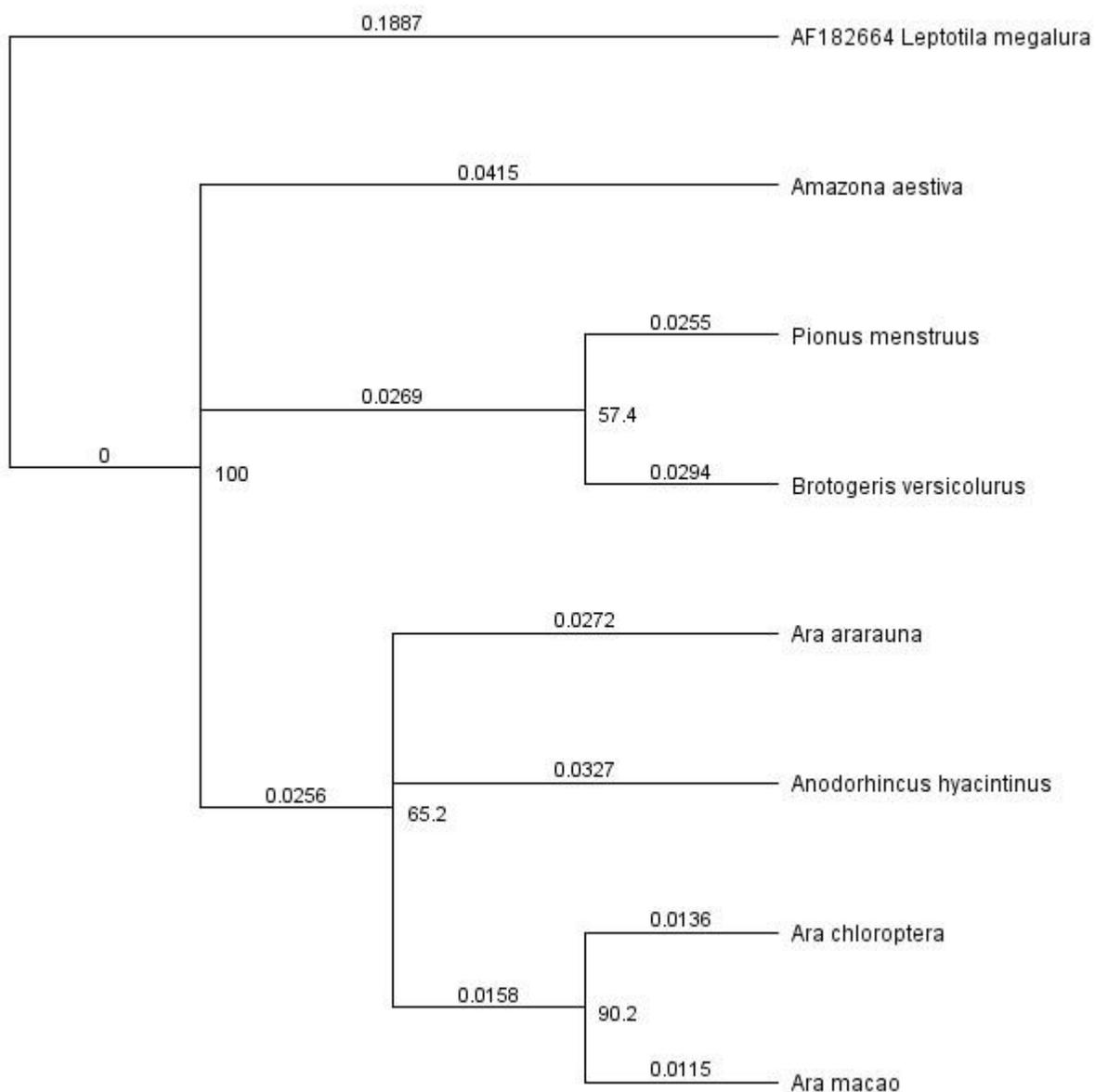
##### 4.3.1.1 Família Psitacidae

Dentre as 11 espécies estudadas no grupo de amostra referência, sete delas pertencem à família Psitacidae. Segundo Tavares *et al.* (2005), os psitacídeos compõem o grupo de espécies mais numeroso da ordem psitaciforme (150 das 330 espécies), sendo o Brasil o país mais rico em representantes dessa família (SICK, 2001). Os psitacídeos apresentam uma grande variação de tamanho, preferência de habitat, distribuição geográfica e comportamento (FORSHAW, 1989). A justificativa pelo interesse no estudo deste grupo ocorreu devido a fatores que tornam estas espécies particularmente importantes no tocante ao crime contra a fauna, como o fato de aproximadamente 27% das espécies serem consideradas vulneráveis ou ameaçadas de extinção (BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2000) e a características que as tornam valiosas comercialmente, como sua inteligência, capacidade de imitar a voz humana e sua exuberante plumagem colorida.

Com o alinhamento e a correção manual das sequências obtidas do Cytb obteve-se uma matriz de 360 pb. A partir das análises de distância genética realizadas pelo método Tamura-Nei (TAMURA *et al.*, 1993) (Tabela 6) foi gerada a árvore consenso representada na figura 10. Para a construção da árvore filogenética, a espécie *Leptotila megalura* (juriti) foi usada como grupo externo.

**Tabela 6.** Análise de distância genética realizada pelo método de Tamura-Nei (1993) para a sequência de 360 pb de bases do segmento do Cytb dos psitacídeos.

	<i>L. megalura</i>	<i>A. aestiva</i>	<i>A. ararauna</i>	<i>A. hyacinthinus</i>	<i>P. menstruus</i>	<i>B. versicolorus</i>	<i>A. chloroptera</i>	<i>A. macao</i>
<i>Leptotila megalura</i>		0,2301	0,2414	0,2470	0,2411	0,2449	0,2437	0,2415
<i>Amazona aestiva</i>	0,2301		0,0942	0,0998	0,0939	0,0977	0,0965	0,0943
<i>Ara ararauna</i>	0,2414	0,0942		0,0559	0,1052	0,1090	0,0566	0,0544
<i>Anodorhincus hyacinthinus</i>	0,2470	0,0998	0,0559		0,1107	0,1145	0,0621	0,0600
<i>Pionus menstruus</i>	0,2411	0,0939	0,1052	0,1107		0,0549	0,1074	0,1053
<i>Brotogeris versicolorus</i>	0,2449	0,0977	0,1090	0,1145	0,0549		0,1113	0,1091
<i>Ara chloroptera</i>	0,2437	0,0965	0,0566	0,0621	0,1074	0,1113		0,0251
<i>Ara macao</i>	0,2415	0,0943	0,0544	0,0600	0,1053	0,1091	0,0251	



**Figura 10.** Arvore consenso de Neighbor-Joining, produzida a partir de matriz de distância genética construída pelo método de Tamura-Nei (1993) para a sequência de 360 pb de bases do segmento do Cytb. A espécie *Leptotila megalura* foi considerada grupo externo nesta análise. Os números abaixo dos ramos são valores de bootstrap baseados em 1000 réplicas.

A variabilidade gênica entre as espécies são, em parte, decorrentes de eventos mutacionais que se acumulam ao longo do tempo. No caso das mutações pontuais, onde há troca de um único nucleotídeo por outro, a ocorrência de uma transversão (troca de uma base purínica por uma pirimidínica ou o inverso - C/T ↔ A/G) é menos comum que a ocorrência de uma transição (troca de uma base purínica ou pirimidínica

por outra do mesmo grupo - A ↔ G / C ↔ T) (FREESE, 1959). Estimativas de tempo de divergência entre espécies são baseadas na taxa de substituição entre as linhagens, desta forma, é coerente esperar que haja maior similaridade entre indivíduos da mesma espécie que entre indivíduos pertencentes a apenas o mesmo gênero. Diferentes estimativas de taxas de frequência têm sido estipuladas. Miyaki *et al.* (2010), em trabalho realizado com espécies de papagaios, considerou uma taxa de substituição de 1,6% a 2,0% de nucleotídeos por milhão de anos.

Com o objetivo de testar a eficiência destas sequências na identificação da espécie, cada uma das sequências obtidas foi confrontada com o banco de dados usando a interface *Blast* integrada ao programa Geneious v5.3 (DRUMMOND, *et al.*, 2010). Os resultados da pesquisa para cada espécie, representados nas figuras 15 a 21 (na seção “Anexos”), estão listados em ordem decrescente considerando os seguintes parâmetros: grau de similaridade entre as sequências (% identical sites); *Score (Bit-Score)*, uma medida da qualidade do alinhamento, que é determinada pela soma dos pontos obtidos por cada unidade pareada (*match*) menos as penalidades pela introdução de *gaps* e posições não pareadas (*mismatch*); *E-value*, que representa a probabilidade desse alinhamento ter ocorrido ao acaso (quanto menor o valor, melhor o resultado) (LBSM, 2010; PROSDOCIMI *et al.*, 2010).

Mesmo que, inicialmente, a comparação da sequência do mtDNA não seja suficiente para a identificação específica, ela pode fornecer parâmetros que permitam o aprofundamento da pesquisa, como por exemplo, indicativo da família ou gênero ao qual pertence a espécie pesquisada. Para isso, no entanto, é necessário que haja conhecimento da filogenia da espécie estudada e do significado da distância genética em cada clado. As consultas realizadas para as espécies de psitacídeos resultaram em grau intra-específico de similaridade com média de 97%, compatível com as espécies esperadas para cada sequência. A média da diferença intra-específica verificada para o segmento do Cytb para todas as espécies referência ficou em 2,05%.

A comparação entre sequências de COI em 260 espécies de aves mostrou uma diferença média de 0,43% entre indivíduos da mesma espécie, 7,93% entre gêneros e 12,71% entre famílias (HERBERT *et al.*, 2004). Em trabalho anterior, analisando 15 diferentes gêneros, Jacques (2005) encontrou um índice médio de similaridade em

torno de 93% entre as espécies do mesmo gênero e 98% na comparação entre indivíduos da mesma espécie. Análises realizadas em sequências de aproximadamente 700 pb da região controladora, revelou um índice de similaridade que variou de 93% a 96% em indivíduos da espécie *Anodorhincus Hyacinthinus* e de 93% a 99% em indivíduos da espécie *Ara ararauna* (PRESTI, 2006).

A análise da composição nas frequências de bases purínicas e pirimidínicas para os segmentos do Cyt b em cada espécie, está resumida na Tabela 7.

**Tabela 7.** Tabela de frequência de bases purínicas e pirimidínicas nos segmentos do Cyt b.

Nome científico	Nome Popular	Cyt b			
		A	C	G	T
<i>Amazona aestiva</i>	Papagaio verdadeiro	27,00%	32,00%	17,00%	24,00%
<i>Anodorhinchus hyacinthinus</i>	Arara azul grande	26,00%	32,70%	15,00%	26,30%
<i>Ara ararauna</i>	Arara canindé	27,40%	30,40%	15,10%	27,10%
<i>Ara chloroptera</i>	Arara vermelha	26,10%	29,60%	15,50%	28,80%
<i>Ara Macao</i>	Araracanga	25,60%	29,20%	16,10%	29,20%
<i>Brotogeris versicolurus</i>	Periquito verde	27,80%	32,80%	15,30%	24,20%
<i>Pionus menstruus</i>	Maritaca da cabeça azul	27,70%	31,60%	15,70%	25%

Em estudos realizados com amostras de 29 espécies de psitacíformes, distribuídas em 25 gêneros, Tavares *et al.* (2006) encontrou valores de frequência que variaram de: A= 29,8% a 32,5% C= 31,2% a 34,6% G= 12,3% a 14,2% e T= 21,2% a 24,5%. Os resultados encontrados neste trabalho corroboram aqueles verificados por Tavares *et al.* (2006), já que ambos não diferiram significativamente entre si ( $P < 0,05$ ).

#### 4.3.1. 2 Ordem Mammalia

O segundo grupo de espécies referência cujo segmento do Cytb foi sequenciado neste estudo é composto por organismos da ordem Mammalia, estando representadas as espécies *Leopardus pardalis* (Jaguar), *Mazama gouazoubira* (veado), *Myrmecophaga tridactyla* (Tamanduá bandeira) e *Nasua nasua* (Quati). O interesse forense pelos mamíferos neste estudo deve-se principalmente à atividade de

caçadores que predam estes animais para consumo da carne e, em particular no caso dos felinos (onça, jaguatirica, etc.), interesse por sua pele que tem alto valor comercial.

O alinhamento e a correção manual das sequências gerou segmentos que variaram de 360 pb em *Leopardus pardalis* e *Myrmecophaga tridactyla* a 470 pb em *Nasua nasua*. Assim como no procedimento adotado para a família dos psitacídeos, as sequências obtidas no alinhamento foram confrontadas com o banco de dados usando a interface *Blast* integrada ao programa Geneious v5.3 (DRUMMOND *et al.*, 2010). Os resultados da pesquisa para cada espécie estão representados, em ordem decrescente de similaridade, nas figuras 22 a 25 (na seção “Anexos”).

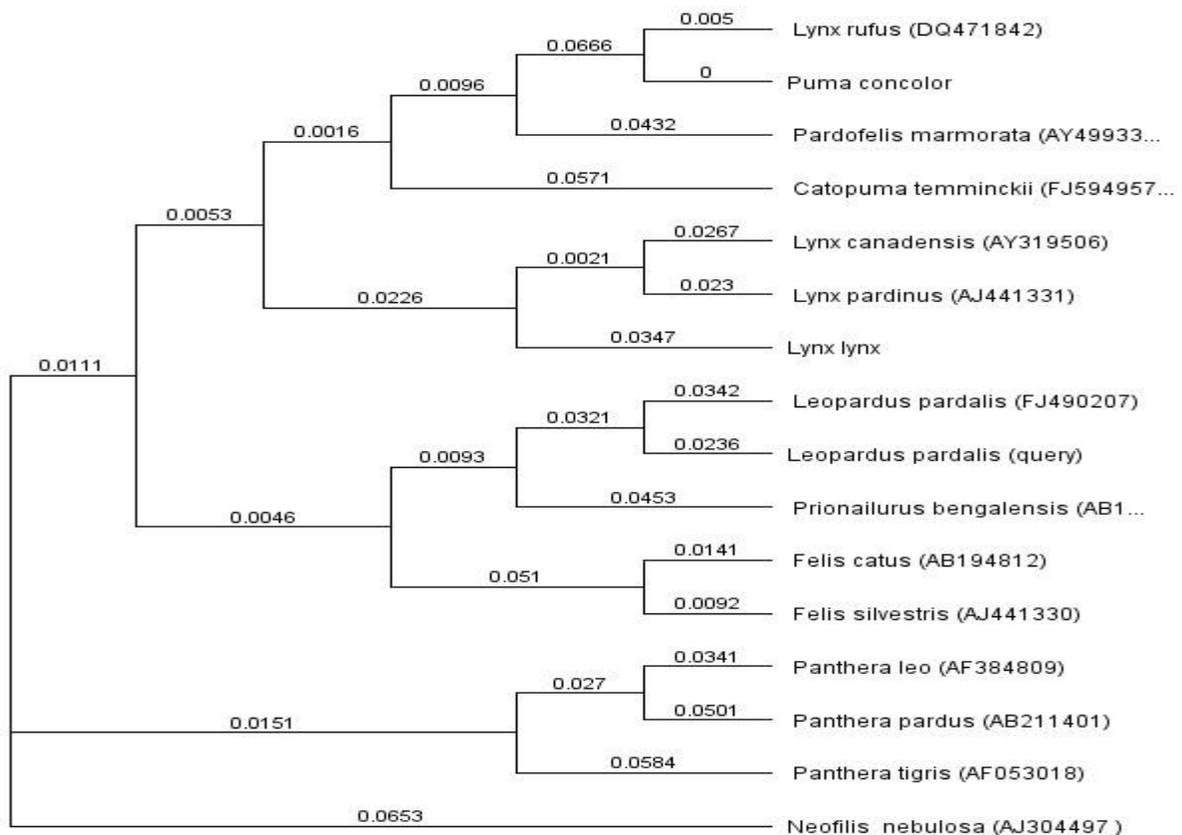
#### 4.3.1.2.1 *Leopardus pardalis*

*Leopardus pardalis* (jaguatirica) junto com *Leopardus tigrinus* (gato-domato pequeno) e *Leopardus wiedii* (gato-maracajá) são as três espécies do gênero *Leopardus* mais amplamente distribuídas pelo território brasileiro. O *Leopardus pardalis* mede entre 65 cm e 1 m de comprimento (com exceção da cauda) e pesa entre 8Kg e 16Kg. A espécie é distribuída por toda a América latina e no Brasil é encontrada na Amazônia, Cerrado, Mata Atlântica, Pantanal e Caatinga (AMBIENTE BRASIL, 2010). A espécie encontra-se na lista de animais ameaçados de extinção (BRASIL, 2003) principalmente pela ação de caçadores que comercializam sua pele.

Com o alinhamento e a correção manual das sequências obtidas do Cytb obteve-se uma matriz de 360 pb, a qual foi confrontada com sequências já depositadas no *GenBank*. A partir das análises de distância genética realizadas pelo método Tamura-Nei (TAMURA *et al.*, 1993) (Tabela 8) entre a sequência pesquisada e as resultantes da pesquisa, foi gerada a árvore consenso representada na Figura 11.

**Tabela 8.** Análise de distância genética realizada pelo método de Tamura-Nei (1993) para a sequência de 360 pb de bases do segmento do Cytb da espécie *Leopardus pardalis*.

	<i>C. temminckii</i>	<i>F. catus</i>	<i>F. silvestris</i>	<i>L. pardalis</i>	<i>L. canadensis</i>	<i>L. pardinus</i>	<i>L. rufus</i>	<i>P. leo</i>	<i>P. pardus</i>	<i>P. tigris</i>	<i>P. marmorata</i>	<i>P. bengalensis</i>	<i>L. pardalis (query)</i>	<i>L. lynx</i>	<i>N. nebulosa</i>	<i>P. concolor</i>
<i>Catopuma temminckii</i>		0,1337	0,1288	0,1442	0,1102	0,1064	0,1383	0,1513	0,1673	0,1486	0,1099	0,1232	0,1336	0,1160	0,1405	0,1333
<i>Felis catus</i>	0,1337		0,0233	0,1407	0,1265	0,1227	0,1578	0,1570	0,1730	0,1543	0,1295	0,1197	0,1301	0,1323	0,1461	0,1529
<i>Felis silvestris</i>	0,1288	0,0233		0,1358	0,1215	0,1177	0,1529	0,1520	0,1680	0,1493	0,1245	0,1148	0,1251	0,1274	0,1412	0,1479
<i>Leopardus pardalis</i>	0,1442	0,1407	0,1358		0,1369	0,1331	0,1683	0,1674	0,1834	0,1647	0,1399	0,1116	0,0578	0,1428	0,1566	0,1633
<i>Lynx canadensis</i>	0,1102	0,1265	0,1215	0,1369		0,0497	0,1343	0,1440	0,1600	0,1413	0,1059	0,1159	0,1263	0,0636	0,1332	0,1293
<i>Lynx pardinus</i>	0,1064	0,1227	0,1177	0,1331	0,0497		0,1305	0,1402	0,1562	0,1375	0,1021	0,1121	0,1225	0,0598	0,1294	0,1255
<i>Lynx rufus</i>	0,1383	0,1578	0,1529	0,1683	0,1343	0,1305		0,1754	0,1914	0,1727	0,1149	0,1473	0,1577	0,1401	0,1646	0,0050
<i>Panthera leo</i>	0,1513	0,1570	0,1520	0,1674	0,1440	0,1402	0,1754		0,0842	0,1194	0,1470	0,1464	0,1568	0,1499	0,1415	0,1704
<i>Panthera pardus</i>	0,1673	0,1730	0,1680	0,1834	0,1600	0,1562	0,1914	0,0842		0,1354	0,1630	0,1624	0,1728	0,1659	0,1575	0,1864
<i>Panthera tigris</i>	0,1486	0,1543	0,1493	0,1647	0,1413	0,1375	0,1727	0,1194	0,1354		0,1443	0,1437	0,1541	0,1472	0,1388	0,1677
<i>Pardofelis marmorata</i>	0,1099	0,1295	0,1245	0,1399	0,1059	0,1021	0,1149	0,1470	0,1630	0,1443		0,1189	0,1293	0,1118	0,1362	0,1099
<i>Prionailurus bengalensis</i>	0,1232	0,1197	0,1148	0,1116	0,1159	0,1121	0,1473	0,1464	0,1624	0,1437	0,1189		0,1009	0,1218	0,1356	0,1423
<i>Leopardus pardalis (query)</i>	0,1336	0,1301	0,1251	0,0578	0,1263	0,1225	0,1577	0,1568	0,1728	0,1541	0,1293	0,1009		0,1321	0,1460	0,1527
<i>Lynx lynx</i>	0,1160	0,1323	0,1274	0,1428	0,0636	0,0598	0,1401	0,1499	0,1659	0,1472	0,1118	0,1218	0,1321		0,1391	0,1352
<i>Neofelis nebulosa</i>	0,1405	0,1461	0,1412	0,1566	0,1332	0,1294	0,1646	0,1415	0,1575	0,1388	0,1362	0,1356	0,1460	0,1391		0,1596
<i>Puma concolor</i>	0,1333	0,1529	0,1479	0,1633	0,1293	0,1255	0,0050	0,1704	0,1864	0,1677	0,1099	0,1423	0,1527	0,1352	0,1596	

**Figura 11.** Árvore consenso de Neighbor-Joining, produzida a partir de matriz de distância genética construída pelo método de Tamura-Nei (1993) para a sequência de 360 pb de bases do segmento do Cytb da espécie *Leopardus pardalis*.

Ao contrário do que se esperava, o resultado indicou maior similaridade com uma sequência da espécie *Prionailurus bengalensis* (91,9%) (Figura 22). A espécie *Prionailurus bengalensis*, também conhecido como leopardo asiático, é um pequeno gato selvagem de ocorrência no continente asiático, com distribuição desde a Índia até a Sibéria, chegando ao extremo Oriente do continente, incluindo Japão, Filipinas e as Ilhas menores da Indonésia (TAMADA *et al.*, 2008). Apesar de sua semelhança com a jaguatirica (*Leopardus pardalis*) elas pertencem a gêneros diferentes.

Apesar de termos encontrado cinco depósitos do gene mitocondrial Cytb para a espécie *Leopardus pardalis* no Genbank (Tabela 4), o tamanho dessas sequências eram curtas, variando de 63pb a 165pb. Considerando que o BitScore, um dos parâmetros para ordenação das espécies em similaridade, leva em consideração o tamanho relativo das sequências comparadas, isso contribuiu para que a sequência depositada de *Leopardus pardalis* não figurasse entre os 100 primeiros resultados de similaridade numa consulta global no banco de dados. Foi então realizada a comparação direta entre a sequência consenso obtida e as duas maiores sequências depositadas de Cytb da espécie *Leopardus pardalis* (102 pb e 165 pb) obtendo-se uma percentagem de similaridade de 99,7% e 97,5%, respectivamente.

A análise da árvore filogenética corroborou a hipótese da relação entre a sequência *query* e a sequência de *Leopardus pardalis* encontrada no banco, agrupando-as num mesmo ramo.

#### 4.3.1.2.2 *Myrmecophaga tridactyla*

O *Myrmecophaga tridactyla* (tamanduá bandeira) é o maior representante entre quatro espécies da família Myrmecophagidae, podendo atingir 2 metros (tamanho médio de 1,2 m) de comprimento total e massa corpórea variando de 18 Kg a 39 Kg (WOLTANSKI, 2010).

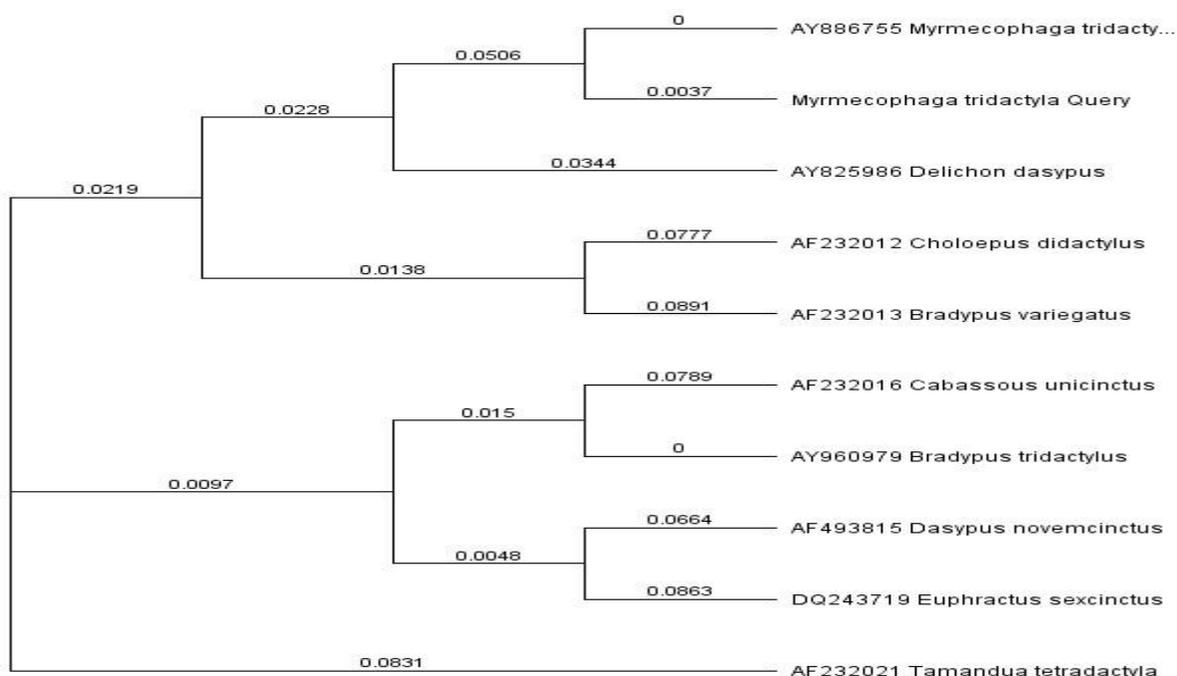
A espécie encontra-se classificada como “Vulnerável” na lista vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais (IUCN, 2010). No Brasil, apesar de também estar classificada como vulnerável na lista do IBAMA (IBAMA, 2009), sua situação é diferente em cada estado. Em algumas regiões,

como no Rio de Janeiro, a espécie está provavelmente extinta, em outras, como o Rio Grande do Sul e Paraná está criticamente em perigo (BRAGA, 2003)

Com o alinhamento e a correção manual das sequências obtidas do Cytb obteve-se uma matriz de 470 pb, a qual foi confrontada com sequências já depositadas no *GenBank*. A partir das análises de distância genética realizadas pelo método Tamura-Nei (TAMURA *et al.*, 1993) (Tabela 9) entre a sequência pesquisada e as resultantes da pesquisa, foi gerada a árvore consenso representada na Figura 12. O arranjo da árvore filogenética inseriu a sequência pesquisada (*Myrmecophaga tridactyla* Query) no mesmo ramo da espécie *Myrmecophaga tridactyla* presente no banco de dados.

**Tabela 9.** Análise de distância genética realizada pelo método de Tamura-Nei (1993) para a sequência de 360 pb de bases do segmento do Cytb da espécie *Myrmecophaga tridactyla*.

	<i>C. didactylus</i>	<i>B.s. variegatus</i>	<i>C. unincinctus</i>	<i>T. tetradactyla</i>	<i>D. novemcinctus</i>	<i>D. novemcinctus</i>	<i>M. tridactyla</i>	<i>B. tridactylus</i>	<i>E. sexcinctus</i>	<i>M. tridactyla (query)</i>
<i>Choleopus didactylus</i>		0,1667	0,2170	0,1965	0,1943	0,1486	0,1648	0,1381	0,2142	0,1685
<i>Bradypus variegatus</i>	0,1667		0,2284	0,2079	0,2057	0,1600	0,1762	0,1496	0,2256	0,1799
<i>Cabassous unincinctus</i>	0,2170	0,2284		0,1867	0,1651	0,1827	0,1989	0,0789	0,1850	0,2026
<i>Tamandua tetradactyla</i>	0,1965	0,2079	0,1867		0,1640	0,1622	0,1784	0,1078	0,1839	0,1821
<i>Dasybus novemcinctus</i>	0,1943	0,2057	0,1651	0,1640		0,1600	0,1762	0,0862	0,1527	0,1799
<i>Dasybus novemcinctus</i>	0,1486	0,1600	0,1827	0,1622	0,1600		0,0850	0,1038	0,1799	0,0887
<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	0,1648	0,1762	0,1989	0,1784	0,1762	0,0850		0,1201	0,1961	0,0037
<i>Bradypus tridactylus</i>	0,1381	0,1496	0,0789	0,1078	0,0862	0,1038	0,1201		0,1062	0,1238
<i>Euphractus sexcinctus</i>	0,2142	0,2256	0,1850	0,1839	0,1527	0,1799	0,1961	0,1062		0,1998
<i>Myrmecophaga tridactyla (query)</i>	0,1685	0,1799	0,2026	0,1821	0,1799	0,0887	0,0037	0,1238	0,1998	



**Figura 12.** Arvore consenso de Neighbor-Joining, produzida a partir de matriz de distância genética construída pelo método de Tamura-Nei (1993) para a sequência de 360 pb de bases do segmento do Cytb da espécie *Myrmecophaga tridactyla*.

É importante notar que para esta espécie foi encontrado o maior grau de similaridade na comparação com as amostras referência presente no banco de dados (100%). Uma análise dos dados da amostra depositada revelou que a sequência resultante foi submetida por Jacques e Grattapaglia em 2005 e é oriunda de indivíduos procedentes do Parque Nacional das Emas (Goiás – Brasil) e Parque Nacional da Serra da Canastra (Minas Gerais – Brasil). Considerando que a amostra *query* (coletada do Zoológico da UFMT), assim como as amostras depositadas por Jacques e Grattapaglia, são provenientes do Brasil central, isso pode explicar a estreita relação entre as duas sequências.

#### 4.3.1.2.3 *Mazama gouazoubira*

*Mazama gouazoubira* (veado cantingueiro) é uma espécie representante da família Cervidae, distribuí-se do sul do México até o norte da Argentina

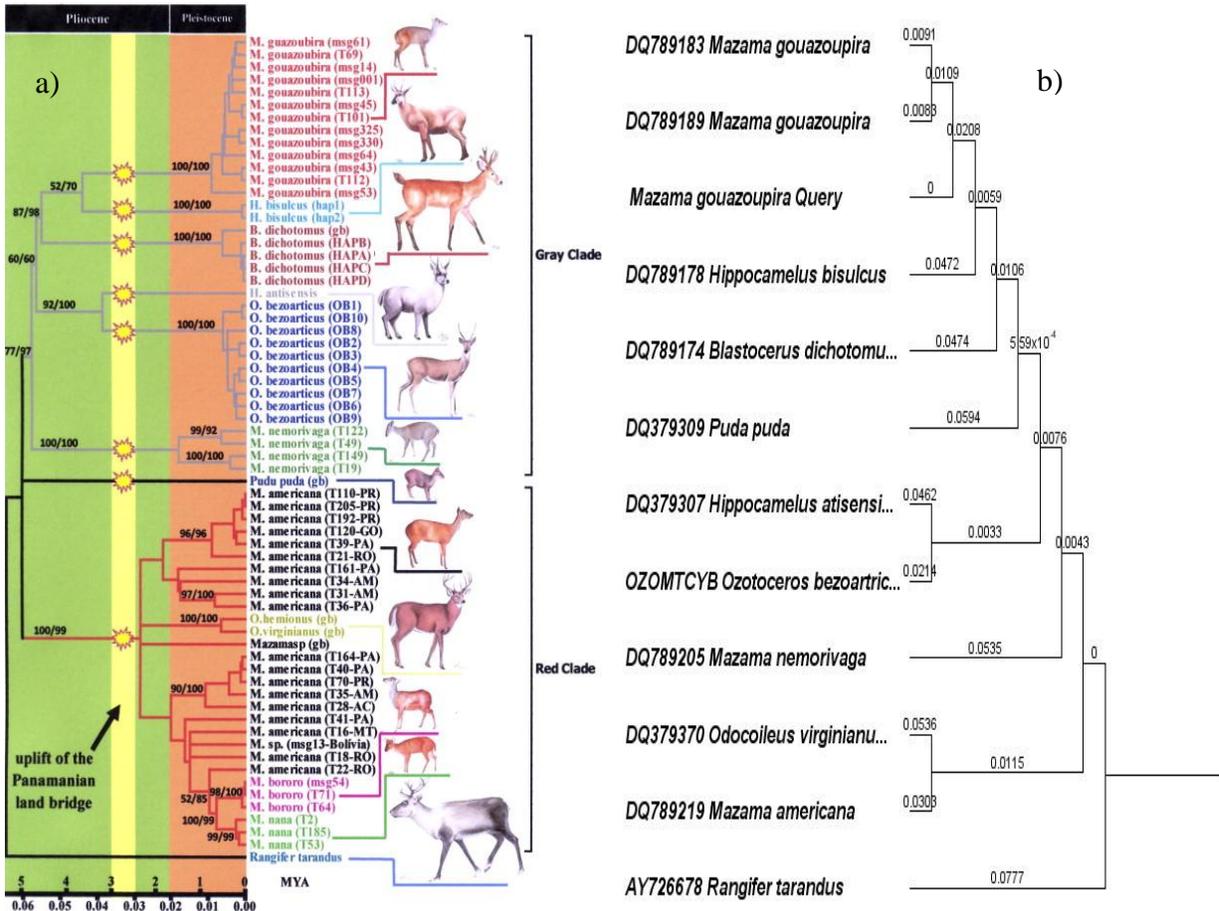
(EISENBERG *et al.*, 1999). No território brasileiro é encontrada em todas as regiões, tanto em áreas florestais como em formações abertas de campo, cerrado e caatinga (TIEPOLO *et al.*, 2009). Medem em média 1030 mm de comprimento (cabeça e corpo) e pesam entre 17 Kg e 23 Kg (EISENBERG *et al.*, 1999). Embora esta espécie não se encontre na lista de espécies ameaçadas, o cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) e o veado-bororó-do-sul (*Mazama nana*) (BRASIL, 2003) estão presentes nesta lista. Isto evidencia ainda mais a necessidade de uma correta identificação destas espécies em casos forenses.

Com o alinhamento e a correção manual das sequências obtidas do Cytb obteve-se uma matriz de 474 pb, a qual foi confrontada com sequências já depositadas no *GenBank*. A partir das análises de distância genética realizadas pelo método Tamura-Nei (TAMURA *et al.*, 1993) (Tabela 10) entre a sequência pesquisada e as resultantes da pesquisa, foi gerada a árvore consenso representada na Figura 13a.

O índice de similaridade alcançado na busca foi de 99,5% para a espécie esperada *Mazama gouazoubira*. Análises moleculares de cervídeos sul-americanos mostraram divergência intra-específica de 0,36% em *M. nana*, 0,43% em *B. dichotomus*, 0,99% em *O. bezoarticus*, 2,59% em *M. nemorivaga* e 3,51% em *M. americana* (DUARTE *et al.*, 2008). Este mesmo autor, comparando dados moleculares e citogenéticos obtidos de 82 indivíduos de diferentes espécies de veados sul-americanos, sugeriu as relações filogenéticas que dão amplo suporte para os resultados encontrados neste estudo (Figura 13b).

**Tabela 10.** Análise de distância genética realizada pelo método de Tamura-Nei (1993) para a sequência de 474 pb de bases do segmento do Cytb da espécie *Mazama Gouazoubira*.

	<i>M. gouazoubira</i>	<i>R. tarandus</i>	<i>H. atisensi</i>	<i>P. puda</i>	<i>O. virginianu</i>	<i>B. dichotomus</i>	<i>H. bisulcus</i>	<i>M. gouazoubira</i>	<i>M. gouazoubira (query)</i>	<i>M. nemorivaga</i>	<i>M. americana</i>	<i>O. bezoarcticus</i>
<i>Mazama gouazoubira</i>		0,1276	0,0874	0,0967	0,1149	0,0741	0,0680	0,0200	0,0191	0,0990	0,0917	0,0626
<i>Rangifer tarandus</i>	0,1276		0,1392	0,1497	0,1428	0,1482	0,1540	0,1476	0,1467	0,1355	0,1195	0,1144
<i>Hippocamelus atisensi</i>	0,0874	0,1392		0,1095	0,1265	0,1080	0,1138	0,1074	0,1065	0,1106	0,1033	0,0676
<i>Pudu puda</i>	0,0967	0,1497	0,1095		0,1370	0,1174	0,1232	0,1167	0,1159	0,1211	0,1138	0,0847
<i>Odocoileus virginianu</i>	0,1149	0,1428	0,1265	0,1370		0,1356	0,1413	0,1349	0,1341	0,1229	0,0839	0,1018
<i>Blastocerus dichotomus</i>	0,0741	0,1482	0,1080	0,1174	0,1356		0,1005	0,0941	0,0933	0,1197	0,1123	0,0832
<i>Hippocamelus bisulcus</i>	0,0680	0,1540	0,1138	0,1232	0,1413	0,1005		0,0880	0,0871	0,1254	0,1181	0,0890
<i>Mazama gouazoubira</i>	0,0200	0,1476	0,1074	0,1167	0,1349	0,0941	0,0880		0,0174	0,1190	0,1117	0,0826
<i>Mazama gouazoubira (query)</i>	0,0191	0,1467	0,1065	0,1159	0,1341	0,0933	0,0871	0,0174		0,1181	0,1108	0,0817
<i>Mazama nemorivaga</i>	0,0990	0,1355	0,1106	0,1211	0,1229	0,1197	0,1254	0,1190	0,1181		0,0996	0,0858
<i>Mazama americana</i>	0,0917	0,1195	0,1033	0,1138	0,0839	0,1123	0,1181	0,1117	0,1108	0,0996		0,0785
<i>Ozotoceros bezoarcticus</i>	0,0626	0,1144	0,0676	0,0847	0,1018	0,0832	0,0890	0,0826	0,0817	0,0858	0,0785	



**Figura 13.** a) Esquema evidenciando a relação filogenética entre 59 haplótipos de veados, derivados de fragmento de 934 pares de bases do Cytb gerados em trabalhos com veados sul-americanos (DUARTE, et al., 2008). b) Arvore consenso de Neighbor-Joining, produzida a partir de matriz de distância genética construída pelo método de Tamura-Nei (1993) para a sequência de 474 pb do segmento do Cytb da espécie *Mazama gouazoubira*.

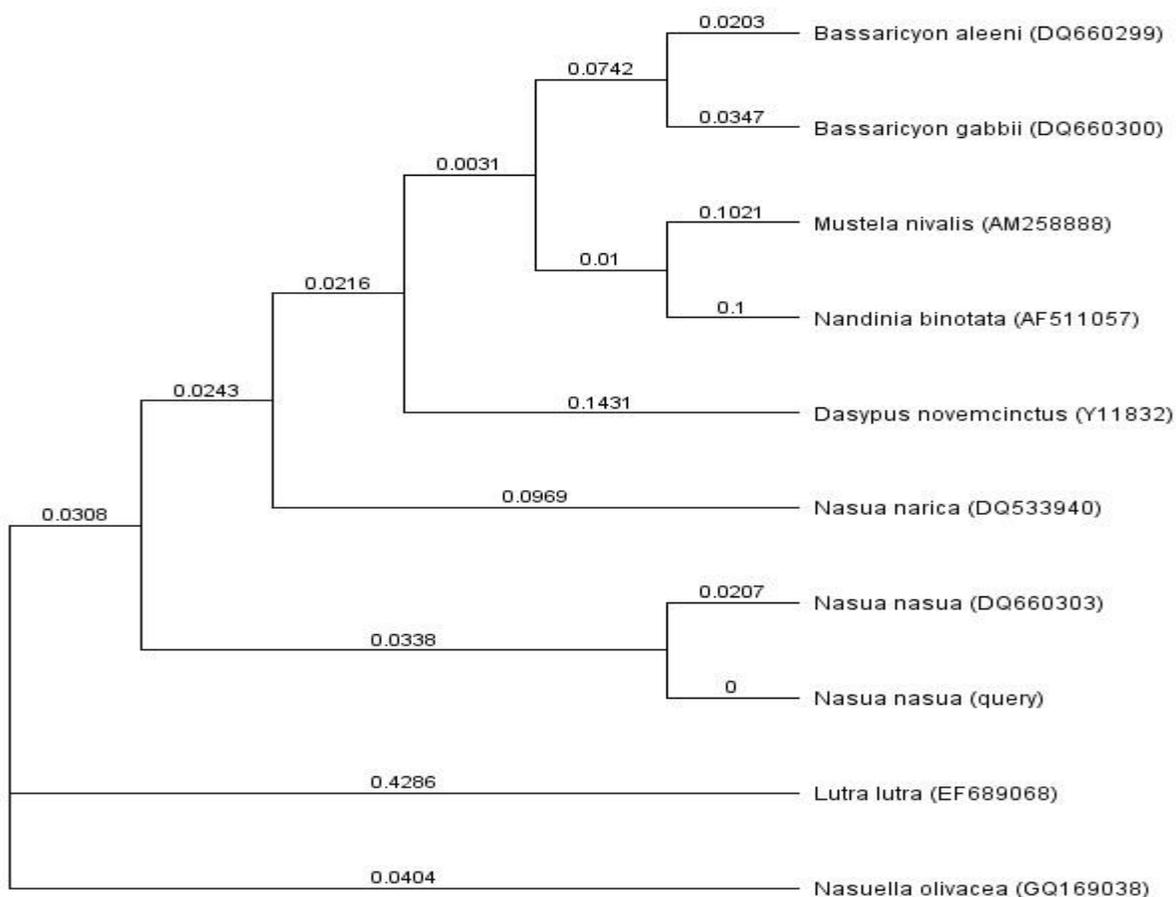
4.3.1.2.4 *Nasua nasua*

*Nasua nasua* (quati) é uma espécie da família Procyonidae com ampla distribuição na América do Sul, da Colômbia e Venezuela até o norte do Uruguai e Argentina. Os adultos medem entre 40cm e 70cm de comprimento (com exceção da cauda que mede em média 50cm) e média de 30 cm de altura, pesam entre 3Kg e 8Kg (BEISIEGEL *et al.*, 2001). Apesar de não ser conhecido pelo apreço de sua carne ou pele, este animal sofre freqüentes ataques por estar supostamente relacionado a ataques às criações domésticas (ROCHA-MENDES *et al.*, 2005)

Com o alinhamento e a correção manual das sequências obtidas do Cytb obteve-se uma matriz de 470 pb, a qual foi confrontada com sequências já depositadas no *GenBank*. A partir das análises de distância genética realizadas pelo método Tamura-Nei (TAMURA *et al.*, 1993) (Tabela 11) entre a sequência pesquisada e as resultantes da pesquisa, foi gerada a árvore consenso representada na Figura 21.

**Tabela 11.** Análise de distância genética realizada pelo método de Tamura-Nei (1993) para a sequência de 470 pb de bases do segmento do Cytb da espécie *Nasua nasua*.

	B. aleeni	B. gabbii	D. novemcinctus	L. lutra	M. nivalis	N. binotata	N. narica	N. nasua	N. nasua (query)	N. olivacea
Bassaricyon aleeni		0,0549	0,2407	0,6028	0,2065	0,2044	0,2160	0,1980	0,1773	0,2146
Bassaricyon gabbii	0,0549		0,2551	0,6172	0,2209	0,2188	0,2304	0,2124	0,1917	0,2290
Dasypus novemcinctus	0,2407	0,2551		0,6484	0,2583	0,2562	0,2616	0,2436	0,2229	0,2602
Lutra lutra	0,6028	0,6172	0,6484		0,6205	0,6183	0,5806	0,5139	0,4932	0,4690
Mustela nivalis	0,2065	0,2209	0,2583	0,6205		0,2021	0,2337	0,2157	0,1949	0,2323
Nandinia binotata	0,2044	0,2188	0,2562	0,6183	0,2021		0,2315	0,2135	0,1928	0,2301
Nasua narica	0,2160	0,2304	0,2616	0,5806	0,2337	0,2315		0,1758	0,1550	0,1924
Nasua nasua	0,1980	0,2124	0,2436	0,5139	0,2157	0,2135	0,1758		0,0207	0,1257
Nasua nasua (query)	0,1773	0,1917	0,2229	0,4932	0,1949	0,1928	0,1550	0,0207		0,1050
Nasua olivacea	0,2146	0,2290	0,2602	0,4690	0,2323	0,2301	0,1924	0,1257	0,1050	



**Figura 14.** Arvore consenso de Neighbor-Joining, produzida a partir de matriz de distância genética construída pelo método de Tamura-Nei (1993) para a sequência de 360 pb de bases do segmento do Cytb da espécie *Nasua nasua*.

Consulta para o segmento de DNA obtido da espécie *Nasua nasua* resultou em uma sequência, de igual espécie, com similaridade de 97,2%, seguida por uma sequência da espécie *Bassaricyon gabbii* (mamífero da família Procyonidae) com similaridade de 85,7%. Este isolamento é um indicativo de que o grupo dos Mymecophagidae ainda é pouco estudado.

#### 4.3.2 Amostra Questionada

Durante o período de estudo houve quatro encaminhamentos de partes de animais que necessitaram do auxílio do Laboratório de Biologia Molecular da POLITEC para a determinação da espécie. A denominação citada neste trabalho como provável

nome da espécie corresponde ao nome popular constante no ofício da autoridade solicitante e ao respectivo nome científico da espécie de maior ocorrência na região para aquele nome popular. As espécies sequenciadas foram:

1. Amostra de couro encaminhado como sendo provavelmente de Jaguatirica (*Leopardus pardalis*);
2. Amostra de partes de animais encaminhados como sendo provavelmente de cateto (*Pecaris tajacu*), tatu peba (*Euphractus sexcinctus*) e Cutia (*Dasyprocta aguti*);
3. Amostras de parte de animal encaminhado como provavelmente sendo de capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*);
4. Amostra de partes de animais encaminhado como sendo provavelmente de teiú (*Tupinambis sp.*), perdiz (*Rhynchotus rufescens*) e Juriti (*Leptotila sp.*).

As sequências obtidas no alinhamento foram checadas no banco de dados gerando os resultados mostrados das figuras 26 a 33.

Nas análises realizadas na amostra de couro encaminhado como sendo de jaguatirica (*Leopardus pardalis*) obteve-se uma sequência de 308 pares de bases do Cytb. Semelhante ao que aconteceu na busca para a amostra referência, foi encontrada similaridade de 91,6% com a espécie *Prionailurus bengalensis*. Alinhamento realizado diretamente entre a sequência da amostra questionada e referência resultou em 100% de similaridade.

A amostra encaminhada como sendo de cutia (*Dasyprocta aguti*) apresentou índice de similaridade superior a 99% com a espécie *Tapirus terrestris* (anta). Este resultado não foi exatamente uma surpresa porque, uma avaliação morfológica do material recebido indicava que a proporção da massa muscular na porção encaminhada era incompatível com o tamanho de uma cutia.

As amostras encaminhadas como sendo de cateto (*Pecaris tajacu*) e Tatu peba (*Euphractus sexcinctus*) retornaram resultados compatíveis com aquelas informadas no ofício. No entanto, o índice de similaridade entre as sequências verificadas para a amostra de cateto foi pouco superior a 94%. Para a certificação desta identificação é sugerido o sequenciamento do segmento COI (já que ele está depositado no banco de

dados) e/ou uma comparação com uma amostra referencia devidamente identificada.

A comparação da sequência tida como sendo de *Rhynchotus rufescens* (perdiz) resultou em similaridade de 96,5% com *Ramphasto toco* (tucano), que pertence a família diferente da espécie pesquisada. Ao contrário do que acontece com a perdiz, o consumo de carne de tucano não é uma prática na região, sugerindo assim uma análise mais cautelosa dos dados. Não foi encontrado depósito do gene Cytb para a espécie *Rhynchotus rufescens*, não sendo, desta forma, possível um confronto direto entre a amostra questionada e uma amostra depositada. Outro procedimento a ser adotado seria, assim como foi feito para a amostra de jaguatirica, realizar sequenciamento de amostras referencia da espécie pesquisada. No entanto, até o fechamento deste trabalho, não havia conseguido um animal devidamente identificado da espécie.

Situação similar a encontrada para a espécie tida como sendo perdiz (*Rhynchotus rufescens*) foi verificada para a juriti (*Leptotila sp.*), apresentando similaridade de 96,1% com a espécie *Amazona guildingii* (família Psitacidae).

As análises realizadas na sequência resultante da amostra encaminhada como sendo teiú (*Tupinambis sp.*), retornou maior similaridade (98,3%) para a espécie *Tupinambis meriana*, uma espécie de lagarto de até 1,4 metro de comprimento e quase 5 quilos, com ampla distribuição no Brasil e no norte da Argentina (FAPESP, 2009).

Para complementar as análises de identificação das espécies encaminhadas como sendo perdiz (*Rhynchotus rufescens*) e Juriti (*Leptotila sp.*) deverão ser realizadas coletas de material referência (amostras devidamente identificadas), o que não foi possível até o presente momento.

## 5 CONCLUSÃO

O estudo da sequência gênica do Cytb é uma importante ferramenta de orientação sobre a relação filogenética entre as espécies. Assim como demonstrados em outros trabalhos sobre a evidência do DNA mitocondrial na evolução de papagaios, aqui ficou evidenciada uma relação filogenética mais próxima entre espécies de papagaios de caudas longas quando comparadas com espécies de caudas curtas.

A identificação de Animais Silvestres por meio do sequenciamento do DNA mitocondrial mostrou ser uma ferramenta efetiva em amostras forense, no entanto alguns cuidados devem ser tomados para garantir a confiabilidade do resultado:

1. Realizar pesquisa preliminar sobre abundância das sequências da espécie pesquisada no banco de dados, a fim de optar pelo sequenciamento do segmento que possibilite o confronto;
2. Pesquisar sobre a filogenia da espécie questionada, isso lhe fornecerá subsídios para inferir sobre relações de gêneros ou famílias, o que será extremamente útil principalmente quando não for possível a identificação específica;
3. Se assegurar da qualidade das sequências obtidas nas análises, só assim o profissional estará tranquilo de que qualquer diferença observada não seja proveniente de erros no processo de sequenciamento;
4. Sempre que necessário, obter amostra referência (sistematicamente identificada) para comparação com a amostra questionada;

A padronização de um único protocolo de reação para os segmentos do DNA mitocondrial Cytb e COI facilitaria a rotina de sequenciamento no laboratório, no entanto os resultados alcançados para os parâmetros seguidos neste trabalho demonstraram pouca eficiência no sequenciamento do segmento COI.

Para os padrões adotados neste estudo o gene Cytb se mostrou mais eficiente, tendo sido obtido sequenciamento em todas as espécies amostradas. Aliado ao fato de que foram encontrados um maior número de depósitos para este segmento em todas as espécies pesquisadas, podemos concluir que para a finalidade de identificação forense o Cytb é mais efetivo.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Durante a condução deste trabalho foi possível aplicar, de forma prática, a técnica de sequenciamento de DNA na identificação de animais silvestres, ajudando, assim, a resolver alguns casos que de outra forma seria muito difícil ou mesmo impossível. Essa experiência também serviu para demonstrar que é necessário um cuidado especial do Perito nas análises dos dados resultantes da comparação com o banco de dados, principalmente quando se tratar de animais onde é escasso o estudo sobre sua filogenia.

Ainda é comum que muitos organismos da fauna brasileira não tenham suas sequências depositadas nos bancos de dados, o que dificulta sobre maneira todo o processo de identificação. O projeto de Identificação Molecular da Biodiversidade (Edital MCT/CNPQ/FNDCT N° 50/2010), que vem sendo implementado pelo Ministério da Ciência e Tecnologia e CNPQ, é um primeiro passo que deve ajudar a mudar essa realidade.

Assim, como já acontece nos laboratórios de identificação humana, é imperativo que os laboratórios de identificação animal participem de programas de testes de proficiência que visem uniformizar os procedimentos e assegurar padrões de qualidade nas análises de identificação. É importante que os órgãos de Segurança Pública promovam cursos de capacitação visando o treinamento de profissionais na identificação molecular de animais, pois o combate da prática de crimes contra a fauna passa pela devida responsabilização dos autores do delito, o que só é possível mediante a materialização do ato criminoso.

## 7 BIBLIOGRAFIA

ALHO, C. J. R. **Biodiverssity of the Pantanal: response to seasonal flooding regime and to environmental degradation**. Brazilian Journal Biology, n. 68, p. 957-966, 2008.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. **Basic local alignment search tool**. Journal Molecular Biology, v. 3, n. 215, p. 403-410, 1990.

ALLEN W. L.; CUTHILL, I. C.; SCOTT-SAMUEL N. E.; BADDELEY, R. **Why the leopard got its spots: relating pattern development to ecology in felids**. *Proceedings of the Royal society*, p. 1-8, 2010.

AMBIENTE BRASIL. **Ambiente Fauna**. Disponível em: [http://ambientes.ambientebrasil.com.br/fauna/mamiferos/jaquatirica\\_\(felis\\_pardalis\).html](http://ambientes.ambientebrasil.com.br/fauna/mamiferos/jaquatirica_(felis_pardalis).html)  
> Acesso em: 03 jan. de 2011.

APPLIED BIOSYSTEMS. **Treinamento Regular em Sequenciamento de mtDNA**. São Paulo, 2009.

ARAÚJO, J. C. **Anatomia dos animais domésticos: aparelho locomotor**. Barueri – São Paulo: Manole, 2003.

AVISE, J. C.; ARNOLD, J.; BALL, R. M.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T. **Intraespecific phylogeography: The mitochondrial bridge between population genetics and systematics**. *Rev Ecol Syst*, v. 18, p. 489-522, 1987.

BEISIEGEL, B. M. STEARMAN. **Notes on the Coati, *Nasua nasua* (Carnivora: Procyonidae) in an Atlantic Forest Area**. Braz. J. Biol., v. 61, p. 689-692, 1993.

BENGTSON, A. L.; BENGTSON, N. G. **Curiosidade sobre os dentes dos animais**. Disponível em <[http://www.saudeanimao.com.br/artiq174\\_print.htm](http://www.saudeanimao.com.br/artiq174_print.htm)> Acesso em 21 de jan. 2011.

BENSON, D. A.; KARSCH-MIZRACHI, I.; LIPMAN, D. J.; OSTELL, J.; RAPP, B. A.; WHEELER, D. L. **GenBank**. *Nucleic Acids Research*, vol. 30, p. 17- 20, 2002.

BIRDLIFE INTERNATIONAL. **Threatened Birds of the World**. Barcelona: Lynx Edicións and Birdlife International, 2000.

BRAGA, F. G. **Tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*), espécie criticamente em perigo: uma preocupação no Estado do Paraná**. *Acta Bio. Par. Curitiba*, v. 33, p. 193-194, 2003.

BRANICK, W., KUPIEC, T.; Pawlowski, R. **Validation of Cytochrome b sequence**

**analysis as a method of species identification.** *Journal of Forensic Sciences*, v.1, n. 48, p. 83-87, 2003 .

BRASIL. **Decreto-Lei nº. 5.197 de 01 de março de 1967.** Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/Leis/L5197.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L5197.htm)> Acesso em: 01 nov. 2010.

BRASIL. **Decreto-Lei nº. 9.605 de 12 de fev. de 1998.** Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/Leis/L9605.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L9605.htm)> Acesso em 01 nov. 2010.

BRASIL. **DECRETO-3607. CITES. 2000.** Disponível em: <<http://www.cites.org/eng/resources/species.html>> Acesso em: 30 nov. 2010.

BRASIL. **Instrução Normativa nº. 03 de 26 de maio de 2003.** Disponível em: <[http://www.mma.gov.br/estruturas/179/arquivos/179\\_05122008034002.pdf](http://www.mma.gov.br/estruturas/179/arquivos/179_05122008034002.pdf)> Acesso em: 30 nov. 2010.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/sobre/geografia/biodiversidade/fauna>> Acesso em: 01 nov. 2010.

BUDOWLE, B.; GAROFANO, P.; HELLMAN, A.; KETCHUM, M.; KANTHASWAMY, S.; PARSON, W.; HAERINGEN, W. V.; FAIN, S.; BROAD, T. **Recommendations for animal DNA forensic and identity testing.** *International Journal Legal Medicine*, v. 119, p. 295-302, 2005.

CANIGLIA, R.; FABBRI, E.; GRECO, C.; GALAVERNI, M.; RANDI, E. **Forensic DNA against wildlife poaching: Identification of a serial wolf killing in Italy.** *Forensic Science International: Genetics*, v. 4, 334-338, 2010.

CARVALHO, L. R. M.; VALLE, J. P.; GASQUES, L. S.; LINDE, G. A.; FERNANDEZ, M. A.; COLAUTO, N. B. **Amplificação por PCR da região controle do DNA mitocondrial de raças *Bombyx mori*.** *Ciência Veterinária Zoologia Unipar*, v. 11, n. 1, p. 15-19, 2009.

CHANG, C.; ROUGERIE, R.; CHEN, J. **Identifying earthworms through DNA barcodes: Pitfalls and promise.** *Pedo Biologia*, v. 52, p. 171-180, 2009.

CHEN, J.; UBOH, C. E.; SOMA, L. R.; LI, X.; GUAN, F.; YOU, Y.; LIU, Y. **Identification of racehorse and sample contamination by novel 24-plex STR system.** *Forensic Science International: Genetics*, v. 4, p. 159-167, 2010.

CRUZ, L. M. **Blast: teoria e prática** apresentado in: I Jornada de Bioinformática do Paraná – JOBIP. 2006, Curitiba.

DELSUC, F., SCALLY, M.; MADSEN, O.; STANHOPE, M. J. **Molecular phylogeny of Living Xenarthrans and the Impact of Character and Taxon Sampling on the**

**placental Tree Rooting.** *Molecular Biology and Evolution*, v. 19, p. 1656-1771, 2002.

DRUMMOND, A. J.; ASHTON, B.; BUXTON, S.; CHEUNG, M. COOPER, A; HELED, J; KEARSE, M.; MOIR, R.; STONES-HAVAS, S.; STURROCK, S; THIERER, T.; WILSON, A. **Geneious v5.3**, Disponível em: <<<http://www.geneious.com>>> Acesso em: 10 nov. 2010.

DUARTE, J. M. B.; GONZÁLEZ, S.; MALDONADO, J. E. **The surprising evolutionary history of South American deer.** *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 49, p.17-22, 2008.

EISENBERG, J. F.; REDFORD, K. H. **Mammals of thr neotropics, the central neotropics: Ecuador, Peru, Bolivia e Brasil.** Vol. 3. Chicago: University of Chicago Press, 1999.

FAPESP, Pesquisa Online, 2009. Disponível em: <<http://www.revistapesquisa.fapesp.br/index.php?art=3927&bd=1&pg=1&lq=>>> Acesso em: 20 de abril de 2011.

FENANDES, I. M.; SIGNOR, C. A.; PENHA, J. **Biodiversidade no pantanal de Poconé.** Cuiabá/MT: *Artema*, 2010.

FERREIRA, L. V.; VENTICINQUE, E.; ALMEIDA, S. **O desmatamento na amazonia e a importancia das áreas protegidas.** *Estudos Avançados*, São Paulo, v. 19, n. 53, p. 157-166, 2005.

FOLMER, O.; Black, M.; Hoeh, W.; Lutz, R.; Vrijenhoek, R. **DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates.** *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, v.5, n. 3, p. 294-299, 1994.

FORSHAW, J. **Parrots of the World.** Melbourne: Landsdowne Editions, 3<sup>a</sup> ed. 1989.

FRASCEQUINI-JUNIO, L.; FRANCESQUINI, M. A.; AMBROSANO, G. M. B.; BARBOSA, C. M. R.; CORRENTE, J. E.; DARUGE, E.; RAMALHO, S. A.; CALDAS, J. C. F. G. **Cristais de hemoglobina em sangue de capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) e sua importância pericial.** Saúde, Ética e justiça. p. 17-23, 2002.

FREESE, E. (1959) **The Specific Mutagenic Effect of Base Analogues on Phage T4.** Disponível em: <<http://www.worldlingo.com/ma/enwiki/en/Mutation>> Acesso em: 28 de. 2010.

FUNATURA 2000. **Fundação Pró-Natureza.** Disponível em: <[http://www.funatura.org.br/htm/projetos/atuais/rede\\_cerrado.htm](http://www.funatura.org.br/htm/projetos/atuais/rede_cerrado.htm)> acesso em: 28 set. 2010.

GALPERIN, M. Y.; COCHRANE, G. **The 2011 Nucleic Ácids Research Database**

**issue and the online molecular Biology Database collection.** *Nucleic Acids research*, vol.39, p. D1-D6, 2011.

GONÇALVES, M. L.; FONTANA, C. S. **Relação entre idade e o padrão de coloração da plumagem do sabiá-laranjeira, *Turdus vieillot*, 1818.** X Salão de iniciação científica – PUCRS, p. 412-414, 2009.

HEBERT, P. D. N.; WAARD, J. R.; LANDRY, J, F. **DNA barcodes for 1/100 of the animal kingdom.** 2009. Disponível em <<http://rsbl.royalsocietypublishing.org/content/6/3/359.abstract> > acesso em: 03 jun. 2010.

HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L.; DEWAARD, R. **Biological identifications through DNA barcodes.** *Biological Science*, v. 270, p. 313-321, 2010a.

HEBERT, P. D. N.; RATNASINGHAM, S.; WAARD, J. R. **Barcode animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species.** *Biological Sciences*, v. 270, s96-s99, 2010b.

HILDEBRAND, M.; GOSLOW, G. **Análise da Estrutura dos Vertebrados.** 3ª. São Paulo: Atheneu, 1995.

IBAMA. 2007. Disponível em: <<http://www.mochileiros.com/mais-de-8-mil-pecas-de-artesanato-c-partes-de-animais-t24455.html>> acesso em 13 nov. 2010.

INPE. Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (2004). Disponível em: <[http://www.inpe.br/noticias/noticia.php?Cod\\_Noticia=2244](http://www.inpe.br/noticias/noticia.php?Cod_Noticia=2244)> Acesso em: 29 dez. 2010.

IUCN. Vers. 2010.4. 2010. Disponível em: <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)> Acesso em: 29 dez. 2010.

JACQUES, G. S. **Identificação de espécies animais usando sequencias de genes mitocondriais no combante ao crime contra a fauna.** Brasília: UCB, 2005. Dissertação de Mestrado Ciencia Genômica e Biotecnologia, Instituto de Biociências, Universidade Católica de Brasília, 2005.

KAMINUMA, E.; KOSUGE, T.; KODAMA, Y. AONO, H.; MASHIMA, J.; GOJOBORI, T.; SUGAWARA, H.; OGASAWARA, O.; TAKAGI, T.; OKUBO, K.; NAKAMURA, Y. **DDBJ progress report.** *Nucleic Acids Research*, vol. 39, p. D22-D27, 2011.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. **A conservação do Cerrado brasileiro.** Megadiversidade, n. 1, p. 1-9, 2005.

KOCHER, T. D.; THOMAS, W. K.; MEYER, A.; EDWARDS, S. V.; PÃÃBO, S.; VILLABLANCA, F. X.; WILSON, A. C. **Dynamics of mitochondrial DNA evolution in**

**animals: amplification and sequencing with conserved primers.** *Proceedings of the National Academy of Sciences the USA*, v. 86, n. 16, p. 6196-6200, 1989.

KOSUGE, T.; ABE, T.; OKIDO, T. TANAKA, N.; HIRAHATA, M.; MARUYAMA, Y.; MASHIMA, J.; TOMIKI, A.; KUROKAWA, M.; HIMENO, R.; MARUYAMA, Y. MIYAZAKI, S.; SUGAWARA, H. **Exploration and grading of possible genes from 183 bacterial strains by a common protocol to identification of new genes: Gene Trek in Prokaryote Space (GTPS).** *DNA Research*, v. 13, p. 245-254, 2006.

LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS. G.; BROWN, N. P.; CHENNA, R.; McGETTIGAN, P. A.; McWILIAN, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I. M.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; HIGGINS, D. G.. **Clustalw and Clustalw version 2.0.** *Bioinformatics*, V. 23, p. 2947-2948, 2007.

LBSM. **Blast passo a passo.** Disponível em:

<http://www.lbsbm.microbiologia.ufrj.br/PAGINA%20EM%20PORTUGUES/DOWNLOAD/INTERNA%20MATERIAL%20DIDATICO/curso2/aula5/aula5%2020blastpassoapasso.pdf>> acesso em: 28 dez. 2010.

LEINONEN, R.; AKHTAR, R. BIRNEY, E.; BONFIELD, J.; BOWER, L.; CORBETT, M.; CHENG, Y.; DEMIRALP, F. **Improvements to Services at the Europeannucleotide Archive.** *Nucleics Acids Research*, vol. 38, p. D39-D45, 2010.

LEINONEN, R.; SUGAWARA, H.; SHUMWAY, M. **The Sequence Reads Archive.** *Nucleics Acids Research*, vol. 39, p. D19-D21, 2011.

LEINONEN, R.; AKHTAR, R.; BIRNEY, E.; BOWER, L.; CERDENO-TÁRRAGA, A.; CHENG, Y.; CLELAND, I.; FARUQUE, N. GOODGAME, N.; GIBSON, R.; HOAD, G.; JANG, M. **The European Nucleotide Archive.** *Nucleic Acids Research*, vol.39, p. D28-D31, 2011.

LEWIN, B. **Genes.** New York: Oxyford University Press Inc. 1994.

MARSHALL, E. **Will DNA bar codes breathe life into classification?** *Science*, vol. 307, p. 1037, 2005.

MÉIO, B. B.; FITAS, C. V.; LEUSEROBERTA, J.; SILVA, M. E. F.; RIBEIRO, J. F.; HENRIQUES, R. P. B. **Influencia da flora das florestas Amazônica e Atlântica na vegetação do cerrado sensu stricto.** *Revista Brasileira de Botânica*, v. 26, n. 4, p. 437-444, 2003.

MILLER, S. E. **Consortium for the Barcode of Life: Supportt for Consortium Activities and Secretariat Office.** Conference, 2006.

MIYAKI, C. Y.; MATIOLI, S. R.; WAJNTAL, T.; BURKE, A. **Parrot Evolution and**

**Paleogeographical Events: Mitochondrial DNA Evidence.** *Molecular Biology and Evolution*, v. 15, n. 5, p. 544-551, 2010.

MOURA, F. B. P.; MARQUES, J. G. W. **Zooterapia popular na Chapada Diamantina: uma medicina incidental?** *Ciencia e Saúde Coletiva*, v.13, p. 2179-2187, 2008.

MURUGAIAH, C.; NOOR, M. Z.; MASTAKIM, M.; BILUNG, L. M.; SELAMAT, J.; RADU, S. **Meat species identification and halal authentication analysis using mitochondrial DNA.** *Meat Science*, v. 83, 57-61, 2009.

NOTÍCIAS AMBIENTE. 2003. Disponível em:

<<http://ecoviagem.uol.com.br/noticias/ambiente/nossa-fauna/ibama-lancou-campanha-contra-venda-ilegal-de-artesanato-de-animais-silvestres-2776.asp>> Acesso em: 10 nov. 2010.

NOVAK, R. **Walker's Mammals of the world.** Baltimore and London: The Johns Hopkins University Press, 1999.

NSDL – Internet Scout Project. **National Science Digital Library** Disponível em: <http://nsdl.org/resource/2200/test.20061004111541306T> Acesso em: 27 jan. de 2011.

NYBAKKEN, J. W.; STORER, T. I.; USINGER, R. L.; STEBBINS-STORER, R. C. **Zoologia Geral.** 6ª. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2002.

ORR, R. T. **Biologia dos Vertebrados.** São Paulo: Roca, 1986.

ORTOLANI, A.; CARO, T. M. **The adaptive significance of color patterns in carnivores: phylogenetics tests of classic hypotheses.** *Carnivore behavior, ecology and Evolution*, vol. 2, p. 132-188, 1996.

PLANETA ORGANICO. 2008. Disponível em:

<<http://www.planetaorganico.com.br/17leisamb.htm>> Acesso em: 20 nov. 2010.

PORTAL BRASIL. **Biodiversidade.** Disponível em:

<<http://www.brasil.gov.br/sobre/geografia/biodiversidade/fauna>> acesso em 20 nov. 2010.

PRESTI, F. T. **Caracterização da variabilidade genética em espécies de psitacídeos ameaçados.** São Paulo: USP, 2006. Dissertação, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 2006.

PROSDOCIMI, F. **Racionalizando a utilização do algoritmo PHRED para a análise de sequências de DNA.** Belo Horizonte/MG: UFMG, 2006. Tese, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, 2006.

PROSDOCIMI, F.; CERQUEIRA, G. C.; BINNECK, E.; SILVA, A. F.; REIS, A. N.;

JUNQUEIRA, A. C. M.; SANTOS, A. C. F. **Bioinformática - manual do usuário. Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento.** 2010. Disponível em: <<http://web.cena.usp.br/apostilas/Figueira/2008/Trabalhos/bioinformatica.pdf>> Acesso em: 04 jan. 2011.

QUADROS, J.; MONTEIRO FILHO, E. L. A. **Revisão conceitual de padrões microestruturais e propostas nomenclatória para os pelo-guarda de mamíferos brasileiros.** *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 23, p.279-292, 2006.

QUADROS, J.; MONTEIRO FILHO, E. L. A. **Coleta e Preparação de pelos de Mamíferos para Identificação em Microscopia Óptica.** *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 23, p. 271-278, 2006.

RACH, R.; DESALLE, R.; SARKAR, I. N.; SCHIERWATER, B.; HADRY, H. **Character-based DNA barcoding allows discrimination of genera, species and populations in Odonata.** *Biological Sciences.*, n. 275, p. 237– 247, 2010.

RATNASINGHAM, S.; Hebert, P. D. N. **Bold: The Barcode of Life Data System.** *Molecular Ecology Notes*, v. 7, p. 1-10, 2007

RENTAS. Rede Nacional de Combate ao Tráfico de Animais Silvestre. **1º Relatório sobre o tráfico de fauna silvestre.** Brasília, 2000. Disponível em: <[http://www.rentas.org.br/files/REL\\_RENTAS\\_pt\\_final.pdf](http://www.rentas.org.br/files/REL_RENTAS_pt_final.pdf)> Acesso em: 29 dez. 2010.

RIBEIRO, L. B.; SILVA, M. G. **O comércio ilegal põe em risco a diversidade de aves no Brasil.** *Ciência e Cultura*,v.4, n. 59, p. 4-5, 2007.

RICHMOND, J. Q.; JOCKUSCH, E. L. **Body size evolution simultaneously creates and collapse species boundaries in a clade of scincid lizards.** *Proc. Biol. Sci.* v. 274, p. 1701-1708, 2007.

ROCHA-MENDES, F.; MIKICH, S. B.; BIANCONI, G. V.; PEDRO, W. A. **Mamíferos do município de Fênix, Paraná, Brasil: etnozootaxia e conservação.** *Revista Brasileira de Zoologia*, v.4, p. 991-1002, 2005.

ROLIM, M. R. S.; SAWAYA, M. C. T. **Manual prático de Medicina Legal no Laboratório.** Curitiba: Juara, 2009.

SAVOLAINEN, V.; COWAN, R. S.; VOGLER, A. P.; RODERICK, G. K.; LANE, R. **Towards Writing the encyclopedia of life: an introduction to DNA barcoding.** *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Phil. Trans. R. Soc. B.* v. 360, n.1462, p. 1805-1811, 2005.

SICK, H. **Ornitologia brasileira.** Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 2001.

SILVÉRIO, J. . **Identificação genética de espécies de tubarões e monitoramento da pesca no litoral de São paulo**. Botucatu/SP: UNESP, 2010. Dissertação de Mestrado em Ciências Biológica, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, 2010.

SIMGENE, **ClustalW**. Disponível em: <<http://www.simgene.com/ClustalW>> Acesso em: fev. de 2011.

SINDIPOL-BRASIL. **Crimes contra a fauna**. *Phoenix Magazine*, Brasília: n°. VIII, p. 18-22, 2006.

TAMADA, T.; SIRIAROONRAT, B.; SUBRAMANIAM, V.; HAMACHI, M.; LIN, L.; OSHIDA, T.; RERKAMNUAYCHOKE, W.; MASUDA, R. **Molecular Diversity and Phylogeography of the Asian leopard Cat, *Felis bengalensis*, Inferred from Mitochondrial and Y-Chromosomal DNA Sequences**. *Zoological Science*, v. 28, 154-163, 2008.

TAMURA, K.; NEI, M. **Estimation of the number of nucleotide substitutions in the controls of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees**. *Molecular Biology and Evolution*, v. 3, n. 10, p. 512-526, 1993.

TAVARES, E. S.; BAKER, A. J.; PEREIRA, S. L.; MIYAKI, C. Y. **Phylogenetic Relationships and historical Biogeography of Neotropical Parrots (Psittaciformes: psitacidae) inferred from Mitochondrial and nuclear DNA Sequences**. *Systematic Biology*, v. 55, p. 454-470, 2006.

TEIXEIRA, T. P. B. **Análise da atuação das instituições de defesa do meio ambiente nas esferas civil e criminal, no controle aos problemas ambientais do Estado de Mato Grosso**. Tese, Engenharia Ambiental, UFRJ, 2002. Rio de Janeiro, 2002.

TIEPOLO, M. L.; M. W. In Oliveira, S. V TOMAS. **Registro de albinismo parcial em veado cantingueiro *Mazama gouazoubira* (G. Fisher, 1814) (*Artiodactyla*, *Cervidae*) na Serra do Sudeste, Rio Grande do Sul, Brasil**. *Biodiversidade Pampeana*, p. 13-15, 2009.

TUBELIS, D. P.; TOMAS, W. M. **Bird species of the wetland, Brasil**. *Ararajuba*, v. 11, n. 1, p. 5-37, 2003.

TUIMALA, J. **Using ClustalX for multiple sequence alignment**. 2004. Disponível em: <[http://www.clustal.org/doc/jarno\\_tuimala\\_clustalx.pdf](http://www.clustal.org/doc/jarno_tuimala_clustalx.pdf)> Acesso em: fev. de 2011.

UFMT – universidade Federal de Mato Grosso – 2008. Disponível em: <[http://www.ufmt.br/institucional/reitoria/balanco\\_social/html/zoologico.htm](http://www.ufmt.br/institucional/reitoria/balanco_social/html/zoologico.htm)> Acesso em: jan. de 2011.

VERMA, S. K.; SINGH, L. **Novel Universal primers establish identity of an enormous number of animal species for forensic application**. *Molecular Ecology*,

v.3, p. 28-31, 2003.

VIRKLER, K.; LEDNEV, I. K. **Analysis of body fluids for forensic purposes: from laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene.** *Forensic Science International*, vol.188, p. 1-17, 2009.

WADE, N. **A revolution at 50; Watson and Crick, both aligned and apart, reinvented biology.** *New York Time*, New York, 25 fev. 2003.

WERLE, E.; SCHNEIDER, C.; RENNER, M.; VOLKER, M.; FIEHN, W. **Convenient single-step, one tube purification of PCR products for direct sequencing.** *Nucleic Acids Research*, v. 22, p. 4354-4355, 1994.

WOLTANSKI, A. **Myemecophaga tridactyla.** 2010. Disponível em: <[http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Myrmecophaga\\_tridactyla.html](http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Myrmecophaga_tridactyla.html)> Acesso em: 28 dez. de 2010.

Woese, C.R.; Fox, G.E. **Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.74, p. 5088-5090, 1997.

WWF-BRASIL. **World Wide Fund for Nature.** 1994. Disponível em: <<http://www.wwf.org/projetos/projeto.asp?lista=bioma&item=10&item=17>> Acesso em: 28 set. de 2010.

ZUERCHER, G. L.; GIPSON, P. S.; STEWART, G. C. **Identification of carnivore feces by local peoples and molecular analyses.** *Wildlife Society Bulletin*, vol. 31, p. 961-970, 2003.

## 8 Anexos

### 8.1 Lista de figuras com resultados “Blast” das sequências consenso das amostras Referencia e Questionada.

E Value	Name	Description	Organism	Sequence Length	Accession	% Pairwise Identity	GID	% Identical Sites	Bit-Score
1.14e-143	AY286204	Ara ararauna cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial gene for mitoc...	Ara ararauna	1,002	AY286204	98.6%	31074342	98.6%	518.182
5.29e-142	AAU70761	Ara ararauna cytochrome b (cyt b) gene, mitochondrial gene encoding mitochond...	Ara ararauna	1,002	U70761	98.3%	3169221	98.3%	512.642
3.21e-134	AY274038	Nandayus nenday NADH dehydrogenase subunit 5 (nd5) gene, partial cds; cytoc...	Nandayus nenday	1,280	AY274038	91.7%	33621757	91.7%	486.789
5.37e-132	DQ150994	Ara ararauna cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	Ara ararauna	888	DQ150994	98.9%	76096723	98.9%	479.403
1.16e-128	AF370770	Orthopsittaca manilata isolate LGEMA1852 cytochrome b (cytb) gene, partial cds;...	Orthopsittaca manilata	1,023	AF370770	93.6%	33305115	93.6%	468.323
5.41e-127	AF370771	Orthopsittaca manilata isolate LGEMA2383 cytochrome b (cytb) gene, partial cds;...	Orthopsittaca manilata	1,023	AF370771	93.3%	33305117	93.3%	462.783
5.41e-127	AY669401	Aratinga weddelli voucher USP/LGEMA 2085 cytochrome b (cytb) gene, complete ...	Aratinga weddelli	1,140	AY669401	90.4%	56277843	90.4%	462.783
2.52e-125	AF346363	Ara macao isolate 44 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	Ara macao	993	AF346363	90.0%	33340891	89.8%	457.243
2.52e-125	AF370766	Ara severa isolate LGEMA2407 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	Ara severa	1,023	AF370766	93.0%	33305107	93.0%	457.243
2.52e-125	AF370765	Ara severa isolate LGEMA1629 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	Ara severa	1,023	AF370765	93.0%	33305105	93.0%	457.243

**Figura 15.** Resultado das 10 primeiras sequencias, ordenadas por ordem decrescentes de valores de Bit-Score, geradas a partir da interface blast integrada ao programa Geneious v5.3 para o segmento de sequência do gene Cytb da espécie *Ara ararauna*.

E Value	U	Name	Description	Organism	Sequence Length	Accession	% Pairwise Identity	GID	% Identical ...	Bit-Score
4.19e-148	AF346367	Ara chloropterus isolate 48 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitoch...	Ara chloropterus	928	AF346367	96.2%	33340899	96.0%	532.955	
9.06e-145	AY669858	Ara chloropterus cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	Ara chloropterus	307	AY669858	98.0%	56277831	98.0%	521.875	
4.22e-143	AF346366	Ara macao isolate 47 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	Ara macao	949	AF346366	93.5%	33340897	93.4%	516.336	
1.52e-142	AF346363	Ara macao isolate 44 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	Ara macao	993	AF346363	92.7%	33340891	92.5%	514.489	
2.54e-140	AF346365	Ara macao isolate 46 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	Ara macao	820	AF346365	93.7%	33340895	93.6%	507.102	
4.34e-123	AF370766	Ara severa isolate LGEMA2407 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mit...	Ara severa	1,023	AF370766	92.4%	33305107	92.4%	449.856	
4.34e-123	AF370765	Ara severa isolate LGEMA1629 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mit...	Ara severa	1,023	AF370765	92.4%	33305105	92.4%	449.856	
7.31e-116	AY283496	Pionus menstruus cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial g...	Pionus menstruus	1,103	AY283496	88.0%	37575027	88.0%	425.85	
7.31e-116	AY283461	Amazona finschi cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial gen...	Amazona finschi	1,168	AY283461	88.0%	37574957	88.0%	425.85	
3.40e-114	AY669402	Anodorhynchus leari voucher USP/LGEMA 410 cytochrome b (cytb) gene,...	Anodorhynchus leari	1,140	AY669402	88.1%	56277845	88.1%	420.31	

**Figura 16.** Resultado das 10 primeiras sequencias, ordenadas por ordem decrescentes de valores de Bit-Score, geradas a partir da interface blast integrada ao programa Geneious v5.3 para o segmento de sequência do gene Cytb da espécie *Ara chloropterus*.

E Value	Name	Description	Organism	Sequence Length	Accession	% Pairwise Identity	GID	% Identical ...	Bit-Score
5.11e-172	AF346363	Ara macao isolate 44 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	Ara macao	993	AF346363	97.9%	33340891	97.7%	612.361
6.61e-171	AF346366	Ara macao isolate 47 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	Ara macao	949	AF346366	98.6%	33340897	98.5%	608.668
8.55e-170	AF346365	Ara macao isolate 46 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	Ara macao	820	AF346365	99.2%	33340895	99.1%	604.975
3.21e-139	AF346367	Ara chloropterus isolate 48 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	Ara chloropterus	928	AF346367	94.6%	33340899	94.4%	503.409
1.15e-138	AY669858	Ara chloropterus cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	Ara chloropterus	307	AY669858	96.1%	56277831	96.1%	501.562
9.05e-130	AY669860	Ara macao cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	Ara macao	255	AY669860	100.0%	56277835	100.0%	472.016
3.25e-129	AF346364	Ara macao isolate 45 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	Ara macao	876	AF346364	97.6%	33340893	97.1%	470.169
1.18e-123	AY669402	Anodorhynchus leari voucher USP/LGEMA 410 cytochrome b (cytb) gene, complete cds...	Anodorhynchus leari	1,140	AY669402	89.8%	56277845	89.8%	451.703
5.48e-122	AF370766	Ara severa isolate LGEMA2407 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	Ara severa	1,023	AF370766	92.3%	33305107	92.3%	446.163
5.48e-122	AF370765	Ara severa isolate LGEMA1629 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	Ara severa	1,023	AF370765	92.3%	33305105	92.3%	446.163

**Figura 17.** Resultado das 10 primeiras sequencias, ordenadas por ordem decrescentes de valores de Bit-Score, geradas a partir da interface blast integrada ao programa Geneious v5.3 para o segmento de sequência do gene Cytb da espécie *Ara macao*.

E Value	U	Name	Description	Organism	Sequence Length	Accession	% Pairwise Identity	GID	% Identical ...	Bit-Score
6.66e-171	AY283469		Amazona aestiva clone 1 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitoch...	Amazona aestiva	1,138	AY283469	97.5%	37574973	97.5%	608.668
8.62e-170	AY283448		Amazona aestiva clone 3 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitoch...	Amazona aestiva	595	AY283448	97.2%	37574931	97.2%	604.975
8.62e-170	AY283497		Amazona aestiva clone 4 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitoch...	Amazona aestiva	1,045	AY283497	97.2%	37575029	97.2%	604.975
4.01e-168	AY283472		Amazona aestiva clone 2 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitoch...	Amazona aestiva	1,095	AY283472	97.0%	37574979	96.9%	599.435
1.88e-161	AY283468		Amazona ochrocephala tresmariae cytochrome b (cytb) gene, partial cds...	Amazona ochrocephala tresmariae	1,142	AY283468	95.8%	37574971	95.8%	577.275
1.88e-161	AY283447		Amazona auropalliata cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondri...	Amazona auropalliata	596	AY283447	95.8%	37574929	95.8%	577.275
6.76e-161	AY283466		Amazona versicolor cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial ...	Amazona versicolor	1,107	AY283466	95.6%	37574967	95.6%	575.428
8.74e-160	AY283445		Amazona arausiaca clone 3 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitoch...	Amazona arausiaca	597	AY283445	95.6%	37574925	95.6%	571.735
8.74e-160	AY283465		Amazona arausiaca clone 4 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitoch...	Amazona arausiaca	1,115	AY283465	95.6%	37574965	95.6%	571.735
8.74e-160	AY194405		Amazona ochrocephala ochrocephala isolate ochro1 cytochrome b (cytb) ...	Amazona ochrocephala ochrocephala	694	AY194405	97.9%	37780884	97.9%	571.735

**Figura 18.** Resultado das 10 primeiras sequencias, ordenadas por ordem decrescentes de valores de Bit-Score, geradas a partir da interface blast integrada ao programa Geneious v5.3 para o segmento de sequência do gene Cytb da espécie *Amazona aestiva*.

E Value	Name	Description	Organism	Sequence Length	Accession	% Pairwise Identity	GID	% Identical Sites	Bit-Score	
6.68e-161	AF346370		Anodorhynchus hyacinthinus isolate 51 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mi...	Anodorhynchus hyacinthinus	942	AF346370	97.3%	33340905	97.1%	575.428
5.24e-152	AY669402		Anodorhynchus leari voucher USP/LGEMA 410 cytochrome b (cytb) gene, comple...	Anodorhynchus leari	1,140	AY669402	94.6%	56277845	94.6%	545.882
1.90e-146	AF346369		Anodorhynchus hyacinthinus isolate 50 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mi...	Anodorhynchus hyacinthinus	919	AF346369	97.7%	33340903	97.7%	527.415
1.15e-138	AF370763		Anodorhynchus leari isolate LGEMA410 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mit...	Anodorhynchus leari	1,023	AF370763	95.5%	33305101	95.5%	501.562
2.49e-135	AF370764		Anodorhynchus leari isolate LGEMA620 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mit...	Anodorhynchus leari	1,023	AF370764	94.9%	33305103	94.9%	490.482
1.50e-132	AY274038		Nandayus nenday NADH dehydrogenase subunit 5 (nd5) gene, partial cds; cytoc...	Nandayus nenday	1,280	AY274038	91.5%	33621757	91.5%	481.249
5.39e-132	AHJ70763		Anodorhynchus hyacinthinus cytochrome b (cyt b) gene, mitochondrial gene enc...	Anodorhynchus hyacinthinus	1,002	U70763	96.2%	3169227	96.2%	479.403
5.39e-132	AY286205		Anodorhynchus hyacinthinus cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondria...	Anodorhynchus hyacinthinus	1,002	AY286205	96.2%	31074344	96.2%	479.403
1.17e-128	DQ143286		Anodorhynchus hyacinthinus voucher LGEMA 5281 cytochrome b (cytb) gene, pa...	Anodorhynchus hyacinthinus	888	DQ143286	98.1%	75677915	98.1%	468.323
2.53e-125	AY283461		Amazona finschi cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial gene for mi...	Amazona finschi	1,168	AY283461	89.7%	37574957	89.7%	457.243
2.53e-125	AY283496		Pionus menstruus cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial gene for ...	Pionus menstruus	1,103	AY283496	89.8%	37575027	89.8%	457.243

**Figura 19.** Resultado das 10 primeiras sequencias, ordenadas por ordem decrescentes de valores de Bit-Score, geradas a partir da interface blast integrada ao programa Geneious v5.3 para o segmento de sequência do gene Cytb da espécie *Anodorhynchus hyacinthinus*.

E Value	Name	Description	Organism	Sequence Length	Accession	% Pairwise Identity	GID	% Identical ...	Bit-Score
5.33e-142	FJ652851	Brotogetis versicolorus voucher LGEMA 1595 cytochrome b (cytb) gene, complete cds; ... Brotogetis versicolorus	Brotogetis versicolorus	1,140	FJ652851	93.1%	257786259	93.1%	512.642
5.33e-142	FJ652852	Brotogetis versicolorus voucher LGEMA 1596 cytochrome b (cytb) gene, complete cds; ... Brotogetis versicolorus	Brotogetis versicolorus	1,140	FJ652852	93.1%	257786261	93.1%	512.642
5.33e-142	FJ652853	Brotogetis versicolorus voucher MPEG A08493 cytochrome b (cytb) gene, complete cds; ... Brotogetis versicolorus	Brotogetis versicolorus	1,140	FJ652853	93.1%	257786263	93.1%	512.642
5.33e-142	FJ652850	Brotogetis versicolorus voucher LGEMA 1592 cytochrome b (cytb) gene, complete cds; ... Brotogetis versicolorus	Brotogetis versicolorus	1,140	FJ652850	93.1%	257786257	93.1%	512.642
5.33e-142	FJ652854	Brotogetis versicolorus voucher LSU B7252 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mito... Brotogetis versicolorus	Brotogetis versicolorus	1,082	FJ652854	93.1%	257786265	93.1%	512.642
1.15e-138	FJ652857	Brotogetis chirini voucher LGEMA 5486 cytochrome b (cytb) gene, complete cds; mitocho... Brotogetis chirini	Brotogetis chirini	1,140	FJ652857	92.6%	257786271	92.6%	501.562
1.15e-138	FJ652858	Brotogetis chirini voucher KUMNH 3631 cytochrome b (cytb) gene, complete cds; mitocho... Brotogetis chirini	Brotogetis chirini	1,140	FJ652858	92.6%	257786273	92.6%	501.562
1.15e-138	FJ652856	Brotogetis chirini voucher LSU B37539 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochond... Brotogetis chirini	Brotogetis chirini	1,076	FJ652856	92.6%	257786269	92.6%	501.562
1.15e-138	FJ652859	Brotogetis chirini voucher UWBM 71475 cytochrome b (cytb) gene, complete cds; mitocho... Brotogetis chirini	Brotogetis chirini	1,140	FJ652859	92.6%	257786275	92.6%	501.562
5.36e-137	FJ652848	Brotogetis trica voucher LGEMA 5366 cytochrome b (cytb) gene, complete cds; mitocho... Brotogetis trica	Brotogetis trica	1,140	FJ652848	92.3%	257786253	92.3%	496.022
2.50e-135	FJ652863	Brotogetis pyrrhopterus voucher ANSP 1809 cytochrome b (cytb) gene, complete cds; ... Brotogetis pyrrhopterus	Brotogetis pyrrhopterus	1,140	FJ652863	91.8%	257786283	91.8%	490.482

**Figura 20.** Resultado das 11 primeiras sequencias, ordenadas por ordem decrescentes de valores de Bit-Score, geradas a partir da interface blast integrada ao programa Geneious v5.3 para o segmento de sequência do gene Cytb da espécie *Brotogetis versicolorus*.

E Value	Name	Description	Organism	Sequence Length	Accession	% Pairwise Identity	GID	% Identical Sites	Bit-Score
1.10e-178	EF517605	Pionus menstruus voucher IBUSP2087 cytochrome b (cytb) gene, complete cds; ... Pionus menstruus	Pionus menstruus	1,140	EF517605	99.4%	154371562	99.4%	634.521
1.10e-178	EF517604	Pionus menstruus voucher IBUSP2938 cytochrome b (cytb) gene, complete cds; ... Pionus menstruus	Pionus menstruus	1,140	EF517604	99.4%	154371560	99.4%	634.521
1.10e-178	EF517603	Pionus menstruus voucher IBUSP866 cytochrome b (cytb) gene, complete cds; mi... Pionus menstruus	Pionus menstruus	1,140	EF517603	99.4%	154371558	99.4%	634.521
1.10e-178	AY669403	Pionus menstruus menstruus voucher USPLGEMA 2087 cytochrome b (cytb) gen... Pionus menstruus menstruus	Pionus menstruus menstruus	1,140	AY669403	99.4%	56277847	99.4%	634.521
5.11e-177	EF517602	Pionus menstruus voucher IBUSP846 cytochrome b (cytb) gene, complete cds; mi... Pionus menstruus	Pionus menstruus	1,140	EF517602	99.1%	154371556	99.1%	628.981
2.38e-175	EF517608	Pionus menstruus rubrigularis voucher NMNH B311 cytochrome b (cytb) gene, co... Pionus menstruus rubrigularis	Pionus menstruus rubrigularis	1,140	EF517608	98.9%	154371568	98.9%	623.441
2.38e-175	EF517606	Pionus menstruus rubrigularis voucher NMNH B1402 cytochrome b (cytb) gene, c... Pionus menstruus rubrigularis	Pionus menstruus rubrigularis	1,140	EF517606	98.9%	154371564	98.9%	623.441
2.38e-175	EF517610	Pionus menstruus reichenowii voucher IBUSP 2488 cytochrome b (cytb) gene, co... Pionus menstruus reichenowii	Pionus menstruus reichenowii	1,140	EF517610	98.9%	154371572	98.9%	623.441
2.38e-175	EF517607	Pionus menstruus rubrigularis voucher NMNH B277 cytochrome b (cytb) gene, co... Pionus menstruus rubrigularis	Pionus menstruus rubrigularis	1,140	EF517607	98.9%	154371566	98.9%	623.441
2.38e-175	EF517609	Pionus menstruus rubrigularis voucher NMNH B551 cytochrome b (cytb) gene, co... Pionus menstruus rubrigularis	Pionus menstruus rubrigularis	1,140	EF517609	98.9%	154371570	98.9%	623.441

**Figura 21.** Resultado das 10 primeiras sequencias, ordenadas por ordem decrescentes de valores de Bit-Score, geradas a partir da interface blast integrada ao programa Geneious v5.3 para o segmento de sequência do gene Cytb da espécie *Pionus menstruus*.

E Value	Name	Description	Organism	Sequence Length	Accession	% Pairwise Identity	GID	% Identical Sites	Bit-Score
1.15e-138	AB210238	Prionailurus bengalensis mitochondrial cytb gene for cytochrome b, complete cds,... Prionailurus bengalensis	Prionailurus bengalensis	1,140	AB210238	91.9%	169807936	91.9%	501.562
1.15e-138	AB210237	Prionailurus bengalensis mitochondrial cytb gene for cytochrome b, complete cds... Prionailurus bengalensis	Prionailurus bengalensis	1,140	AB210237	91.9%	169807934	91.9%	501.562
5.37e-137	FJ788107	Prionailurus bengalensis euphlura cytochrome b (CYTB) gene, partial cds; mitocho... Prionailurus bengalensis euphlura	Prionailurus bengalensis euphlura	1,102	FJ788107	91.6%	225580013	91.6%	496.022
5.37e-137	AB194818	Prionailurus bengalensis euphlura mitochondrial cytb gene for cytochrome b, com... Prionailurus bengalensis euphlura	Prionailurus bengalensis euphlura	1,140	AB194818	91.6%	68299574	91.6%	496.022
5.37e-137	AB210226	Prionailurus bengalensis mitochondrial cytb gene for cytochrome b, complete cds,... Prionailurus bengalensis	Prionailurus bengalensis	1,140	AB210226	91.6%	169807912	91.6%	496.022
2.50e-135	AB210227	Prionailurus bengalensis mitochondrial cytb gene for cytochrome b, complete cds,... Prionailurus bengalensis	Prionailurus bengalensis	1,140	AB210227	91.3%	169807914	91.3%	490.482
2.50e-135	AB210235	Prionailurus bengalensis mitochondrial cytb gene for cytochrome b, complete cds,... Prionailurus bengalensis	Prionailurus bengalensis	1,140	AB210235	91.3%	169807930	91.3%	490.482
2.50e-135	AB210228	Prionailurus bengalensis iriomotensis mitochondrial cytb gene for cytochrome b, c... Prionailurus iriomotensis	Prionailurus iriomotensis	1,140	AB210228	91.3%	169807916	91.3%	490.482
2.50e-135	AB210233	Prionailurus bengalensis mitochondrial cytb gene for cytochrome b, complete cds,... Prionailurus bengalensis	Prionailurus bengalensis	1,140	AB210233	91.3%	169807926	91.3%	490.482
2.50e-135	AB210230	Prionailurus bengalensis mitochondrial cytb gene for cytochrome b, complete cds,... Prionailurus bengalensis	Prionailurus bengalensis	1,140	AB210230	91.3%	169807920	91.3%	490.482
2.50e-135	AB210229	Prionailurus bengalensis mitochondrial cytb gene for cytochrome b, complete cds,... Prionailurus bengalensis	Prionailurus bengalensis	1,140	AB210229	91.3%	169807918	91.3%	490.482
1.16e-133	AB210234	Prionailurus bengalensis mitochondrial cytb gene for cytochrome b, complete cds,... Prionailurus bengalensis	Prionailurus bengalensis	1,140	AB210234	91.1%	169807928	91.1%	484.943
1.16e-133	AB210236	Prionailurus bengalensis mitochondrial cytb gene for cytochrome b, complete cds,... Prionailurus bengalensis	Prionailurus bengalensis	1,140	AB210236	91.1%	169807932	91.1%	484.943
1.16e-133	AY598470S06	Lynx canadensis cytochrome b (CYTB) gene, complete cds; mitochondrial Lynx canadensis	Lynx canadensis	1,140	AY598475	91.1%	51339304	91.1%	484.943

**Figura 22.** Resultado das 14 primeiras sequencias, ordenadas por ordem decrescentes de valores de Bit-Score, geradas a partir da interface blast integrada ao programa Geneious v5.3 para o segmento de sequência do gene Cytb da espécie *Leopardus pardalis*.

E Value	Name	Description	Organism	Sequence Length	Accession	% Pairwise Identity	GID	% Identical Sites	Bit-Score
0	DQ789189	Mazama gouazoupira voucher msg64mgo cytochrome b (cytb) gene, partial cds; ... Mazama gouazoupira	Mazama gouazoupira	985	DQ789189	99.5%	194590720	99.5%	708.387
0	DQ789179	Mazama gouazoupira voucher msg001mgo cytochrome b (cytb) gene, partial cds; ... Mazama gouazoupira	Mazama gouazoupira	985	DQ789179	99.0%	194590700	99.0%	697.307
0	DQ789229	Mazama gouazoupira voucher T69mgo cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mit... Mazama gouazoupira	Mazama gouazoupira	985	DQ789229	99.0%	194590800	99.0%	697.307
0	DQ789181	Mazama gouazoupira voucher msg14mgo cytochrome b (cytb) gene, partial cds; ... Mazama gouazoupira	Mazama gouazoupira	985	DQ789181	99.0%	194590704	99.0%	697.307
0	DQ789186	Mazama gouazoupira voucher msg53mgo cytochrome b (cytb) gene, partial cds; ... Mazama gouazoupira	Mazama gouazoupira	985	DQ789186	99.0%	194590714	99.0%	697.307
0	AY326232	Blastoceros dichotomus haplotype 1 cytochrome b gene, partial cds; mitochondri...	Blastoceros dichotomus	479	AY326232	93.3%	37499590	93.3%	695.461
0	DQ789188	Mazama gouazoupira voucher msg61mgo cytochrome b (cytb) gene, partial cds; ... Mazama gouazoupira	Mazama gouazoupira	985	DQ789188	98.7%	194590718	98.7%	691.767
0	DQ789202	Mazama gouazoupira voucher T112mgo cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mi... Mazama gouazoupira	Mazama gouazoupira	985	DQ789202	98.7%	194590746	98.7%	691.767
0	DQ789203	Mazama gouazoupira voucher T113mgo cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mi... Mazama gouazoupira	Mazama gouazoupira	985	DQ789203	98.7%	194590748	98.7%	691.767
0	AY326231	Blastoceros dichotomus haplotype 2 cytochrome b gene, partial cds; mitochondri...	Blastoceros dichotomus	478	AY326231	93.1%	37499588	93.1%	689.921

**Figura 23.** Resultado das 10 primeiras sequencias, ordenadas por ordem decrescentes de valores de Bit-Score, geradas a partir da interface blast integrada ao programa Geneious v5.3 para o segmento de sequência do gene Cytb da espécie *Mazama gouazoubira*.

E Value	Name	Description	Organism	Sequence Length	Accession	% Pairwise Identity	GID	% Identical Sites	Bit-Score
1.12e-158	AY886755	Myrmecophaga tridactyla isolate Mt1 cytochrome b gene, partial cds; mitochondrial	Myrmecophaga tridactyla	307	AY886755	100.0%	62421820	100.0%	568.042
5.21e-157	AY886757	Myrmecophaga tridactyla isolate Mt3 cytochrome b gene, partial cds; mitochondrial	Myrmecophaga tridactyla	307	AY886757	99.7%	62421824	99.7%	562.502
5.21e-157	AY886758	Myrmecophaga tridactyla isolate Mt4 cytochrome b gene, partial cds; mitochondrial	Myrmecophaga tridactyla	307	AY886758	99.7%	62421826	99.7%	562.502
2.43e-155	AY886756	Myrmecophaga tridactyla isolate Mt2 cytochrome b gene, partial cds; mitochondrial	Myrmecophaga tridactyla	307	AY886756	99.3%	62421822	99.3%	556.962
9.36e-105	AF232023	Tamandua tetradactyla done 7 cytochrome b gene, partial cds; mitochondrial ge...	Tamandua tetradactyla	648	AF232023	86.3%	13128900	86.3%	388.917
1.57e-102	AJ421450	Tamandua tetradactyla complete mitochondrial genome	Tamandua tetradactyla	16,395	AJ421450	86.0%	21425525	86.0%	381.53
7.29e-101	AF232017	Tamandua tetradactyla done 1 cytochrome b gene, partial cds; mitochondrial ge...	Tamandua tetradactyla	648	AF232017	85.7%	13128889	85.7%	375.99
3.39e-99	AF232022	Tamandua tetradactyla done 6 mitochondrial cytochrome b nuclear pseudogene, ...	Tamandua tetradactyla	648	AF232022	85.4%	13128899	85.4%	370.45
5.76e-87	EF186442	Rattus hoffmanni isolate HoSu061b cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitoch...	Rattus hoffmanni	713	EF186442	83.4%	139472284	83.4%	329.824
5.76e-87	EF186441	Rattus hoffmanni isolate HoSu044b cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitoch...	Rattus hoffmanni	713	EF186441	83.4%	139472282	83.4%	329.824

**Figura 24.** Resultado das 10 primeiras sequencias, ordenadas por ordem decrescentes de valores de Bit-Score, geradas a partir da interface blast integrada ao programa Geneious v5.3 para o segmento de sequência do gene Cytb da espécie *Myrmecophaga tridactyla*.

E Value	Name	Description	Organism	Sequence Length	Accession	% Pairwise Identity	GID	% Identical Sites	Bit-Score
0	DQ660303	<i>Nasua nasua</i> cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	<i>Nasua nasua</i>	1,140	DQ660303	97.2%	111075376	97.2%	780.406
2.01e-132	X94931	<i>B.gabii</i> mitochondrial DNA for cytochrome b (complete sequence)	<i>Bassaricyon gabii</i>	1,140	X94931	85.7%	1289206	85.7%	481.249
9.35e-131	GQ169038	<i>Nasuella olivacea</i> voucher EPN3414 cytochrome b (cytb) gene, complete cds; mit...	<i>Nasuella olivacea</i>	1,140	GQ169038	85.6%	290784294	85.6%	475.709
9.42e-126	DQ660299	<i>Bassaricyon alleni</i> cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	<i>Bassaricyon alleni</i>	1,140	DQ660299	84.9%	111075368	84.9%	459.089
3.39e-125	DQ533940	<i>Nasua narica</i> cytochrome b (CYTB) gene, complete cds; mitochondrial	<i>Nasua narica</i>	1,140	DQ533940	84.8%	110276928	84.8%	457.243
2.04e-122	DQ660300	<i>Bassaricyon gabii</i> cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	<i>Bassaricyon gabii</i>	1,140	DQ660300	84.4%	111075370	84.4%	448.01
3.49e-105	Y11832	<i>Dasybus novemcinctus</i> complete mitochondrial genome	<i>Dasybus novemcinctus</i>	17,056	Y11832	82.3%	2252500	82.3%	390.763
1.25e-104	AM258888	<i>Mustela nivalis</i> mitochondrial cyt-b gene for cytochrome b, tissue library Dk98	<i>Mustela nivalis</i>	1,140	AM258888	82.3%	242375724	82.3%	388.917
1.25e-104	AM258875	<i>Mustela nivalis</i> mitochondrial cyt-b gene for cytochrome b, tissue library It82	<i>Mustela nivalis</i>	1,140	AM258875	82.3%	242375698	82.3%	388.917
1.25e-104	AM258862	<i>Mustela nivalis</i> mitochondrial cyt-b gene for cytochrome b, tissue library UK38	<i>Mustela nivalis</i>	1,140	AM258862	82.3%	242375672	82.3%	388.917

**Figura 25.** Resultado das 10 primeiras sequencias, ordenadas por ordem decrescentes de valores de Bit-Score, geradas a partir da interface blast integrada ao programa Geneious v5.3 para o segmento de sequência do gene Cytb da espécie *Nasua nasua*.

E Value	Name	Description	Organism	Sequence Length	Accession	% Pairwise Identity	GID	% Identical Sites	Bit-Score
1.16e-138	AB210238	<i>Prionailurus bengalensis</i> mitochondrial cytb gene for cytochrome b, complete cds, haplo...	<i>Prionailurus bengalensis</i>	1,140	AB210238	91.9%	169807936	91.9%	501.562
1.16e-138	AB210237	<i>Prionailurus bengalensis</i> mitochondrial cytb gene for cytochrome b, complete cds, haplo...	<i>Prionailurus bengalensis</i>	1,140	AB210237	91.9%	169807934	91.9%	501.562
5.39e-137	FJ788107	<i>Prionailurus bengalensis</i> euphilura cytochrome b (CYTB) gene, partial cds; mitochondrial	<i>Prionailurus bengalensis euphilura</i>	1,102	FJ788107	91.6%	225580013	91.6%	496.022
5.39e-137	AB194818	<i>Prionailurus bengalensis</i> euphilura mitochondrial cytb gene for cytochrome b, complete cds	<i>Prionailurus bengalensis euphilura</i>	1,140	AB194818	91.6%	68299574	91.6%	496.022
5.39e-137	AB210226	<i>Prionailurus bengalensis</i> mitochondrial cytb gene for cytochrome b, complete cds, haplo...	<i>Prionailurus bengalensis</i>	1,140	AB210226	91.6%	169807912	91.6%	496.022
2.51e-135	AB210227	<i>Prionailurus bengalensis</i> mitochondrial cytb gene for cytochrome b, complete cds, haplo...	<i>Prionailurus bengalensis</i>	1,140	AB210227	91.3%	169807914	91.3%	490.482
2.51e-135	AB210229	<i>Prionailurus bengalensis</i> mitochondrial cytb gene for cytochrome b, complete cds, haplo...	<i>Prionailurus bengalensis</i>	1,140	AB210229	91.3%	169807918	91.3%	490.482
2.51e-135	AB210233	<i>Prionailurus bengalensis</i> mitochondrial cytb gene for cytochrome b, complete cds, haplo...	<i>Prionailurus bengalensis</i>	1,140	AB210233	91.3%	169807926	91.3%	490.482
2.51e-135	AB210228	<i>Prionailurus bengalensis iriomotensis</i> mitochondrial cytb gene for cytochrome b, comple...	<i>Prionailurus iriomotensis</i>	1,140	AB210228	91.3%	169807916	91.3%	490.482
2.51e-135	AB210230	<i>Prionailurus bengalensis</i> mitochondrial cytb gene for cytochrome b, complete cds, haplo...	<i>Prionailurus bengalensis</i>	1,140	AB210230	91.3%	169807920	91.3%	490.482
2.51e-135	AB210235	<i>Prionailurus bengalensis</i> mitochondrial cytb gene for cytochrome b, complete cds, haplo...	<i>Prionailurus bengalensis</i>	1,140	AB210235	91.3%	169807930	91.3%	490.482
1.17e-133	AY928671	<i>Lynx canadensis</i> cytochrome b (CYTB) gene, complete cds; mitochondrial	<i>Lynx canadensis</i>	1,140	AY928671	91.1%	62870482	91.1%	484.943
1.17e-133	AB210236	<i>Prionailurus bengalensis</i> mitochondrial cytb gene for cytochrome b, complete cds, haplo...	<i>Prionailurus bengalensis</i>	1,140	AB210236	91.1%	169807932	91.1%	484.943
1.17e-133	AB210231	<i>Prionailurus bengalensis</i> mitochondrial cytb gene for cytochrome b, complete cds, haplo...	<i>Prionailurus bengalensis</i>	1,140	AB210231	91.1%	169807922	91.1%	484.943

**Figura 26.** Resultado das 14 primeiras sequencias, ordenadas por ordem decrescentes de valores de Bit-Score, geradas a partir da interface blast integrada ao programa Geneious v5.3 para o segmento de sequência do gene Cytb da espécie encaminhada como sendo jaguatirica (*Leopardus pardalis*).

E Value	Name	Description	Organism	Sequence Length	Accession	% Pairwise Identity	GID	% Identical ...	Bit-Score
5.23e-172	GU136721	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i> voucher NK27254 cytochrome B (cytb) gene, complet...	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	1,140	GU136721	97.5%	289152543	97.5%	612.361
4.19e-148	FJ430787	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i> cytochrome b gene, partial cds; mitochondrial	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	336	FJ430787	98.1%	215260050	98.1%	532.955
2.67e-105	GU136722	<i>Kerodon rupestris</i> voucher KR40 cytochrome B (cytb) gene, partial cds; mitochond...	<i>Kerodon rupestris</i>	1,128	GU136722	86.5%	289152545	86.5%	390.763
4.62e-78	DQ000481	<i>Peromyscus hylocetes</i> voucher TK45309 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mi...	<i>Peromyscus hylocetes</i>	1,143	DQ000481	82.0%	62822566	82.0%	300.278
2.15e-76	DQ000480	<i>Peromyscus spicilegus</i> voucher TK47888 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mi...	<i>Peromyscus spicilegus</i>	1,143	DQ000480	81.7%	62822564	81.7%	294.738
2.78e-75	GU136747	<i>Cavia aperea pamparum</i> voucher NK110550 cytochrome B (cytb) gene, complete ...	<i>Cavia aperea pamparum</i>	1,140	GU136747	81.6%	289152595	81.6%	291.044
2.78e-75	FN640573	<i>Talpa levantis</i> mitochondrial partial cytb gene for cytochrome b, specimen voucher...	<i>Talpa levantis</i>	1,122	FN640573	81.7%	294337796	81.7%	291.044
2.78e-75	GU136745	<i>Cavia aperea pamparum</i> voucher NK113574 cytochrome B (cytb) gene, partial cds...	<i>Cavia aperea pamparum</i>	1,106	GU136745	81.6%	289152591	81.6%	291.044
2.78e-75	FN640574	<i>Talpa levantis</i> mitochondrial cytb gene for cytochrome b, specimen voucher ZMMU...	<i>Talpa levantis</i>	1,140	FN640574	81.7%	294337798	81.7%	291.044
3.60e-74	AF437784	<i>Dasyprocta fuliginosa</i> isolate MV2155205 cytochrome b gene, complete cds; mitoc...	<i>Dasyprocta fuliginosa</i>	1,140	AF437784	81.5%	33315504	81.4%	287.351

**Figura 27.** Resultado das 10 primeiras sequencias, ordenadas por ordem decrescentes de valores de Bit-Score, geradas a partir da interface blast integrada ao programa Geneious v5.3 para o segmento de sequência do gene Cytb da espécie encaminhada como sendo capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*).

E Value	Name	Description	Organism	Sequence Length	Accession	% Pairwise Identity	GID	% Identical Sites	Bit-Score
0	AJ428947	Tapirus terrestris complete mitochondrial genome	Tapirus terrestris	16,776	AJ428947	98.3%	37496461	98.3%	824.726
0	GQ259913	Tapirus terrestris isolate TG28 cytochrome b gene, complete cds; mitochondrial	Tapirus terrestris	1,140	GQ259913	99.1%	269114164	99.1%	765.633
0	GQ259914	Tapirus terrestris isolate TBo183 cytochrome b gene, partial cds; mitochondrial	Tapirus terrestris	1,138	GQ259914	99.1%	269114166	99.1%	761.94
0	GQ259952	Tapirus terrestris isolate TA11 cytochrome b gene, complete cds; mitochondrial	Tapirus terrestris	1,140	GQ259952	98.9%	269114242	98.8%	761.94
0	GQ259915	Tapirus terrestris isolate TG05 cytochrome b gene, complete cds; mitochondrial	Tapirus terrestris	1,140	GQ259915	98.8%	269114168	98.8%	760.093
0	AF056030	Tapirus terrestris cytochrome b gene, mitochondrial gene encoding mitochondrial ...	Tapirus terrestris	1,140	AF056030	98.8%	3025854	98.8%	760.093
0	GQ259911	Tapirus terrestris isolate TG06 cytochrome b gene, complete cds; mitochondrial	Tapirus terrestris	1,140	GQ259911	98.8%	269114160	98.8%	760.093
0	GQ259953	Tapirus terrestris isolate TA12 cytochrome b gene, partial cds; mitochondrial	Tapirus terrestris	1,137	GQ259953	99.1%	269114244	99.1%	760.093
0	GQ259927	Tapirus terrestris isolate TP104 cytochrome b gene, partial cds; mitochondrial	Tapirus terrestris	1,137	GQ259927	99.1%	269114192	99.1%	760.093
0	GQ259933	Tapirus terrestris isolate TC100 cytochrome b gene, partial cds; mitochondrial	Tapirus terrestris	1,139	GQ259933	98.8%	269114204	98.8%	758.247
0	GQ259923	Tapirus terrestris isolate TV95 cytochrome b gene, partial cds; mitochondrial	Tapirus terrestris	1,138	GQ259923	98.8%	269114184	98.8%	756.4

**Figura 28.** Resultado das 11 primeiras sequencias, ordenadas por ordem decrescentes de valores de Bit-Score, geradas a partir da interface blast integrada ao programa Geneious v5.3 para o segmento de sequência do gene Cytb da espécie encaminhada como sendo cutia (*Dasyprocta aguti*).

E Value	Name	Description	Organism	Sequence Length	Accession	% Pairwise Identity	GID	% Identical Sites	Bit-Score
2.39e-145	AF151177	Tupinambis merianae USNMField 166756 cytochrome b gene, partial c...	Tupinambis merianae	300	AF151177	98.3%	5107224	98.3%	523.722
5.17e-142	AF151174	Tupinambis merianae USNMField 166649 cytochrome b gene, partial c...	Tupinambis merianae	300	AF151174	97.7%	5107221	97.7%	512.642
1.12e-138	AF151182	Tupinambis merianae USNMField 166780 cytochrome b gene, partial c...	Tupinambis merianae	300	AF151182	97.0%	5107229	97.0%	501.562
1.12e-138	AF151181	Tupinambis merianae USNMField 166779 cytochrome b gene, partial c...	Tupinambis merianae	300	AF151181	97.0%	5107228	97.0%	501.562
2.53e-105	AF151175	Tupinambis rufescens USNMField 166740 cytochrome b gene, partial ...	Tupinambis rufescens	300	AF151175	91.6%	5107222	91.6%	390.763
9.09e-105	AF151178	Tupinambis duseni USNMField 166778 cytochrome b gene, partial cds;...	Tupinambis duseni	300	AF151178	91.3%	5107225	91.3%	388.917
4.23e-103	AF151176	Tupinambis rufescens USNMField 166743 cytochrome b gene, partial ...	Tupinambis rufescens	300	AF151176	90.9%	5107223	90.9%	383.377
5.47e-102	AF151180	Tupinambis duseni USNMField 166777 cytochrome b gene, partial cds;...	Tupinambis duseni	300	AF151180	90.9%	5107227	90.9%	379.683
5.47e-102	AF151179	Tupinambis duseni USNMField 166766 cytochrome b gene, partial cds;...	Tupinambis duseni	300	AF151179	90.9%	5107226	90.9%	379.683
1.25e-58	AF089046	Oreopsar bolivianus cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochond...	Oreopsar bolivianus	890	AF089046	82.6%	6048466	82.6%	235.645
2.71e-55	AY851714	Liolaemus monticola voucher L2559-CUCH cytochrome b gene, partial...	Liolaemus monticola	335	AY851714	79.7%	61373172	79.7%	224.565
2.71e-55	AY851710	Liolaemus monticola voucher L2091-CUCH cytochrome b gene, partial...	Liolaemus monticola	335	AY851710	79.7%	61373164	79.7%	224.565

**Figura 29.** Resultado das 12 primeiras sequencias, ordenadas por ordem decrescentes de valores de Bit-Score, geradas a partir da interface blast integrada ao programa Geneious v5.3 para o segmento de sequência do gene Cytb da espécie encaminhada como sendo teiú (*Tupinambis sp.*).

E Value	Name	Description	Organism	Sequence Length	Accession	% Pairwise Identity	GID	% Identical Sites	Bit-Score
3.12e-164	AY283460	Amazona guildingii clone 2 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial g...	Amazona guildingii	1,143	AY283460	96.1%	37574955	96.1%	586.508
3.12e-164	AY283459	Amazona guildingii clone 1 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial g...	Amazona guildingii	1,143	AY283459	96.1%	37574953	96.1%	586.508
1.48e-147	AY283469	Amazona aestiva clone 1 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial ge...	Amazona aestiva	1,138	AY283469	93.6%	37574973	93.6%	531.109
1.48e-147	AY283455	Amazona autumnalis clone 2 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial...	Amazona autumnalis	1,066	AY283455	93.4%	37574945	93.4%	531.109
1.48e-147	AY283456	Amazona autumnalis clone 1 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial...	Amazona autumnalis	1,043	AY283456	93.4%	37574947	93.4%	531.109
1.48e-147	AY283461	Amazona finschi cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial gene for mi...	Amazona finschi	1,168	AY283461	93.4%	37574957	93.4%	531.109
1.92e-146	AY283448	Amazona aestiva clone 3 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial ge...	Amazona aestiva	595	AY283448	93.3%	37574931	93.3%	527.415
1.92e-146	FJ899168	Amazona farinosa voucher ANSP:2233 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mit...	Amazona farinosa	1,079	FJ899168	93.1%	284831601	93.1%	527.415
1.92e-146	AY283497	Amazona aestiva clone 4 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial ge...	Amazona aestiva	1,045	AY283497	93.3%	37575029	93.3%	527.415
8.91e-145	AY283472	Amazona aestiva clone 2 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial ge...	Amazona aestiva	1,095	AY283472	93.1%	37574979	93.0%	521.875
3.21e-144	AY283454	Amazona dufresniana cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial gene ...	Amazona dufresniana	1,102	AY283454	92.8%	37574943	92.8%	520.029

**Figura 30.** Resultado das 11 primeiras sequencias, ordenadas por ordem decrescentes de valores de Bit-Score, geradas a partir da interface blast integrada ao programa Geneious v5.3 para o segmento de sequência do gene Cytb da espécie encaminhada como sendo juriti (*Leptotila sp.*)

E Value	Name	Description	Organism	Sequence Length	Accession	% Pairwise Identity	GID	% Identical Sites	Bit-Score
6.96e-156	GQ457986	Ramphastos toco albogularis isolate R-264, cytochrome b gene, partial cds; mitoc...	Ramphastos toco albogularis	1,048	GQ457986	96.5%	259089926	96.5%	558.808
6.96e-156	AY959852	Ramphastos toco albogularis isolate B1477 cytochrome b gene, partial cds; mitoch...	Ramphastos toco albogularis	1,048	AY959852	96.5%	62547377	96.5%	558.808
3.24e-154	AY959851	Ramphastos toco albogularis isolate B10925 cytochrome b gene, partial cds; mitoc...	Ramphastos toco albogularis	1,048	AY959851	96.2%	62547375	96.2%	553.269
3.24e-154	GQ457987	Ramphastos toco albogularis isolate R-265, cytochrome b gene, partial cds; mitoc...	Ramphastos toco albogularis	1,048	GQ457987	96.2%	259089928	96.2%	553.269
3.24e-154	GQ457988	Ramphastos toco albogularis isolate B-38206, cytochrome b gene, partial cds; mit...	Ramphastos toco albogularis	1,048	GQ457988	96.2%	259089930	96.2%	553.269
2.56e-140	AF100554	Ramphastos toco cytochrome b gene, partial cds; mitochondrial gene for mitocho...	Ramphastos toco	864	AF100554	96.2%	11036684	96.2%	507.102
3.38e-124	AY959845	Ramphastos sulfuratus sulfuratus isolate B2007 cytochrome b gene, partial cds; ...	Ramphastos sulfuratus sulfuratus	1,048	AY959845	91.0%	62547363	91.0%	453.549
1.57e-122	AY959846	Ramphastos sulfuratus brevicarinatus isolate B28577 cytochrome b gene, partial ...	Ramphastos sulfuratus brevicarinatus	1,048	AY959846	90.7%	62547365	90.7%	448.01
1.59e-112	AY959849	Ramphastos tucanus cuvieri isolate B9392 cytochrome b gene, partial cds; mitoch...	Ramphastos tucanus cuvieri	1,048	AY959849	89.0%	62547371	89.0%	414.77
1.59e-112	AY959850	Ramphastos tucanus tucanus isolate B1356 cytochrome b gene, partial cds; mito...	Ramphastos tucanus tucanus	1,048	AY959850	89.0%	62547373	89.0%	414.77

**Figura 31.** Resultado das 10 primeiras sequencias, ordenadas por ordem decrescentes de valores de Bit-Score, geradas a partir da interface blast integrada ao programa Geneious v5.3 para o segmento de sequência do gene Cytb da espécie encaminhada como sendo perdiz (*Rhynchotus rufescens*).

E Value	Name	Description	Organism	Sequence Length	Accession	% Pairwise Identity	GID	% Identical Sites	Bit-Score
1.48e-142	DQ179078	Pecari tajacu voucher COL-7 cytochrome b gene, complete cds; mitochondrial	Pecari tajacu	1,140	DQ179078	92.7%	76781131	92.7%	514.489
1.48e-142	DQ179083	Pecari tajacu voucher BOL-2 cytochrome b gene, complete cds; mitochondrial	Pecari tajacu	1,140	DQ179083	92.7%	76781141	92.7%	514.489
1.48e-142	DQ179082	Pecari tajacu voucher BOL-1 cytochrome b gene, complete cds; mitochondrial	Pecari tajacu	1,140	DQ179082	92.7%	76781139	92.7%	514.489
1.48e-142	DQ179076	Pecari tajacu voucher COL-8 cytochrome b gene, complete cds; mitochondrial	Pecari tajacu	1,140	DQ179076	92.7%	76781127	92.7%	514.489
1.48e-142	DQ179075	Pecari tajacu voucher COL-9 cytochrome b gene, complete cds; mitochondrial	Pecari tajacu	1,140	DQ179075	92.7%	76781125	92.7%	514.489
1.48e-142	DQ179077	Pecari tajacu voucher COL-10 cytochrome b gene, complete cds; mitochondrial	Pecari tajacu	1,140	DQ179077	92.7%	76781129	92.7%	514.489
1.48e-142	DQ179079	Pecari tajacu voucher COL-1 cytochrome b gene, complete cds; mitochondrial	Pecari tajacu	1,140	DQ179079	92.7%	76781133	92.7%	514.489
5.33e-142	AF232020	Tamandua tetradactyla clone 4 cytochrome b gene, partial cds; mitochondrial ge...	Tamandua tetradactyla	648	AF232020	92.5%	13128895	92.5%	512.642
1.92e-141	AY886759	Pecari tajacu isolate Pt cytochrome b gene, partial cds; mitochondrial	Pecari tajacu	335	AY886759	94.3%	62421828	94.3%	510.796
8.91e-140	DQ179073	Pecari tajacu voucher UNK-1 cytochrome b gene, complete cds; mitochondrial	Pecari tajacu	1,140	DQ179073	93.3%	76781121	93.3%	505.256
8.91e-140	DQ179074	Pecari tajacu voucher UNK-2 cytochrome b gene, complete cds; mitochondrial	Pecari tajacu	1,140	DQ179074	93.3%	76781123	93.3%	505.256

**Figura 32.** Resultado das 10 primeiras sequencias, ordenadas por ordem decrescentes de valores de Bit-Score, geradas a partir da interface blast integrada ao programa Geneious v5.3 para o segmento de sequência do gene Cytb da espécie encaminhada como sendo cateto (*Pecari tajacu*).

E Value	Name	Description	Organism	Sequence Length	Accession	% Pairwise Identity	GID	% Identical ...	Bit-Score
0	DQ243722	Euphractus sexcinctus isolate 196PA cytochrome b gene, partial cds; mitochondrial	Euphractus sexcinctus	476	DQ243722	97.7%	78059630	97.7%	749.013
0	DQ243723	Euphractus sexcinctus isolate 194PA cytochrome b gene, partial cds; mitochondrial	Euphractus sexcinctus	476	DQ243723	97.7%	78059632	97.7%	749.013
0	DQ243724	Euphractus sexcinctus isolate 73PA cytochrome b gene, partial cds; mitochondrial	Euphractus sexcinctus	476	DQ243724	97.5%	78059634	97.5%	743.473
0	DQ243720	Euphractus sexcinctus isolate 36PA cytochrome b gene, partial cds; mitochondrial	Euphractus sexcinctus	476	DQ243720	97.9%	78059626	97.9%	754.553
0	DQ243719	Euphractus sexcinctus isolate 33PI cytochrome b gene, partial cds; mitochondrial	Euphractus sexcinctus	476	DQ243719	98.2%	78059624	98.2%	760.093
0	DQ243721	Euphractus sexcinctus isolate 17PA cytochrome b gene, partial cds; mitochondrial	Euphractus sexcinctus	476	DQ243721	97.9%	78059628	97.9%	754.553
1.62e-133	Y11832	Dasybus novemcinctus complete mitochondrial genome	Dasybus novemcinctus	17,056	Y11832	85.5%	2252500	85.5%	484.943
5.95e-118	AM181026	Hydrurga leptonyx complete mitochondrial genome	Hydrurga leptonyx	16,602	AM181026	83.5%	115344955	83.5%	433.236
5.99e-113	X97337	Equus asinus complete mitochondrial genome	Equus asinus	16,670	X97337	82.9%	1805746	82.9%	416.616
6.03e-108	X72204	Balaenoptera musculus mitochondrial DNA complete genome	Balaenoptera musculus	16,402	X72204	82.4%	414126	82.4%	399.997

**Figura 33.** Resultado das 10 primeiras sequencias, ordenadas por ordem decrescentes de valores de Bit-Score, geradas a partir da interface blast integrada ao programa Geneious v5.3 para o segmento de sequência do gene Cytb da espécie encaminhada como sendo tatu peba (*Euphractus sexcinctus*).

## 8.2 Sequências de bases dos segmentos dos genes mitocondriais Cytb e COI das espécies pesquisadas.

Sequência do gene mitocondrial Cytb da espécie *Amazona aestiva*.

TCCATCCAACATTCTCGCATGATGAAACTTTGGGTCTCTCCTAGGAATTTGCCTAGCAAC  
ACAAATCCTAACAGGTTTACTCCTAGCCGCACACTACACCGCAGACACCTCCCTAGCCT  
TCTCATCTGTGGCTAACACATGCCGGAACGTACAGTACGGCTGACTAATCCGCAACCTT  
CACGCAAACGGAGCCTCACTCTTCTTCATCTGCATCTACCTGCATATCGCCCGAGGCTTC  
TACTATGGCTCATACCTGTATAAAGAAACCTTGAAACACAGGAATCATCCTTCTCCTAAC  
CCTCAATGGCAACCAGCCTTCGTAGGATACGTCCTGCCATGAGGCCAAATACAATTCTG  
AGGGGA

Sequência do gene mitocondrial Cytb da espécie *Ara ararauna*.

CATCCAACATCTCCGCATGATGAAACTTCGGATCCCTCCTAGGAATCTGCCTAACAAACA  
CAAATCCTAACCGGCCTACTCCTAGCTGCCACTACTGCAGATACCTCCCTAGCCTTC  
TCCTCTGTGGCTAACATATGCCGAAACGTACAATATGGATGACTAATTCGAAATCTCCAT  
GCAAATGGAGCCTCATTCTTCTTCATCTGTATCTATCTCCATATTGCCCGAGGCCTTACT  
ACGGCTCATACCTATATAAAGAAACCTGAAACACAGGCATCATCCTCCTACTTACCCTCA  
TAGCTACAGCCTTTGTTGGCTATGTTTTACCATGAGGCCAAATATCATTCTGAGGGGA

Sequência do gene mitocondrial Cytb da espécie *Ara chloroptera*.

TCCATCCAACATCTCCGCATGATGAAACTTCGGATCCCTCCTCTTTAGGAATCTGCTTAA  
CAACACAAATCCTAACAGGCCTACTCCTAGCTGCCATTACAACCCTGCAGACACCTCT  
CTGGCCTTCTCTTCTGTGGCTAATATGTGTTTCGAAACGTACAATATGGTTGACTAATTCG  
AAACCTCCATGCAAACGGAGCCTCATTCTTCTTCATCTGTATCTACCTTCATATCGCCCG  
AGGCTTTTATTACGGCTCGTACCTATACAAAGAAACCTGAAACACAGGTATCATCCTTCT  
ACTTACCCTCATAGCCACAGCCTTTGTTGGCTATGTCTTACCATGAGGCCAAATATCATT  
CTGAGGGGA

Sequência do gene mitocondrial Cytb da espécie *Ara macao*.

TCCATCCAACATCTCCGCATGATGAAACTTCGGATCCCTCTTAGGAATCTGCTTAAACAAC  
ACAAATCCTAACCGGCCTGCTCCTAGCTGCCATTACTGCAGACACCTCTTTGGCCT  
TCTCTTCTGTGGCCAATATGTGTCGAAACGTACAATATGGTTGACTAATTCGAAACCTCC  
ATGCAAATGGAGCCTCATTCTTCTTCATCTGTATCTACCTTCATATCGCCCGAGGCTTTTA  
TTATGGCTCTTACCTATACAAAGAAACCTGAAACACAGGTATCATCCTCCTACTTACCCT  
CATGGCCACAGCCTTTGTTGGTTATGTCCTACCATGAGGCCAAATATCATTCTGAGGGGA

Sequência do gene mitocondrial Cytb da espécie *Anodorhincus hyacintinus*.

CCATCCAACATCTCCGCATGATGAAACTTCGGATCCCTTCTAGGAATCTGCCTAACAAAC  
ACAAATCCTAACTGGCCTGCTCCTAGCCGCCACTACTGCAGATACCTCCTTAGCCTT  
CTCATCCGTGGCTAATATATGCCGAAACGTACAATATGGTTGACTAATCCGAAACCTCCA  
TGCAAACGGAGCCTCATTCTTCTTCATCTGCATTTACCTCCACATTGCCCGAGGTTTCTA  
CTACGGCTCATACCTATACAAAGAAACCTGAAATACAGGCATCATCCTTCTACTTACCCT  
CATAGCCACAGCCTTTGTTGGCTACGTTCTGCCCTGAGGC

Sequência do gene mitocondrial Cytb da espécie *Brotogeris versicolurus*.

TCCATCCAACATCTCCGCATGATGAAACTTCGGGTCCCTCCTGGGAATCTGCCTAACAA  
CACAAATCTTAACTGGCCTACTCTTAGCCGCCACTACACCGCAGATAACTCCCTAGCC  
TTCTCATCCATGGCTAACATGTGCCAAAATGTACAATACGGCTGACTAATCCGCAACATC  
CATGCAAACGGAGCCTCATTCTTCTTCATTTGCATCTACCTCCACATCGCCCGAGGCTTC  
TACTATGGCTCATACCTATACAAAGAACTTGAAACACAGGAGTCATCCTCCTACTCAC  
CCTCATAGCAACAGCCTTCATCGGTTACGTCCTACCATGAGGCCAAATATCATTCTGAGG  
GGA

Sequência do gene mitocondrial Cytb da espécie *Euphractus sexcinctus* (16-17)

TCCATCCAACATCTCCGCATGATGAAACTTTGGCTCCCTTTTAGGAATATGCCTAATCTTA  
CAAATTATCACGGGCCTATTCTTAGCCATACACTATAACATCAGATACAACCACTGCCTTCT  
CATCCGTAGCCATATTTGCCGAGATGTAAATTACGGATGAATTATCCGCTATCTCCACGC  
TAACGGAGCATCCATATTCTTCATCTGCCTATTTATCCACGTAGGACGAGGTTTGTACTAT  
GGATCCTACACATTCTTAGAAACATGAAACATCGGAATTATTCTACTATTACAGTGATG  
GCAACAGCATTATAGGCTACGTTCTGCCGTGAGGCCAAATATCAATTCTGAGGGGA

Sequência do gene mitocondrial Cytb da espécie *Euphractus sexcinctus* (18-19)

AAAACCATCGTTGTAAATTCAACTACAAGAACTAATGACTAACATCCGTAAGACTCACC  
CACTATTTAAATCATTAAACCAATCATTGACTTACCCACCCCAACAAGCATCTCAT  
CATGATGAAATTTTGGTTCACTACTAGGCATCTGCCTAGTCATCCAAATCTTAACAGGCC  
TATTCCTAGCCATACACTATACTCAGACACACTCACCGCCTTCTCATCTGTCACCCACA  
TTTGCCGAGACGTAAACTATGGCTGAGTTATCCGCTACTTACACGCCAACGGAGCTTCC  
CTATTCTTCATATGCCTATATATACATGTAGGTCGAGGGCTTTACTATGGGTCCTACGCATT  
CACCGAAACATGAAATATCGGAATTATTCTACTATTTACAGTAATAGCCACAGCATTATG  
GGCTATGTACTTCCATGAGGACAAATATTCATTCTGAG

Sequência do gene mitocondrial Cytb da espécie *Euphractus sexcinctus* (20-21).

TTACCCATGAGGGAACAATATCATTCTGAGGGGGCTACAGTAATTACCAACCTCCTATCAG  
CAATCCCATACATTGGAGCCGATCTCGTAGAATGAATCTGAGGAGGCTTTTCAGTTGATA  
AAGCCACCCTAACGCGATTCTTCGCTTTCCACTTCATCCTCCCATTTCATCGTAACAGCCT  
TCGTAGTAATTCACCTCCTATTCTACATGAAACAGGATCAAACAACCCAACAGGCATC  
TCATCAAGTATAGACGCAATCCCATTTACCCATACTACACCATCAAAGATATCCTAGGC  
CTATTCTTTATAATCCTTTTCCTAATAACCCTAGTCCTATTTTCCCAGACCTATTAGGAGA  
CCCAGACAACCTATACACCAGCAAACCCCTTAGTACCCCTCCCCACATCAAACCAGAAT  
GATATTTCTTATTTGCCTATGCAATCCTACGATCAATCCCTACAAAATAAGGAGGGGAGG

Sequência do gene mitocondrial COI da espécie *Euphractus sexcinctus*.

GTATCCGGTAGTAGTGGTACTGCCCTGAGCCTTTCTCATTCGAGCTGAACTAGGGCAA  
CCAGGAACCCTATTAGGAGACGATCAAATCTATAACGTTATTGTTACAGCTCACGCATTT  
GTTATAATCTTCTTCATAGTAATGCCATTATAATCGGGGGCTTCGGCAATTGACTAGTAC  
CACTAATAATTGGTGCCCCAGACATAGCATTCCCACGAATGAACAATATAAGCTTCTGAC  
TTCTTCCCCCATCATTCTTCTCCTACTCGCATCATCAATAGTTGAAGCCGGCGCAGGAA  
CAGGTTGAACAGTATATCCACCACTAGCTGGCAACTTAGCCCATGCAGGTGCATCCGTG  
GACCTAACTATCTTCTCCCTCCACCTAGCAGGTGTGTCATCAATCTTAGGTGCTATCAAC  
TTTATTACAACCATTATTAACATGAAACCCCTGCCATGACACAATATCAAACCCCTTAT

TCGTGTGGTCTGTACTAATCACAGCTGTCCTTCTACTCCTATCACTACCTGTCCTCGCCG  
CGGGCATCACCATGCTACTGACTGATCGAAACCTTAATACCACATTCTTTGACCCAGCC  
GGCGGAGGAGATCCAATCCTCTA

Sequência do gene mitocondrial Cytb da espécie *Leopardus pardalis* (questionado).

CTCCATCCAACATCTCCGCATGATGAAACTTCGGCTCCTTATTAGGAATTTGCCTAATACT  
ACAAATCCTCACCGGCCTTTTTCTGGCCATACACTATAACATCAGACACAACAACCGCCT  
TTTCATCAGTTACTCACATCTGCCGTGACGTCAACTATGGCTGAATCATCCGATACATAC  
ATGCCAACGGAGCCTCCATATTTTTATCTGCCTATACATACACGTAGGACGAGGAATAT  
ACTATGGCTCCTACACCTTCTCAGAAACATGAAACATCGGAATCATACTGCTATTCGCAG  
TTATAGCC

Sequência do gene mitocondrial Cytb da espécie *Leopardus pardalis* (Referência).

CTCCATCCAACATCTCCGCATGATGAAACTTCGGCTCCTTATTAGGAATTTGCCTAATACT  
ACAAATCCTCACCGGCCTTTTTCTGGCCATACACTATAACATCAGACACAACAACCGCCT  
TTTCATCAGTTACTCACATCTGCCGTGACGTCAACTATGGCTGAATCATCCGATACATAC  
ATGCCAACGGAGCCTCCATATTTTTATCTGCCTATACATACACGTAGGACGAGGAATAT  
ACTATGGCTCCTACACCTTCTCAGAAACATGAAACATCGGAATCATACTGCTATTCGCAG  
TTATAGCCACAGCCTTCATAGGATACGTTCTACCATGAGGCCAAATATCATTCTGAGGGG  
A

Sequência do gene mitocondrial Cytb da espécie *Mazama gouazoubira*.

GAAAACCATCGTTGTTATTCAACTACAAGAACACCAATGACCAACATCCGAAAAACTC  
ACCCACTAATAAAAATTGTAAATAACGCATTCATTGATCTCCCAGCTCCATCAAATATCTC  
ATCATGATGAAACTTTGGTTCTCTACTAGGAATTTGCTTGATTCTACAAATCCTTACTGG  
CCTATTCTTAGCAATACTATTTCATCCGACACAACAACAGCATTTCCTCTGTTACCCA  
CATCTGCCGAGACGTCAATTATGGCTGAATTATTCGATATATACATGCCAACGGAGCATC  
AATATTCTTCATTTGCCTATTTATACATGTGGGACGGGGACTATACTATGGATCATATACTT  
TCTCAGAAACATGAAACATTGGAGTAATTCTCCTATTTACGGTAATAGCCACAGCATTCTG  
TAGGATATGTCCTACCATGAGGACAAATATTCATTCTGAGGGGGCTGCAGTTT

Sequência do gene mitocondrial Cytb da espécie *Myrmecophaga tridactyla*.

TCCATCCAACATCTCCGCATGATGAAACTTTGGCTCCCTACTAGGAATTTGCTTAATCAT  
CCAAATCCTAACAGGCCTTTTCTAGCAATACATTATACATCAGACACAATCACAGCATT  
CTCATCAGTTACCCACATTTGCCGGGACGTAAACTATGGTTGACTCATCCGTTACATCCA  
CGCCAACGGGGCCTCAATATTCTTCATATGTCTTTACTTACATGTAGGCCGTGGCTTGTAT  
TACGGCTCCTACCTATACATAGAACTTGAAACATTGGAGTCGTCTCTACTAGTAACT  
ATAGCAACCGCATTCATAGGCTATGTCCTCCCATGAGGCCAAATATCAATCTGAGGGGA

Sequência do gene mitocondrial Cytb da espécie *Nasua nasua*.

TTTACCATGAGGAACAAATATCATTCTGAGGAGCCACAGTAATCACAAACCTATTATCAG  
CTTATTTCCCTACATCGGAGCCAGCCTGGTAGAATGAATCTGAGGAGGATTCTCAGTCG  
ACAAAGCAACACTAACACGCTTCTTCGCCCTCCACTTCATCCTACCCTTTATTATTTTCAT  
CACTAGCAATAATCCACCTTTTATTCTTACATGAAACAGGATCAAACAACCCCTCTGGAA  
TCCCATCCAACCTCAGACAAAATCCCCTTCCACCCCTACTATACAGTAAAAGACACCCTG  
GGTGCCTTAGCATTAAATTTCCATTCTATTGATACTCGTACTATTCATACCCGACTTACTAG  
GAGACCCAGACAACACTACACCCCGGCCAACCCAACCTCAATACCCCTCCCAATATTAAG

CCTGAAATGATATTTCTTATTCGCATACGCAATTCTACGATCAATCCCTACA

Sequência do gene mitocondrial Cytb da espécie *Pionus menstruus*.

TCCATCCAACATTCCC GCATGATGAAACTTCGGGTCCCTCTTAGGAATTTGCCTAATAAC  
ACAAATTCTTACAGGCCTACTCTTAGCCGCCACTACACCGCAGACACCTCCCTAGCCT  
TCTCATCAGTAGCCAACATATGCCGAAATGTACAATATGGCTGACTAATCCGCAACCTTC  
ATGCAAACGGAGCCTCGTTCTTCTTCATCTGCATCTACCTACACATCGCCCCGAGGCTTCT  
ATTACGGCTCATACCTGTACAAAGAAACCTTGGAAACACAGGAATCATCCTCCTCCTCA  
CCCTTATAGCAAACAGCCTTTGTAGGCTATGTCTACCATGAGGCCAAATATCAATTCTG  
AGGGGA

Sequência do gene mitocondrial Cytb da espécie “Perdiz”.

TCCATCCAACATCTCCGCATGATGAAACTTTGGATCACTCCTAGGCATCTGCCTCATCAC  
ACAAATTGGTCACCGGACTCCTCCTAGCCGCCACTATACCGCAGACACCTCTCTAGCC  
TTCTCATCTGTCATCTGTAGCCACACATGCCGAAACGTCCAATACGGCTGACTAATCCG  
CAACCTCCATGCAAACGGAGCCTCGTTCTTCTTCATCTGTATTTACCTCCACATCGGACG  
GGGGTTTTACTATGGCTCCCTATCTCTTCAAGGAGACCTGAAACATCGGCGTTATCCTCC  
TTTTAGCCCTCATAGCTACAGCTTTCGTGGGCTATGTCTCCCATGAGGCCAAATATCAA  
TTCTGAGGGGA

Sequência do gene mitocondrial COI da espécie *Tapirus terrestris*.

CATGCATTTGTAATAAATTTTCTTCATAGTTATGCCAATCATAATCGGAGGATTTTGGGA  
ACTGATTAGTTCCTTWANNTGATTGGAGCACCCCGACATAGCATTTCCACGAATAAACA  
ACATAAGCTTCTGATTACTTCCCCCATCCTTTCTGCTCCTACTAGCATCTTCAATAATTGA  
AGCTGGTGCAGGTACAGGCTGAACTGTCTATCCACCCCTAGCTGGTAACTTAGCACACG  
CAGGAGCTTCCGTTGACTTAACCATTTTCTCCCTCCACCTTGCAGGTGTATCCTCAATTC  
TAGGCGCTATTA ACTTTATTACTAACAATTATTAATAAAAACCACCAGCTATATCACAGT  
ACCAAACACCTTTATTTGTTTGATCAGTCCTAATTACAGCAGTATTACTATTACTAGCACT  
TCCAGTTCTAGCAGCAGGGATTACCATACTACTAACAGAC

Sequência do gene mitocondrial Cytb da espécie Teiu.

GCCTATCCCTTG TAGTACAATTCTACAGGCCTATTCCCTAGCATACTATAACAGCAGACA  
CAACCCTGGCCTTCTCTTCTGTAGCTAACATCTGCCGAGACGTCCAATACGGATGACTT  
CTCCGAACAATACACGCAAACGGAGCCTCCATATTCTTCATTTGTATTTATTACACATCG  
GCCGAGGTCTATACTACGGCTCTTATTCCAACAAAGAAACCTGAAACATTGGTGTATC  
CTGCTCTTTCTCCTAATAGCAACCGCTTTCATAGGTTATATCCTACCCTGAGGCCAAATAT  
CATTCTGAGGGGAG

### 8.3 Protocolos de Extração de DNA genômico

#### 8.3.1 Extração de DNA com Kit Axyprep™ Multisource Genomic DNA miniprep (Axygen Biosciences®).

Este kit foi utilizado para extração das amostras de tecidos muscular e fragmento de pele, seguindo o seguinte protocolo:

1. Selecionar 1-20mg do tecido animal ou um fragmento de aproximadamente 5mm X 5mm (recortado em fragmentos menores) de pele e transferir para um mortiz, congelar completamente em nitrogênio líquido e triturar para formar um homogeneizado;
2. Adicionar 350µL de PBS e 1µL de RNase. Mexer suavemente por 30 segundos para homogeneizar o PBS com o tecido moído;
3. Coletar 350µL do homogeneizado e transferir para um microtubo de 2mL. Se o volume do homogeneizado for menor que 350µL, complete-o com PBS;
4. Adicione 20µL Proteinase K e 150 µL de Buffer C-L, vortexar por 1 minuto;
5. Incubar a 56°C por 10 minutos. Centrifugar brevemente para remover gotas no interior da tampa;
6. Adicionar 350 µL de Buffer P-D à amostra e vortexar por 30 segundos;
7. Centrifugar a 12.000 g por 10 minutos para a sedimentação de restos celulares;
8. Colocar a coluna Miniprep em um microtubo de 2 mL. Pipetar o sobrenadante obtido no passo anterior para a coluna Miniprep. Centrifugar por 1 minuto a 12.000g;
9. Descartar o filtrado do microtubo de 2 mL. Retornar a coluna Miniprep para o microtubo, adicionar 500 µL de Buffer W1 e centrifugar por 1 minuto a 12.000 g;
10. Descartar o filtrado e retornar a coluna para o microtubo, adicionar 700 µL de Buffer W2 e centrifugar por 1 minuto a 12.000g. Descartar o filtrado do microtubo e repetir este passo de lavagem com uma segunda alíquota de

700  $\mu$ L de Buffer W2.

11. Descartar o filtrado do microtubo e retornar a coluna para o microtubo e centrifugar por 1 minuto a 12.000g.
12. Transferir a Coluna Miniprep para um microtubo de 1,5 mL limpo. Para eluir o DNA genômico, adicionar 100-200  $\mu$ L do eluente ao centro da membrana, deixar descansar por 1 minuto a temperatura ambiente. Centrifugar por 1 minuto a 12.000g.

### 8.3.2 Extração de DNA com fenol clorofórmio

As amostras de sangue impregnada em papel FTA (MGM<sup>®</sup>) seguiram protocolo de extração pelo método de fenol clorofórmio, seguida por purificação em membrana concentradora Microcon.

1. Adicionar 300  $\mu$ L de tampão de extração de manchas, 24  $\mu$ L de proteinase K e 48  $\mu$ L de DTT – vortex e spin por 10s;
2. Incubar a 56°C por 18h-24h – colocar mais 24  $\mu$ L de PK algumas horas antes de iniciar o restante dos procedimentos;
3. Transferir para um tubo spin-X com cesta;
4. Centrifugar a 14.000g por 5 min.;
5. Descartar a cesta;
6. Adicionar 500  $\mu$ L de clorofane a cada amostra – vortex;
7. Centrifugar a 14.000g por 5 min.;
8. Purificar com Microcon

Purificação com Microcon:

9. Transferir a fase aquosa para as unidades concentradoras de Microcon 100, previamente umedecido com 100  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O estéril (MiliQ);
10. Centrifugar a 500g até que o volume tenha sido filtrado;
11. Adicionar 400  $\mu$ L (2X de 200  $\mu$ L) de H<sub>2</sub>O estéril (MiliQ) à unidade concentradora de Microcon100 e centrifugar a 500g até que o volume tenha sido filtrado;
12. Adicionar 50  $\mu$ L de TE<sup>-4</sup> sobre o microcon e dar vortex para recuperar o DNA extraído (Obs.: neste momento troca-se o microtubo e inverte-se a

membrana concentradora).

13. Recuperar a 14.000g por 5 min.;

14. DNA extraído

#### 8.4 Reação de amplificação

Para amplificação dos genes mitocondriais utilizou-se a tecnologia da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando-se quatro conjuntos de primers universais, descritos por Branick *et al.* (2003), Kocher *et al.* (1989), Verma e Singh (2003) e Folmer *et al.* (1995).

GENE	Nome	SEQUÊNCIA DO PRIMER*	Referência
<b>Cytb</b>	cytbF	CCATCCAACATCTCCGCATGATGAAA	<b>Branicki <i>et al.</i>, 2003</b>
	cytbR	CCCCTCAGAATGATATTTGGCCTCA	
<b>Cytb</b>	L14724	CGAAGCTTGATATGAAAAACCATCGTTG	<b>Kocher <i>et al.</i>, 1989</b>
	H15149	AAACTGCAGCCCCTCAGAATGAATATTTGTCCTCA	
<b>Cytb</b>	Mcb398	TACCATGAGGACAAATATCATTCTG	<b>Verma e Singh, 2003</b>
	Mcb869	CCTCCTAGTTTGTAGGGATTGATCG	
<b>Col</b>	LCO 1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	<b>Folmer <i>et al.</i>, 1994</b>
	HCO 2198	TAAACTTCAGGTGACCAAAAAATCA	
• Sentido 5' → 3'			

A amplificação dos fragmentos de DNA dos genes mitocondriais Cytb e COI foi realizada em termociclador BioRad MyCycler™ Plus (BioRad®), utilizando os seguintes volumes e concentrações para cada reação:

Reagentes	Volume a ser pipetado
PCR mix (Invitrogen®)	10,5 µL
Tampão 10X	2,0 µL
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	2,0 µL
Taq	0,5 µL
Primers Forward (10nmol)	2 µL
Primers reverse (10nmol)	2 µL
DNA molde	2 µL
H <sub>2</sub> O q.s.p.	25 µL

As condições do ciclo de amplificação seguiram os seguintes parâmetros (Centro de Treinamento Applied Biosystems, 2009):

Etapa	Temperatura	Tempo	Ciclo
Desnaturação inicial	95°C	11 minutos	1
Desnaturação	95°C	10 segundos	36
“Annealing”	56°C	30 segundos	
Extensão	72°C	30 segundos	
Extensão final	72°C	7 minutos	1
Hold	4°C	∞	-

Antes da reação de sequenciamento os produtos da reação de amplificação foram purificados com as enzimas exonuclease I (EXO I) e fosfatase alcalina de camarão (SAP) (WERLE, et al., 1994), seguindo o seguinte protocolo:

1. Para cada 15 mL de produto de PCR foi acrescentado 5 unidades de SAP e 2 unidades de ExoI. A enzima SAP geralmente vem na concentração de 1 U/ $\mu$ L, portanto basta pipetar diretamente a quantidade necessária na reação. A enzima Exo I geralmente vem na concentração de 20 U/ $\mu$ L e necessita ser diluída em água MilliQ para se obter a concentração necessária a ser adicionada na reação.
2. Misturar bem e incubar a 37°C por 1 hora
3. Incubar a 80°C por 20 minutos para inativar as enzimas e manter a 4°C.

A enzima EXOI digere o excesso de oligonucleotídeos iniciadores da PCR enquanto a SAP desfosforila o excesso de dNTPs.

### **8.5 Visualização do DNA amplificado em gel de agarose**

A visualização do produto de amplificação foi realizada em cuba de eletroforese Labnet GeXL ENDURO e transiluminador Cienlab, seguindo o seguinte protocolo:

1. Preparar o gel de agarose a 1% (0,1g de agarose/1mL de tampão TBE 1X);
2. Colocar a agarose ainda líquida sobre a placa, inserir o pente e esperar solidificar;
3. Retirar o pente e colocar a placa na cuba de eletroforese e enche-la com tampão TBE 1X até que cubra completamente o gel de agarose;
4. Aplicar o DNA ladder 100pb Plus no primeiro poço e nos poços seguintes o produto da PCR, sendo 5µL da amostra + 2 µL de corante Blue Juice 10X + 3 µL de tampão TBE 1X.
5. Submeter as amostras a eletroforese no gel de agarose em corrente de 120V constante por 30 minutos;
6. Corar o gel de agarose com brometo de Etídio por 10 minutos;
7. Visualizar as bandas de DNA com auxílio de luz UV em transiluminador;

### **8.6 Reação de sequenciamento**

Para garantir a acurácia das sequências obtidas foram sequenciados os dois sentidos da fita de DNA (Forward e Reverse). Na reação de sequenciamento utilizou-se o Kit Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems®) seguindo os seguintes volumes e concentrações para cada reação:

- Big Dye Mix – 4µL
- Tampão de sequenciamento 5X - 2µL
- Primer – 3,0 pmoles/reação
- Amostra template – 2µL
- Água – q.s.q 20 µL final

Para cada amostra foram utilizados os primers Forward e Reverse de cada par de primer estudado. Para o processo de termociclagem foi utilizado o termociclador BioRad MyCycler™ Plus (BioRad®), seguindo a seguinte temperatura de ciclagem (Centro de Treinamento Applied Biosystems, 2009) :

Etapa	Temperatura	Tempo	Ciclo
Desnaturação	95°C	11 minutos	1
Desnaturação	95°C	30 segundos	30
“Annealing”	55°C	15 segundos	
Extensão	60°C	4 minutos	
Holding	4°C	∞	1

### 8.7 Purificação do produto de sequenciamento

O produto de sequenciamento foi purificado seguindo o protocolo de precipitação de DNA com isopropanol/isopropanol constante no POP 38 do manual de Treinamento regular em Sequenciamento de mtDNA (Centro de Treinamento Applied Biosystems, 2009).

1. Adicionar 20  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O ultra pura (MiliQ) e 60  $\mu$ L de Isopropanol 100% em cada amostra;
2. Agitar no vortex rapidamente e deixar em temperatura ambiente por 15min.;
3. Centrifugar por 25 min. (~14000 RPM);
4. Descartar o sobrenadante aspirando com uma micropipeta P200;
5. Adicionar 200  $\mu$ L de isopropanol 75% em cada amostra;
6. Agitar no vortex rapidamente;
7. Centrifugar por 10 min. (~14000 RPM);
8. Descartar o sobrenadante aspirando com uma micropipeta P200;
9. Deixar o pellet secando a temperatura ambiente e protegido da luz ou acondicionado no termociclador a 80°C por 2 min.;
10. Os tubos com o pellet seco pode ser armazenado no freezer até estar pronta para ser sequenciada.

Antes do sequenciamento, ressuspender as amostras com 10  $\mu$ L de formamida Hi-Di, agitar no vortex, desnaturar em 95 °C por 2 min., e colocar no gelo por 2 min.

As amostras amplificadas e purificadas foram analisadas em sequenciador automático ABI 3130 DNA Sequence (Applied Biosystems®)

### **8.8 Alinhamento e edição das sequências obtidas**

Os alinhamentos das sequências nucleotídicas obtidas foram realizadas através da interface virtual do programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) disponível no endereço: <http://ebi.ac.uk/clustalw>. As visualizações e edições dos alinhamentos foram realizadas utilizando o programa Geneious v5.3 (DRUMMOND, *et al.*, 2010).

As sequências nucleotídicas obtidas dessas análises foram comparadas com as sequências nucleotídicas dos genes citocromo b e subunidade I do citocromo c oxidase disponíveis no *GenBank* (Benson *et al.*, 2000), utilizando a interface virtual do programa *Blast – Basic Local Alignment Search Tool* (Altschul *et al.*, 1990) integrada ao programa Geneious v5.3 (DRUMMOND, *et al.*, 2010).

Após o alinhamento, as sequências foram submetidas à análise de distância genética pelo método Tamura-Nei (1993) a partir do qual foram construídas as árvores filogenéticas para os grupos de espécies.