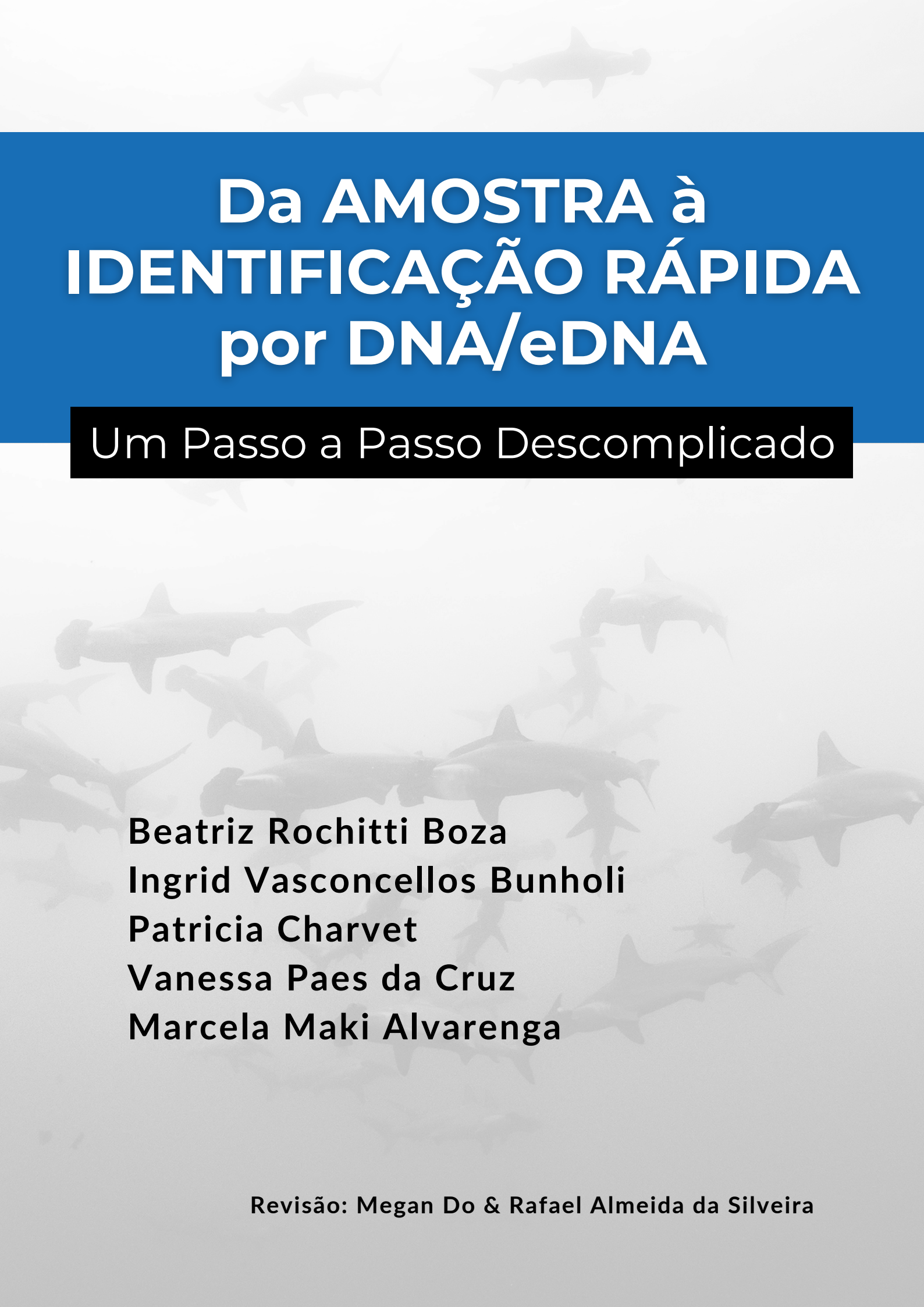




Da AMOSTRA à IDENTIFICAÇÃO RÁPIDA por DNA/eDNA

Um Passo a Passo Descomplicado

**Beatriz Rochitti Boza
Ingrid Vasconcellos Bunholi
Patricia Charvet
Vanessa Paes da Cruz
Marcela Maki Alvarenga**

Revisão: Megan Do & Rafael Almeida da Silveira

Da AMOSTRA à IDENTIFICAÇÃO RÁPIDA por DNA/eDNA

Um Passo a Passo Descomplicado

**Beatriz Rochitti Boza
Ingrid Vasconcellos Bunholi
Patricia Charvet
Vanessa Paes da Cruz
Marcela Maki Alvarenga**

Revisão: Megan Do & Rafael Almeida da Silveira

ISBN: 978-65-89398-47-9

Da amostra à identificação rápida por DNA/eDNA

Um passo a passo descomplicado

Beatriz Rochitti Boza

Botucatu, São Paulo: Edição dos autores, 2026.

Da amostra à identificação rápida por DNA/eDNA [recurso eletrônico] : um passo a passo descomplicado / Beatriz Rochitti Boza ... [et al]. ; revisão Megan Do, Rafael Almeida da Silveira. – Botucatu: Ed. da autora, 2026.

38 p.

Ebook

Tradução de: From sample to rapid DNA and eDNA identification: an easy step-by-step guide

ISBN: 978-65-89398-47-9

1. Tubarões. 2. Raias (Peixe). 3. Elasmobrânquios. 4. Divulgação científica. 5. Biologia molecular. I. Boza, Beatriz Rochitti. II. Bunholi, Ingrid Vasconcellos. III. Charvet, Patricia. IV. Cruz, Vanessa Paes da. V. Alvarenga, Marcela Maki. VI. Do, Megan. VII. Silveira, Rafael Almeida da. VIII. Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu.

CDD 573.848



Créditos das imagens: As imagens foram criadas utilizando os *softwares* Canva, Sora e BioRender, ou fotografadas pelas autoras. A imagem de fundo da capa apresenta tubarões-martelo, de autoria de Erika Beux. Todos os direitos reservados às autoras deste e-book.

PREFÁCIO

Este e-book apresenta um guia **prático e acessível para a identificação de espécies por meio de DNA ou DNA ambiental (eDNA)**, abrangendo desde o planejamento do projeto e a escolha do ensaio até a coleta de amostras e a análise genética. O conteúdo explica de forma clara os conceitos de biologia molecular essenciais para essa abordagem, diferencia os métodos que utilizam sequenciamento daqueles que não utilizam, apresenta as principais técnicas de identificação rápida (sem sequenciamento) e destaca a importância da padronização dos procedimentos para garantir resultados confiáveis. Ao final, busca **apoiar pesquisadores e profissionais da área ambiental na aplicação dessas técnicas** de forma eficiente e eficaz.

O foco principal deste e-book está nos peixes cartilaginosos (Chondrichthyes). No entanto, muitos dos conceitos e técnicas abordados também podem ser aplicados a outros grupos. Além disso, **este e-book inclui quatro fluxogramas que orientam o leitor em cada etapa de um projeto de identificação molecular**, desde a definição dos objetivos e a escolha das técnicas mais adequadas até a análise e validação dos resultados. Com esta obra, buscamos contribuir para a disseminação do conhecimento científico e a conservação da biodiversidade marinha.

ÍNDICE

Conceitos Básicos e Fundamentos

(1-4)

1. O que é Identificação Molecular?

1.1 Identificação com Sequenciamento de DNA

1.2 Identificação sem Sequenciamento de DNA

2. Contextualização: Tubarões e Raias e a Necessidade de Ferramentas de Identificação Rápida

Planejamento de Projeto Molecular

(5-8)

3. Planejando seu Projeto de Identificação Molecular

3.1 Iniciando um Projeto

3.2 Escolhendo a Técnica Molecular Adequada

3.3 Quais Ferramentas Estão Disponíveis?

Definições Básicas de Biologia Molecular

(9-17)

4. Fundamentos da Identificação Molecular: O que Você Precisa Saber para Planejar seu Projeto

4.1 O que é PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)?

4.2 Variações de PCR

4.3 *Primer* vs. Sonda: Qual é a Diferença?

4.4 Genética Simplificada: Entendendo Conceitos-Chave

Técnicas Rápidas de Identificação Molecular

(18-24)

4.5 Ferramentas Rápidas de Identificação Baseadas em DNA/eDNA

Amostragem e Análise de Dados

(25-34)

5. Execução do seu Projeto de Identificação Molecular

5.1 Como Coletar e Preservar Amostras para Identificação

5.2 Como Registrar Adequadamente as Amostras Coletadas

5.3 Registro Fotográfico

5.4 Como Acessar o DNA da Amostra

5.5 Como Analisar sua Amostra de DNA

5.6 Como Interpretar e Validar seus Resultados

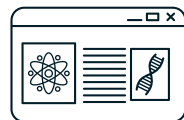
Saiba Mais

(35-38)

6. Leitura Complementar

1. O QUE É IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR?

A identificação molecular utiliza variações no DNA para determinar a espécie de uma amostra. Essencial para a biologia da conservação e áreas afins, essa ferramenta costuma ser aplicada por meio de duas abordagens principais:



1.1 IDENTIFICAÇÃO COM SEQUENCIAMENTO DE DNA

Este método requer o sequenciamento do DNA extraído da amostra. Ele fornece informações sobre a variação genética e é especialmente eficaz para a identificação de espécies e a detecção de variantes genéticas raras.



1.2 IDENTIFICAÇÃO SEM SEQUENCIAMENTO DE DNA

Este método não requer sequenciamento em laboratório, o que o torna uma alternativa mais rápida e econômica para a identificação molecular. Essas abordagens, denominadas “ferramentas rápidas de identificação baseadas em DNA/eDNA”, permitem a detecção direta de DNA e, em alguns casos, a sua quantificação.

1. O QUE É IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR?

Além de serem mais rápidas e econômicas, as ferramentas rápidas de identificação baseadas em DNA/eDNA vêm ampliando seu uso para além das análises laboratoriais tradicionais. Avanços em tecnologias portáteis permitem realizar reações de PCR e até mesmo sequenciamento diretamente em campo, com equipamentos compactos e de fácil uso. Dispositivos de sequenciamento portáteis, como o MinION (Oxford Nanopore Technologies), possibilitam a geração de sequências de DNA em tempo real fora de laboratórios convencionais.



MINIPCR® MINI8

MINIPCR. miniPCR mini8X thermal cycler.

Disponível em: <https://www.minipcr.com/product/minipcr-mini8x-thermal-cycler/>. Acesso em: 12 de maio de 2025.



BENTO LAB

BENTO BIO. Bento Lab – portable DNA laboratory.

Disponível em: <https://bento.bio/product/bento-lab/>. Acesso em: 12 de maio de 2025.



BIOMEME FRANKLIN™

BIOMEME. Franklin™ Real-Time PCR Thermocycler. Disponível em: <https://biomeme.com/platforms/franklin/>. Acesso em: 12 de maio de 2025.



MINION

OXFORD NANOPORE TECHNOLOGIES. MinION Mk1B – portable nanopore sequencing device. Disponível em:

<https://nanoporetech.com/products/sequence/minion-mk1b>.

Acesso em: 14 de novembro de 2025.

Esses **dispositivos portáteis** permitem a detecção de DNA em tempo real, sendo vantajoso em situações que exigem decisões rápidas. Isso inclui, por exemplo, o monitoramento de espécies ameaçadas em regiões remotas, a verificação da identidade de capturas durante inspeções pesqueiras e o apoio à fiscalização do comércio de fauna quando o acesso a laboratórios é limitado ou há risco de degradação das amostras.

2. CONTEXTUALIZAÇÃO: TUBARÕES E RAIAS E A NECESSIDADE DE FERRAMENTAS DE IDENTIFICAÇÃO RÁPIDA

Tubarões e raias estão entre os organismos marinhos mais ameaçados do mundo, enfrentando fortes pressões devido à sobrepesca e à degradação de habitats. A captura e o comércio ilegal de espécies ameaçadas representam um problema grave, já que muitas vezes esses animais são identificados incorretamente e comercializados sem identificação adequada, o que torna ainda mais difícil a aplicação de medidas de fiscalização e conservação.

Nesse contexto, as ferramentas rápidas de identificação baseadas em DNA/eDNA surgem como técnicas estratégicas para permitir a detecção precisa de espécies, inclusive em produtos processados, auxiliando no combate à pesca ilegal e na proteção de populações ameaçadas. O uso dessas técnicas possibilita obter de forma rápida e de baixo custo informações sobre os **táxons de elasmobrânquios** capturados e comercializados, gerando dados atualizados sobre as atividades pesqueiras.



Nota: Um táxon é uma unidade de classificação biológica (plural: táxons ou taxa) que representa um grupo de organismos reconhecido em um determinado nível taxonômico, como espécie, gênero ou família.

CONTEXTUALIZAÇÃO: TUBARÕES E RAIAS E A NECESSIDADE DE FERRAMENTAS DE IDENTIFICAÇÃO RÁPIDA

Além disso, a aplicação dessas técnicas rápidas ao DNA ambiental (eDNA: do inglês *environmental DNA*) — utilizando amostras do ambiente, como água, para identificação — pode facilitar o monitoramento da biodiversidade. Isso é fundamental para o desenvolvimento de estratégias de manejo que contribuam efetivamente para a conservação e o uso sustentável dos recursos marinhos. Diante disso, investir em técnicas de identificação rápidas e acessíveis é essencial para garantir um monitoramento e uma fiscalização mais eficientes e frequentes.



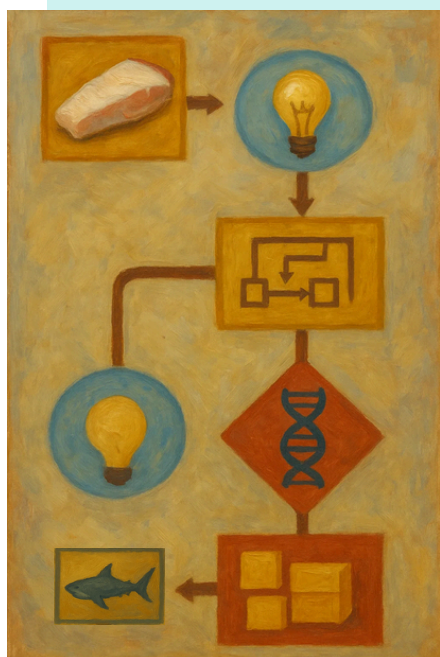
Figura 1. Coleta e filtração de amostras de água para análise de eDNA utilizando um amostrador de eDNA Smith-Root (<https://www.smith-root.com/edna/edna-sampler>). Créditos da imagem: Ingrid Bunholi e Mary Finch.

3. PLANEJANDO SEU PROJETO DE IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

Esta seção apresenta a etapa de planejamento de um projeto de identificação molecular. Ela oferece um guia prático para auxiliar pesquisadores, estudantes e profissionais a transformar um problema ou ideia inicial em um plano de projeto estruturado.



Três fluxogramas que ilustram o fluxo de trabalho da identificação molecular são apresentados para fornecer um caminho claro e prático, do conceito à implementação:



(i) como iniciar um projeto a partir de uma ideia, questão ou situação inicial, transformando-a em um plano de ação estruturado; (ii) como selecionar as técnicas moleculares mais adequadas; e (iii) como avaliar e organizar os recursos disponíveis.

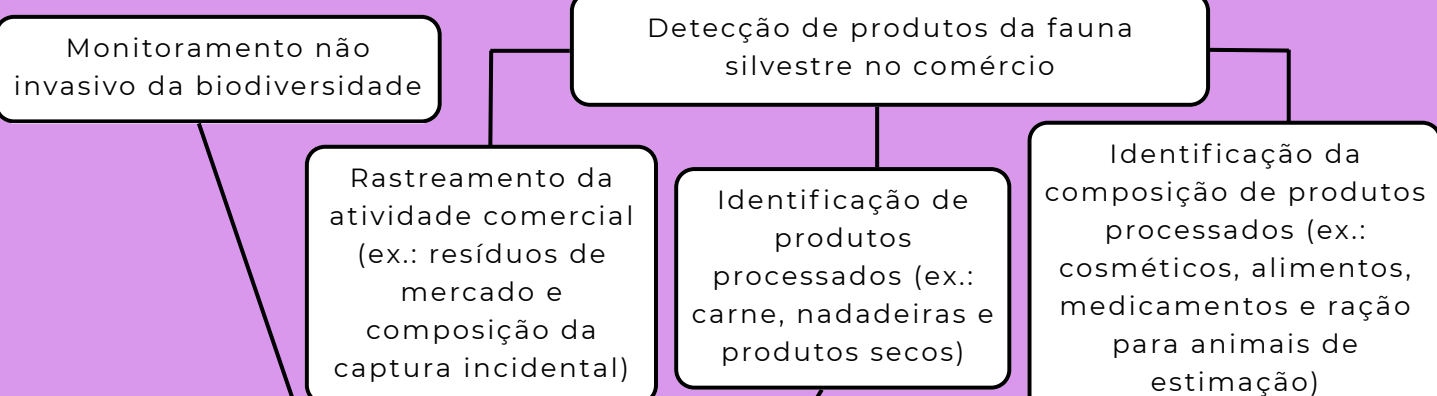
Por fim, no tópico 5, “Execução do seu Projeto de Identificação Molecular”, é apresentado um quarto fluxograma (iv), que conecta o conhecimento adquirido nesta seção à execução do projeto, desde a coleta de amostras até a identificação das espécies.

3. PLANEJANDO SEU PROJETO DE IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

3.1 INICIANDO UM PROJETO

Iniciar um projeto de identificação molecular exige compreender claramente quatro aspectos fundamentais: **o que você pretende alcançar**, **o tipo de amostras que serão utilizadas**, **a estrutura que orienta o trabalho** e **os recursos disponíveis**.

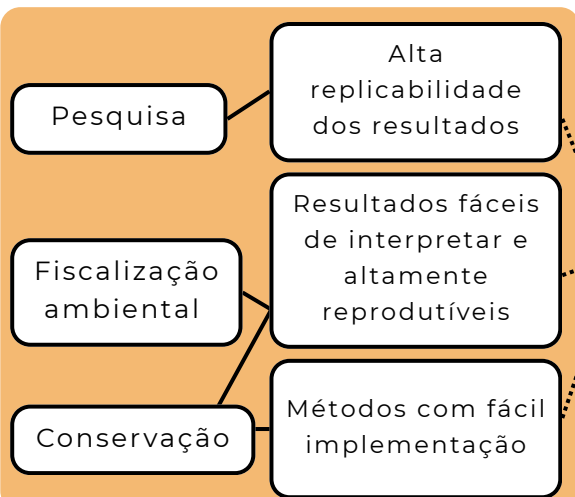
Objetivo da Pesquisa



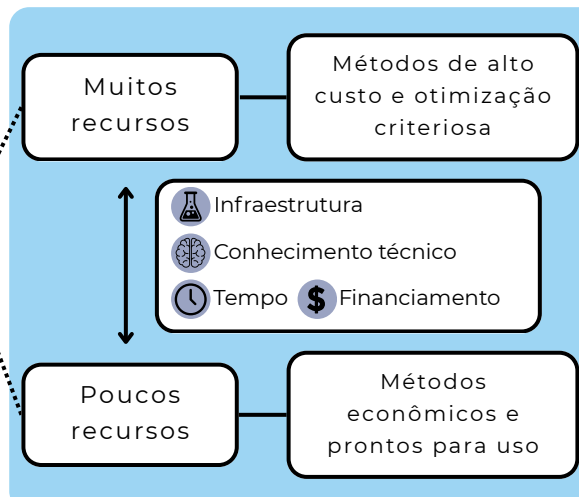
Tipo de Amostra



Abordagem Conceitual



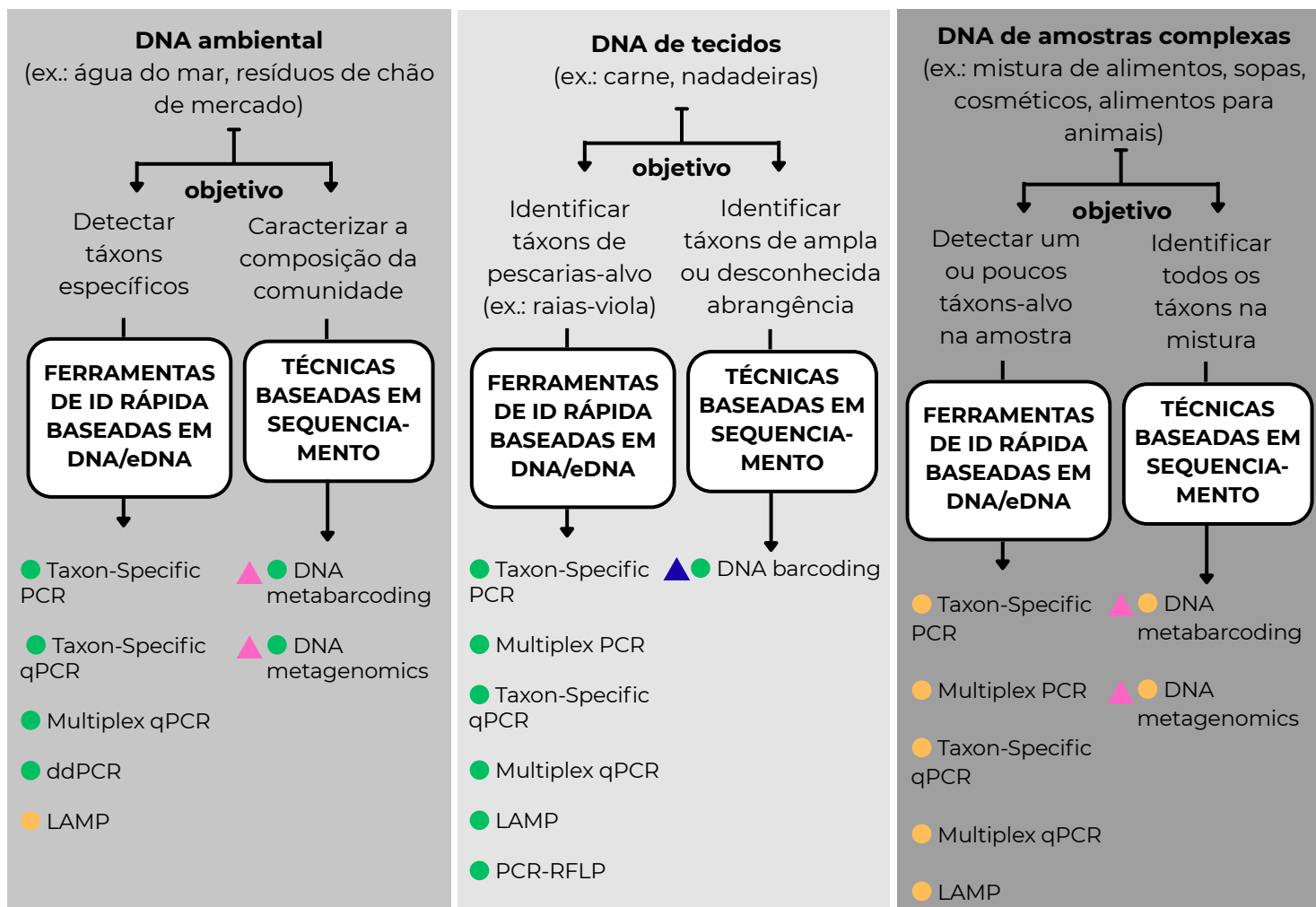
Recursos Disponíveis



ACESSE A SEÇÃO 4.2 PARA ESCOLHER O MÉTODO MAIS ADEQUADO AO SEU TIPO DE AMOSTRA, OBJETIVOS, E RECURSOS

3. PLANEJANDO SEU PROJETO DE IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

3.2 ESCOLHENDO A TÉCNICA MOLECULAR ADEQUADA



O custo é um fator limitante?

Taxon-Specific PCR, LAMP, PCR-RFLP, Multiplex PCR

É fácil desenvolver do zero?

Taxon-Specific PCR, PCR-RFLP

É preciso quantificar?

Taxon-Specific qPCR, ddPCR, DNA metagenomics, Multiplex qPCR

São necessários resultados rápidos em campo?

LAMP, Taxon-Specific qPCR, Multiplex qPCR, sequenciamento com MinION

É necessária alta sensibilidade?

ddPCR, Taxon-Specific qPCR

É necessário detectar espécies raras?

ddPCR, Taxon-Specific qPCR

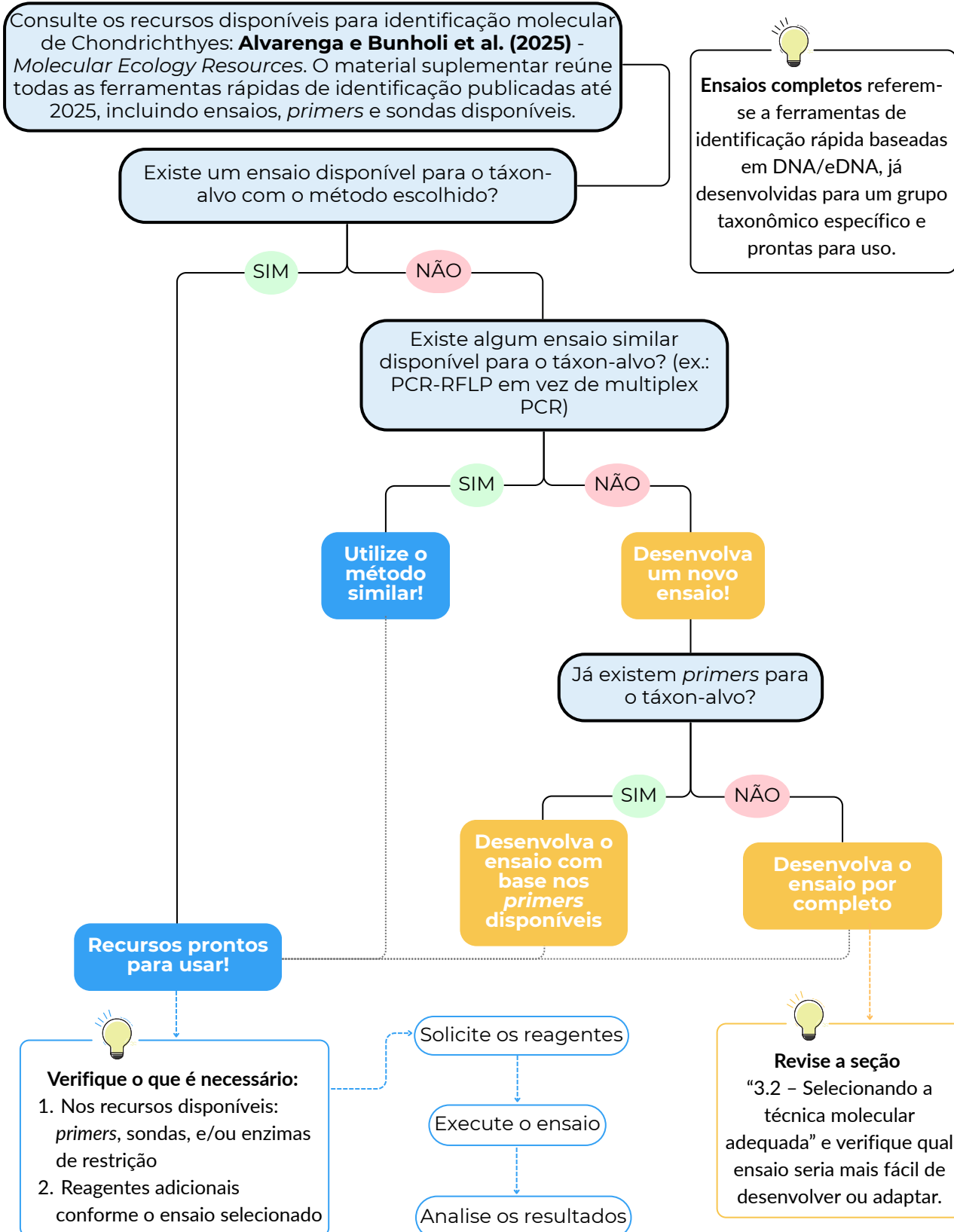
É necessário identificar todas as espécies presentes na amostra?

DNA metabarcoding, DNA metagenomics

- Validado para Chondrichthyes
- Não validado para Chondrichthyes
- ▲ Sequenciamento por NGS
- ▲ Sequenciamento de Sanger

3. PLANEJANDO SEU PROJETO DE IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

3.3 QUAIS FERRAMENTAS ESTÃO DISPONÍVEIS?



4. FUNDAMENTOS DA IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR: O QUE VOCÊ PRECISA SABER PARA PLANEJAR SEU PROJETO

Após apresentar como planejar um projeto de identificação molecular, o próximo passo é compreender os **conceitos moleculares essenciais** que irão orientar suas decisões. Um bom entendimento dos fundamentos da biologia molecular é fundamental para selecionar os métodos mais adequados e garantir um projeto bem estruturado.

Esta seção oferece uma visão geral simplificada dos conceitos fundamentais e destaca algumas das ferramentas rápidas de identificação baseadas em DNA/eDNA mais utilizadas e emergentes. Em conjunto, esses conhecimentos fornecem a base necessária para alinhar o planejamento do seu projeto com as abordagens moleculares que o tornam possível.

4.1 O QUE É PCR (REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE)?

- **Definição Simples**

A PCR (do inglês: *Polymerase Chain Reaction*) é uma técnica utilizada para produzir múltiplas cópias de uma região específica do DNA. Podemos dizer que ela funciona de maneira semelhante a uma fotocopadora.

Essas cópias podem ter tamanhos específicos, determinados pelos *primers* (ver definição a seguir), auxiliando na identificação de espécies ou grupos específicos e servindo de base para diversas técnicas de identificação molecular.



4. FUNDAMENTOS DA IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR: O QUE VOCÊ PRECISA SABER PARA PLANEJAR SEU PROJETO

4.1 O QUE É PCR (REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE)?

• **Reagentes Principais**



DNA Molde - Fita de DNA que contém a sequência de interesse a ser amplificada/copiada.



Primers - Sequências curtas de DNA de fita simples que se ligam a regiões complementares do DNA molde, delimitando a região que será amplificada.



Polimerase - Enzima responsável por sintetizar novas fitas de DNA ao adicionar nucleotídeos complementares à fita molde, a partir da região do *primer*. A Taq polimerase é a enzima mais utilizada em PCR, pois é capaz de resistir às altas temperaturas necessárias para a separação das fitas de DNA, ao contrário da maioria das enzimas.



Nucleotídeos (desoxirribonucleotídeos trifosfatados:

dNTPs, do inglês: *deoxynucleoside triphosphates*) -

Unidades básicas que compõem o DNA. Cada nucleotídeo é formado por três componentes: uma base nitrogenada (adenina = **A**, timina = **T**, citosina = **C** ou guanina = **G**), um açúcar de cinco carbonos (desoxirribose) e um grupo fosfato.



Cloreto de magnésio ($MgCl_2$) - Fornece íons magnésio que atuam como cofatores da DNA polimerase, influenciando a atividade enzimática, a ligação dos *primers* e a especificidade da amplificação.



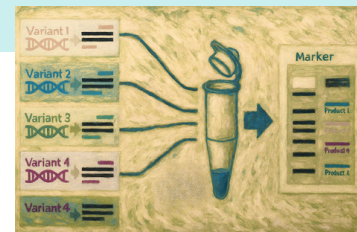
Tampão - Solução que estabiliza o sistema, ajudando a manter o pH e as condições ideais para o funcionamento da polimerase, garantindo que a reação ocorra de forma eficiente.

4. FUNDAMENTOS DA IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR: O QUE VOCÊ PRECISA SABER PARA PLANEJAR SEU PROJETO

4.2 VARIAÇÕES DE PCR

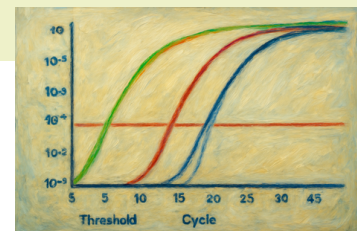
- **PCR multiplex (Multiplex PCR)**

Permite detectar simultaneamente múltiplas regiões do DNA por meio do uso de vários *primers*.



- **PCR em tempo real (Real-time quantitative PCR, qPCR)**

Permite a quantificação do DNA em tempo real utilizando *primers* específicos. Sondas podem ser adicionadas para aumentar a especificidade, especialmente em amostras de eDNA, mas seu uso não é restrito a esse tipo de amostra; tanto amostras de tecido quanto de eDNA podem ser analisadas utilizando apenas *primers* ou em combinação com sondas.



- **PCR digital em gotas (Droplet-digital PCR, ddPCR)**

Amplifica o DNA por meio de milhares de microgotas, permitindo a quantificação precisa de eDNA mesmo em baixas concentrações. Requer o uso de *primers* e sondas específicos.



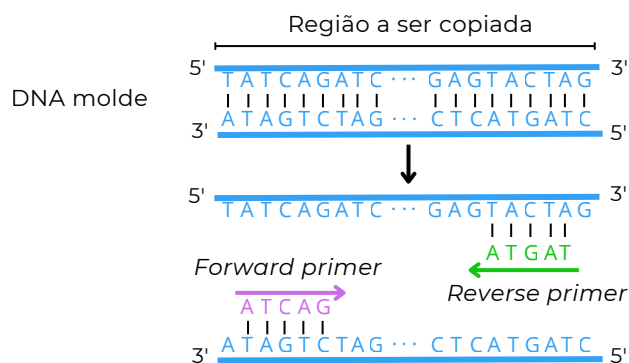
4. FUNDAMENTOS DA IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR: O QUE VOCÊ PRECISA SABER PARA PLANEJAR SEU PROJETO

4.3 PRIMER VS. SONTA: QUAL É A DIFERENÇA?

Primers e sondas são utilizados em técnicas de biologia molecular, principalmente em PCR e suas variações, sendo as sondas mais comumente empregadas em qPCR e ddPCR.

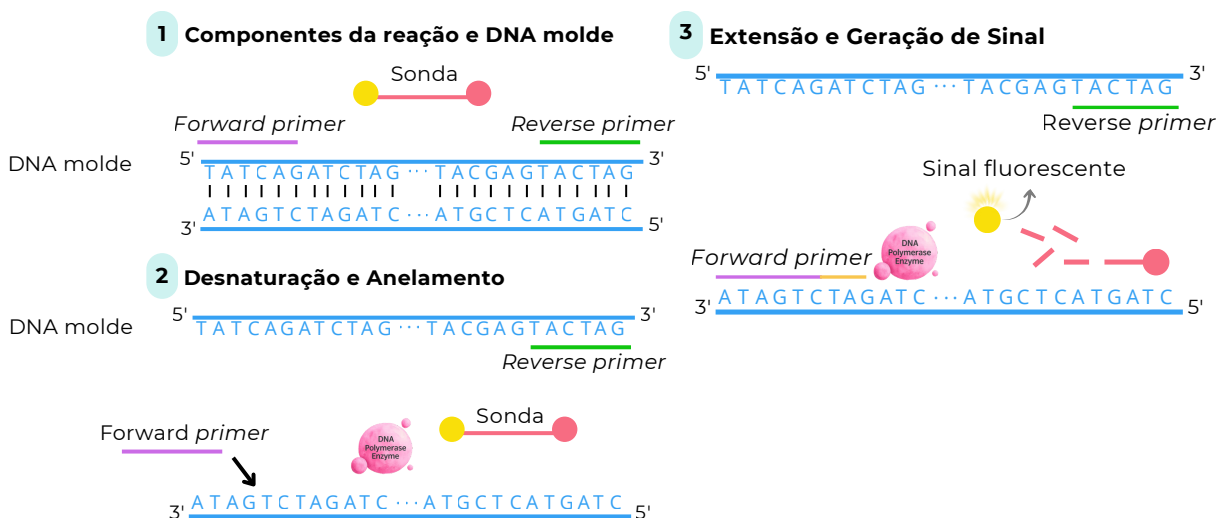
- **Primers**

São sequências curtas de DNA que atuam como pontos de início para a amplificação do DNA na PCR. Elas se ligam à sequência-alvo e indicam à enzima (polimerase) onde iniciar a cópia do DNA.



- **Sondas**

São sequências curtas de DNA que se ligam especificamente ao DNA-alvo e contêm um marcador fluorescente. São utilizadas para aumentar a especificidade na identificação e quantificação de amostras de eDNA, tanto em aplicações de qPCR quanto de ddPCR.



4. FUNDAMENTOS DA IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR: O QUE VOCÊ PRECISA SABER PARA PLANEJAR SEU PROJETO

4.4 GENÉTICA SIMPLIFICADA: ENTENDENDO CONCEITOS-CHAVE

• **Bioinformática**

A bioinformática é uma área científica que combina biologia e computação para analisar grandes conjuntos de dados biológicos, como sequências de DNA, RNA e proteínas. É essencial para otimizar análises genéticas e auxilia em:

- Identificação de genes e mutações;
- Comparação de sequências entre diferentes organismos;
- Desenho de *primers* para técnicas de PCR;
- Experimentos e simulações *in silico*;
- Análises estatísticas de variação genética e dados de sequenciamento.

• **Células**

A célula é a menor unidade funcional dos organismos vivos, responsável por atividades essenciais como produção de energia, crescimento e reprodução. Nas células eucarióticas, o DNA está protegido pelo núcleo, onde é armazenado e transmitido entre gerações.



É importante lembrar que há **dois principais tipos de células**:

➔ **Células procarióticas**

Células mais simples, sem núcleo delimitado por membrana, cujo material genético (DNA) está localizado no citoplasma. Incluem os grupos Bacteria e Archaea.

➔ **Células eucarióticas**

Células mais complexas, com núcleo delimitado por membrana, onde está o DNA, e com organelas especializadas. Incluem animais, plantas, fungos e protistas.

4. FUNDAMENTOS DA IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR: O QUE VOCÊ PRECISA SABER PARA PLANEJAR SEU PROJETO

4.4 GENÉTICA SIMPLIFICADA: ENTENDENDO CONCEITOS-CHAVE

- **Reação em cadeia**

É um processo no qual uma ação inicial desencadeia uma sequência de eventos sucessivos. Um exemplo bem conhecido é a PCR; como discutido anteriormente neste e-book, a PCR copia um fragmento de DNA milhões de vezes.

- **Contaminação**

A contaminação em análises moleculares pode ter diversas origens e comprometer a precisão dos resultados. Ocorre quando substâncias ou materiais indesejados interferem na amostra ou no processo de análise, levando a erros ou a resultados falso-positivos ou falso-negativos. Exemplos de contaminação incluem:

- Contaminação ambiental (por exemplo, resíduos de DNA/RNA de amostras anteriores ou aerossóis no ambiente de trabalho);
- Contaminação proveniente de reagentes ou equipamentos (por exemplo, reagentes vencidos ou equipamentos mal conservados);
- Erros de pipetagem e manuseio (por exemplo, pipetas mal calibradas, ponteiros mal encaixadas ou manipulação de amostras sem o uso de luvas).

- **DNA (Ácido Desoxirribonucleico)**

O DNA é uma macromolécula biológica que atua como o principal material genético de todos os organismos vivos e de alguns vírus. É um polímero composto por duas longas cadeias (fitas) formadas por unidades chamadas nucleotídeos (formados por uma base nitrogenada, um açúcar e um grupo fosfato), que se enrolam entre si, formando uma estrutura de dupla hélice antiparalela.

4. FUNDAMENTOS DA IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR: O QUE VOCÊ PRECISA SABER PARA PLANEJAR SEU PROJETO

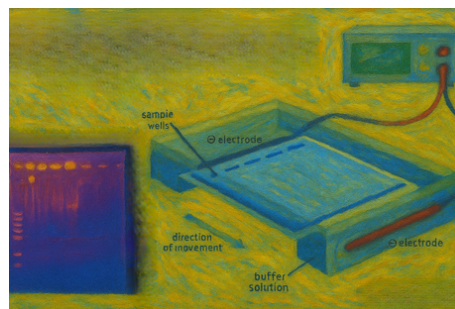
4.4 GENÉTICA SIMPLIFICADA: ENTENDENDO CONCEITOS-CHAVE

- **eDNA (DNA ambiental)**

O eDNA é o material genético liberado pelos organismos no ambiente (água, solo ou ar). Pode ser analisado para detectar a presença de espécies sem a necessidade de captura ou coleta direta.

- **Eletroforese**

A eletroforese é uma técnica utilizada para separar DNA, RNA ou proteínas com base no tamanho e na carga. É geralmente realizada em gel de agarose com tampões como TAE (Tris-acetato-EDTA) ou TBE (Tris-borato-EDTA), que mantêm o pH estável durante a corrida em gel. Os ácidos nucleicos possuem carga negativa e, quando submetidos a uma corrente elétrica, migram em direção ao eletrodo positivo (ânodo). Moléculas menores se deslocam mais rapidamente pelos poros do gel, enquanto as maiores se movem mais lentamente, permitindo sua visualização e comparação de acordo com o tamanho.



- **Enzima**

As enzimas são proteínas que atuam como “máquinas”, catalisando reações químicas essenciais, como a replicação ou o corte do DNA. Enzimas de restrição, por exemplo, reconhecem sequências específicas de nucleotídeos no DNA e realizam cortes nesses pontos, gerando fragmentos úteis para a identificação molecular. Já a DNA polimerase é uma enzima que sintetiza novas fitas de DNA a partir de uma fita molde, adicionando nucleotídeos complementares.

4. FUNDAMENTOS DA IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR: O QUE VOCÊ PRECISA SABER PARA PLANEJAR SEU PROJETO

4.4 GENÉTICA SIMPLIFICADA: ENTENDENDO CONCEITOS-CHAVE

- **Amplificação genética**

A amplificação genética é o processo de produzir múltiplas cópias de um fragmento específico de DNA. É útil para estudos gênicos, identificação de organismos e até testes forenses.

- **Marcador molecular**

Um marcador molecular é uma sequência de DNA usada para identificar características genéticas de um organismo, funcionando como um “código de barras biológico”. É amplamente utilizado para diferenciar espécies, estudar relações genéticas ou diagnosticar doenças.

- **Inibidor de PCR**

Inibidores de PCR são substâncias, como ácido húmico ou metais dissolvidos, presentes em amostras ambientais que interferem na ação da polimerase e dos *primers*, reduzindo a eficiência da PCR e afetando métodos em tempo real, como a qPCR.

- **RNA (Ácido Ribonucleico)**

O RNA é uma molécula geralmente de fita simples, semelhante ao DNA, que desempenha diversas funções celulares, incluindo a participação na produção de proteínas.

- **Sequenciamento**

O sequenciamento é o processo de determinar a ordem exata dos nucleotídeos (**A**, **T/U**, **C** e **G**) em uma molécula de DNA ou RNA. Em estudos de identificação molecular e eDNA, permite comparar sequências com bancos de dados para identificar espécies, detectar variações genéticas e avaliar a biodiversidade.

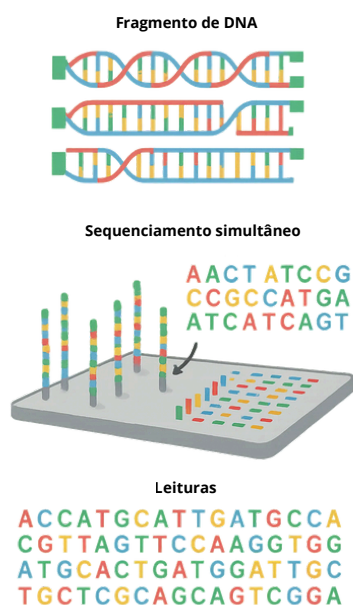
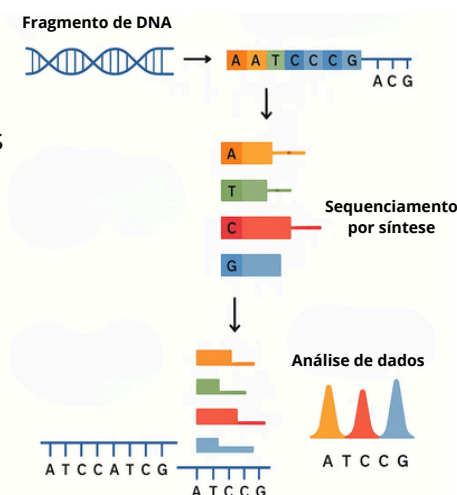
4. FUNDAMENTOS DA IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR: O QUE VOCÊ PRECISA SABER PARA PLANEJAR SEU PROJETO

4.4 GENÉTICA SIMPLIFICADA: ENTENDENDO CONCEITOS-CHAVE

Diversos métodos de sequenciamento estão disponíveis, desde o **sequenciamento Sanger**, que analisa um fragmento de DNA por vez, até o **sequenciamento de alto rendimento (HTS)**, do inglês *High-Throughput Sequencing*), também conhecido como **sequenciamento de nova geração (NGS)**, do inglês *Next-Generation Sequencing*), capaz de processar milhões de fragmentos simultaneamente.

Sequenciamento Sanger:

Método clássico que determina a ordem dos nucleotídeos de um fragmento de DNA por meio da síntese de novas fitas, utilizando nucleotídeos modificados que interrompem a reação em bases específicas. É altamente preciso, mas limitado em rendimento, pois sequencia um fragmento de DNA por vez.



Sequenciamento de alto rendimento (HTS):

Conjunto de métodos que permite o sequenciamento simultâneo de milhões de fragmentos de DNA ou RNA. Nesse processo, os fragmentos são amplificados e lidos base a base, geralmente por meio de sinais fluorescentes emitidos durante a incorporação de nucleotídeos. O HTS possibilita o sequenciamento rápido em larga escala, sendo adequado para diversas aplicações genômicas.



Enquanto o sequenciamento Sanger é mais simples e econômico para projetos de identificação, o HTS oferece maior profundidade e resolução para análises mais complexas, como metabarcoding e a determinação da origem populacional de uma amostra.

4. FUNDAMENTOS DA IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR: O QUE VOCÊ PRECISA SABER PARA PLANEJAR SEU PROJETO

4.5 FERRAMENTAS RÁPIDAS DE IDENTIFICAÇÃO BASEADAS EM DNA/eDNA

TAXON-SPECIFIC PCR

Definição

Técnica de PCR que detecta táxons específicos por meio de *primers* direcionados a regiões únicas do DNA.

Amostras-alvo:

Tecidos, eDNA e amostras complexas.

Aplicações práticas:

Identificar a qual espécie pertence uma amostra de tecido ou verificar a presença de uma espécie específica em amostras ambientais ou alimentares.

Como interpretar os resultados:

Se o DNA-alvo estiver presente, a técnica produzirá uma marcação no tamanho esperado, permitindo sua visualização após a eletroforese.

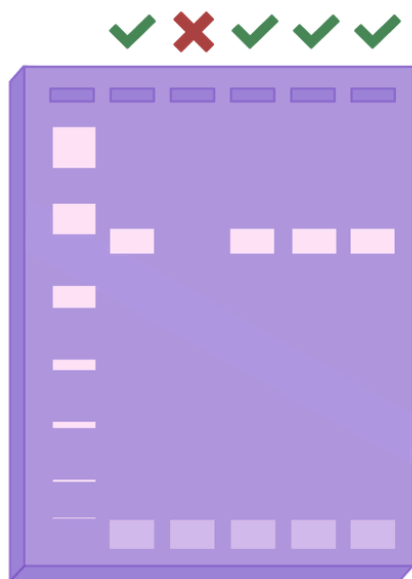


Figura 2. Ilustração esquemática de um gel de agarose de Taxon-Specific PCR contendo cinco amostras. A primeira faixa mostra o padrão de tamanho molecular (*ladder*). As faixas 2-6 exibem os produtos da amplificação, sendo que a amostra 2 apresenta falha na amplificação, indicando ausência do DNA-alvo. Criado com BioRender.com.

Limitações: Depende fortemente da qualidade do desenho dos *primers*, podendo gerar falsos negativos ou detectar espécies semelhantes quando mal planejado. Também possui baixa sensibilidade para pequenas quantidades de DNA-alvo, limitando seu uso em amostras de eDNA.

Recomendações: Validar os *primers* antes do uso e sempre incluir controles positivos e negativos.

4. FUNDAMENTOS DA IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR: O QUE VOCÊ PRECISA SABER PARA PLANEJAR SEU PROJETO

4.5 FERRAMENTAS RÁPIDAS DE IDENTIFICAÇÃO BASEADAS EM DNA/eDNA

MULTIPLEX PCR

Definição:

Técnica de PCR que amplifica múltiplas regiões de DNA simultaneamente usando vários *primers* em uma única reação.

Amostras-alvo:

Tecidos e amostras complexas.

Aplicações práticas:

Permite detecção rápida, sendo ideal para inspeções comerciais de rotina e monitoramento.

Como interpretar os resultados:

Cada espécie produz um padrão específico de marcação, que pode ser visualizado após a eletroforese.

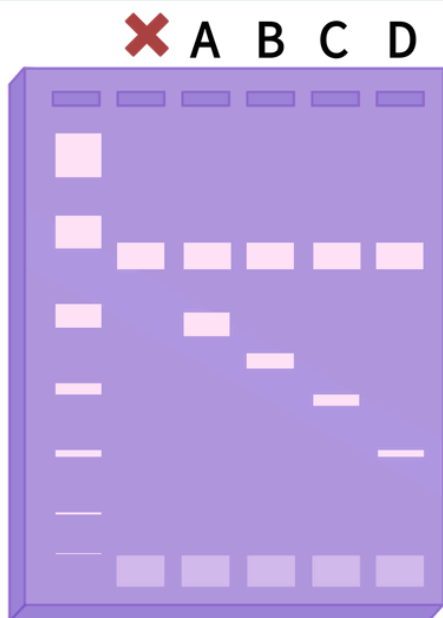


Figura 3. Ilustração esquemática de um gel de agarose de Multiplex PCR contendo cinco amostras. A primeira faixa mostra o padrão de tamanho molecular (*ladder*). As faixas 2-6 exibem uma marcação universal e produtos de amplificação de diferentes tamanhos, correspondentes a múltiplas regiões-alvo amplificadas simultaneamente em cada reação. Cada padrão de marcação representa uma espécie diferente (A, B, C e D). A faixa 1 ilustra uma identificação malsucedida, na qual apenas a marcação universal foi amplificada. Criado com BioRender.com.

Limitações: Risco de amplificação inespecífica; alvos geneticamente próximos ou amostras mistas exigem desenho e otimização cuidadosos dos *primers*.

Recomendações: Utilizar *primers* validados de bancos de dados confiáveis, consultar a literatura antes de desenvolver novos ensaios e optar por multiplex qPCR para maior especificidade ou PCR-RFLP (ver próxima página) para táxons geneticamente próximos.

4. FUNDAMENTOS DA IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR: O QUE VOCÊ PRECISA SABER PARA PLANEJAR SEU PROJETO

4.5 FERRAMENTAS RÁPIDAS DE IDENTIFICAÇÃO BASEADAS EM DNA/eDNA

PCR-RFLP

Definição:

Técnica que utiliza enzimas de restrição para cortar o DNA amplificado em sítios específicos, gerando padrões de fragmentos que permitem a identificação de espécies.

Amostras-alvo:

Tecidos.

Aplicações práticas:

Diferenciar táxons ou espécies geneticamente próximas, mesmo com baixa divergência genética, por meio de diferenças em sítios de restrição que funcionam como marcadores específicos.

Como interpretar os resultados:

O DNA digerido gera um padrão de fragmentos que pode ser analisado após a eletroforese para determinar a espécie.

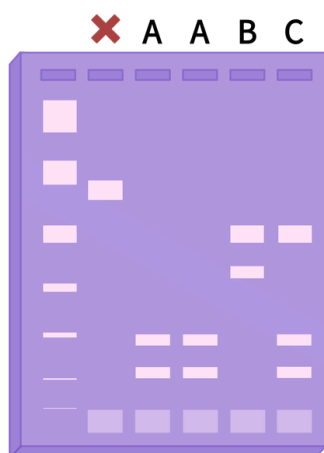


Figura 4. Ilustração esquemática de um gel de agarose de PCR-RFLP contendo cinco amostras. A primeira faixa mostra o padrão de tamanho molecular (*ladder*). As faixas 2–6 exibem diferentes padrões de fragmentos gerados pela digestão enzimática, refletindo a presença ou ausência de sítios de restrição específicos em cada amostra. Três espécies distintas (A, B e C) estão representadas, cada uma com um padrão característico de bandas. A faixa 1 representa uma amplificação malsucedida. Criado com BioRender.com.

Limitações: Requer conhecimento prévio dos sítios de restrição, o que pode limitar sua aplicação entre diferentes táxons.

Recomendações: Selecionar e testar cuidadosamente as enzimas de restrição e comparar os padrões de digestão com bancos de dados de referência para garantir identificação precisa.

4. FUNDAMENTOS DA IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR: O QUE VOCÊ PRECISA SABER PARA PLANEJAR SEU PROJETO

4.5 FERRAMENTAS RÁPIDAS DE IDENTIFICAÇÃO BASEADAS EM DNA/eDNA

TAXON-SPECIFIC qPCR

Definição:

Técnica que amplifica e quantifica DNA/eDNA em tempo real por meio de sinais fluorescentes, permitindo detectar a presença da espécie-alvo.

Amostras-alvo:

Tecidos, eDNA, e amostras complexas.

Aplicações práticas:

Identificação de espécies e monitoramento da biodiversidade. Equipamentos portáteis permitem a identificação em campo (veja mais detalhes na página 2).

Como interpretar os resultados:

Quanto mais cedo a curva de amplificação ultrapassa o limite de detecção, maior é a quantidade inicial de DNA (ou eDNA) da espécie-alvo. O sinal é gerado por corantes ou sondas fluorescentes, permitindo o monitoramento da amplificação em tempo real.

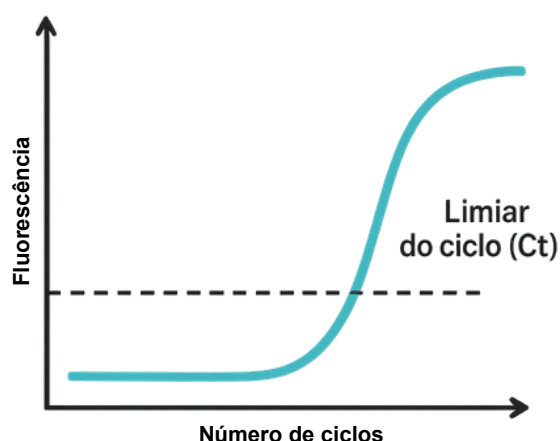


Figura 5. Ilustração esquemática de um gráfico de amplificação de qPCR convencional. A linha horizontal representa o limiar de fluorescência, e o Ct indica o ciclo em que a curva de amplificação do DNA-alvo ultrapassa esse limiar e se torna detectável. Criado com Sora.

Limitações: Menor sensibilidade para detectar táxons raros em amostras de eDNA do que o ddPCR (veja abaixo) e suscetibilidade à inibição da PCR.

Recomendações: Utilizar controles rigorosos e validar *primers* e sondas *in silico* (ex.: Primer-BLAST) e *in vitro* com espécies-alvo e espécies coocorrentes antes das análises.

4. FUNDAMENTOS DA IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR: O QUE VOCÊ PRECISA SABER PARA PLANEJAR SEU PROJETO

4.5 FERRAMENTAS RÁPIDAS DE IDENTIFICAÇÃO BASEADAS EM DNA/eDNA

MULTIPLEX qPCR

Definição:

Variação da qPCR que amplifica simultaneamente múltiplas sequências de DNA usando diferentes conjuntos de *primers*. Corantes fluorescentes ou sondas marcadas permitem detectar cada alvo em uma única reação.

Amostras-alvo:

Tecidos e eDNA.

Aplicações práticas:

Deteção e quantificação de múltiplos táxons em amostras de tecidos e de eDNA.

Como interpretar os resultados:

Cada espécie-alvo gera uma curva de amplificação distinta, permitindo a detecção simultânea de múltiplas espécies em amostras complexas. Os valores de ciclo limiar (Ct) indicam a presença do DNA-alvo.

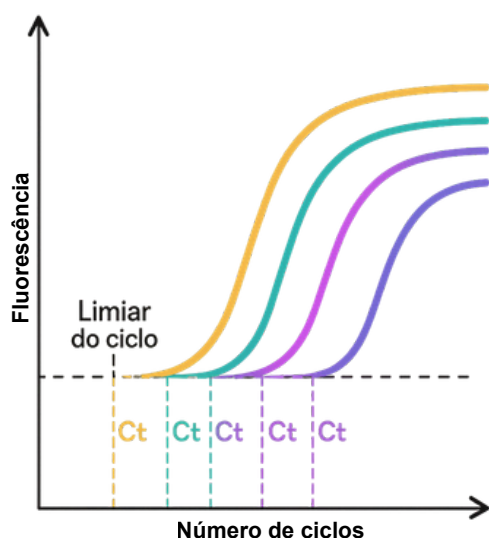


Figura 6. Ilustração esquemática de um gráfico de amplificação de Multiplex qPCR, com curvas de diferentes cores, cada uma representando uma sequência-alvo distinta (ou seja, diferentes espécies). A linha horizontal preta indica o limiar de fluorescência, e as linhas verticais marcam os valores de Ct, correspondentes aos ciclos em que cada DNA-alvo ultrapassa esse limiar e se torna detectável. Criado com Sora.

Limitações: Requer um planejamento mais complexo, apresenta maior risco de amplificação inespecífica e tem custo superior ao da Multiplex PCR.

Recomendações: Utilizar *primers* e sondas validados, otimizar as condições da reação e incluir todos os controles necessários. Para amostras mais simples, considerar alternativas de menor custo, como Multiplex PCR ou PCR-RFLP.

4. FUNDAMENTOS DA IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR: O QUE VOCÊ PRECISA SABER PARA PLANEJAR SEU PROJETO

4.5 FERRAMENTAS RÁPIDAS DE IDENTIFICAÇÃO BASEADAS EM DNA/eDNA

DROPLET-DIGITAL (ddPCR).

Definição:

Método altamente sensível para quantificação de DNA, no qual a reação de PCR é dividida em milhares de *nanodroplets* (nanogotículas) envoltos em óleo, cada um funcionando como uma reação independente.

Amostras-alvo:

eDNA.

Aplicações práticas:

Monitoramento da biodiversidade, especialmente para espécies raras ou pouco abundantes.

Como interpretar os resultados:

Droplets (gotículas) positivos indicam a detecção do DNA-alvo, enquanto *droplets* negativos indicam sua ausência ou falha na amplificação. A proporção de *droplets* positivos permite estimar a concentração do DNA-alvo na amostra.

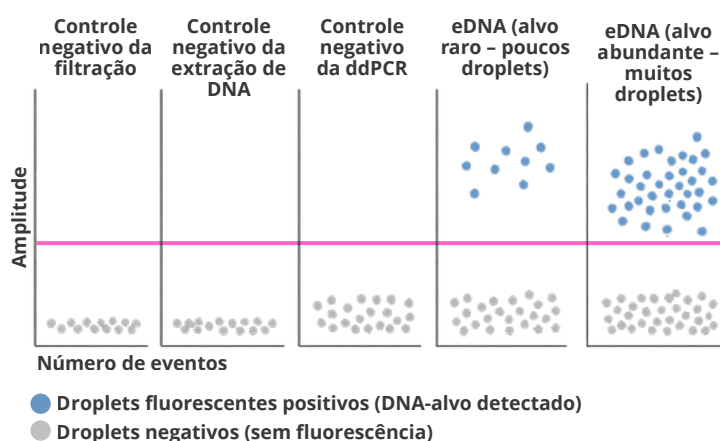


Figura 7. Ilustração esquemática de gráficos de amplitude de fluorescência em ddPCR (amplitude de fluorescência x número de eventos) para cinco tipos de amostra: controle negativo da filtração (sem amostra filtrada, para verificar contaminação em campo), controle negativo da extração de DNA (sem DNA molde, para verificar contaminação durante a extração), controle negativo da ddPCR (sem DNA molde, para verificar contaminação na PCR), eDNA com alvo raro (poucos droplets positivos) e eDNA com alvo abundante (muitos droplets positivos). A linha rosa indica o limiar de detecção do ensaio. Criado com Sora e Canva.

Limitações: Alto custo e requer equipamentos e treinamento especializados.

Recomendações: Use ddPCR para amostras com pouco DNA-alvo ou muitos inibidores. Valide *primers* e sondas *in silico* e *in vitro* com espécies-alvo e coocorrentes.

4. FUNDAMENTOS DA IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR: O QUE VOCÊ PRECISA SABER PARA PLANEJAR SEU PROJETO

4.5 FERRAMENTAS RÁPIDAS DE IDENTIFICAÇÃO BASEADAS EM DNA/eDNA

LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION (LAMP).

Definição:

A LAMP (amplificação isotérmica mediada por loop) é uma técnica rápida de amplificação de DNA realizada em temperatura constante, dispensando o uso de termociclador.

Amostras-alvo:

Tecidos, eDNA.

Aplicações práticas:

Ideal para identificação rápida de táxons, especialmente em trabalhos de campo ou análises realizadas no próprio local de coleta.

Como interpretar os resultados:

A mudança de cor ou a formação de precipitado indica a presença do DNA da espécie-alvo.

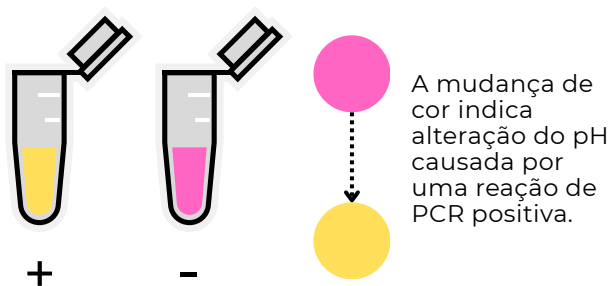


Figura 8. Ilustração esquemática de uma reação LAMP positiva, indicada pela mudança de cor de rosa para amarelo devido à alteração do pH, confirmando a presença do DNA da espécie-alvo em ensaios espécie-específicos. Criado com Canva.

Limitações: Sensível à contaminação e potencialmente menos específica que técnicas convencionais de PCR.

Recomendações: Utilize *primers* bem desenhados e valide o ensaio antes de aplicações em larga escala.

5. EXECUÇÃO DO SEU PROJETO DE IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

1. COLETA DE AMOSTRA

Tecidos
(ex.: músculo, nadadeiras)

- Utilizar instrumentos estéreis para cortar fragmentos de tecido de até ~0,5 cm²
- Preservar em etanol ≥92% e refrigerar a amostra

Nota: aplicável também em amostras complexas (ex.: alimentos, sopas, cosméticos, rações etc)

DNA ambiental
(ex.: filtro de água, sedimento)

- Coletar ~1–5 L de água ou ~5 g de sedimento com instrumentos esterilizados
- Preservar com RNAlater (ou reagente similar) ou congelar imediatamente

2. REGISTRO E IDENTIFICAÇÃO

- Registrar data, local, coordenadas, origem e condições ambientais (eDNA) ou sexo e tamanho corporal (tecido)
- Fotografar o exemplar (para amostras de tecido) e garantir registros completos e claros

3. EXTRAÇÃO DE DNA / eDNA

- Utilizar kits comerciais ou protocolos próprios
- Remover inibidores ao trabalhar com amostras ambientais

4. ANÁLISE DE DNA / eDNA

- Escolher a técnica molecular adequada conforme a seção “3.2 Escolhendo a técnica molecular adequada”
- Seguir o protocolo específico, utilizando reagentes, *primers* e/ou sondas adequados
- Garantir a inclusão de todos os controles para verificar se houve contaminação e desempenho do ensaio

5. ANÁLISE DOS RESULTADOS

- A interpretação depende da técnica utilizada, podendo envolver sinais de amplificação, comparações de sequências ou resultados específicos de marcadores

6. CONFIRMAÇÃO DA ESPÉCIE

- Avaliar resultados para confirmar presença ou ausência da espécie-alvo
- Se ambíguos, repetir o ensaio, aplicar técnica molecular alternativa ou comparar sequências com bancos de referência
- Registrar resultados confirmados para concluir o fluxo de identificação molecular



Requer centrífuga, micropipetas e reagentes específicos de extração.



Consulte novamente
“4.5 Ferramentas Rápidas de Identificação Baseadas em DNA/eDNA”

5. EXECUÇÃO DO SEU PROJETO DE IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

5.1 COMO COLETAR E PRESERVAR AMOSTRAS PARA IDENTIFICAÇÃO



- **Tecidos**

(muscular, hepático, nadadeira ou outros)

Armazenamento: Manter uma amostra de tecido por recipiente para evitar contaminação.

Recomendações:

Tamanho do tecido: Aproximadamente 0,5 cm²;

Utilizar instrumentos de corte limpos;

Higienizar os materiais utilizados na coleta e no manuseio das amostras (ex.: tesouras e pinças) com solução de etanol a 70% ou mais, entre cada amostra.



Proporção entre tecido e fixador: É fundamental que o tecido fique completamente imerso em etanol, que atua como fixador e preserva a amostra. Sempre que possível, manter o recipiente refrigerado para favorecer a conservação da amostra e a qualidade do DNA.

A amostra deve ser preservada em etanol $\geq 92\%$, pois, concentrações menores podem comprometer sua conservação. O tecido deve ocupar no máximo $\frac{1}{4}$ do recipiente, garantindo que fique completamente envolvido pelo etanol.

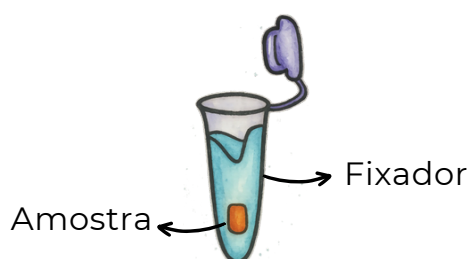
5. EXECUÇÃO DO SEU PROJETO DE IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

5.1 COMO COLETAR E PRESERVAR AMOSTRAS PARA IDENTIFICAÇÃO



Um microtubo de 1,5 mL comporta aproximadamente 0,5 cm² de tecido. A amostra deve se mover livremente no etanol ao agitar suavemente o tubo, sem ficar comprimida no fundo ou nas laterais, nem presa sob a tampa.

Exemplo:



Recomenda-se trocar o etanol pelo menos três vezes após a imersão da amostra, especialmente se ela não for processada imediatamente. Isso evita a redução da concentração do álcool causada pela liberação de água do tecido para a solução.

- **DNA ambiental (eDNA)**

(Filtro de água ou sedimento)

Tamanho da amostra: Aproximadamente 1–5 L de água ou 5 g de sedimento.

Recomendações:

Esterilizar instrumentos e materiais com solução de hipoclorito de sódio a 10% antes do uso;

Usar luvas de látex ou similares durante a coleta para minimizar o risco de contaminação.

Os filtros ou sedimentos devem ser congelados imediatamente após a coleta ou preservados em RNAlater (ou reagente similar).



Para orientações sobre o preparo, consulte Malmstrom (2015):
<https://doi.org/10.17504/protocols.io.c56y9d>

Incluir um controle negativo (ex.: água Milli-Q ou destilada) em cada ponto de coleta para verificar possíveis contaminações;

Sempre que possível, realizar réplicas de campo para aumentar a chance de detectar as espécies presentes.

5. EXECUÇÃO DO SEU PROJETO DE IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

5.2 COMO REGISTRAR ADEQUADAMENTE AS AMOSTRAS COLETADAS



- **Registro adequado**

Para **amostras de tecido**, identifique os tubos com marcador permanente. Informações adicionais também podem ser anotadas a lápis em papel vegetal ou outro papel resistente a líquidos e mantidos junto à amostra. Para **amostras de eDNA**, siga o mesmo procedimento e registre todas as informações antes do congelamento ou da adição de conservantes, evitando danos à identificação.



Nota 1: Como as amostras de tecido são preservadas em etanol, anotações feitas com canetas ou marcadores podem borrar ou apagar, comprometendo a identificação da amostra.



Nota 2: Amostras sem identificação ou com códigos ilegíveis geralmente perdem sua utilidade e precisam ser descartadas, pois, se torna praticamente impossível determinar sua origem ou o organismo coletado.

Cada amostra deve ser identificada no microtubo com um código numérico ou alfanumérico.

Registre os metadados em um caderno ou arquivo digital, incluindo:

Data e local da coleta (cidade, estado e ponto de coleta, como mercado, rio, lago etc.);

Coordenadas geográficas (quando disponíveis);

Para **amostras de tecido**: origem da amostra (ex.: pesca ou mercado), sexo e tamanho do espécime (cm ou mm), conforme o táxon: comprimento total (tubarões) ou largura do disco (raias);

Para **amostras de eDNA** (água ou sedimento): condições ambientais (ex.: temperatura, profundidade e tipo de substrato), volume de água filtrada ou quantidade de sedimento coletado e profundidade da coleta.



5. EXECUÇÃO DO SEU PROJETO DE IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

5.3 REGISTRO FOTOGRÁFICO



Sempre que possível, fotografe o espécime ou partes dele (ex.: nadadeiras, tronco ou cabeça) para criar um registro visual e auxiliar na identificação da espécie, especialmente em coletas de tecido destinadas a análises laboratoriais.

- **Equipamentos necessários**

Câmera de alta resolução ou smartphone;

Fonte de iluminação auxiliar para ambientes escuros (ex.: lanterna ou flash externo, quando necessário);

Objeto de referência para escala: preferencialmente régua ou fita métrica com bom contraste em relação ao fundo. Na ausência desses itens, podem ser usados objetos de tamanho conhecido, como moeda, tampa de caneta, caneta ou lápis.

- **Etapas para o registro fotográfico**

Dentro do possível, posicione o espécime sobre uma superfície limpa e de cor contrastante (ex.: branca ou preta) e coloque a escala ao lado, garantindo que ela apareça na fotografia;

Exemplo:



Figura 9. Embrião de *Zapteryx brevirostris* em vista dorsal. A tampa de caneta ao lado do espécime serve como referência de tamanho. Crédito da imagem: Beatriz Rochitti Boza.

5. EXECUÇÃO DO SEU PROJETO DE IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

5.3 REGISTRO FOTOGRÁFICO



Padronize os nomes dos arquivos de imagem (ex.: “Código da amostra_Espécie_Local_Coletor_Data”);

Fotografe cada espécime de forma que as imagens possam ser associadas à amostra correspondente, utilizando uma identificação visível ou códigos sequenciais (ex.: PP01a, PP01b);

Fotografe o espécime inteiro em vistas lateral, dorsal e ventral, registrando também características importantes para a identificação, como cabeça e rostro (ex.: boca, olhos, narinas e dentes), região pélvica, nadadeiras e traços distintivos (ex.: espinhos, tubérculos ou entalhe caudal). Para raias, procure registrar as vistas dorsal e ventral, além de detalhes da cabeça e do rostro (ex.: boca, olhos, narinas e espiráculos) e da região pélvica com as nadadeiras.

Exemplo:

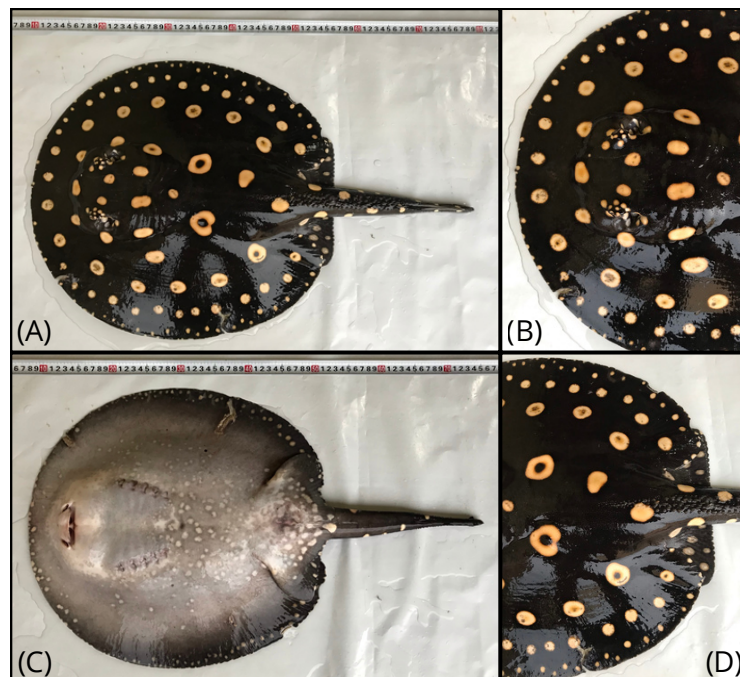


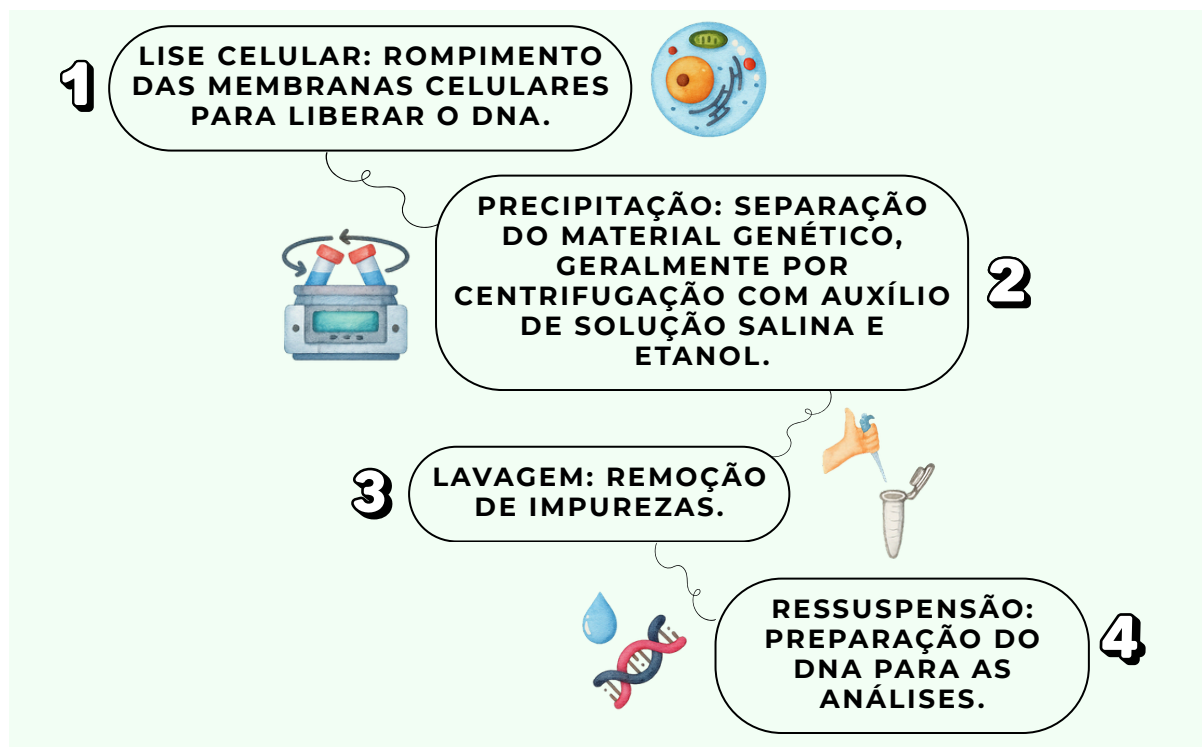
Figura 10. *Potamotrygon leopoldi*: (A) vista geral dorsal, (B) região anterior dorsal, (C) vista geral ventral e (D) região posterior dorsal. A régua presente nas imagens serve como referência de tamanho do espécime. Crédito das imagens: Patricia Charvet.



Lembre-se: Um bom registro fotográfico facilita muito a identificação da espécie ou de suas partes.

5. EXECUÇÃO DO SEU PROJETO DE IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

5.4 COMO ACESSAR O DNA DA AMOSTRA



O uso de kits comerciais pode tornar a purificação do DNA mais eficiente, especialmente em amostras de eDNA. Esses kits geralmente utilizam colunas com membranas que retêm o DNA enquanto impurezas são removidas, aumentando a eficiência e a reprodutibilidade do processo.

Protocolos de extração de DNA preparados no próprio laboratório também podem ser utilizados, reduzindo significativamente os custos. Um exemplo é o protocolo otimizado à base de CTAB para diferentes tipos de tecido descrito por Godinez-Vidal e Groen (2025).

Amostras de eDNA podem conter diversos inibidores, como ácidos húmicos, sedimentos e metais dissolvidos, que comprometem a qualidade do DNA extraído. Por isso, protocolos capazes de remover esses compostos contribuem para maior eficiência nas etapas de amplificação.

Godinez-Vidal, R., & Groen, S. (2025). Optimized CTAB DNA extraction for different tissues (Version 1). Department of Nematology, University of California Riverside. [Protocols.io](https://protocols.io).

5. EXECUÇÃO DO SEU PROJETO DE IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR



Antes de iniciar as análises, verifique se você tem todos os materiais e recursos necessários. Consulte o **checklist** abaixo:

Checklist Rápido

- ☒ **Amostra de DNA** pronta e armazenada adequadamente
- ☒ **Técnica de análise definida** (ex.: PCR, qPCR, ddPCR, LAMP, Multiplex PCR, PCR-RFLP ou Multiplex qPCR)
- ☒ **Reagentes preparados** (ex.: *primers*, sondas, enzimas, tampões e materiais de consumo)
- ☒ **Equipamentos disponíveis** (ex.: termociclador, equipamento de qPCR/ddPCR e sistema de eletroforese, quando necessário)
- ☒ **Controles preparados** (positivo e negativo)
- ☒ **Informações da amostra registradas** (ex.: local, data, método de preservação e espécie)
- ☒ **Tempo e orçamento planejados**
- ☒ **Apoio de laboratório confirmado** (caso o acesso à infraestrutura seja limitado)



Instruções detalhadas sobre cada técnica: consulte a Seção **4.5 – Ferramentas Rápidas de Identificação Baseadas em DNA/eDNA**.

5. EXECUÇÃO DO SEU PROJETO DE IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

5.5 COMO ANALISAR SUA AMOSTRA DE DNA

Após concluir o *checklist* e reunir os materiais necessários, avalie onde as amostras de DNA serão analisadas caso você não tenha acesso aos equipamentos adequados. Uma boa opção é buscar laboratórios especializados ou grupos de pesquisa. Universidades, centros de pesquisa, museus e coleções científicas podem oferecer serviços de identificação molecular ou estabelecer colaborações. Publicações recentes e plataformas como ResearchGate e Google Scholar também podem ajudar a localizar grupos que trabalham com as espécies de interesse. Antes de entrar em contato, reúna as principais informações sobre a amostra e a coleta, como local, data, método, forma de preservação, possível espécie e objetivo da análise (pesquisa, monitoramento, conservação ou fiscalização). Verifique também a disponibilidade dos reagentes necessários, como *primers*, sondas, enzimas e tampões, seja por compra ou colaboração. Como algumas instituições trabalham apenas por meio de parcerias ou cobram pelo serviço, confirme previamente a disponibilidade e os procedimentos.



5. EXECUÇÃO DO SEU PROJETO DE IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

5.6 COMO INTERPRETAR E VALIDAR SEUS RESULTADOS

Após a análise do DNA, o próximo passo é interpretar os resultados, que variam conforme a técnica molecular utilizada. Cada método fornece diferentes evidências sobre a presença, ausência ou quantidade da espécie-alvo.



Consulte novamente a Seção **4.5 – Ferramentas Rápidas de Identificação Baseadas em DNA/eDNA** para orientações sobre a interpretação dos resultados de cada técnica. Isso ajudará a compreender corretamente os dados e aplicá-los em contextos de pesquisa, monitoramento ou conservação.



Após interpretar os resultados, é fundamental validar a identificação para garantir sua confiabilidade. Isso pode incluir a realização de réplicas adicionais ou o sequenciamento de parte das amostras, confirmando a consistência dos resultados obtidos pelos métodos de detecção rápida.

A validação reduz erros e aumenta a confiabilidade das identificações. Ao concluir essas etapas, o fluxo de identificação molecular é finalizado, permitindo confirmar e documentar a presença ou ausência da espécie-alvo, conforme indicado no fluxograma.



6. LEITURA COMPLEMENTAR

A SEGUIR, APRESENTAMOS ALGUMAS SUGESTÕES DE LEITURA PARA APROFUNDAR CONHECIMENTOS SOBRE DIFERENTES GRUPOS TAXONÔMICOS E TÉCNICAS MOLECULARES.

Este e-book foi inspirado principalmente no recente trabalho:

Alvarenga e Bunholi et al. (2025). Rapid DNA/eDNA-Based ID Tools for Improved Chondrichthyan Monitoring and Management. *Molecular Ecology Resources*, e70044. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.70044>

O trabalho apresenta uma **visão abrangente das ferramentas de identificação rápida baseadas em DNA e eDNA**, destacando sua importância para o monitoramento da biodiversidade e a fiscalização do comércio de espécies ameaçadas, especialmente de condrictes. O estudo reúne métodos disponíveis e *primers* específicos para diferentes táxons, além de apontar importantes lacunas de conhecimento e oferecer orientações práticas para a identificação de espécies.

Assim, este artigo constitui um **ponto de partida** para leitores interessados na **aplicação prática de ferramentas moleculares à conservação de elasmobrânquios**. Sua leitura permite compreender os principais métodos, desafios e oportunidades relacionados ao uso de abordagens rápidas baseadas em DNA/eDNA no monitoramento e manejo de tubarões e raias. **Por esse motivo, é a primeira leitura recomendada nesta seção.**



6. LEITURA COMPLEMENTAR

A SEGUIR, APRESENTAMOS ALGUMAS SUGESTÕES DE LEITURA PARA APROFUNDAR CONHECIMENTOS SOBRE DIFERENTES GRUPOS TAXONÔMICOS E TÉCNICAS MOLECULARES.



Peixes Cartilaginosos

Alvarenga et al. (2024). Fifteen years of elasmobranchs trade unveiled by DNA tools: Lessons for enhanced monitoring and conservation actions. *Biological Conservation*, 292, 110543.

<https://doi.org/10.1016/j.biocon.2024.110543>

Prasetyo et al. (2024). SHARKlock holmes: Applications of DNA forensic in tackling illegal trade of sharks and rays in Southeast Asia Region. *BIO Web of Conferences*, 112, 08002. EDP Sciences.

<https://doi.org/10.1051/bioconf/202411208002>

Cardeñosa et al. (2025). Integrating portable qPCR and image recognition to combat illegal trade in sharks and rays. *Scientific Reports*, 15(1), 38629. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-22370-y>



Outras Espécies de Peixes

Damasceno et al. (2016). Molecular identification of Atlantic goliath grouper *Epinephelus itajara* (Lichtenstein, 1822) (Perciformes: Epinephelidae) and related commercial species applying multiplex PCR. *Neotropical Ichthyology*, 14(03), e150128.

<https://doi.org/10.1590/1982-0224-20150128>

Singh et al. (2024). Twenty-three years of PCR-based seafood authentication assay development: What have we learned? *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 23(4), e13401. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.13401>



Camarões

Wilwet et al. (2021). Rapid detection of fraudulence in seven commercial shrimp products by species-specific PCR assays. *Food Control*, 124, 107871. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.107871>

6. LEITURA COMPLEMENTAR

A SEGUIR, APRESENTAMOS ALGUMAS SUGESTÕES DE LEITURA PARA APROFUNDAR CONHECIMENTOS SOBRE DIFERENTES GRUPOS TAXONÔMICOS E TÉCNICAS MOLECULARES.



Equinos

Wang et al. (2021). A fast PCR test for the simultaneous identification of species and gender in horses, donkeys, mules and hinnies. *Journal of Equine Veterinary Science*, 102, 103458. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2021.103458>



Suínos

Erwanto et al. (2018). Identification of pig DNA in food products using polymerase chain reaction (PCR) for halal authentication-a review. *International Food Research Journal*, 25(4). (nenhum DOI fornecido)



Crocódilos

Meganathan et al. (2011). Validation of a multiplex PCR assay for the forensic identification of Indian crocodiles. *Journal of Forensic Sciences*, 56(5), 1241-1244. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2011.01812.x>



Felinos

Henger et al. (2023). A new multiplex qPCR assay to detect and differentiate big cat species in the illegal wildlife trade. *Scientific Reports*, 13(1), 9796. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-36776-z>



Técnicas

Shivji et al. (2002). Genetic identification of pelagic shark body parts for conservation and trade monitoring. *Conservation Biology*, 16(4), 1036-1047. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.2002.01188.x>

6. LEITURA COMPLEMENTAR

A SEGUIR, APRESENTAMOS ALGUMAS SUGESTÕES DE LEITURA PARA APROFUNDAR CONHECIMENTOS SOBRE DIFERENTES GRUPOS TAXONÔMICOS E TÉCNICAS MOLECULARES.



Técnicas

Tasrip et al. (2019). Loop mediated isothermal amplification; a review on its application and strategy in animal species authentication of meat based food products. *International Food Research Journal*, 26(1). (nenhum DOI fornecido)

Chaudhary & Kumar (2022). Recent advances in multiplex molecular techniques for meat species identification. *Journal of Food Composition and Analysis*, 110, 104581.

<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2022.104581>

Azad et al. (2023). Authentication of meat and meat products using molecular assays: A review. *Journal of Agriculture and Food Research*, 12, 100586. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2023.100586>

Jenrette et al. (2023). Detecting Mediterranean white sharks with environmental DNA. *Oceanography*, 36(1), 87-89.

<https://doi.org/10.5670/oceanog.2023.s1.28>

Sodré et al. (2024). Molecular identification of sharks from the genus *Sphyrna* (Elasmobranchii: Chondrichthyes) in Maranhão Coast (Brazil). *Brazilian Journal of Biology*, 84, e274862.

<https://doi.org/10.1590/1519-6984.274862>

Tiktak et al. (2024). Genetic identification of three CITES-listed sharks using a paper-based Lab-on-a-Chip (LOC). *PLOS ONE*, 19(4), e0300383. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0300383>

AGRADECIMENTOS

Expressamos nossa sincera gratidão a **Rafael Almeida da Silveira** (IBAMA) por suas valiosas sugestões e revisão da primeira versão deste e-book. Agradecemos também a todos que, direta ou indiretamente, apoiaram o desenvolvimento deste e-book, incluindo colegas e colaboradores que contribuíram com pesquisas, obtenção de amostras e recursos para pesquisa com Chondrichthyes. Nosso agradecimento especial a **Megan Do** pelo trabalho de tradução da versão em inglês e pela cuidadosa revisão do conteúdo, e a **Erika Beux** por gentilmente ceder a fotografia utilizada na capa deste e-book. Agradecemos ainda a **Maria Carolina Andrade Cruz e Santos** (UNESP Botucatu) pela elaboração da ficha catalográfica. Por fim, reconhecemos a contribuição de inúmeros pesquisadores, comunidades pesqueiras e entusiastas de tubarões e raias, cujos esforços, conhecimentos e dedicação contribuem para a conservação e a compreensão dessas espécies tão singulares.



TEXAS
The University of Texas at Austin

