

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU - IBB

MESTRADO

***DNA Barcode* na identificação de Peixes de Bico explorados
comercialmente: uma abordagem forense**

Carlos Egberto Rodrigues Junior

Botucatu - SP

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Carlos Egberto Rodrigues Junior

***DNA Barcode na identificação de Peixes de Bico explorados
comercialmente: uma abordagem Forense***

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, *Campus* Botucatu, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas – Área de concentração: Zoologia.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Porto-Foresti

Botucatu – SP

2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Rodrigues Junior, Carlos Egberto.

DNA Barcode na identificação de Peixes de bico explorados comercialmente : uma abordagem forense / Carlos Egberto Rodrigues Junior. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Fábio Porto Foresti
Capes: 20406010

1. Peixe - Genética. 2. DNA. 3. Tubarão. 4. Zoologia - Pesquisa. 5. Espécies em perigo de extinção. 6. Predação (Biologia).

Palavras-chave: Billfish; DNA Barcode; Espadarte; Marlim branco; Peixes de bico.



Laboratório de
Genética de Peixes
Unesp Bauru



Dedico este trabalho a minha família, pelo amor a mim dispensado.

“A persistência é o menor caminho do êxito”.

Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

Primeiramente aos meus pais, Carlos Egberto Rodrigues e Libete Ribeiro Rodrigues, por sempre acreditarem em mim. Obrigado por acreditarem em mim!

A minha esposa Miriam Wowk dos Santos Silva pela paciência e carinho durante todos estes anos de convívio.

Ao meu filho Francisco Wowk Rodrigues por todos os dias me ensinar algo de especial.

A minha irmã Claudia Ribeiro Rodrigues pela amizade e ajuda durante minha vida.

Ao meu orientador e amigo, Prof. Dr. Fábio Porto Foresti, agradeço a oportunidade e aos mais de 20 anos de cumplicidade.

Ao Prof. Dr. Fausto Foresti pelo conhecimento compartilhado e pelo exemplo como pesquisador.

A amiga Juliana Foresti pela hospedagem durante o curso de pós-graduação.

Aos colegas de laboratório, Diego Galetti, Sandro Daniel, Willian Correa, Caio Felipe, Aline Valentim, Caio Goes, Carol Albano, Raul Oliveira, Cahique Daneluz, Bruna Mendonça, Manolo Penitente, Andrea Mourão, Fenanda Dotti e Maíce Ramos pelos ensinamentos e ajuda na biologia molecular e genética.

Aos professores da banca de qualificação, Prof. Dra. Fernanda Dotti do Prado e Prof. Dr. Wellington Adriano Moreira Peres pelas correções e sugestões.

Ao amigo Fernando Costa Marques pelo incentivo durante a concessão da licença de capacitação.

Aos colegas do Ibama, Carlos Yamashita, Rodrigo Cassola, Felipe Seino, Reginaldo Viana, Daniel Visciano, Felipe Cometti, Katia dos Santos, Lucas

Cardoso e Marcos Hiroshi pelo auxílio nas coletas de material biológico, e Livia Martins e Jair Schmitt pelo incentivo.

À Pós-graduação do Instituto de Biociências da Unesp/Botucatu, por possibilitar o desenvolvimento da minha dissertação e ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis pela concessão da licença de capacitação.

Aos amigos, Alexandre Martineli, Rogério Caetano (Cebola), Fabiano Taddei, Andres Calonge, Gassen Gibran, Rodrigo Hebeller e Rodrigo Braz, pela amizade e confiança.

Ao corpo docente da Pós-graduação do Instituto de Biociências da Unesp de Botucatu, por compartilhar seus conhecimentos e ensinamentos.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Peixes de bico -----	11
1.2 Comércio de peixes de bico no Estado de São Paulo -----	15
1.3 Uso de marcadores moleculares na identificação de pescado -----	16
1.4 Uso de marcadores moleculares na ciência forense -----	18

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral -----	22
2.2 Objetivos específicos -----	22

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta das amostras -----	24
3.1.1 Coleta no comércio atacadista -----	24
3.1.2 Coleta na exportação -----	25
3.2 Metodologia	
3.2.1 Extração do DNA -----	29
3.2.2 Amplificação e sequenciamento do gene mitocondrial COI -----	29
3.2.3 Purificação das amostras amplificadas -----	30
3.2.4 Reação de sequenciamento -----	30
3.2.5 Preparação das amostras amplificadas por precipitação em EDTA/acetato de sódio/etanol -----	31
3.2.6 Sequenciamento de DNA -----	32
3.2.7 DNA Barcode na identificação das espécies -----	33

4 RESULTADOS

Capítulo 1- Considerações sobre o comércio de peixes de bico no estado de São Paulo. -----	36
Capítulo 2- Marcadores genéticos como ferramenta na identificação do comércio ilegal de peixes de bico no mercado atacadista em São Paulo Brasil. -----	54
Capítulo 3- DNA Barcode na identificação de peixes de bico na exportação ---	65

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS ----- 77

5.1 Contribuições à conservação e manejo de peixes de bico -----	79
--	----

6 REFERÊNCIAS ----- 83

7 ANEXOS ----- 94

8 APÊNDICES ----- 102

RESUMO

Os peixes de bico são espécies pelágicas oceânicas frequentemente capturadas pela frota atuneira e com grande interesse da pesca esportiva. Este grupo de peixes possui legislação específica que proíbe a comercialização e exportação de duas espécies, *Kajikia albida* e *Makaira nigricans* desse grupo no Brasil. O *DNA Barcode* é um sistema universal de identificação molecular baseado em uma sequência de DNA mitocondrial Citocromo Oxidase subunidade I (COI) de aproximadamente 650 pares de base, servindo como código de barras de DNA de cada espécie. Este sistema tem sido utilizado com êxito para identificar amostras que são comercializadas descaracterizadas e de forma ilegal, como tubarões e outras espécies ameaçadas de extinção. A técnica de *DNA Barcode* foi utilizada para a identificação de peixes de bico comercializados no segundo maior entreposto pesqueiro da América Latina, CEAGESP, SP e no Aeroporto Internacional de Guarulhos, atualmente o maior volume brasileiro de exportações de peixes de bico no País. Foram coletadas 302 amostras de peixes de bico durante vistorias realizadas pelo IBAMA, 223 no aeroporto e 79 no CEAGESP, órgão executor da política nacional do meio ambiente. Após sequenciamento do DNA foi possível à identificação das espécies de 70 amostras (88,60%) coletadas no CEAGESP, sendo 21 (30%) identificadas como *Xiphias gladius*, 43 (61,42%) como *Istiophorus platypterus* e seis (8,57%) como *Kajikia albida*, esta última de comércio proibido no Brasil, e considerada vulnerável pela lista de espécies em perigo da IUCN e pela Lista Nacional Oficial de Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção - Peixes e Invertebrados Aquáticos. No Aeroporto Internacional de Guarulhos foi possível à identificação de 223 amostras (100%), sendo todas identificadas como *Xiphias gladius* conforme declarado pelo exportador e indicado pelo seu NCM (Nomenclatura Comum do Mercosul). A análise molecular demonstrou ser uma importante ferramenta na identificação de peixes de bico comercializados no Brasil em diferentes centros como o Aeroporto Internacional de Guarulhos e CEAGESP, SP. A identificação de agulhões branco sendo ilegalmente comercializados na CEAGESP demonstra a ineficácia das técnicas de fiscalização utilizadas e enfatizam a necessidade melhores políticas públicas para a conservação da espécie.



WWW.ARKIVE.ORG

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Peixes de Bico

Peixes de bicos são espécies oceânicas, epipelágicas, migratórias e habitam águas tropicais, temperadas e sazonalmente frias de todos os oceanos. Representantes deste grupo caracterizam-se por possuir a mandíbula superior prolongada muito além da mandíbula inferior em um longo rostro plano em espadartes ou arredondado como uma lança em agulhões (Nakamura 1983; Nakamura, 1985).

De acordo com Nakamura 1985 este grupo de peixes é composto por duas famílias Xiphiidae e Istiophoridae, compreendendo 12 espécies divididas em quatro gêneros, *Makaira*, *Tetrapturus*, *Istiophorus* e *Xiphias*. No entanto, recentemente uma nova reorganização no grupo foi proposta utilizando técnicas de biologia molecular, sugerindo a existência de mais dois gêneros, *Istiompax* e *Kajikia*, e diminuindo o número de espécies para dez (Collete *et al.*, 2006). Existem evidências que Xiphiidae e Istiophoridae são grupos irmãos (Nelson, 2006).

Os peixes de bico são capturados durante a pesca de espécies de maior valor como o atum (De Sylva *et al.*, 2000). O *By-catch*, pesca acidental, destas espécies geralmente reduzem a sua abundância mais que observado em espécies alvos (kitchell, 2006). Além da captura pela frota atuneira, os peixes de bico também são muito apreciados na pesca esportiva (Arfelli *et al.*, 1994, Ditton *et al.*, 2003, Nelson, 2006).

No Atlântico Sul podemos citar a ocorrência e distribuição de seis espécies de peixes de bico, o agulhão-negro (*Makaira nigricans*), agulhão-vela (*Istiophorus platypterus*), agulhão-branco (*Kajikia albida*), agulhão-estilete (*Tetrapturus pfluegeri*) e marlim-polegar (*Tetrapturus georgii*), pertencentes à família Istiophoridae e o espadarte (*Xiphias gladius*), representante da família Xiphiidae (Amorim *et al.*, 2011). No Brasil os representantes deste grupo são conhecidos por diferentes nomes comuns (tabela 1).

Tabela 1- Nomes comuns dos peixes de bico encontrados no Brasil.

Nome científico	Nome vulgar	Bibliografia	Status IUCN (2016)
<i>Istiophorus platypterus</i> (Shaw, 1792)	Agulhão-bandeira, Agulhão de vela.	Arocha & Ortiz, 2006 ^a	Menor preocupação
<i>Kajikia albida</i> (Poey, 1860)	Agulhão, branco e branco.	Agulhão e Marlim Hooligan, 2013 ^a	Vunerável
<i>Makaira nigricans</i> (Lacepède 1802)	Agulhão preto, Agulhão e Marlim Azul.	Arocha & Ortiz, 2006 ^b	Vunerável
<i>Xiphias gladius</i> (Linnaeus 1758)	Agulhão, Espadarte, Espadarte-meca, Meka, Peixe espada	Abid & Idrissi, 2006	Menor preocupação
<i>Tetrapturus pfluegeri</i> (Robins & de Sylva, 1963)	Agulhão estilete, Marlim bicudo e Agulhão verde.	SEAP, 2005; Hooligan, 2013 ^b	Menor preocupação
<i>Tetrapturus georgii</i> (Lowe, 1841)	Marlim polegar	Amorim <i>et al.</i> , 2011	Desconhecido

Preocupado com a proteção dos peixes de bico, em 2005, o governo brasileiro por intermédio da então Secretaria Especial de Pesca – SEAP publicou a Instrução Normativa SEAP nº 12/05, regulamentando a captura e o comércio de quatro espécies de agulhões em águas jurisdicionais brasileiras e alto mar. Dentre medidas propostas nesta Instrução Normativa destaca-se a proibição da comercialização e exportação dos agulhões negro e branco,

capturados por embarcações pesqueiras brasileiras e estrangeiras em águas jurisdicionais brasileira e em alto mar. A Instrução Normativa proíbe ainda, a retirada e corte a bordo da primeira nadadeira dorsal e da primeira nadadeira anal dos indivíduos de agulhões branco, negro, verde e vela, além de dar parâmetros para a identificação morfológica destas espécies por meio destas nadadeiras (SEAP, 2005).

Apesar do controle estabelecido em 2005, a mesma instrução normativa permitiu a descaracterização dos peixes de bico após o desembarque em infraestruturas portuárias e em terminais pesqueiros nacionais, públicos ou particulares, ou a bordo, caso o corte e a retirada das nadadeiras seja realizada por técnico brasileiro ou observador de bordo, indicado pela SEAP/PR, o que dificulta a identificação das espécies deste grupo após o desembarque.

No ano de 2009, 34,30 % da captura total da frota atuneira paulista foram de peixes de bico, sendo a grande maioria (93,80 %) de espadartes (*Xiphias gladius*) seguidos por espécies do gênero *Tetrapturus* (*kajikia*) que representaram 4,1% da captura, agulhão-negro (*Makaira nigricans*) com 1,90 % e agulhão-vela (*Istiophorus albicans*) com 0,20 %, demonstrando que a proporção de peixes de bico do gênero *Tetrapturus* capturados em São Paulo não mudou com a publicação da Instrução Normativa SEAP nº 12/05, o que confirma a possibilidade de que todos os peixes de bico capturados vêm sendo comercializados, mesmo aquelas espécies proibidas. Outro ponto a ser ressaltado é que posteriormente a publicação da legislação os agulhões começaram a ser comercializados sem cabeça, dificultando assim a identificação da espécie comercializada (Piva-Silva *et al.*, 2014).

O alto valor comercial e intervalo de gerações longos estão relacionados com o declínio das populações, por este motivo populações de agulhões negro e branco estão em declínio (Collete *et al.*, 2011), sendo consideradas espécies vulneráveis na lista da União Internacional para a Conservação da Natureza – IUCN (IUCN, 2016). Além de constarem na lista de espécies vulneráveis da IUCN, os agulhões brancos e negros encontram-se na Lista Nacional Oficial de Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção - Peixes e Invertebrados Aquáticos publicada pelo Ministério do Meio Ambiente nas categorias vulnerável e em perigo, respectivamente (MMA, 2014).

O agulhão negro, *Makaira nigricans*, é uma espécie oceânica epipelágica conhecido também como marlim azul. Assim como outros peixes de bico são animais solitários, e são distribuídos nas águas tropicais e subtropicais do Oceano Atlântico em temperaturas de 22°C a 31°C. (Nakamura, 1985; Arocha & Ortiz, 2006). Estima-se um declínio de 31% na abundância do estoque global de agulhões negros ao longo de 14 anos (IUCN, 2016).

Já o agulhão branco, também é uma espécie oceânica epipelágica, encontrada entre temperaturas de 21°C a 28°C, possui comportamento solitário, mas existem relatos de formação de cardumes, pequenos grupos, na literatura. Estes peixes de bico habitam águas subtropicais e tropicais do Oceano Atlântico, ocasionalmente em águas temperadas e no mar Mediterrâneo. (Nakamura, 1985; Hooligan, 2013). Para esta espécie constatou-se um declínio contínuo na abundância desde o início de sua exploração. Estima-se ainda, um declínio de 9% na abundância de estoque ao longo de 13 anos (IUCN, 2016).

1.2 Comércio de Peixes de bico no Estado de São Paulo

No ano de 2011 a produção de pescado no Brasil foi de 1.431.974,4 toneladas, sendo 38,7% referente à pesca extrativista marinha. Deste montante, 3.408 toneladas de pescado foram de peixes de bico, 3,40% de agulhões, 1,75% de agulhão branco, 1,86% de agulhão negro, 4,02% de agulhão vela e a 88,97% de espadarte (MPA, 2011).

Neste contexto o sudeste brasileiro contribuiu com 15% (226.233,20 toneladas) da pesca extrativista marinha brasileira, sendo o estado de São Paulo responsável por 21.563 toneladas (1,5%) desta categoria de pesca (MPA, 2011). Com relação aos peixes de bico dados do Instituto de Pesca relatam a captura de 10,50 toneladas para mesmo ano (PROPESQ, 2016).

Grande parte do comércio atacadista de pescado no estado de São Paulo é realizada pela Companhia de Entrepostos e Armazéns Gerais de São Paulo – CEAGESP. O entreposto de pescado da CEAGESP é o segundo maior da América Latina e comercializa diariamente 200 toneladas de pescado de 97 espécies diferentes, dentre elas os agulhões (Istiophoridae) e espadartes (Xiphiidae) (CEAGESP, 2016).

Assim como no comércio atacadista da CEAGESP, os peixes de bico têm um importante papel no comércio exterior. Somente nos últimos seis anos foram exportadas mais de 6.300 toneladas, sendo sua grande maioria de espadartes, destinadas a países da Europa, América do Norte, América do Sul e Japão (ALICEWEB, 2016). A última exportação de agulhões foi realizada no ano 2011 com um volume de 2,44 toneladas com destino ao Japão.

1.3 Uso de marcadores moleculares na identificação de pescado

Nos últimos anos, a identificação por meio de marcadores moleculares pode ser realizada com mínimas amostras de tecido que independem do estado de modificação que o pescado possa apresentar. Diferentes regiões do genoma, tanto mitocondrial como nuclear, têm sido utilizadas para a identificação de espécies de organismos aquáticos de interesse econômico (Kyle & Wilson, 2007; Sevilla *et al.*, 2007), sendo amplamente utilizadas as técnicas de PCR-RFLP, PCR-multiplex e análise de sequências.

Um dos genes mais comumente utilizados na identificação é o Citocromo Oxidase subunidade I (COI), que consiste de uma sequência de aproximadamente 650 pares de base, catalogados por um sistema universal de identificação, denominado *DNA Barcode* (Hebert *et al.*, 2003^a, Hebert *et al.*, 2003^b), sendo utilizada com sucesso na identificação de diversos grupos de peixes (Ward *et al.*, 2005; Lakra *et al.*, 2011), aves (Hebert *et al.*, 2004; Tavares *et al.*, 2011; Johnsen *et al.*, 2010) e insetos (Virgilio *et al.*, 2012; Webb *et al.*, 2012). Estes métodos de identificação são viáveis e seu desenvolvimento poderá proteger as espécies superexploradas (Teletchea *et al.*, 2005).

O *DNA Barcode* é um sistema de identificação microgenômica, que permitem a identificação de uma espécie através da análise de um pequeno segmento do genoma. De forma geral estas sequências podem ser comparadas a um “código de barras” genético incorporado a cada célula (Hebert *et al.*, 2003^a).

Os códigos de barras utilizados no comércio de produtos utilizam 10 numerais alternativos em onze posições podendo gerar 100 bilhões de identificadores únicos. O código de barras genômicos possui apenas quatro nucleotídeos alternados em cada posição, mas a série de sitios disponíveis para a inspeção é enorme. O levantamento de apenas 15 dessas posições de nucleotídeos cria a possibilidade aproximadamente um bilhão de códigos, 100 vezes o número necessário para discriminar taxon existente de forma exclusiva (Hebert *et al.*, 2003^a).

São vários trabalhos realizados utilizando com sucesso o *DNA Barcode* como ferramenta na identificação de peixes. No Canadá aproximadamente 200 espécies de peixes de água doce foram identificadas com sucesso utilizando a técnica (Hubert *et al.*, 2008). Em outro estudo, mais de 200 espécies de peixes marinhos de três grupos, tubarões e arraias, peixes leão e atuns, foram identificados na Austrália (Ward *et al.*, 2005). Na China a técnica foi utilizada na identificação de 121 espécies que compreendendo a maioria dos peixes existentes no mar do Sul da China (Zhang J., 2011). Na América do Sul o *DNA Barcode* foi utilizado na identificação de 125 espécies de peixes argentinos solucionando possíveis incertezas taxonômicas (Mabragaña *et al.*, 2011).

A implementação das técnicas de biologia molecular, em especial a técnica de *DNA Barcode* na ciência forense marinha já foi utilizada para identificar peixes de bico, onde ao menos cinco das dez espécies testadas (*Istiophorus indica*, *Istiophorus platypterus*, *Makaira nigricans*, *Tetrapturus georgii* e *Xiphias gladius*) foram facilmente diferenciadas pela técnica. De acordo com o estudo as outras cinco espécies se dividem em dois complexos moleculares que dificultam a sua identificação pela técnica (Hanner *et al.*, 2011).

Recentemente a mesma técnica foi utilizada com sucesso na identificação de larvas e ovos de peixes de bico das espécies *I. platypterus*, *K. albida* e *X. gladius*, da costa sudeste brasileira (Rodrigues, 2014).

1.4 Uso de marcadores moleculares na ciência forense

Nos últimos anos os especialistas têm observado o aumento da ligação dos crimes ambientais com o crime organizado. O tráfico ilegal de animais ou plantas oferecem recursos financeiros comparados aos obtidos com o narcotráfico com um risco muito menor (Ogden *et al*, 2009). Técnicas de biologia molecular vêm sendo utilizadas na genética forense, não só na identificação de individual da espécie, mas também na identificação de sua origem geográfica (Ogden *et al*, 2009, Alacs *et al.*, 2010).

A utilização de marcadores moleculares na identificação de espécies na genética forense vem sendo utilizada como ferramenta na investigação de crimes ambientais em todo o mundo. No Centro Oeste brasileiro o gene Citocromo B foi utilizada na identificação das espécies, *Hydrochoerus hydrochaeris*, *Ortalis canicollis* e *Ozotoceros bezoarticus*, de caça apreendida pelo IBAMA (Sanchez *et al.*, 2012). Na Austrália, 99 ovos de psitacídeos apreendidos pelas autoridades foram analisados utilizando os marcadores moleculares Citocromo B e 12 s, em 91% das amostras o DNA foi extraído com sucesso, 52% foi possível a identificação da espécie. Duas das espécies identificadas encontravam-se na lista de vermelha da IUCN, sendo, *Cacatua sulphurea*, como criticamente ameaçada e *Cacatua alba*, como vulnerável. Todas as espécies estão listadas nos anexos da CITES Convenção sobre o

Comércio Internacional de Espécies da Flora e Fauna Selvagens em Perigo de Extinção (Coghlan *et al.*, 2011).

Neste sentido o *DNA Barcode*, já foi tecnicamente validado (Dawnay *et al.*, 2007), em uma investigação na Austrália a técnica identificou precisamente em nível de espécie, 91,5% do material apreendido pelas autoridades australianas de barbatanas de tubarões e arraias secas, onde nessa apreensão foi observado que 3,6% das amostras pertenciam à espécie *Anoxypristis cuspidata*, considerada criticamente ameaçada pela IUCN (Holmes *et al.*, 2009). Em outro caso a utilização da técnica possibilitou a identificação de espécies de comércio proibido, raia manta e enguias, nas Filipinas (Asis *et al.*, 2016). No Brasil, a Polícia Federal realizou a apreensão de 20kg de barbatanas de tubarão sem nenhuma documentação e utilizou com sucesso o *DNA Barcode* na identificação das espécies, no Aeroporto Internacional de Guarulhos (Carvalho *et al.*, 2013).

Ainda neste contexto, a rotulagem ilegal de peixes e frutos do mar vem sendo prejudicial para o consumidor e para indústria. Neste sentido, técnicas de identificação molecular destes produtos podem prevenir fraudes econômicas e prejuízos a saúde (Rasmussen *et al.*, 2008). O conhecimento da espécie é fundamental no controle da qualidade de comida processada ou na detecção e identificação de material animal em amostras de comida (Hamadan *et al.*, 2012).

A dificuldade na identificação de peixes descaracterizado morfológicamente após o beneficiamento levou a utilização ampla do *DNA Barcode*, peixes filetados de mercados no Egito (Galal-Khallaf *et al.*, 2014), peixes defumados (Smith *et al.*, 2008) e peixes, crustáceos e moluscos em

mercados na Itália (Nicolé *et al.*, 2012) já tiveram suas espécies identificadas utilizando a técnica. Nas Filipinas o comércio trocado de espécies foi identificado no comércio pelo *DNA Barcode* (Maralit *et al.*, 2013). No Brasil observou-se a rotulagem incorreta de cerca de 80% das amostras analisadas comercializadas como surubim (Carvalho *et al.*, 2011). Mais recentemente, o PROCON coletou trinta amostras de peixes marinhos em pontos de comércio em Florianópolis/SC. Após a identificação por *DNA Barcode* constatou-se a venda trocada de espécies em oito amostras coletadas (Carvalho *et al.*, 2015).



WWW.ARKIVE.ORG

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Tendo em vista o interesse na identificação genética através de marcadores moleculares e considerando a importância comercial de várias espécies de peixes comercializados, esse trabalho objetiva de um modo geral, aplicar marcadores genéticos na identificação forense de espécies exploradas pela pesca, podendo assim auxiliar em informações de interesse para o melhor controle, fornecendo dados de exportação e comercialização por espécies.

2.2 Objetivos específicos

- a)** Identificar através da técnica genética, *DNA Barcode*, amostras de produtos exportados, com NCM específicos de peixes de bico;
- b)** Identificar através da técnica genética, *DNA Barcode*, amostras de peixes de bico comercializados na CEAGESP;
- c)** Gerar dados comparativos entre a análise genética e a Nomenclatura Comum do Mercosul (NCM) das amostras coletadas dos produtos de exportação;
- d)** Propor programas de manejo adequado, exploração sustentável e controle dessas espécies;
- e)** Padronizar o protocolo desenvolvido como ferramenta na fiscalização ambiental.
- f)** Analisar o comércio de peixes de bico no estado de São Paulo



WWW.ARKIVE.ORG

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E METODOS

3.1 Coleta das amostras

Coletas de amostras foram realizadas no comércio atacadista e em um ponto de exportação, totalizando a coleta de 302 amostras de peixes de bico coletadas (tabela 2).

Tabela 2: Amostras coletadas de peixes de bico

Local de coleta	Espécie declarada	Quantidade	Ano	Origem do pescado
CEAGESP	Espadarte	21	2016	Santa Catarina
	Agulhão	58	2015/2016	Rio de Janeiro e Espírito Santo
Aeroporto Internacional de São Paulo.	Espadarte	223	2015	Santa Catarina
	Agulhão	0	-	-

3.1.1 Coleta no comércio atacadista

Para coleta de amostras no comércio atacadista foram realizadas três vistorias nos meses de novembro (2015), janeiro e fevereiro (2016), na Companhia de Entrepostos e Armazéns Gerais de São Paulo – CEAGESP, em São Paulo (Figura 1).

Amostras de nadadeiras ou músculo de peixes de bico foram coletadas e armazenadas em tubo com álcool absoluto para fixação e posterior análise genética. Todas as amostras coletadas foram vinculadas a nota fiscal apresentada pelo responsável pelo comércio. Após a identificação todo o material foi incorporado a coleção do Laboratório de Genética de Peixes (LaGenPe), da UNESP de Bauru.



Figura 1: a) Visão geral do CEAGESP. b) Coleta de amostras. c) Comércio de agulhões. d) Comércio de espadarte e tubarão.

3.1.2 Coleta na exportação

Na exportação foram realizadas coletas de amostras de pescado com a Nomenclatura de Comum do Mercosul (NCM) de peixes de bico, exportados pelo Aeroporto Internacional de São Paulo, Guarulhos, SP, nos meses de agosto, setembro e outubro de 2015, totalizando 19 exportações (Figura 2). As amostras de tecidos coletadas foram fixadas em álcool absoluto visando a posterior análise molecular. Todas as amostras foram vinculadas ao documento de exportação e integradas à coleção do Laboratório de Genética de Peixes (LaGenPe), da UNESP de Bauru.



Figura 2: a) Coleta de amostra no Aeroporto. b) Espadarte beneficiado para exportação. c) Pescado para exportação d) Chegada de pescado no terminal de cargas.

3.2 Metodologia

3.2.1 Extração do DNA

A extração de DNA realizada foi baseada no protocolo do kit comercial “Wizard Genomic DNA Purification Kit – Promega”, com algumas modificações ou por meio do protocolo de extração salina (Aljanabi *et al.*, 1997) também com modificações, de acordo com o tecido utilizado.

Protocolo Kit comercial “Wizard Genomic DNA Purification Kit – Promega”

- a) Pedacos de tecido com aproximadamente 2 mm³ foram distribuídos em tubos de microcentrifuga 1,5 ml devidamente numerados e posteriormente colocados para secagem em estufa por 10 minutos a uma temperatura de 37°C.
- b) Posteriormente foram adicionados aos tubos de microcentrifuga 300 µl de “Cell Lysis Solution”, 300 µl de “Nuclei Lysis Solution” e 4 µl de Proteinase K, sendo colocados em banho maria a 60°C *overnight*.
- c) No outro dia foi adicionado a solução 2,5 µl de RNase, sendo incubado em banho maria por 30 minutos a uma temperatura de 37°C.
- d) Após o tempo estabelecido foi adicionado à solução 200 µl de “protein precipitation solution” e colocado a uma temperatura de -80°C por 5 minutos.
- e) Todo o material foi centrifugado por 4 minutos a 13.000 rpm, sendo retirado todo o sobrenadante e colocados em nova sequência de tubos com 600 µl de isopropanol.
- f) Novamente a solução foi centrifugada por 4 minutos a 13.000 rpm sendo descartado o sobrenadante e adicionado 600 µl de álcool 70%.
- g) Após nova centrifugação por 4 minutos a 13.000 rpm o sobrenadante foi descartado e os tubos com DNA foram colocados em estufa a 37°C por duas horas para secagem.
- h) Por último foi adicionado 35 µl de DNA rehydration solution sendo colocada em banho maria por 1 hora a temperatura de 60°C.

Protocolo extração salina de DNA

Solução de Extração

246,5 µl H₂O X n° de amostra

29 µl SDS (10%) X n° de amostra

5,8 µl EDTA (0,5 M) X n° de amostra

8,7 µl TRIS (1M) X n° de amostra

- a) Pequenos fragmentos de tecido, aproximadamente 2 mm³, foram colocados em tubos de microcentrifuga devidamente numerados, e colocados em estufa a 37°C por 10 minutos.
- b) Posteriormente foram adicionados 290 µl de *Solução de Extração* (tampão) e 5 µl de proteinase K em cada tubo de microcentrifuga com amostra, sendo colocados em banho maria a 55 °C por 3 horas.
- c) Após as amostras voltarem a temperatura ambiente foram adicionados 100 µl de NaCl 5M nos tubos de microcentrifuga, sendo centrifugados por 10 minutos a 10.000 rpm.
- d) Em seguida os sobrenadantes dos tubos foram transferidos para uma segunda série de tubo de microcentrifuga contendo 600 µl de etanol 100% gelado.
- e) Todos os tubos foram levados ao freezer a -80°C por 40 minutos e posteriormente centrifugados por 40 minutos a 12.000 rpm.
- f) Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e os tubos foram colocados para secar em estufa a uma temperatura de 37°C por cerca de 30 minutos, sendo adicionado 50 µl H₂O miliQ2 após secagem.

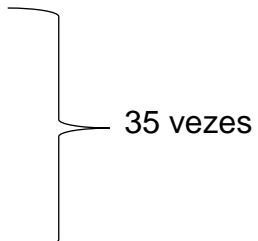
g) Todo o material foi mantido refrigerado até o uso.

As amostras de DNA foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose 1% corado com corado com Nancy-520 DNA (2,5µl/ ml), e visualizadas em transiluminador, sob luz ultravioleta para verificação de sua integridade e a quantidade. Para quantificação do DNA foi utilizado comparações diretas com um marcador padrão de peso molecular e concentração conhecidos (Low DNA Mass Ladder - Invitrogen).

3.2.2 Amplificação do gene mitocondrial

Após a extração de DNA, foi realizada a amplificação dos genes COI-Fish1 e COI-Fish2, para tanto foi utilizada a seguinte concentração de reagentes: 1xPCR buffer (20mM Tris-HCl, pH 8.4 e 50mM KCl), 1.5mM MgCl₂, 150µM de cada dNTP, 0.4mM dos primers COI-Fish1 F (5'-ACGCCTGTTTATCAAAAACAT-3') e R (5' CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3'); COIFish2 F (5'-TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC-3') R (5'-ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA-3'), descritos por Ward et al. (2005), e 10 a 30 ng/µ de DNA.

Para a reação de PCR (Polymerase Chain Reaction) adotou-se o seguinte programa:

- a) 95 °C por 5 minutos (desnaturação inicial)
 - b) 95 °C por 30 segundos (desnaturação)
 - c) 57 °C por 30 segundos (anelamento dos primers)
 - d) 72 °C por 45 segundos (extensão da cadeia nucleotídica)
- 

e) 72 °C por 5 minutos (extensão final)

Os produtos de PCR foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com Nancy-520 DNA (2,5µL/ ml), e visualizadas em transluminador, sob luz ultravioleta e fotografadas com a câmera OLYMPUS, C-5060.

3.2.3 Purificação enzima Exo-SAP

As amostras amplificadas pela reação de PCR foram purificadas por meio da enzima *Exo-SAP IT® (USB Corporation)*. Para isto, 5 µl do produto amplificados foram colocados em um microtubo (0,2 ml) e posteriormente adicionado 2,0 µl da solução de purificação (0,13 µl de ExoSap + 1, 87 µl de água ultrapura). As amostras foram colocadas em termociclador por 1 hora a 37°C seguida de 15 minutos à 80°C.

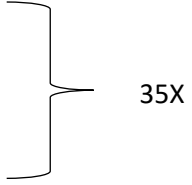
3.2.4 Reação de sequenciamento

Para a reação de sequenciamento foi utilizado o Kit "*Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction*" (Applied Biosystems), nos seguintes volumes:

- a) 1,0 µL do DNA amplificado (concentração de aproximadamente 40ng);
- b) 0,35 µL de primer Fish 1 ou Fish 2 (*Forward* ou *Reverse*, 10 uM);
- c) 0,7 µL de BigDye;

- d) 1,05 μL de Tampão 5X para sequenciamento;
- e) 3,9 μL de H_2O miliQ2.

Após a mistura dos reagentes com os DNA amplificados o material foi colocado no termociclador conforme programa abaixo:

- a) 96°C por 2 minutos (desnaturação inicial)
 - b) 96°C por 30 segundos (desnaturação)
 - c) 50°C por 15 segundos (anelamento dos *primers*)
 - d) 60°C por 4 minutos (extensão da cadeia nucleotídica)
 - f) 12°C até a retirada do material do aparelho (extensão final)
- 
- A right-facing curly bracket groups items b, c, and d. To the right of the bracket is the label "35X".

3.2.5 Limpeza das amostras amplificadas - EDTA/acetato de sódio/etanol:

Posteriormente a reação de sequenciamento as amostras foram submetidas a uma etapa de limpeza eliminando excessos de reagentes utilizados, seguindo o seguinte protocolo:

- a) Primeiramente adicionou-se 0,7 μL de EDTA (125mM) e 0,7 μL de acetato de sódio (3M) a cada amostra.
- b) Então acrescentou-se 17,5 μL de etanol 100% para posterior incubação por 15 minutos a temperatura ambiente;
- c) Em seguida centrifugou-se por 75 minutos a 3.500 rpm à 25°C, descartando o sobrenadante posteriormente;
- d) Novamente as amostras foram colocadas na centrífuga para um spin invertido por 1 minuto a 1250 rpm

- e) Adicionou-se 24,5 μ L de etanol 70% gelado e centrifugou-se por 18 minutos a 3.500 rpm à 25°C, sendo retirado o sobrenadante posteriormente
- f) Novo spin invertido foi realizado na centrifuga por 2 minutos a 1250 rpm.
- g) Por último as amostras foram colocadas no termociclador por 8 minutos a 96°C com a tampa do termociclador aberta (para a completa evaporação do etanol);
- h) As placas foram guardadas na geladeira envoltas em papel alumínio, até o momento do sequenciamento.

3.2.6 Sequenciamento do DNA

As amostras foram analisadas em sequenciador de DNA automático, sendo parte das amostras no Laboratório de Biologia e Genética de Peixes da UNESP de Botucatu/SP e parte no Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica – CREBIO da UNESP de Jaboticabal/SP.

As amostras encaminhadas ao Laboratório de Biologia e Genética de Peixes foram analisadas com um sequenciador de DNA modelo ABI 3130- *Genetic Analyzer (Applied Biosystems)*, sendo que para cada amostra foi adicionado 15 μ L de formamida Hi-Di (*Applied Biosystems*), seguindo uma etapa de desnaturação a 96°C por dois minutos e resfriamento rápido em gelo por mais dois minutos. Em seguida as amostras foram colocadas no aparelho para a realização da corrida de leitura da sequência.

Já as amostras encaminhadas ao CREBIO foram ressuspendidas em 10 μ L de formamida, sendo desnaturadas por 5 min a 95 °C e submetidas ao sequenciamento no sequenciador automático ABI 3730 XL DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California (CA)) conforme recomendações sugeridas pelo fabricante.

3.2.7 Identificações das espécies

Para a identificação das espécies as sequências *forward* e *reverse* foram alinhadas no programa *Geneious 4.8.5* (Kearse *et al.*, 2012), formando sequências *consensus*, conferindo mais confiabilidade ao sequenciamento. As sequências foram submetidas na base de dados da plataforma do BOLD *The Barcode of Life Data System* - www.boldsystems.org (Ratnasingham & Hebert, 2007).

O BOLD é uma plataforma de bioinformática gratuita que auxilia na aquisição, armazenamento, análise e publicações de registros de *DNA Barcode*. Esta plataforma reúne dados moleculares, morfológicos e de distribuição de espécies, permitindo a comparação da sequência de DNA com as 100 sequências mais similares depositadas, identificando assim a espécie (Ratnasingham & Hebert, 2007).



WWW.ARKIVE.ORG

RESULTADO

4 RESULTADOS

Os resultados e a discussão deste estudo serão apresentados em capítulos na forma de artigos científicos. Assim sendo, foi possível a divisão dos dados em três artigos específicos descritos abaixo:

- **Capítulo 1-** *Considerações sobre o comércio de peixes de bico no estado de São Paulo.*
- **Capítulo 2-** *Marcadores genéticos como ferramenta na identificação do comércio ilegal de peixes de bico no mercado atacadista em São Paulo Brasil.*
- **Capítulo 3-** *DNA Barcode na identificação de peixes de bico na exportação*

Capítulo 1 - Considerações sobre o comércio de peixes de bico no estado de São Paulo.

Resumo

Os peixes de bico são espécies pelágicas oceânicas frequentemente capturadas pela frota atuneira e com grande interesse da pesca esportiva. Este grupo de peixes é composto por duas famílias Xiphiidae e Istiophoridae, compreendendo 12 espécies divididas em seis gêneros, *Makaira*, *Tetrapturus*, *Istiophorus*, *Xiphias*, *Istiompax* e *Kajikia*. Objetivando a proteção deste grupo foi publicada legislação específica que norteia a pesca de peixes de bico e proíbem a comercialização e exportação de duas espécies no Brasil, agulhões negros e brancos. Este trabalho tem o objetivo de diagnosticar o comércio de peixes de bico no estado de São Paulo dando subsídios para futuras ações de pesquisas e fiscalização, para isso realizou-se levantamentos de dados referentes a exportação, mercado atacadista e desembarque de peixe de bico no estado de São Paulo.

1 INTRODUÇÃO

Peixes de bicos são espécies oceânicas, epipelágicas, migratórias e habitam águas tropicais, temperadas e sazonalmente frias de todos os oceanos. Representantes deste grupo caracterizam-se por possuir a mandíbula superior prolongada muito além da mandíbula inferior em um longo rostro plano em espadartes ou arredondado como uma lança em agulhões (Nakamura, 1983; 1985). De acordo com Nakamura (1985), este grupo é composto por duas famílias Xiphiidae e Istiophoridae, compreendendo 12 espécies divididas em quatro gêneros, *Makaira*, *Tetrapturus*, *Istiophorus* e *Xiphias*. No entanto, recentemente uma nova reorganização no grupo foi proposta utilizando técnicas de biologia molecular, sugerindo a existência de mais dois gêneros, *Istiompax* e *Kajikia*, diminuindo o número de espécies que anteriormente era 12 para dez espécies atualmente (Collete *et al.*, 2006).

No Atlântico Sul podemos citar seis espécies de peixes de bico, o agulhão-negro (*Makaira nigricans* Lacepède 1802), agulhão-vela (*Istiophorus platypterus* Shaw, 1792), agulhão-branco (*Kajikia albida* Poey, 1860), agulhão-estilete (*Tetrapturus pfluegeri* Robins & de Sylva, 1963) e marlim-polegar (*Tetrapturus georgii* Lowe, 1841), pertencentes à família Istiophoridae e o espadarte (*Xiphias gladius* Linnaeus 1758), pertencente à família a Xiphiidae (Amorim *et al.*, 2011).

Os peixes de bico são capturados durante a pesca de espécies de maior valor como o atum (De Sylva *et al.*, 2000). A captura acidental destas espécies geralmente reduz a sua abundância mais que observado em espécies alvos (Kitchell, 2006). Além da captura pela frota atuneira, os peixes de bico também

são muito apreciados na pesca esportiva (Arfelli *et al.*, 1994; Ditton *et al.*, 2003; Nelson, 2006).

Preocupado com a proteção dos peixes de bico, em 2005, o governo brasileiro por intermédio da então Secretaria Especial de Pesca – SEAP publicou a Instrução Normativa SEAP nº 12/05, regulamentando a captura e o comércio de quatro espécies de agulhões, *Tetrapturus albidus* (atualmente denominada *Kajikia albida*), *Makaira nigricans*, *Tetrapturus pfluegeri* e *Istiophorus albicans* (atualmente denominada *Istiophorus platypterus*), em águas jurisdicionais brasileiras e alto mar.

Dentre medidas propostas nesta Instrução Normativa destaca-se a proibição da comercialização e exportação das espécies de agulhões negro e brancos, *Makaira nigricans* e *Kajikia albida* (na instrução normativa denominada *Tetrapturus albidus*) respectivamente, capturados por embarcações pesqueiras brasileiras e estrangeiras em águas jurisdicionais brasileira e alto mar, sendo que todos os agulhões brancos e negros capturados com vida, obrigatoriamente, devem ser devolvidos ao mar e os mortos desembarcados e doados às instituições científicas, hospitalares, penais e outras com fins beneficentes.

A instrução normativa proíbe ainda, a retirada e corte a bordo da primeira nadadeira dorsal e da primeira nadadeira anal dos indivíduos de agulhões branco, negro, verde e vela, além de dar parâmetros para a identificação morfológica destas espécies por meio destas nadadeiras (SEAP, 2005).

Apesar do controle estabelecido em 2005, a mesma instrução normativa permitiu a descaracterização dos peixes de bico após o desembarque em

infraestruturas portuárias e em terminais pesqueiros nacionais, públicos ou particulares, ou a bordo, caso o corte e a retirada das nadadeiras seja realizada por técnico brasileiro ou observador de bordo, indicado pela SEAP/PR, o que dificulta a identificação das espécies deste grupo após o desembarque.

O alto valor comercial e a grande expectativa de vida estão relacionados com o declínio das populações e por este motivo populações de agulhões negro e branco estão em declínio (Collete *et al.*, 2011), sendo consideradas espécies vulneráveis na lista da União Internacional para a Conservação da Natureza – IUCN (IUCN, 2016). Além de citadas na lista vermelha das espécies ameaçadas da IUCN, os agulhões brancos e negros encontram-se na Lista Nacional Oficial de Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção - Peixes e Invertebrados Aquáticos, publicada pelo Ministério do Meio Ambiente nas categorias vulnerável e em perigo, respectivamente (MMA, 2014).

No ano de 2009, 34,3% da captura total da frota atuneira paulista foram de peixes de bico, sendo que 93,8% de espadartes (*Xiphias gladius*), seguidos por espécies do gênero *Tetrapturus* que representaram 4,1% da captura, agulhão-negro (*Makaira nigricans*) com 1,9% e agulhão-vela (*Istiophorus albicans*) com 0,2%. A proporção de peixes de bico do gênero *Tetrapturus* capturados em São Paulo não sofreu alterações com a publicação da Instrução Normativa SEAP nº 12/05, o que indica a possibilidade de que todos os agulhões capturados vêm sendo comercializados, mesmo as espécies proibidas, como *Tetrapturus albidus* (*Kajikia albida*). Outro ponto a ser ressaltado é que posteriormente a publicação da legislação os agulhões começaram a ser comercializados morfologicamente descaracterizados, sem

cabeça, dificultando assim a identificação da espécie comercializada (Piva-Silva, *et al.* 2014).

No ano de 2011 a produção de pescado no Brasil foi de 1.431.974,4 toneladas, sendo 38,7 % referente à pesca extrativista marinha. Deste montante, 3.408,7 toneladas de pescado foram de peixes de bico, 3,40% de agulhões, 1,75% de agulhão branco, 1,86% de agulhão negro, 4,02% de agulhão vela e a 88,97% de espadarte (MPA, 2011).

Neste contexto o sudeste brasileiro contribuiu com 15% (226.233,2 toneladas) da pesca extrativista marinha brasileira, sendo o estado de São Paulo responsável por 21.563 toneladas (1,5%) desta categoria de pesca (MPA, 2011). Com relação aos peixes de bico dados do Instituto de Pesca relatam a captura de 10,5 toneladas de peixes de bico para mesmo ano (PROPESQ, 2016).

Grande parte do comércio atacadista de pescado no estado de São Paulo é realizada pela Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo – CEAGESP. O entreposto de pescado da CEAGESP é o segundo maior da América Latina e comercializa diariamente 200 toneladas de pescado de 97 espécies diferentes, dentre elas os agulhões e espadartes (CEAGESP, 2016). Assim como no comércio atacadista da CEAGESP, os peixes de bico têm um importante papel no comércio exterior. Somente nos últimos seis anos foram exportadas mais de 6.300 toneladas de peixes de bico, sendo sua grande maioria de espadartes, destinadas a países da Europa, América do Norte, América do Sul e Japão (ALICEWEB, 2016). Para melhor demonstrar o comércio de peixes de bico no estado de São Paulo organizamos dados disponíveis em bancos de dados disponibilizados por instituições públicas.

Dados sobre a comercialização e origem de peixes de bico no CEAGESP foram disponibilizados pela Seção de Economia e Desenvolvimento – SEDES, CEAGESP. O comércio exterior, o desembarque dos peixes de bico no estado de São Paulo e o permissionamento de embarcações foram analisados com base nos dados obtidos no Sistema de Análise das Informações de Comércio Exterior (<http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br>), Programa de Monitoramento da Atividade Pesqueira Marinha e Estuarina do Instituto de Pesca (<http://www.propesq.pesca.sp.gov.br>) e do Sistema Nacional de Informações da Pesca e Aquicultura – SINPESQ, (<http://sinpesq.mpa.gov.br>). Foram levantadas informações no período de janeiro de 2010 até dezembro de 2015. Para fins deste trabalho considerou-se agulhões todos os exemplares da família Istiophoridae e espadartes os representantes da família Xiphiidae.

Considerando os dados obtidos dividimos esta revisão em quatro tópicos: comércio atacadista, pesca, desembarque e exportação de peixes de bico.

Comércio Atacadista

Durante o período analisado que foi de janeiro de 2010 a dezembro de 2015, contatou-se um volume de 832,46 toneladas de peixes de bico comercializados no CEAGESP, sendo 39,79% de agulhões (Istiophoridae) e 60,11% de espadartes (Xiphiidae). Observou-se no período uma queda de 81,83% no volume de peixe de bico comercializado período de 2012 até 2014 e aumento de 486,95% do mesmo a partir de 2014 (Figura 1).

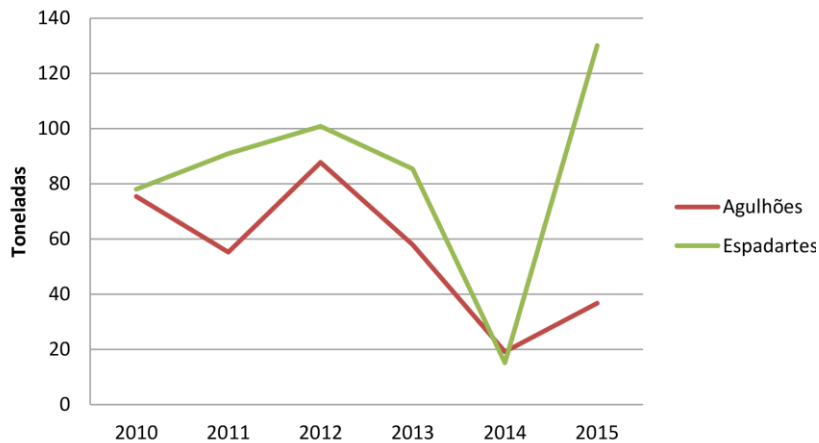


Figura 1: Comércio de Peixes de Bico CEAGESP (2010 até 2015)

Em média foram comercializadas 79,02 toneladas de peixe de bico no CEAGESP por mês no período de estudo, sendo 67,1% de espadartes e 32,9% de agulhões. O período de novembro até fevereiro ocorre o maior fluxo de comércio de agulhões no CEAGESP e no período de abril a outubro o comércio maior é de espadartes (Figura 2).

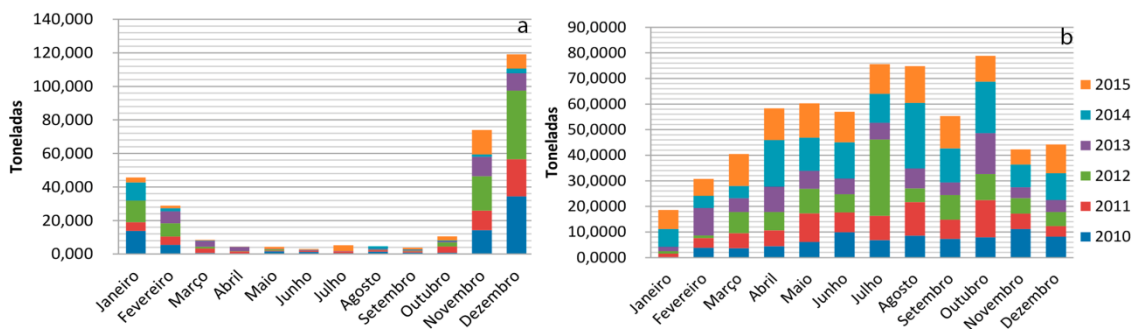


Figura 2: Comércio Mensal de Agulhões (a) e Espadartes (b) no CEAGESP (2010 até 2015)

Dez estados brasileiros abasteceram o comércio atacadista de peixe de bico da CEAGESP no período, o Rio de Janeiro e Espírito Santo são o mais representativos para agulhões com um volume anual médio de 40,32 e 9,11

toneladas respectivamente, e Rio Grande do Sul e Santa Catarina para espadartes com volume anual médio de 33,67e 51,34 toneladas (figura 3).

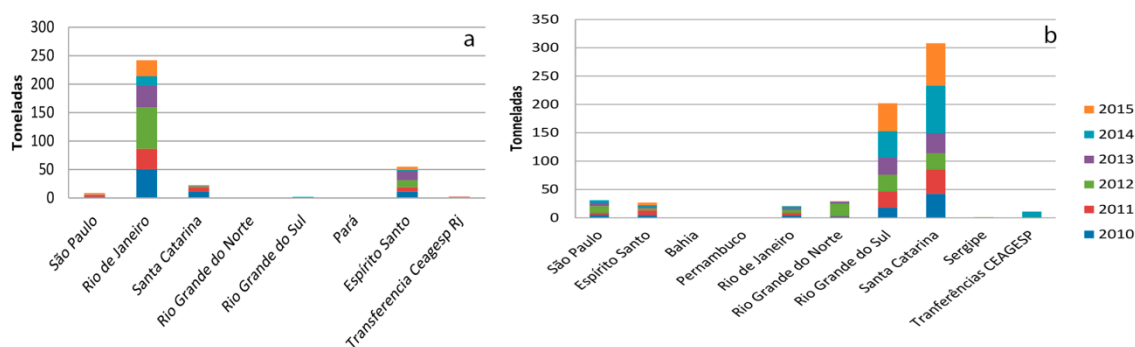


Figura 3: Origem dos Agulhões (a) e Espadartes (b) comercializados no CEAGESP (2010 até 2015).

Pesca de peixes de bico.

No Brasil existem sete modalidades de permissionamentos que autorizam a pesca de peixes de bico, seja como espécie alvo, fauna acompanhante ou como fauna de captura incidental (tabela 1), totalizando 842 embarcações. Os estados do Espírito Santo e Rio de Janeiro correspondem a quase 70 % da frota de pesca com permissionamento para este grupo de peixes, seguidos pelos estados do Rio Grande do Norte e Santa Catarina com 8,79% e 9,26% respectivamente. O único peixe de bico que aparece como espécie alvo é o espadarte. Atualmente existem 142 embarcações cadastradas nesta modalidade, sendo o estado do Espírito Santo com maior número de embarcações (Figura 4).

Tabela 1 – Modalidade de permissionamentos de pesca para peixes de bico

Modalidade de permissionamento	Espécie alvo	Fauna acompanhante	Fauna de captura incidental	Petrecho	Local de pesca
1.01.002	Albacora-bandolim (<i>Thunnus obesus</i>)	Agulhão-vela (<i>Istiophorus albicans</i>), Agulhão-verde		Espinhel Horizontal de Superfície	Litoral brasileiro

	Albacora-branca (<i>Thunnus alalunga</i>) Albacora-laje (<i>Thunnus albacares</i>)	(<i>Tetrapturus pfluegeri</i>) e Espadarte (<i>Xiphias gladius</i>)			
1.01.001	Espadarte (<i>Xiphias gladius</i>)	Agulhão-vela (<i>Istiophorus albicans</i>) e Agulhão-verde (<i>Tetrapturus pfluegeri</i>)		Espinhel Horizontal de Superfície	Litoral brasileiro
1.02.001	Dourado (<i>Coryphaena hippurus</i>)	Agulhão-vela (<i>Istiophorus albicans</i>) e Agulhão-verde (<i>Tetrapturus pfluegeri</i>) Espadarte (<i>Xiphias gladius</i>)	Agulhão-branco (<i>Tetrapturus albidus</i>) Agulhão-negro (<i>Makaira nigricans</i>)	Espinhel Horizontal de Superfície	Litoral Sudeste/Sul
1.01.003	Dourado (<i>Coryphaena hippurus</i>)	Agulhão-vela (<i>Istiophorus albicans</i>) e Agulhão-verde (<i>Tetrapturus pfluegeri</i>) Espadarte (<i>Xiphias gladius</i>)	Agulhão-branco (<i>Tetrapturus albidus</i>) Agulhão-negro (<i>Makaira nigricans</i>)	Espinhel Horizontal de Superfície	Litoral Norte/Nordeste
1.05.001	Bonito-listrado (<i>Katsuwonus pelamis</i>)	Agulhão-vela (<i>Istiophorus albicans</i>) e Agulhão-verde (<i>Tetrapturus pfluegeri</i>)		Linha/Vara/Isca Viva	Litoral Sul/Sudeste
1.07.001	Albacorinha (<i>Thunnus atlanticus</i>) Cavala (<i>Scomberomorus cavalla</i>)	Agulhão-vela (<i>Istiophorus albicans</i>)		Linha de Mão de Superfície e Rede de Espera de Superfície	Litoral Norte/Nordeste
4.01.004	Bonito-listrado (<i>Katsuwonus pelamis</i>)	Agulhão-vela (<i>Istiophorus albicans</i>), Agulhão-verde (<i>Tetrapturus pfluegeri</i>) e Espadarte (<i>Xiphias gladius</i>)		Rede de Cerco	Litoral Sul/Sudeste

O estado de São Paulo possui apenas sete embarcações autorizadas à pesca direta ou indireta de peixe de bico, sendo seis com espadarte como

espécie alvo e agulhão vela e agulhão verde como fauna acompanhante e uma embarcação com albacora-bandolim, albacora-branca, albacora-laje como espécies alvos e espadarte, agulhão vela e agulhão verde como fauna acompanhante. Destaca-se que das sete permissões existentes para embarcações registradas no estado de São Paulo quatro encontram-se sem vigência.

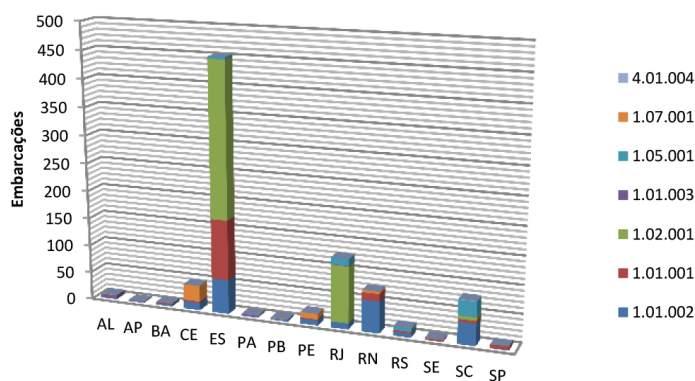


Figura 4: Número de embarcações cadastradas por modalidade de permissionamento, conforme tabela 1.

Desembarque de peixe de bico.

No período analisado foram desembarcadas aproximadamente 414,94 toneladas de peixes de bicos em doze terminais pesqueiros no estado de São Paulo, sendo 95,40% de espadarte e 4,60% de agulhões. Os meses de novembro, dezembro, fevereiro e abril, foram os meses mais representativos para desembarque de agulhões nos terminais pesqueiros do estado. Para espadartes os meses mais representativos foram abril, maio, junho, julho e novembro (figura 5).

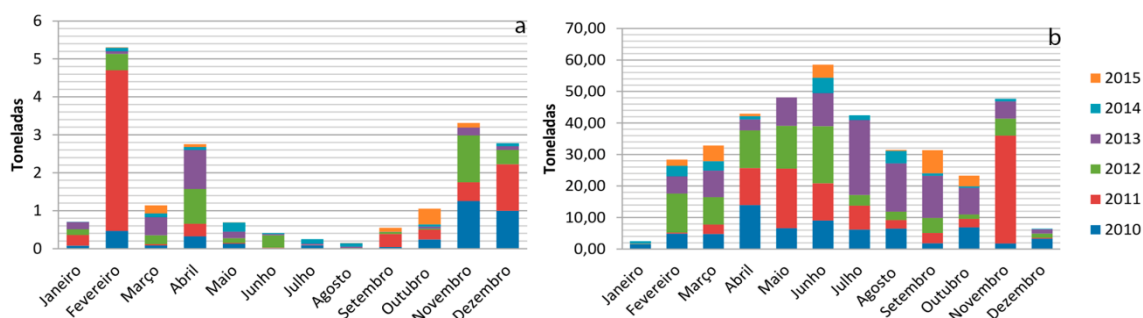


Figura 5: Local de desembarque dos Agulhões (a) e Espadartes (b) comercializados no CEAGESP de 2010 a 2015.

Dentre as regiões onde ocorreu o desembarque de maior quantidade de peixes de bico no litoral do estado de São Paulo, podemos destacar os terminais pesqueiros Santos/Guarujá e Cananéia (Litoral Sul do Estado), e Ubatuba (Litoral Norte do Estado), onde somente o terminal pesqueiro de Santos/Guarujá é responsável por 93,88% dos espadartes e 47,16% dos agulhões desembarcados no estado de São Paulo no período analisado (Figura 6).

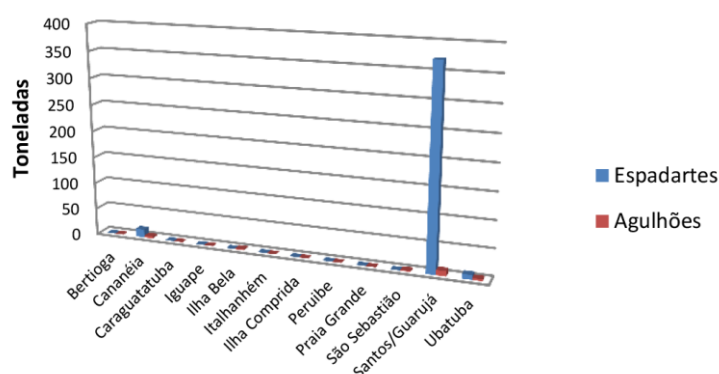


Figura 6: Desembarque de peixes de bico no Estado de São Paulo (2010 até 2015).

Exportação

Dados de exportação mostram que nos últimos seis anos foram exportadas 6.318,66 toneladas de peixes de bico em todo o Brasil. A única exportação de agulhão realizada neste período foi de 2,437 toneladas com destino ao Japão, realizada pelo Porto de Parnamirim/RN, o restante das exportações de peixes de bico foram de espadartes, destinadas a países da América do Norte, Canadá e Estados Unidos, Europa, Reino Unido, França,

Holanda, Espanha, Alemanha e Portugal, América do Sul, Argentina e Uruguai, e Japão.

Ainda no período, o estado de São Paulo se destaca como o segundo maior exportador de peixe de bico do Brasil, sendo responsável pela exportação de 29,74% dos representantes deste grupo (Figura 7).

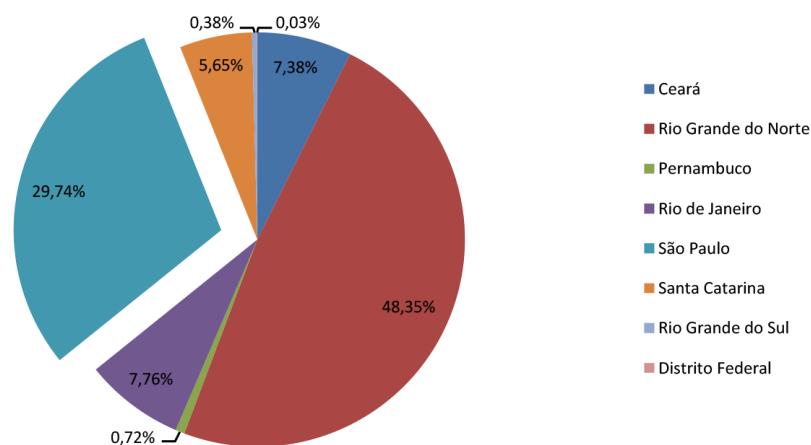


Figura 7: Exportação de peixe de bico no Brasil (2010 até 2015)

Nos anos de 2013, 2014 e 2015, o estado de São Paulo foi o maior exportador de peixes de bico do Brasil, tendo exportado neste período 1.333,16 toneladas de espadartes (Figura 8), sendo 88,86 % destinadas aos Estados Unidos, 10,4% ao Reino Unido, 0,71% à França e 0,04% ao Uruguai.

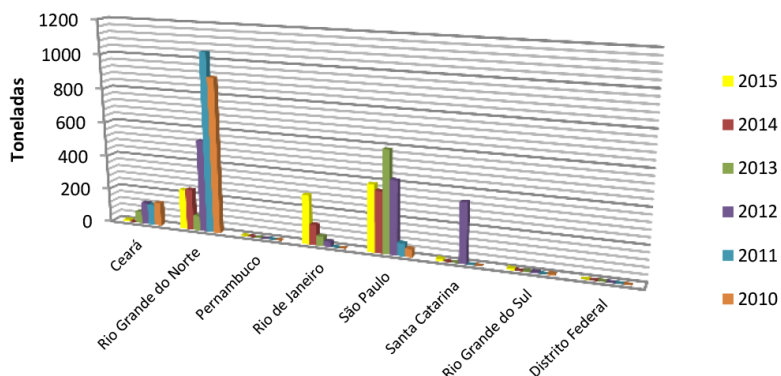


Figura 8: Exportação de peixe de bico no Brasil (2010 até 2015)

No estado de São Paulo o comércio exterior de espadartes acontece em três unidades aduaneiras, Aeroporto Internacional de Viracopos – Campinas/SP, Terminal Portuário de Santos e Aeroporto Internacional de São Paulo-Guarulhos, este último responsável por 97% das exportações no período. As exportações de espadartes realizadas pelo Aeroporto Internacional de São Paulo tiveram uma alta considerável no período compreendido pelos anos 2011 a 2013, seguido por uma queda em 2014. No ano de 2015 notou-se outro expressivo aumento nas exportações dos espadartes (Figura 9).

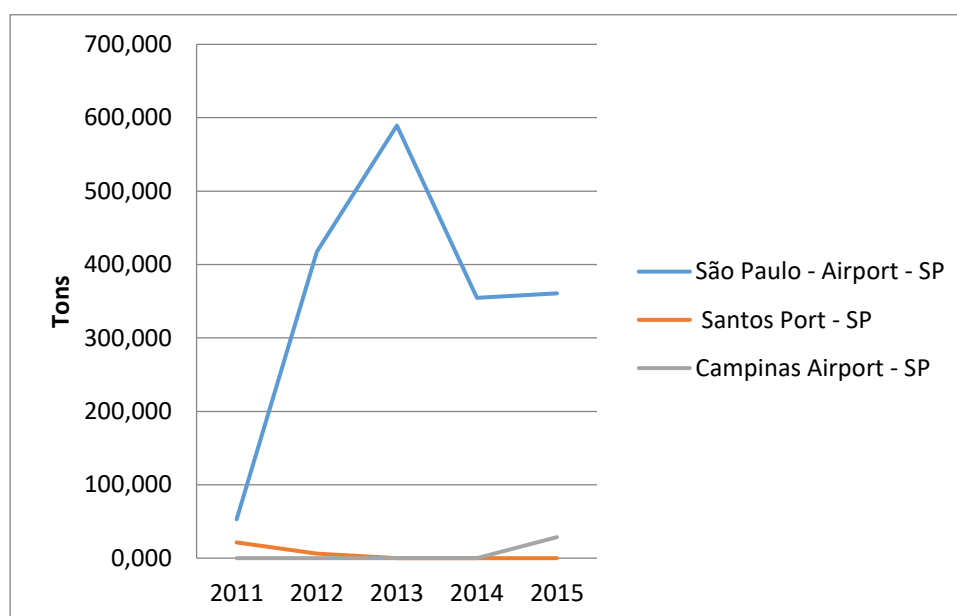


Figura 9: Exportação de peixe de bico no Estado de São Paulo (2010 até 2015)

Os espadartes exportados no estado de São Paulo têm como origem os municípios de Natal/RN, Rio Grande/RS, Itajaí/SC e Santos/SP. No acumulado para o período de 2010 a 2015, Santos/SP aparece como o maior fornecedor de peixes de bico para exportação no estado com um total de 779,187 toneladas de espadartes, seguido por Rio Grande/RS com 435,86 toneladas, Itajaí/SC com 336,91 toneladas e Natal/RN com 326,37 toneladas. No entanto,

observou-se um incremento na exportação de peixes de bico oriundos de Natal/RN e Itajaí/SC no ano de 2015 (Figura 10).

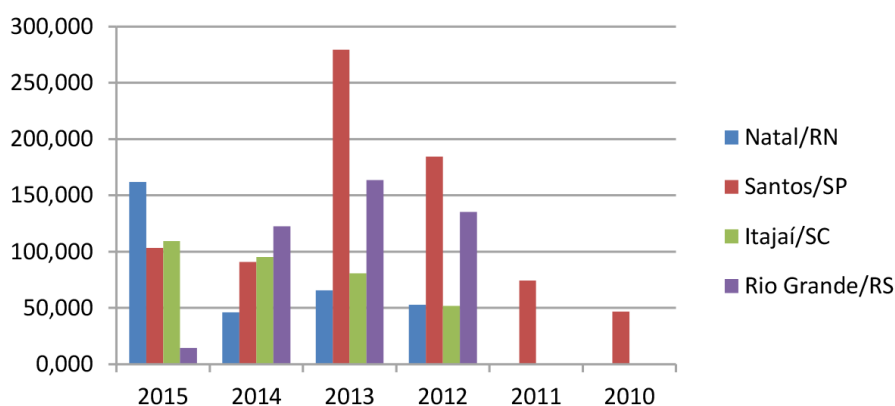


Figura 10: Origem do pescado exportado no Estado de São Paulo (2010 até 2015)

2 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nota-se que o desembarque de peixes de bico no estado de São Paulo pouco contribuiu para o mercado atacadista de peixes de bico realizado no CEAGESP. Tal fato pode ser explicado, segundo o levantamento realizado mais de 90% do desembarque de espadartes no estado ocorre no terminal pesqueiro de Santos/Guarujá e, provavelmente, devem estar sendo destinadas a exportação, uma vez que o município de Santos foi o que mais colaborou com as exportações em São Paulo no período estudado.

Os dados demonstraram que os períodos de maior comércio de agulhões (novembro a fevereiro) e espadarte (abril a outubro) na CEAGESP são semelhantes aos períodos de desembarques no Estado de São Paulo, apesar do desembarque no estado pouco influenciar no comércio do grupo no CEAGESP. Durante uma época do ano os agulhões migram para águas quentes a procura de condições oceanográficas ideais para desova (Nakamura, 1985), isto pode explicar o aumento no comércio e no

desembarque de agulhões o período observado. Considerando o aumento da pesca e do comércio de agulhões no verão brasileiro, quando ocorre o aumento da temperatura das águas, e que estas espécies procuram águas mais quentes para a desova, pode-se concluir que, provavelmente, a pesca destas espécies no Brasil vem provocando impactos negativos na conservação dos agulhões.

Já para os espadartes, a migração ocorre em direção a águas frias ou temperadas para alimentação no verão, voltando para águas quentes no outono para reprodução ou hibernação (Nakamura, 1985), o que pode ser constatado também na análise dos dados no período estudado.

Poucos são os trabalhos que relatam as estatísticas de pesca no Brasil, a última publicação de uma estatística federal refere-se aos dados de 2011 e foi elaborada pela Secretaria Especial de Pesca.

Neste contexto, a queda de mais de 81% no volume de peixes de bico na CEAGESP poderia ser explicada por dados de desembarque nos estados que mais contribuíram para o abastecimento, isto é, Rio de Janeiro e Espírito Santo para agulhões, Rio Grande do Sul e Santa Catarina para espadartes.

No entanto, os estados do Espírito Santo e Rio Grande do Sul não possuem estatísticas de pesca para o período estudado. Já os estados do Rio de Janeiro e Santa Catarina possuem estatísticas em parte do período, 2011 a 2014 e 2010 a 2012, respectivamente, onde observou-se nas estatísticas do estado do Rio de Janeiro uma queda 94,47% no desembarque de agulhões no período de 2011 até 2014 (FIPERJ, 2014; FIPERJ, 2013; FIPERJ, 2012; FIPERJ, 2011), o que explica a diminuição do comércio no CEAGESP, uma

vez que o estado do Rio de Janeiro é o maior fornecedor de agulhões para CEAGESP.

A análise das estatísticas de desembarques de espadartes no estado de Santa Catarina, maior fornecedor da espécie na CEAGESP, indicam uma diminuição de cerca de 10% desembarque de espadartes nos anos de 2011 para 2012, é provável que isso tenha se tornado uma tendência para os próximos anos (UNIVALI/CTTMar, 2013a; UNIVALI/CTTMar, 2013b).

Os estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo possuem maior quantidade de embarcações permissionadas para pesca de peixes de bico, o que justifica alto volume de agulhões comercializados na CEAGESP por estes estados. Apesar de o número de embarcações permissionadas para pesca de peixes de bico ser menor os estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, provavelmente, a pesca nestes estados seria mais industrializada, permitindo uma maior especialização na pesca de espécies de maior valor econômico, como é o caso do espadarte e do atum. Dados do Boletim estatístico da pesca e aquicultura de 2011 demonstram que a região sul seria a segunda maior produtora de pescado extrativista marinho do Brasil, sendo o estado de Santa Catarina o maior produtor do país (MPA, 2011).

Comparando dados sobre a origem dos peixes de bico do estado de São Paulo destinados ao CEAGESP com o desembarque deste grupo também no estado de São Paulo constatou-se algumas diferenças (Tabela 2), notando que em alguns casos a quantidade desembarcada em determinado terminal pesqueiro é menor daquela recebida pela CEAGESP pelo mesmo município.

Tabela 2: Comparação entre as origens de peixe de bico comercializados na CEAGESP e desembarcadas no estado de São Paulo (2010 até 2015)

Ano	Espécie	Município	Quantidade recebida CEAGESP	Quantidade desembarcada
2010	Agulhão	Bertioga	0,10	0,017
2011	Agulhão	Bertioga	1,22	0
2011	Agulhão	Iguape	0,20	0
2013	Agulhão	Santos	0,31	0,162
2015	Agulhão	São Sebastião	2,74	0,176
2010	Espadarte	São Sebastião	0,06	0,012
2014	Espadarte	Cananéia	4	0,357

São várias as possibilidades que justificariam estas diferenças desde o erro na coleta dos dados, pescado não declarado ou mesmo comércio trocado de espécies. Outra possibilidade seria que o comércio de peixes de bico desembarcados em um determinado município por empresas localizadas em outros municípios.

Após a análise dos dados coletados podemos constatar que o comércio de peixes de bico no estado de São Paulo tende a aumentar, principalmente na exportação com os espadartes. A melhor época para estudo ou fiscalização de peixes de bico no estado é de novembro até fevereiro para agulhões e no período de abril a outubro para espadartes.

O trabalho realizado indica a necessidade de melhoria nas políticas públicas para conservação dos peixes de bico nas águas jurisdicionais brasileiras. A legislação existente perde sua efetividade quando permite a descaracterização morfológica dos agulhões após o desembarque, dificultando a identificação de espécies de comércio proibido, que algumas vezes só é possível com a utilização de técnicas de biologia molecular.

A falta de dados estatísticos oficiais atualizados sobre a pesca em outros estados brasileiros dificulta o entendimento da dinâmica da pesca e comércio

de peixes de bico no território nacional, dificultando a elaboração de propostas de políticas públicas para a conservação destas espécies.

A pesca indiscriminada de agulhões no litoral brasileiro, principalmente no verão, aliada ao uso do litoral como área de desova de algumas espécies, sugere a necessidade de estudos sobre os impactos negativos provocados por esta pesca na conservação destas espécies. A proibição da pesca neste período motra-se necessária até que se tenham resultados conclusivos destes estudos, lembrando que os agulhões não são espécie alvos em nenhum permissionamento no Brasil.

Capítulo 2 – Marcadores genéticos como ferramenta na identificação do comércio ilegal de peixes de bico no mercado atacadista em São Paulo Brasil.

Resumo

Os peixes de bico são espécies pelágicas oceânicas frequentemente capturadas pela frota atuneira e com grande interesse da pesca esportiva. Este grupo de peixes possui legislação específica que proíbe a comercialização e exportação de duas espécies desse grupo no Brasil. O *DNA Barcode* é um sistema universal de identificação molecular baseado em uma sequência de DNA mitocondrial Citocromo Oxidase subunidade I (COI) de aproximadamente 650 pares de base, servindo como código de barras de DNA de cada espécie. Este sistema tem sido utilizado com êxito para identificar amostras que são comercializadas descaracterizadas e de forma ilegal, como tubarões e outras espécies ameaçadas de extinção. A técnica de *DNA Barcode* foi utilizada para a identificação de peixes de bico comercializados no segundo maior entreposto pesqueiro da América Latina, CEAGESP, SP. Foram coletadas 79 amostras de peixes de bico durante três vistorias realizadas pelo IBAMA, órgão executor da política nacional do meio ambiente. Após sequenciamento do DNA foi possível à identificação das espécies de 70 amostras (88,60%), sendo 21 (30%) identificadas como *Xiphias gladius*, 43 (61,42%) como *Istiophorus platypterus* e 6 (8,57%) como *Kajikia albida*, esta última de comércio proibido no Brasil, e considerada vulnerável pela lista de espécies em perigo da IUCN e pela Lista Nacional Oficial de Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção - Peixes e Invertebrados Aquáticos. A análise molecular demonstrou ser uma excelente ferramenta na identificação de peixes de bico comercializados irregularmente. A identificação de agulhões branco sendo ilegalmente comercializados na CEAGESP demonstra a ineficácia das técnicas de fiscalização utilizadas e enfatizam a necessidade melhores políticas públicas para a conservação da espécie.

INTRODUÇÃO

Peixes de bicos são espécies oceânicas, epipelágicas, migratórias e habitam águas tropicais, temperadas e sazonalmente frias de todos os oceanos. Representantes deste grupo caracterizam-se por possuir a mandíbula superior prolongada muito além da mandíbula inferior em um longo rostro plano em espadartes ou arredondado como uma lança em agulhões (Nakamura, 1983; Nakamura, 1985). São pertencentes a duas famílias Xiphiidae e Istiophoridae, compreendendo 12 espécies divididas em quatro gêneros, *Makaira*, *Tetrapturus*, *Istiophorus* e *Xiphias* (Nakamura, 1985). Recentemente, utilizando técnicas de biologia molecular, uma nova reorganização no grupo foi sugerida, incluindo dois novos gêneros, *Istiompax* e *Kajikia*, e diminuindo o número de espécies de 12 para dez (Collete *et al.*, 2006).

Os peixes de bico são capturados durante a pesca de espécies de maior valor como o atum (De Sylva *et al.*, 2000). A pesca acidental destas espécies geralmente reduz a sua abundância mais que observado em espécies alvos (Kitchell, 2006). Além da captura pela frota atuneira, os peixes de bico também são muito apreciados na pesca esportiva (Arfelli *et al.*, 1994; Ditton *et al.*, 2003; Nelson, 2006).

No Atlântico Sul podemos citar seis espécies de peixes de bico, o agulhão-negro (*Makaira nigricans* Lacepède 1802), agulhão-vela (*Istiophorus platypterus* Shaw, 1792), agulhão-branco (*Kajikia albida* Poey, 1860), agulhão-estilete (*Tetrapturus pfluegeri* Robins & de Sylva, 1963) e marlim-polegar (*Tetrapturus georgii* Lowe, 1841), pertencentes à família Istiophoridae e o

espadarte (*Xiphias gladius* Linnaeus 1758), pertencente à família a Xiphiidae (Amorim *et al.*, 2011).

Somente no ano de 2009, 34,3% da captura total da frota atuneira paulista foram de peixes de bico, sendo a grande maioria de espadartes (*Xiphias gladius*) totalizando 93,8 %, seguidos por espécies do gênero *Tetrapturus* que representaram 4,1% da captura, agulhão-negro (*Makaira nigricans*) com 1,9% e agulhão-vela (*Istiophorus albicans*) com 0,2%. Os dados estatísticos levantados demonstram que a proporção de peixes de bico do gênero *Tetrapturus* capturados em São Paulo não mudou com a publicação da Instrução Normativa SEAP nº 12/05, o que indicaria a possibilidade de que todos os peixes de bico capturados vêm sendo comercializados, mesmo as espécies de comércio proibido. Posteriormente a publicação da legislação os agulhões começaram a ser comercializados sem cabeça, dificultando assim a identificação da espécie comercializada (Piva-Silva *et al.*, 2014).

Nos últimos anos, a identificação por meio de marcadores moleculares pode ser realizada com pequenas amostras de tecido que independem do estado de modificação morfológica que o pescado possa apresentar. Um dos genes mais comumente utilizados na identificação é o Citocromo Oxidase subunidade I (COI), que consiste de uma sequência de aproximadamente 650 pares de base, catalogados por um sistema universal de identificação, denominado *DNA Barcode* (Hebert *et al.*, 2003^a; Hebert *et al.*, 2003^b), sendo utilizada com sucesso na identificação de diversos grupos de peixes (Lakra *et al.*, 2011), aves (Tavares *et al.*, 2011), insetos (Webb *et al.*, 2012) Estes métodos de identificação são viáveis e seu desenvolvimento poderá proteger as espécies superexploradas (Teletchea *et al.*, 2005).

A implementação das técnicas de biologia molecular, em especial a técnica de *DNA Barcode* na ciência forense marinha já foi utilizada para identificar peixes de bico, onde ao menos cinco das dez espécies existentes já foram testadas (*Istiophorus indica*, *Istiophorus platypterus*, *Makaira nigricans*, *Tetrapturus georgii* e *Xiphias gladius*) e diferenciadas pela técnica (Hanner *et al.*, 2011).

Recentemente a mesma técnica foi utilizada com sucesso na identificação de larvas e ovos de peixes de bico das espécies *Istiophorus platypterus*, *K. albida* e *Xiphias gladius*, da costa sudeste brasileira (Rodrigues, 2014).

Grande parte do comércio atacadista de pescado no estado de São Paulo é realizada pela Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo – CEAGESP. O entreposto de pescado da Companhia é o segundo maior da América Latina e comercializa diariamente 200 toneladas de pescado de 97 espécies diferentes, dentre elas os agulhões e espadarte (CEAGESP, 2016).

Neste contexto a utilização de técnicas de identificação de pescado por meio da biologia molecular em pontos de comércio é de grande importância na constatação do comércio de espécies proibidas, principalmente no principal mercado atacadista do país, onde são comercializados grande quantidade de peixes, em especial os peixes de bico.

2 Materiais e Métodos

2.1 Coleta das amostras

As amostras de peixes de bico, famílias Xiphiidae e Istiophoridae, foram coletadas em três fiscalizações realizadas pelo IBAMA na CEAGESP de São Paulo nos meses de novembro (2015), janeiro e fevereiro (2016).

Todas as amostras, músculo ou nadadeira, foram armazenadas em tubos com álcool 100% e vinculadas ao documento fiscal de origem do pescado. Amostras de tecido coletadas foram integradas à coleção do Laboratório de Genética de Peixes (LaGenPe), da UNESP de Bauru.

2.2 Extração do DNA

Para extração de DNA foi utilizada pequeno pedaço do tecido aproximadamente 2 mm³ por cada amostra coletada. A extração de DNA realizada baseada no protocolo do kit comercial “Wizard Genomic DNA Purification Kit – Promega”, com algumas modificações, ou pelo protocolo de extração salina de DNA (Aljanabi *et al.*, 1997) também com modificações.

A integridade e a quantidade das amostras de DNA foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose 1% corado com SYBR® Safe DNA (0,015µl/ ml), e visualizadas em transiluminador, sob luz ultravioleta. Para quantificação do DNA foram realizadas comparações diretas com um marcador padrão de peso molecular e concentração conhecida (Low DNA Mass Ladder - Invitrogen). As amostras de DNA obtidas foram mantidas no Laboratório de Genética de Peixes do Departamento de Ciências Biológicas de Bauru - UNESP, formando um banco de tecidos e de moléculas, para posterior processamento das análises genético-moleculares.

2.3 Amplificação e sequenciamento do gene mitocondrial

Após a extração de DNA, foi realizada a amplificação dos genes COI-Fish1 e COI-Fish2, para isso foi utilizada a seguinte concentração de reagentes: 1xPCR buffer (20mM Tris-HCL, pH 8.4 e 50mM KCl), 1.5mM MgCl₂, 150µM de cada dNTP, 0.4mM dos primers COI-Fish1 F (5'-ACGCCTGTTTATCAAAAACAT-3') e R (5' CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3'); COIFish2 F (5'-TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC-3') R (5'-ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA-3'), descritos por Ward *et al.* (2005), 0.5 U de *Taq Polimerase* (Invitrogen) e 10 a 30 ng/µl de DNA. E a reação de PCR seguiu o seguinte programa 5 minutos a 95°C, 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 57°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos, 5 minutos a 72°C. Posteriormente os produtos de PCR foram purificados através da enzima ExoSAP IT® (USB) e sequenciados, em ambas as direções, utilizando Big Dye Terminator kit v1.1 (Life Technologies) com as seguintes condições de amplificação, 2 minutos de desnaturação a 95°C, seguida de 35 ciclos de 96°C por 30 segundos, 56°C por 15 segundos, 60°C por 4 minutos e 12 °C até a retirada do material.

Subsequentemente, as amostras foram purificadas e aplicadas em sequenciador automático de capilaridade ABI3130 (Perking-Elmer). As sequências resultantes foram alinhadas por parâmetro ClustalW através do software *Geneious* 4.8.5. Posteriormente as sequências consensus foram inseridas na base de dados do site BOLD Species Level Barcode-www.boldsystems.org (Ratnasingham & Hebert, 2007), e identificadas pela plataforma.

3 Resultado

Durante as coletas realizadas na CEAGESP foram obtidas 79 amostras de peixes de bico, 58 comercializados com o nome comum de agulhão ou peto (*Istiophorus platypterus*) e 21 como meca (*Xiphias gladius*). Todas as amostras coletadas foram vinculadas a um documento fiscal. Observou-se durante a coleta do material que parte dos peixes de bico expostos à venda encontravam-se sem nadadeira dorsal e cabeça, o que dificulta a identificação morfológica (Figura 1).



Figura 1: Comércio de peixes de bico morfológicamente descaracterizados. A) Agulhões B Espadartes.

Os protocolos utilizados permitiram a extração de DNA de 70 (88,60%) amostras coletadas, sendo de 38 através do kit comercial e 32 do protocolo de extração salina, todas as extrações foram amplificadas com sucesso. Após a análise das sequências no *Bold System* foram identificadas três espécies nas amostras coletadas, *Istiophorus platypterus*, *Kajikia albida* e *Xiphias gladius*.

Sessenta e quatro amostras obtiveram 100% de similaridade com alguma sequência depositada no *Bold Systems* e seis amostras obtiveram similaridade maior que 99%, e apenas uma amostra obteve similaridade menor que 98%, *Kajikia álbida* com 95,01%. Todas as amostras declaradas como

Meca, *Xiphias gladius*, tiveram sua identificação confirmada após a análise do DNA extraído (Apêndice 1).

A técnica realizada possibilitou a identificação 70 (100%) das amostras com DNA extraído, 21 amostras foram identificadas como *Xiphias gladius*, 43 como *Istiophorus platypterus* e 6 como *Kajikia álbida* (Figura 2).

4 Discussão

Todas as amostras comercializadas como Meca, *Xiphias gladius*, tiveram sua identificação confirmada pela a análise molecular utilizada. O comércio ilegal de peixes de bico na CEAGESP estaria ligado aos representantes da família Istiophoridae, provavelmente pela dificuldade na identificação morfológica dos representantes deste grupo quando comercializados morfológicamente descaracterizados, sem cabeça e nadadeira dorsal, na CEAGESP.

Durante a vistoria na CEAGESP, 58 amostras foram coletadas como agulhão vela, *Istiophorus platypterus*, após a identificação molecular constatou-se que 43 (74,13%) amostras tiveram sua identificação confirmada, em oito amostras não foi possível a extração do DNA e seis (10,34%) amostras foram identificadas como *Kajikia albida*, agulhão branco, espécie de comércio proibido no Brasil pela Instrução Normativa SEAP nº 12/05 e considerada vulnerável pela Portaria MMA nº 445/2014 - Lista Nacional Oficial de Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção - Peixes e Invertebrados Aquáticos (MMA, 2014) e pela lista vermelha das espécies em perigo da União Internacional para a Conservação da Natureza – IUCN (IUCN, 2016).

Apesar de proibir a descaracterização morfológica embarcada, corte de nadadeiras anal e dorsal, de quatro espécies da família Istiophoridae, *Tetrapturus albidus* (atualmente denominada *Kajikia albida*), *Makaira nigricans*, *Tetrapturus pfluegeri* e *Istiophorus albicans* (atualmente denominada *Istiophorus platypterus*), para facilitar a identificação, a mesma legislação permite a descaracterização após o desembarque (SEAP, 2005), o que compromete a identificação de espécies de comércio proibido, como o agulhão branco, que muitas vezes só é possível por meio de análise molecular.

Os resultados obtidos neste trabalho enfatizam a aplicabilidade do *DNA Barcode* como ferramenta na fiscalização de pescado morfológicamente descaracterizado comercializado além de sugerir a necessidade de melhorias nas políticas públicas que visam à conservação do agulhão branco.

Dados obtidos junto a Seção de Economia e Desenvolvimento – SEDES da CEAGESP indicam que apenas no ano de 2015, foram comercializadas 36,754 toneladas de agulhões. Se extrapolarmos as porcentagens obtidas nas três coletas realizadas durante este trabalho com a quantidade de agulhões comercializados no CEAGESP, podemos indicar o comércio de aproximadamente 3,6 toneladas de agulhão branco somente no ano de 2015.

Outro ponto a ser abordado é que no período de dezembro a março os agulhões brancos utilizam as águas jurisdicionais brasileiras para a desova (Arfelli, 1986; Oliveira *et al.*, 2007), mesma época que foi realizada as coletas das amostras na CEAGESP, o que, provavelmente, aumenta os impactos negativos na conservação desta espécie no Brasil, espécie que de acordo com Collete *et al.* (2011) encontra-se com suas populações em declínio.

4 Conclusão

Se considerarmos uma similaridade da sequência maior que 98% para identificação correta de uma espécie, pode se afirmar que o protocolo utilizado permitiu a identificação de mais que 100% das amostras, sendo uma excelente ferramenta na identificação de peixes de bicos comercializados.

A proibição da descaracterização morfológica realizada pela retirada e corte a bordo da primeira nadadeira dorsal e da primeira nadadeira anal em quatro espécies agulhões, não impediu o comércio ilegal de agulhão branco na CEAGESP. A descaracterização morfológica realizada posteriormente ao desembarque esta sendo utilizada para ludibriar a fiscalização do comércio de peixes de bico de comércio proibido como é o caso do agulhão branco, o que enfatiza a necessidade de melhorias das políticas públicas de conservação desta espécie. A identificação molecular aliada a uma fiscalização rotineira melhoraria eficiência do controle na venda de espécies proibidas.

A pesca de agulhões brancos no verão brasileiro, período utilizado para sua desova, provavelmente, aumenta os impactos negativos sobre sua conservação, fazendo-se necessários estudos sobre estes impactos provocados por esta categoria de pesca no Brasil.

Capítulo 3 - DNA Barcode na identificação de peixes de bico destinados a exportação.

Resumo

Os peixes de bico são espécies pelágicas oceânicas frequentemente capturadas pela frota atuneira e com grande interesse da pesca esportiva. Este grupo de peixes possui legislação específica que proíbe a comercialização e exportação de duas espécies no Brasil. O Aeroporto Internacional de São Paulo destaca-se pelo maior volume brasileiro de exportações de peixe de bico dos últimos três anos. Neste período, os espadartes, *Xiphias gladius*, foi à única espécie de peixe de bico exportada, sendo parte destes morfologicamente descaracterizadas devido ao beneficiamento, o que dificulta a sua identificação morfológica. O espadarte possui uma Nomenclatura Comum do Mecosul - NCM específico, o que permite a comparação da mercadoria exportada com os documentos apresentados pelo exportador. O NCM é um código utilizado pela Receita Federal do Brasil para identificar a mercadoria exportada. O *DNA Barcode* é um sistema universal de identificação baseado em sequência de DNA de aproximadamente 650 pares de base, servindo como código de barras de cada espécie. Este sistema tem sido utilizado com êxito para identificar amostras que são comercializadas descaracterizadas e de forma ilegal, como tubarões e outras espécies ameaçadas de extinção. A técnica de DNA Barcode foi utilizada para a identificação de peixes de bico exportados pelo Aeroporto Internacional de São Paulo. Foram coletadas 223 amostras de peixes de bico destinadas a exportação para os Estados Unidos e Inglaterra. Após sequenciamento do DNA foi possível à identificação das espécies de 100 % amostras, sendo todas identificadas como *Xiphias gladius*, confirmando os NCM declarados pelo exportador. Os altos índices de similaridade das sequências obtidas nas amostras com as sequências depositadas na plataforma *Bold Systems* permitem a validação da técnica utilizada, especialmente no monitoramento da exportação de pescados.

Introdução

Peixes de bicos são espécies oceânicas, epipelágicas, migratórias e habitam águas tropicais, temperadas e sazonalmente frias de todos os oceanos. As espécies deste grupo são divididas em duas famílias Xiphiidae e Istiophoridae, com 12 espécies divididas em quatro gêneros, *Makaira*, *Tetrapturus*, *Istiophorus* e *Xiphias* (Nakamura, 1985). No entanto, a utilização de técnicas moleculares sugeriu uma reorganização do grupo diminuindo o número de espécies para dez e adicionando dois novos gêneros, *Istiompax* e *Kajikia* (Collete *et al.*, 2006).

A captura de peixes de bico esta relacionada à fauna acompanhante da pesca de espécies de maior valor como o atum (De Sylva *et al.*, 2000), além de serem muito apreciados na pesca esportiva (Arfelli *et al.*, 1994, Ditton *et al.*, 2003).

Seis espécies de peixes de bico são encontradas no Atlântico Sul, o agulhão-negro (*Makaira nigricans* – Lacepède, 1802), agulhão-vela (*Istiophorus platypterus* - Shaw, 1792), agulhão-branco (*Kajikia albida* - Poey, 1860), agulhão-estilete (*Tetrapturus pfluegeri* - Robins & de Sylva, 1963) e marlim-polegar (*Tetrapturus georgii* - Lowe, 1841), pertencentes à família Istiophoridae e o espadarte (*Xiphias gladius* – Linnaeus, 1758), pertencente à família a Xiphiidae (Amorim *et al.*, 2011).

Preocupado com a proteção dos peixes de bico, em 2005, o governo brasileiro publicou a Instrução Normativa SEAP nº 12/05, regulamentando a captura e o comércio de quatro espécies de agulhões em águas jurisdicionais brasileiras e alto mar. Dentre medidas propostas destaca-se a proibição da

comercialização e exportação dos agulhões negro e brancos, e da retirada e corte a bordo da primeira nadadeira dorsal e da primeira nadadeira anal dos indivíduos de agulhões branco, negro, verde e vela, o que facilita a identificação destas espécies.

No entanto, um estudo realizado na captura total da frota atuneira paulista demonstrou que a proporção de peixes de bico do gênero *Tetrapturus* capturados em São Paulo não mudou com a publicação da Instrução Normativa SEAP nº 12/05, o que indicaria a possibilidade de comércio de espécies proibidas. Após a publicação da legislação os agulhões começaram a ser comercializados sem cabeça, dificultando assim a identificação da espécie comercializada (Piva-Silva *et al.*, 2014).

De acordo com a última estatística pesqueira oficial publicada no Brasil, no ano de 2011, 3.408,70 toneladas de peixes de bico foram capturados nos oceanos brasileiros, sendo a grande maioria 88,97% de espadartes. O restante refere-se a agulhões, dentre eles espécies de comércio e exportação proibida como agulhão branco (1,75%) e agulhão negro (1,86%) (MPA, 2011).

No mesmo ano foram exportadas 1.240,58 toneladas de espadartes e 2,43 toneladas de agulhões, destinados a países como Reino Unido, França, Japão e Espanha. Ainda em 2011 ocorreu a última exportação de agulhões realizada no Brasil. Neste contexto destaca-se o Aeroporto Internacional de São Paulo-Guarulhos “Governador André Franco Montoro”, somente nos últimos dois anos (2014 e 2015) foram exportadas 743,84 toneladas de espadartes, em sua totalidade comercializada morfologicamente descaracterizada (ALICEWEB, 2016).

Atualmente a Receita Federal do Brasil utiliza a Nomenclatura Comum do Mercosul (NCM) na classificação da mercadoria exportada. O NCM é um código de oito dígitos baseados em uma convenção internacional (Sistema Harmonizado – SH) padronizada. No entanto, nem todas as espécies possuem um NCM específico, sendo estas exportadas com códigos gerais (RFB, 2008; MEFP,1992).

Dentre os peixes de bico os espadartes, *Xiphias gladius*, são os únicos que possuem específico para a espécie. Representantes da família Istiophoridae, são exportados com NCM gerais para todas as espécies (RFB, 2008).

Atualmente, várias técnicas utilizando marcadores moleculares são empregadas na identificação de uma espécie com mínimas amostras de tecido. Dentre elas podemos destacar a técnica de *DNA Barcode*, utilizando o gene mitocondrial Citocromo Oxidase subunidade I (COI), sequência de aproximadamente 650 pares de base que permite a identificação de uma espécie através da análise de um pequeno segmento do genoma. De forma geral estas sequências podem ser comparadas a um “código de barras” genético incorporado a cada célula (Hebert *et al.*, 2003^a, Hebert *et al.*, 2003^b), sendo utilizada com sucesso na identificação de diversos grupos de peixes (Lakra *et al.*, 2011, Johnsen *et al.*, 2010; Webb *et al.*, 2012). Estes métodos de identificação são viáveis e seu desenvolvimento poderá proteger as espécies superexploradas. (Teletchea *et al.*, 2005).

A identificação de peixes de bico pela técnica de *DNA Barcode* já foi utilizada com sucesso tanto na identificação de indivíduos adulto (Hanner *et al.*, 2011) como na identificação larvas e ovos de peixes de bico das espécies *I.*

platypterus, *K. albida* e *X. gladius*, da costa sudeste brasileira (Rodrigues, 2014).

Na ciência forense marcadores moleculares têm sido utilizados na solução de crimes ambiental, seja na identificação da origem de marfins de elefantes africanos (Wasser *et al.*, 2008), ou na identificação de chifres de Bovidae e Cervidae ameaçados pela exploração descontrolada (Yan *et al.*, 2013). Na exportação o DNA barcode já foi utilizado em disputa comercial entre a China e um país importador de chá torrado, ficando comprovado a venda trocada do produto. No Brasil a técnica já foi utilizada na identificação de babrbatanas de tubarão no Aeroporto Internacional de São Paulo (Carvalho *et al.*, 2013).

Atualmente o Aeroporto Internacional de São Paulo é o maior exportador de peixes de bico do Brasil, tendo exportado aproximadamente 460 toneladas de espadartes somente no ano de 2015 (ALICEWEB, 2016).

Portanto a utilização dessa técnica em pontos de exportação é de grande importância, principalmente no principal aeroporto do país, Aeroporto Internacional de São Paulo-Guarulhos “Governador André Franco Montoro”, onde são exportados grande quantidade de pescados descaracterizados, em especial os espadartes.

2 Material e Métodos

2.1 Coleta das amostras

As amostras de tecido (músculo ou nadadeira) de peixes de bico foram coletadas em vistorias realizadas pelo IBAMA no Aeroporto Internacional de

São Paulo nos meses de agosto, setembro e outubro de (2015), totalizando 19 cargas com destino aos Estados Unidos e Reino Unido. As amostras de tecidos coletadas foram fixadas em álcool 100% visando a posterior análise molecular, sendo posteriormente enviadas ao laboratório de genética de peixes da Unesp de Bauru. Todas as amostras, músculo ou nadadeiras foram armazenadas em álcool 100% e vinculadas ao documento fiscal de origem do pescado. Amostras de tecido coletadas foram integradas à coleção do Laboratório de Genética de Peixes (LaGenPe), da UNESP de Bauru.

2.2 Extração do DNA

Para extração de DNA foi utilizado um pequeno fragmento do tecido aproximadamente 2 mm³ por cada amostra coletada. A extração de DNA realizada foi baseada no protocolo do kit comercial “*Wizard Genomic DNA Purification Kit – Promega*”, com algumas modificações.

A integridade e a quantidade das amostras de DNA foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose 1% corado com SYBR® Safe DNA (0,015µl/ml), e visualizadas em transiluminador, sob luz ultravioleta. Para quantificação do DNA foram realizadas comparações diretas com um marcador padrão de peso molecular e concentração conhecidas (*Low DNA Mass Ladder - Invitrogen*). As amostras de DNA obtidas foram mantidas no Laboratório de Genética de Peixes do Departamento de Ciências Biológicas de Bauru - UNESP, formando um banco de tecidos e de moléculas, para posterior processamento das análises genético-moleculares.

2.3 Amplificação e sequenciamento do gene mitocondrial

Após a extração de DNA, foi realizada a amplificação dos genes COI-Fish1 e COI-Fish2, para isso foi utilizada a seguinte concentração de reagentes: 1xPCR buffer (20mM Tris-HCl, pH 8.4 e 50mM KCl), 1.5mM MgCl₂, 150µM de cada dNTP, 0.4mM dos primers COI-Fish1 F (5'-ACGCCTGTTTATCAAAAACAT-3') e R (5' CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3'); COIFish2 F (5'-TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC-3') R (5'-ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA-3'), descritos por Ward *et al.* (2005), 0.5 U de *Taq Polimerase* (Invitrogen) e 10 a 30 ng/µl de DNA. A reação de PCR seguiu o seguinte programa 5 minutos a 95°C, 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 57°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos, 5 minutos a 72°C. Posteriormente os produtos de PCR foram purificados através da enzima ExoSAP IT® (USB) e sequenciados, em ambas as direções, utilizando Kit "*Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction*" (Applied Biosystems) com as seguintes condições de amplificação, 2 minutos de desnaturação a 96°C, seguida de 35 ciclos de 96°C por 30 segundos, 50°C por 15 segundos, 60°C por 4 minutos e 12 °C até a retirada do material.

Subsequentemente, as amostras foram purificadas e aplicadas em sequenciador automático de capilaridade ABI3130 (*Perking-Elmer*). As sequências (*forward* e *reverse*) resultantes foram alinhadas por parâmetro ClustalW através do software *Geneious 4.8.5*. Posteriormente as sequências consensus foram inseridas na base de dados do site *BOLD Species Level Barcode-www.boldsystems.org* (Ratnasingham & Hebert, 2007), e identificadas pela plataforma.

3 Resultado

Durante as coletas realizadas no Aeroporto Internacional de São Paulo foram obtidas 223 amostras de peixes de bico, comercializados com dois NCM, espadarte (*Xiphias gladius*), frescos ou refrigerados (NCM-03024700) e filé de espadartes (*Xiphias gladius*), fresco ou refrigerado (NCM-03045400), ambos relacionados exportação de espadartes. Não foram observadas a exportação de representantes da família Istiophoridae no período estudado. Todas as amostras coletadas foram vinculadas a um documento fiscal. Observou-se durante a coleta do material que os peixes de bico exportados se encontravam morfológicamente descaracterizados, sem cabeça ou na forma de filé (Figura 1).



Figura 1- Peixes de bico exportados: a) filé de espadartes (*Xiphias gladius*), fresco ou refrigerado (NCM-03045400) b) espadarte (*Xiphias gladius*), frescos ou refrigerados (NCM-03024700).

O protocolo utilizado permitiu a extração de DNA de todas as amostras coletadas, sendo todas as extrações amplificadas com sucesso. Após a análise das sequências na plataforma do *Bold Systems* foi identificada apenas uma espécie nas amostras coletadas, *Xiphias gladius*.

Cento e setenta e quatro amostras obtiveram 100% de similaridade com alguma sequência depositada na plataforma *Bold Systems* para a espécie *Xiphias gladius*, quarenta e sete amostras obtiveram similaridade maior que 99% e duas amostras obtiveram similaridade maior que 98% (Figura 2).

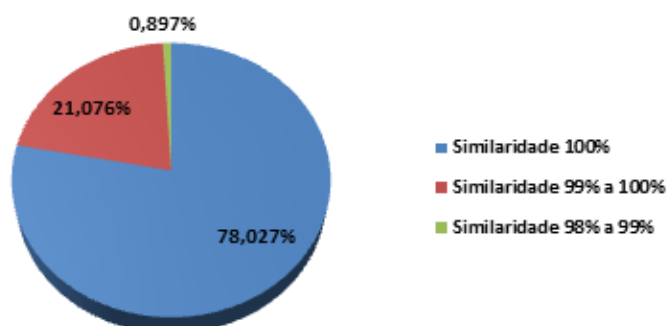


Figura 2- Grau de similaridade das amostras analisadas.

Após o sequenciamento do DNA extraído nas amostras, foi possível ratificar os dados declarados pelo exportador, não sendo identificado o comércio de espécies trocadas (Apêndice 2).

4 Discussão

Durante o período de coleta das amostras, agosto, setembro e outubro de 2015, apenas espadartes, *Xiphias gladius*, foram exportados pelo Aeroporto Internacional de São Paulo. A confirmação da espécie de 100% das amostras coletadas com a espécie declarada pelo exportador, *Xiphias gladius*, enfatiza a aplicabilidade da técnica utilizada como ferramenta no monitoramento da exportação não só dos peixes de bico, mas de pescado em geral, mesmo que morfológicamente descaracterizado.

Apesar do comércio trocado de peixes de bico estar ligado aos representantes da família Istiophoridae, devido às semelhanças morfológicas, a venda de espadartes como se fossem cações não é incomum no comércio. Ramos (2016) identificou a comercialização de espadartes como se fosse cações no entreposto de pesca de Santos/SP.

Diferentemente do encontrado no comércio interno, onde não é incomum o comércio trocado de espécies (Carvalho *et al.*, 2015), na exportação o comércio de pescado apresenta um maior controle dos órgãos federais (Carvalho *et al.*, 2013). Além do controle interno, a confirmação de 100% das amostras coletadas, possivelmente, também estaria relacionada ao país de destino da exportação, Inglaterra e Estados Unidos. Países desenvolvidos frequentemente utilizam a técnica de DNA Barcode como ferramenta na fiscalização (Holmes *et al.*, 2009, Coghlan *et al.*, 2011).

No Brasil a coleta de material biológico para identificação genética de pescado já foi prevista na Instrução Normativa IBAMA nº 2/2014, que define os procedimentos para controle e desembarque de tubarões e arraias (IBAMA, 2014). Todavia, esta legislação refere-se apenas a espécies de tubarões e arraias, e não define como esta coleta deve ser realizada, prejudicando assim a sua utilização.

Os altos índices de similaridade obtidos na consulta na plataforma *Bold Systems*, com aproximadamente 78% das sequências obtidas pelo protocolo utilizado nas amostras com 100% de similaridade com sequências depositadas na plataforma do *Bold Systems* para a espécie *Xiphias gladius*, reforçam a validação da técnica do *DNA Barcode* para a espécie.

Embora a última exportação de agulhões tenha ocorrido no ano de 2011, utilizando um NCM específico apenas para família (ALICEWEB, 2016), a falta de um NCM específico para cada espécie impede a elaboração de estatísticas de exportação fidedignas sobre os representantes da família Istiophoridae, prejudicando a criação de políticas para a conservação destas espécies, uma vez que as mesmas utilizam as águas quentes, como as águas marinhas brasileiras, para desova (Nakamura, 1985), podendo sua captura nestes períodos prejudicar a reprodução das espécies.

5 Conclusão

As técnicas moleculares, em especial o *DNA Barcode*, se apresentaram como uma importante ferramenta na fiscalização no comércio exterior de pescados morfológicamente descaracterizados.

Os altos índices de similaridades das sequências obtidas com as sequências depositadas no *Bold Systems* para espécie *Xiphias gladius* permite a validação da técnica no monitoramento de sua exportação.

No entanto, faz-se necessário a publicação de um documento legal regulamentando os procedimentos a serem adotados durante a fiscalização de pescado nas unidades aduaneira com fins na análise genética.

A falta de um NCM específico na exportação para as espécies da família Istiophoridae prejudicam a elaboração de estatísticas confiáveis, prejudicando as políticas públicas para conservação das espécies.



WWW.ARKIVE.ORG

CONSIDERAÇÕES FINAIS

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A preocupação mundial com o meio ambiente vem se destacando nas últimas décadas. Desequilíbrios ambientais vêm provocando novos regulamentos na tentativa de auxiliar a conservação dos recursos naturais. Da mesma forma são várias as legislações destinadas à conservação dos recursos pesqueiros no Brasil, seja regulamentando o tamanho mínimo de espécies alvos, determinando uma época para a pesca ou mesmo proibindo a pesca de espécies.

Neste contexto o governo brasileiro preocupado com a pesca de peixes de bico, publicou a Instrução Normativa SEAP nº 12/05 e a Portaria MMA nº445/2014, Lista Nacional Oficial de Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção - Peixes e Invertebrados Aquáticos, que após avaliação de especialistas, considerou os agulhões negros e brancos como espécies em perigo e vulneráveis respectivamente. Todavia, o estudo demonstrou que mesmo com a publicação destes instrumentos legais, a pesca e comércio de agulhões brancos ainda vêm sendo realizados.

A utilização de técnicas de fiscalização obsoletas ou até mesmo a ausência de fiscalização prejudicam controle do comércio ilegal de espécies ameaçadas como o agulhão branco e negro. A constatação do comércio de agulhão branco, espécie ameaçada de extinção, no segundo maior mercado atacadista da América Latina, CEAGESP, acende um alerta na conservação deste peixe de bico.

Por outro lado, apesar de pouco utilizadas na fiscalização ambiental técnicas moleculares, em especial o *DNA Barcode*, são fundamentais no

combate ao crime ambiental, seja na identificação de pescados ou na investigação da origem geográfica de espécies. Tais técnicas poderiam auxiliar no combate ao comércio ilegal de agulhões brancos e negro no Brasil, facilitada pela descaracterização morfológica.

A falta de uma estatística oficial brasileira atualizada prejudica o entendimento da dinâmica da pesca no país dificultando propostas na conservação de espécies, dentre elas os peixes de bico. O Estado de São Paulo é um dos poucos que mantêm uma estatística oficial atualizada, auxiliando o entendimento da pesca deste grupo de peixes. A análise dos dados disponibilizados, seja pelo Instituto de Pesca ou pela CEAGESP, indica uma maior exploração dos agulhões durante o verão, período quando as águas estão mais quentes e que espécies deste grupo migram para desova segundo Nakamura (1985).

Assim como na pesca e no comércio interno, na exportação a falta de uma Nomenclatura Comum do Mercosul – NCM específica para cada espécie, dificulta a elaboração de dados estatísticos confiáveis e a elaboração de políticas de conservação de espécies, lembrando que dentre os peixes de bico, apenas o espadarte, *Xiphias gladius*, possui NCM específico. Todos os agulhões, as cinco espécies de ocorrência no Brasil, são exportados com um mesmo NCM.

De uma forma geral o estudo realizado não só enfatiza os riscos na conservação dos peixes de bico no Brasil, mas também nos dá algumas informações viáveis na melhoria da conservação deste grupo, tais como: os melhores meses para fiscalizar a pesca e o comércio do peixe de bico no

estado de São Paulo, locais de comércio ilegal, ferramenta (*DNA Barcode*) ideal a ser utilizada na fiscalização, dentre outras.

Da mesma forma que a falta de dados estatísticos atualizados deixa uma lacuna no entendimento do comércio interno e externo de peixes de bico, em especial os agulhões, no Brasil e levanta alguns questionamentos: Quais as espécies são comercializadas com NCM geral de agulhões? Qual a quantidade de peixes de bico pescados por estado no Brasil? Quais estados que mais exploram este grupo de peixes? Tais questionamentos seriam facilmente respondidos por meio de políticas destinadas a proteção dos peixes de bico no Brasil.

5.1 Contribuições à conservação e manejo de peixes de bico

A utilização do DNA Barcode como ferramenta de rotina na fiscalização de pescado morfologicamente descaracterizado vem se demonstrando uma excelente ferramenta no combate ao crime ambiental (Carvalho *et al.*, 2013; Carvalho *et al.*, 2015). No trabalho realizado esta ferramenta permitiu com segurança a identificação das espécies de peixes de bico comercializadas no CEAGESP e no Aeroporto Internacional de São Paulo. No entanto, apesar de ser considerado um método rápido para identificação genética de espécies, com o protocolo utilizado no trabalho possível em cinco dias, e permitir a autuação administrativa do infrator, a técnica dificulta a apreensão do pescado, uma vez que exigira o armazenamento do mesmo até a identificação molecular.

Apesar desta limitação, a utilização do *DNA Barcode* se demonstrou eficaz no controle do comércio ilegal de pescado, permitindo firmar a proposta

de sua inclusão como ferramenta de rotina na fiscalização ambiental de pescado.

A coleta de material biológico para identificação genética de pescado já esta prevista na Instrução Normativa IBAMA nº 2/2014, que define os procedimentos para controle e desembarque de tubarões e arraias (IBAMA, 2014). No entanto, esta instrução normativa limita-se à apenas tubarões e arraias, e não define os procedimentos a serem adotados pela fiscalização para posterior identificação genética da espécie. A criação de um instrumento legal regulamentando tais procedimentos como ferramenta na fiscalização de pescado facilitaria a execução deste tipo de identificação e melhoraria o controle.

Outra proposta a ser implementada seria inclusão dos representantes da família Istiophoridae nos anexos da CITES, uma vez que estudos apontam a o declínio destas populações (Collete *et al.*, 2011; IUCN, 2016) e sua a características migratória. A Convenção sobre Comércio Internacional das Espécies da Flora e Fauna Selvagens em Perigo de Extinção – CITES, a qual o Brasil é signatário, visa regular o comércio de espécies da fauna e flora prevenindo-as do perigo de extinção, para isto um Decreto Federal relugamenta a concessão das licenças CITES (CITES, 2000). A inclusão dos agulhões na CITES permitiria um maior controle na exportação e importação destes peixes de bico no mundo, considerando os critérios para destas licenças.

O estudo demonstrou ainda, o aumento da pesca e comércio dos agulhões no verão brasileiro, durante a desova destes peixes (Rodrigues,

2014; Nakamura, 1985), o que agravaria os impactos gerados pela exploração das mesmas no período. Uma opção seria a proibição do comércio e captura das espécies de exploração permitida, agulhão-vela (*Istiophorus platypterus*), agulhão-estilete (*Tetrapturus pfluegeri*) e marlim-polegar (*Tetrapturus georgii*), durante o período de desova, até a realização de estudos determinando estes impactos, devendo os indivíduos pescados acidentalmente, serem devolvidos ao mar quando vivos ou doado às instituições científicas, hospitalares, penais e outras com fins beneficentes quando mortos. Para isto é importante ressaltarmos que estas espécies são capturadas acidentalmente pela frota atuneira (De Sylva *et al.*, 2000), isto é, não são consideradas espécies alvo da indústria pesqueira.

Outro ponto a ser ressaltado é a necessidade de um NCM específico para cada espécie exportada. A criação desta numeração específica permitiria a elaboração de estatísticas de exportações de pescado confiáveis.



WWW.ARKIVE.ORG

REFERÊNCIAS

6 REFERÊNCIAS

- Abid, N. & Idrissi, N. ICCAT. 2006-2015. *ICCAT Manual. International Commission for the Conservation of Atlantic Tuna. In: ICCAT Publications* [on-line]. Updated 2006. [Cited 01/27/]. <http://www.iccat.int/en/ICCATManual.asp>, ISBN (Electronic Edition): 978-92-990055-0-7
- Alacs, E. A., Georges, A., FitzSimmons, N. N., & Robertson, J. (2010). DNA detective: a review of molecular approaches to wildlife forensics. *Forensic Science, Medicine, and Pathology*, 6(3), 180-194.
- ALICEWEB (2016). Sistema de Análise das Informações de Comércio Exterior. Disponível em <<http://www.aliceweb.mdic.gov.br/>> Acesso em: 5 de abril, 2016.
- Aljanabi, S. M., & Martinez, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic acids research*, 25(22), 4692-4693.
- Amorim, A. F., Pimenta, E. G. & Amorim, M. C. C. (2011). *Peixes-de-bico do Atlântico*. Santos, SP, Edição do Autor:108p.
- Arfelli, C. A., De Amorim, A. F. and Galhardo-Amado, J. C. (1986). Analysis of *Tetrapturus albidus* Poey (1861), caught off South and southeast of Brazil (1971-1984). *ICCAT Col. Vol. Sci. Pap.*, 25: 202-217.
- Arfelli, C. A., Amorim, A. F. & Graça-Lopes, R. (1994). Billfish sport fishery off Brazilian coast. *ICCAT Coll. Vol. Sci. Pap.*, 41:214-217. Ministério da Pesca

e Aquicultura. Boletim estatístico da pesca e aquicultura 2011. Brasília: MPA, 2011. 60p.

Arocha, F. & Ortiz, M. Blue Marlin ICCAT. 2006-2015 a. *ICCAT Manual. International Commission for the Conservation of Atlantic Tuna. In: ICCAT Publications* [on-line]. Updated 2006. [Cited 01/27/]. <http://www.iccat.int/en/ICCATManual.asp>, ISBN (Electronic Edition): 978-92-990055-0-7

Arocha, F. & Ortiz, M. Sailfish ICCAT. 2006-2015 b. *ICCAT Manual. International Commission for the Conservation of Atlantic Tuna. In: ICCAT Publications* [on-line]. Updated 2006. [Cited 01/27/]. <http://www.iccat.int/en/ICCATManual.asp>, ISBN (Electronic Edition): 978-92-990055-0-7

Asis, A. M. J. M., Lacsamana, J. K. M., & Santos, M. D. (2016). Illegal trade of regulated and protected aquatic species in the Philippines detected by DNA barcoding. *Mitochondrial DNA Part A*, 27(1), 659-666.

Carvalho, C. B. V. & Freitas, J. M. (2013) O uso do *DNA Barcode* para identificar barbatanas de tubarão comercializadas ilegalmente no Brasil. *Saúde, Ética e Justiça*. 18 (Ed. Especial): 50-4

Carvalho, D. C., Neto, D. A., Brasil, B. S., & Oliveira, D. A. (2011). DNA barcoding unveils a high rate of mislabeling in a commercial freshwater catfish from Brazil. *Mitochondrial DNA*, 22(sup1), 97-105.

Carvalho, D. C., Palhares, R. M., Drummond, M. G.; & Frigo, T. B. (2015). DNA Barcode identification of commercialized seafood in South Brazil: a governmental regulatory forensic program. *Food Control*, 50, 784-788.

- CEAGESP (2016). Disponível em: <www.ceagesp.gov.br>. Acesso em: janeiro de 2016.
- CITES (2000). Convenção sobre Comércio Internacional das Espécies da Flora e Fauna Selvagens em Perigo de Extinção – CITES. Decreto Federal nº 3.607, de 21 de setembro de 2000. 18p.
- Coghlan, M. L., White N. E., Parkinson, L., Haile, J, Spencer, B. P. S & Bunce, M. (2011). Egg forensics: An appraisal of DNA sequencing to assist in species identification of illegally smuggled eggs, *Forensic Sci. Int. Genet.*, doi:10.1016/j.fsigen.2011.06.006
- Collette, B. B., Carpenter, K. E., Polidoro, B. A., Juan-Jordá, M. J., Boustany, A., Die, D. J., ... & McManus, R. (2011). High value and long life-double jeopardy for tunas and billfishes. *Science*, 333(6040), 291-292.
- Collette, B.B., McDowell, J. R., Graves, J. E. (2006). Phylogeny of recente billfishes (Xiphiidae) *Bulletin of Marine Science*, 79(3): 455–468.
- De Sylva, D. P., Richards, W. J., Capo, T. R. & Serafy, J. E. (2000). Potential effects of human activities on billfishes (Istiophoridae and Xiphiidae) in the western Atlantic ocean. *Bull.Mar.Sci.* 66(1): 187-198.
- Ditton, R. B. & Stoll, J. R.; (2003). Social and economic perspective on recreational billfish Fisheries. *Marine and Freshwater Research*. 54:545-554.
- Dawnay, N., Ogden, R., McEwing, R., Carvalho, G. R., & Thorpe, R. S. (2007). Validation of the barcoding gene COI for use in forensic genetic species identification. *Forensic Science International*, 173(1), 1-6.
- FIPERJ (2014). Fundação Instituto de Pesca do Estado do Rio de Janeiro. Relatório Final 2014. Rio de Janeiro, 141p.

- FIPERJ (2013). Fundação Instituto de Pescado Estado do Rio de Janeiro. Relatório Final 2013. Rio de Janeiro, 146p.
- FIPERJ (2012). Fundação Instituto de Pescado Estado do Rio de Janeiro. Relatório Final 2012. Rio de Janeiro, 85p.
- FIPERJ (2011). Fundação Instituto de Pescado Estado do Rio de Janeiro. Relatório Final 2011. Rio de Janeiro, 52p.
- Galal-Khallaf, A., Ardura, A., Mohammed-Geba, K., Borrell, Y. J. & Garcia-Vazquez, E. (2014). DNA Barcode reveals a high level of mislabeling in Egyptian fish Fillets. *Food Control* 46 (2014) 441 e 445.
- Hanner, R., Floyd, R., Bernard, A., Collette, B. B. & Shivji M (2011). DNA Barcode of billfishes. *Mitochondrial DNA*, 22(S1): 27–36.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L. & de Waard, J. R. (2003a). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270, 313–321.
- Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S. & de Waard, J. R. (2003b). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 270, S596–S599
- Hebert, P. D. N., Stoeckle, M. Y., Zemplak, T. S. & Francis, C. M. (2004). Identification of Birds through DNA Barcodes. *PLoS Biol* 2(10): e312. doi:10.1371/journal.pbio.0020312
- Holmes, B. H., Steinke, D. & Ward, R. D. (2009). Identification of shark and ray fins using DNA Barcode. *Fisheries Research* 95 (2009) 280–288

- Hooligan, J. White Marlin ICCAT. 2006-2015 a. *ICCAT Manual. International Commission for the Conservation of Atlantic Tuna. In: ICCAT Publications* [on-line]. Updated 2013. [Cited 01/27/].
- Hooligan, J. Lonbill Spearfish ICCAT. 2006-2015 b. *ICCAT Manual. International Commission for the Conservation of Atlantic Tuna. In: ICCAT Publications* [on-line]. Updated 2013. [Cited 01/27/].
- Hubert, N., Hanner, R., Holm, E., Mandrak, N. E., Taylor, E., *et al.* (2008). Identifying Canadian Freshwater Fishes through DNA Barcodes. *PLoS ONE* 3(6): e2490. doi:10.1371/journal.pone.0002490
- IBAMA (2014) Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - Instrução Normativa IBAMA nº 2/2014 *Diário Oficial da União*. Seção 1, 48p.
- IUCN (2016). International Union for Conservation of Nature e Natural Resources. Disponível em <<http://www.iucnredlist.org> site> Acesso em: 28 de abril, 2016.
- Johnsen, A., Rindal, E., Ericson, P. G., Zuccon, D., Kerr, K. C., Stoeckle, M. Y., & Lifjeld, J. T. (2010). DNA barcoding of Scandinavian birds reveals divergent lineages in trans-Atlantic species. *Journal of Ornithology*, 151(3), 565-578.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Mentjies, P., & Drummond, A. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647-1649.

- Kitchell, J. F., Martell, S. J. D., Walters, C.J., Jensen, O. P., Kaplan, I. C., Watters, J, Essington, T. E. & Boggs, C. H. (2006) Billfishes in a ecosystem contexto. *Bulletin of Marine Science*, 79(3): 669–682.
- Kyle, C. J. & Wilson, C. C. (2007). Mitochondrial DNA identification of game and harvested freshwater fish species. *Forensic Science International* 166: 68-76.
- Lakra, W. S., Verma, M. S., Goswami, M., Lal, K. K., Mohindra, V., Punia, P., ... & Hebert, P. (2011). DNA barcoding Indian marine fishes. *Molecular Ecology Resources*, 11(1), 60-71.
- Mabragaña, E., de Astarloa, J. M. D., Hanner, R., Zhang, J. & Castro, M. G. (2011). DNA Barcode identifies Argentine fishes from marine and brackish waters. *PLoS One*, 6(12), e28655.
- Maralit, B. A., Aguila, R. D., Ventolero, M. F. H., Perez, S. K. L., Willette, D. A., & Santos, M. D. (2013). Detection of mislabeled commercial fishery by-products in the Philippines using DNA barcodes and its implications to food traceability and safety. *Food Control*, 33(1), 119-125.
- MEFP (1993). Ministério da Economia Fazenda e Planejamento. Decreto Federal nº 435/1992 de 27 de janeiro de 1993. *Diário Oficial da União*. Seção 1, 1053p.
- MMA (2014). Ministério do Meio Ambiente. Lista Nacional Oficial de Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção - Peixes e Invertebrados Aquáticos" Portaria nº 445, Diário Oficial da União. República Federativa do Brasil de 17 dezembro 2014 *Diario Oficial da União* nº 245, Seção 1, 126 p.

- MPA (2011). Ministério da Pesca e Aquicultura Boletim estatístico da pesca e aquicultura. MPA. *Diário Oficial da União*. República Federativa do Brasil 60 p.
- Nakamura, I. (1984). Systematics of the billfishes (Xiphiidae and Istiophoridae) *Publ. Seto Mar. Biol. Lab.*, XXVIII (5/6), 255-396.
- Nakamura, I. (1985). FAO Species Catalogue. Vol.5: Billfishes of the World. Na annotated and illustrated catalogue of marlins, sailfishes, spearfishes and swordfishes known to date. *FAO Fishery Synopsis*, Rome, 125 (5):65p.
- Nelson, J.S. (2006). Fish of the World, 4rd edn. John Wiley & Sons, Inc., New York, 601 pp.
- Nicolé, S., Negrisoló, E., Eccher, G., Mantovani, R., Patarnello, T., *et al.* (2012). Seafood Authentication by DNA Barcode, *Food Technol. Biotechnol.* 50 (4) 387–398
- Ogden, R., Dawnay, N., & McEwing, R. (2009). Wildlife DNA forensics—bridging the gap between conservation genetics and law enforcement. *Endangered Species Research*, 9(3), 179-195.
- Oliveira, I. M., Hazin, F., Travassos, P., Pinheiro, P. & Hazin, H. G. (2007). Preliminary results on the reproductive biology of the white marlin, *Tetrapturus albidus* Poey 1960, in the western equatorial Atlantic Ocean. *ICCAT Col. Vol. Sci. Pap.*, 60: 1738-1745.
- Piva-Silva, N. & Amorim A. F. (2014). Fishery biology of *Tetrapturus* (Osteichthyes, Istiophoridae) caught by São Paulo Longliners off Southern Brazil. *Collect. Vol. Sci. Pap. ICCAT*, 70(5): 2490-2498.

- PROPESQ (2016) Programa de Monitoramento da Atividade Pesqueira Marinha e Estuarina do Instituto de Pesca Disponível em <<http://www.propesq.pesca.sp.gov.br/>> Acesso em: 5 de abril, 2016.
- Ramos, M. G. (2016). *DNA Barcoding* na identificação de espécies de tubarões exploradas comercialmente no litoral de São Paulo. Dissertação de mestrado - UNESP Botucatu/SP 73 pp.
- Ramadan, H. A. I & Baeshen, N. A. (2012). Biodiversity Conservation and Utilization in a Diverse World Chapter 5 Biological Identifications Through DNA Barcodes intech, 852-859
- Rasmussen, R. S. & Morrissey, M. T. (2008). DNA-Based Methods for the Identification of Commercial Fish and Seafood Species *COMPREHENSIVE REVIEWS IN FOOD SCIENCE AND FOOD SAFETY—Vol. 7, 2008* 280-295
- Ratnasingham, S., & Hebert, P. D. N. (2007). BOLD: The barcode of life data system ([www. barcodinglife. org](http://www.barcodinglife.org)). *Molecular Ecology Notes* 7: 355–364. *Publisher Full Text*.
- RFB. 2008. Receita Federal do Brasil. Instrução Normativa RFB nº 907, de 07 de fevereiro de 2008. *Diário Oficial da União*. República Federativa do Brasil. 13p.
- Rodrigues, T (2014). Identificação molecular de larvas e ovos de peixe-de-bico das famílias Istiophoridae e Xiphiidae (Perciformes) da costa Sudeste do Brasil através do DNA Barcode / Tiago Rodrigues. Dissertação de mestrado – São Paulo, 2014 v, 59f.

- Smith, P. J., McVeagh, S. M. & Steinke, D. (2008). DNA Barcode for the identification of smoked fish products. *Journal of Fish Biology* (2008) 72, 464–471 doi:10.1111/j.1095-8649.2007.01745.x,
- Sanches, A., Tokumoto, P. O., Peres, W. A. M.; Nunes, F. L., Gotardi, M. S. T., et al (2012) Illegal hunting cases detected with molecular forensics in Brazil. *Investigative Genetics* 2012 3:17.
- SEAP. (2005). Secretaria Especial de Pesca Instrução Normativa nº 12, de 14 de julho de 2005. *Diário Oficial da União* nº 135, Seção 1, 3-4 p.
- Sevilla, R. G., Diez, A., Noren, M., Mouchel, O., Jerome, M., Verrezbagnis, V., Van Pelth, H., Favre- Krey, L., Krey, G., Consortium, T. F. & Bautista, J. M. (2007). Primers and polymerase chain reaction conditions for DNA Barcode teleost fish based on the mitochondrial cytochrome b and nuclear rhodopsin genes. *Molecular Ecology Notes* 7: 730 734.
- Tavares, E.S., Goncalves, P., Miyaki, CY, Baker, A.J (2011). DNA Barcode Detects High Genetic Structure within Neotropical Bird Species. *PLoS ONE* 6(12): e28543. doi:10.1371/journal.pone.0028543
- Teletchea, F., Maudet, C. & Hänni, C. (2005). Food and forensic molecular identification: update and challenges. *Trends in Biotechnology*, 23 (7): 359-366.
- UNIVALI/CTTMar (2013a). Boletim estatístico da pesca industrial de Santa Catarina – Ano 2012. Universidade do Vale do Itajaí, Centro de Ciências Tecnológicas da Terra e do Mar, Itajaí, SC. Volume 13, número 1, 66 p.
- UNIVALI/CTTMar, (2013b). Boletim estatístico da pesca industrial de Santa Catarina – Ano 2011. Universidade do Vale do Itajaí, Centro de Ciências Tecnológicas da Terra e do Mar, Itajaí, SC. Volume 12, número 1, 59 p.

- Virgilio, M., Jordaens, K., Breman, F. C., Backeljau, T. & De Meyer, M. (2012). Identifying Insects with Incomplete DNA Barcode Libraries, African Fruit Flies (Diptera: Tephritidae) as a Test Case. *PLoS ONE* 7(2): e31581. doi:10.1371/journal.pone.0031581
- Ward, R. D., Zemlak, T. S., Innes, B. H., Last, P. R. & Hebert, P. D. (2005). DNA Barcode Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, v. 360, n. 1462, p.1847-57.
- Wasser, S. K., Clark, J. W., Drori, O., Kisamo, S. E. Mailand, C., Mutayoba, B., & Stephens, M. (2008). Combating the illegal trade in African elephant ivory with DNA forensics. *Conservation Biology*, 22(4), 1065-1071.
- Webb, J. M., Jacobus, L. M., Funk, D. H., Zhou, X., Kondratieff, B., Geraci, C. J., ... & Hebert, P. D. (2012). A DNA barcode library for North American Ephemeroptera: progress and prospects. *Plos One*, 7(5), e38063.
- Yan, D., Luo, J. Y., Han, Y. M., Peng, C., Dong, X. P., Chen, S. L., ... & Xiao, X. H. (2013). Forensic DNA barcoding and bio-response studies of animal horn products used in traditional medicine. *PloS one*, 8(2), e55854.
- Zhang, J. (2011). Species identification of marine fishes in China with DNA Barcode. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v 2011p. 1-10.



WWW.ARKIVE.ORG

7. ANEXOS

ANEXOS

Anexo 1 – Espécies identificadas no estudo



Xiphias gladius - Espadarte



Istiophorus platypterus – Agulhão Vela



Kajikia albida – Agulhão Branco

Anexo 2 – Instrução Normativa nº 12/2005

DOU 15.07.2005

INSTRUÇÃO NORMATIVA SEAP Nº- 12, DE 14 DE JULHO DE 2005 O SECRETÁRIO ESPECIAL DE AQUICULTURA E PESCA DA PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA, no uso da atribuição que lhe confere o art. 23 da Lei nº 10.683, de 28 de maio de 2003, e tendo em vista o disposto no Decreto-Lei nº 221, de 28 de fevereiro de 1967, no Decreto 4.810, de 19 de agosto de 2003, e o que consta do Processo nº 21000.006547/2003-40, resolve:

Art. 1º Estabelecer normas e procedimentos para captura e comercialização dos agulhões brancos (*Tetrapturus albidus*), agulhões negros (*Makaira nigricans*), agulhões verdes (*Tetrapturus pfluegeri*) e agulhões vela (*Istiophorus albicans*), nas águas jurisdicionais brasileiras e alto-mar.

Art. 2º Deverão ser obrigatoriamente devolvidos ao mar todos os agulhões brancos (*Tetrapturus albidus*) e os agulhões negros (*Makaira nigricans*) que ainda se encontrarem vivos no momento do embarque pós-captura, de forma a possibilitar a maior sobrevivência dos animais.

Parágrafo único. Ficam proibidos os descartes de indivíduos de agulhões brancos (*Tetrapturus albidus*) e agulhões negros (*Makaira nigricans*) que se encontrarem mortos no momento do embarque pós-captura, bem como os de indivíduos destas espécies já beneficiados a bordo, tais como peças evisceradas, descabeçadas ou congeladas.

Art. 3º Proibir a retirada e corte da primeira nadadeira dorsal e da primeira nadadeira anal dos indivíduos de agulhões branco (*Tetrapturus albidus*), negro (*Makaira nigricans*), verde (*Tetrapturus pfluegeri*) e vela (*Istiophorus albicans*) e

autorizar, como forma de beneficiamento a bordo, a evisceração, o descabeçamento e o corte das demais nadadeiras.

§ 1º A realização de qualquer outra forma de beneficiamento diferente daquela definida no **caput** deste artigo será considerada como descaracterização das espécies a bordo, ficando os infratores sujeitos às sanções previstas no art. 4º desta Instrução Normativa.

§ 2º A primeira nadadeira dorsal e a primeira nadadeira anal somente poderão ser retiradas ou cortadas após o desembarque em infra-estruturas portuárias e de terminais pesqueiros nacionais, públicos ou particulares, ou a bordo, caso o corte e a retirada da nadadeira seja realizada por técnico brasileiro ou observador de bordo, quando designado pela Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca da Presidência da República - SEAP/PR ou pelo Ministério do Meio Ambiente - MMA, com finalidade de amostragem científica.

§ 3º Os exemplares capturados poderão ser identificados de acordo com o Anexo I desta Instrução Normativa.

Art. 4º Proibir a comercialização no mercado interno, bem como a exportação de agulhões brancos (*Tetrapturus albidus*) e de agulhões negros (*Makaira nigricans*) capturados em águas jurisdicionais brasileiras e alto mar por embarcações pesqueiras nacionais e estrangeiras arrendadas por empresas ou cooperativas de pesca brasileiras.

§ 1º Os indivíduos de agulhões brancos (*Tetrapturus albidus*) e agulhões negros (*Makaira nigricans*) desembarcados deverão ser obrigatoriamente doados às instituições científicas, hospitalares, penais e outras com fins beneficentes.

§ 2º Nos anos subseqüentes, a proibição de que trata o **caput** do art. 4º poderá ser revista em função dos resultados das avaliações sobre o estado de exploração dos agulhões brancos e negros, bem como das recomendações técnicas emanadas pelo Comitê Permanente de Gestão de Atuns e Afins, instituído pela Instrução Normativa SEAP/PR nº 04, de 25 de maio de 2004, da Secretaria Especial de Aqüicultura e Pesca da Presidência da República.

Art. 5º Os infratores das disposições contidas nesta Instrução Normativa ficarão sujeitos às sanções previstas no Decreto-Lei n.º 221, de 28 de fevereiro de 1967, na Lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998 e no Decreto n.º 3.179, de 21 de setembro de 1999.

Art. 6º Revoga-se a Instrução Normativa SEAP/PR nº 11, de 11 de novembro de 2004, da Secretaria Especial de Aqüicultura e Pesca da Presidência da República.

Art. 7º Esta Instrução Normativa entra em vigor na data de sua publicação.

JOSE FRITSCH

ANEXO I

GUIA DE IDENTIFICAÇÃO DOS AGULHÕES VELA, NEGRO, VERDE E BRANCO

1ª Espécie: Agulhão Vela - Pez Vela - Atlantic Sailfish - **Código da ICCAT:** SAI

Primeira nadadeira dorsal em forma de vela, sendo sua altura máxima, maior que a altura do corpo, contendo 42 (quarenta e dois) a 46 (quarenta e seis) raios.

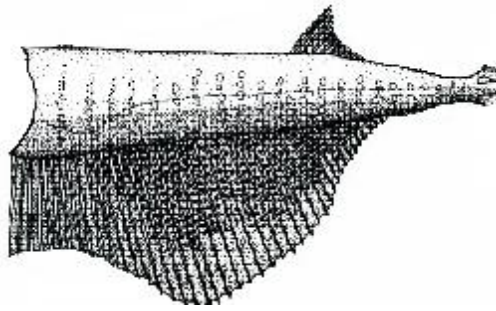


Fig.1: Aspecto geral do “charuto” do Agulhão Vela.

2ª Espécie: Agulhão Negro - Aguja Azul - Atlantic Blue Marlin - Nishikurokajiki - Hay pichi yu - (*Makaira nigricans*) **Código da ICCAT: BUM**

Primeira nadadeira dorsal com o lóbulo anterior pontiagudo (primeiro raios), sendo a altura menor que a altura máxima do corpo, apresentando 39 (trinta e nove) a 43 (quarenta e três) raios.

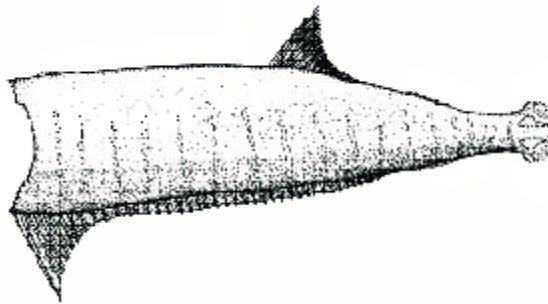


Fig.2: Aspecto geral do “charuto” do Agulhão Negro.

3ª Espécie: Agulhão Branco - Aguja Blanca - Atlantic White Marlin - Nishimakajiki - Hung jou chi yu - (*Tetrapturus albidus*) **Código da ICCAT: WHM**

Primeira nadadeira dorsal apresentando de 38 (trinta e oito) a 46 (quarenta e seis) raios, geralmente

com o lóbulo anterior arredondado e maior que a altura máxima do corpo.

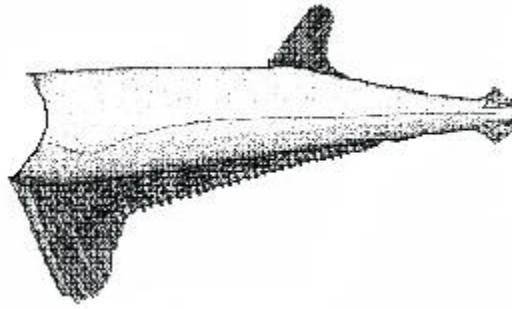


Fig.3: Aspecto geral do “charuto” do Agulhão Branco.

4ª Espécie: Agulhão Verde- Aguja Picuda -Longbill Spearfish - Kuchinagafurai - Chang wen chi yu - (*Tetrapturus albidus*) **Código da ICCAT: SPF**

Primeira nadadeira dorsal contendo 44 (quarenta e quatro) a 50 (cinquenta) raios, com lóbulo anterior arredondado, sendo sua altura maior que a altura máxima do corpo, decrescendo abruptamente depois do 9º (nono) raio e mantendo-se, a partir daí, na mesma altura até a sua extremidade final.

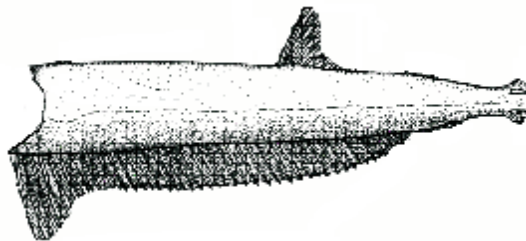


Fig.4: Aspecto geral do “charuto” do Agulhão Verde.

Observação: as nadadeiras deverão estar relaxadas no processo de conservação do pescado, e conseqüentemente seu congelamento deverá dificultar a identificação das espécies através da referida nadadeira pela impossibilidade de se “armar” esta estrutura.

Neste caso, os raios deverão ser destacados para constatação da espécie, sendo o agulhão vela facilmente identificado desta forma, e o agulhão verde

poderá ser identificado pela distância do ânus em relação a primeira nadadeira anal



WWW.ARKIVE.ORG

APÊNDICE

8. APÊNDICE

Apêndice 1 – Identificação das amostras coletadas no CEAGESP

Numero da amostra	Espécie declarada	Similaridade	Espécie identificada	BOLD ID
8943	<i>Istiophorus platypterus</i>	100%	<i>Istiophorus platypterus</i>	ABZ5149
8945	<i>Istiophorus platypterus</i>	100%	<i>Istiophorus platypterus</i>	ABZ5149
8946	<i>Istiophorus platypterus</i>	100%	<i>Istiophorus platypterus</i>	ABZ5149
8948	<i>Istiophorus platypterus</i>	100%	<i>Istiophorus platypterus</i>	ABZ5149
8949	<i>Istiophorus platypterus</i>	100%	<i>Istiophorus platypterus</i>	ABZ5149
8950	<i>Istiophorus platypterus</i>	99,85%	<i>Istiophorus platypterus</i>	ABZ5149
8951	<i>Istiophorus platypterus</i>	100%	<i>Istiophorus platypterus</i>	ABZ5149
8952	<i>Istiophorus platypterus</i>	100%	<i>Istiophorus platypterus</i>	ABZ5149
8953	<i>Istiophorus platypterus</i>	100%	<i>Kajikia albida</i>	AAA6007
8954	<i>Istiophorus platypterus</i>	100,00%	<i>Istiophorus platypterus</i>	ABZ5149
8955	<i>Istiophorus platypterus</i>	100%	<i>Istiophorus platypterus</i>	ABZ5149
8956	<i>Istiophorus platypterus</i>	100%	<i>Kajikia albida</i>	AAA6007
8957	<i>Istiophorus platypterus</i>	98,95%	<i>Kajikia albida</i>	AAA6007
8958	<i>Istiophorus platypterus</i>	95,01%	<i>Kajikia albida</i>	AAA6007
8959	<i>Istiophorus platypterus</i>	99,82%	<i>Istiophorus platypterus</i>	ABZ5149
8960	<i>Istiophorus platypterus</i>	100%	<i>Istiophorus platypterus</i>	ABZ5149
8961	<i>Istiophorus platypterus</i>	100,00%	<i>Istiophorus platypterus</i>	ABZ5149
8962	<i>Istiophorus platypterus</i>	100,00%	<i>Istiophorus platypterus</i>	ABZ5149
8963	<i>Istiophorus platypterus</i>	100%	<i>Istiophorus platypterus</i>	ABZ5149

8964	<i>Istiophorus platypterus</i>	100%	<i>Istiophorus platypterus</i>	ABZ5149
8965	<i>Istiophorus platypterus</i>	100%	<i>Istiophorus platypterus</i>	ABZ5149
8966	<i>Istiophorus platypterus</i>	100%	<i>Kajikia albida</i>	AAA6007
8967	<i>Istiophorus platypterus</i>	100%	<i>Istiophorus platypterus</i>	ABZ5149
8968	<i>Istiophorus platypterus</i>	100%	<i>Istiophorus platypterus</i>	ABZ5149
8969	<i>Istiophorus platypterus</i>	100%	<i>Istiophorus platypterus</i>	ABZ5149
8970	<i>Istiophorus platypterus</i>	100%	<i>Kajikia albida</i>	AAA6007
8971	<i>Istiophorus platypterus</i>	100%	<i>Istiophorus platypterus</i>	ABZ5149
8990	<i>Istiophorus platypterus</i>	100%	<i>Istiophorus platypterus</i>	ABZ5149
8991	<i>Istiophorus platypterus</i>	100%	<i>Istiophorus platypterus</i>	ABZ5149
9126	<i>Istiophorus platypterus</i>	100%	<i>Istiophorus platypterus</i>	ABZ5149
9127	<i>Istiophorus platypterus</i>	100%	<i>Istiophorus platypterus</i>	ABZ5149
9128	<i>Istiophorus platypterus</i>	100%	<i>Istiophorus platypterus</i>	ABZ5149
9129	<i>Istiophorus platypterus</i>	100%	<i>Kajikia albida</i>	AAA6007
9130	<i>Istiophorus platypterus</i>	100%	<i>Istiophorus platypterus</i>	ABZ5149
9131	<i>Istiophorus platypterus</i>	100%	<i>Istiophorus platypterus</i>	ABZ5149
9132	<i>Istiophorus platypterus</i>	100%	<i>Istiophorus platypterus</i>	ABZ5149
9134	<i>Istiophorus platypterus</i>	100%	<i>Istiophorus platypterus</i>	ABZ5149
9135	<i>Istiophorus platypterus</i>	100%	<i>Istiophorus platypterus</i>	ABZ5149
9136	<i>Istiophorus platypterus</i>	100%	<i>Istiophorus platypterus</i>	ABZ5149
9137	<i>Istiophorus platypterus</i>	100%	<i>Istiophorus platypterus</i>	ABZ5149
9139	<i>Istiophorus platypterus</i>	100%	<i>Istiophorus platypterus</i>	ABZ5149
9141	<i>Istiophorus platypterus</i>	100%	<i>Istiophorus platypterus</i>	ABZ5149
9142	<i>Istiophorus platypterus</i>	100%	<i>Istiophorus platypterus</i>	ABZ5149
9143	<i>Istiophorus platypterus</i>	100%	<i>Istiophorus platypterus</i>	ABZ5149
9144	<i>Xiphias gladius</i>	100%	<i>Xiphias gladius</i>	AAA6300

9145	<i>Xiphias gladius</i>	100%	<i>Xiphias gladius</i>	AAA6300
9146	<i>Xiphias gladius</i>	100%	<i>Xiphias gladius</i>	AAA6300
9147	<i>Xiphias gladius</i>	100%	<i>Xiphias gladius</i>	AAA6300
9148	<i>Xiphias gladius</i>	100%	<i>Xiphias gladius</i>	AAA6300
9149	<i>Xiphias gladius</i>	100%	<i>Xiphias gladius</i>	AAA6300
9150	<i>Xiphias gladius</i>	99,77%	<i>Xiphias gladius</i>	AAA6300
9151	<i>Xiphias gladius</i>	99,47%	<i>Xiphias gladius</i>	AAA6300
9152	<i>Xiphias gladius</i>	100%	<i>Xiphias gladius</i>	AAA6300
9153	<i>Xiphias gladius</i>	100%	<i>Xiphias gladius</i>	AAA6300
9154	<i>Xiphias gladius</i>	100%	<i>Xiphias gladius</i>	AAA6300
9155	<i>Xiphias gladius</i>	100%	<i>Xiphias gladius</i>	AAA6300
9156	<i>Xiphias gladius</i>	100%	<i>Xiphias gladius</i>	AAA6300
9157	<i>Xiphias gladius</i>	100%	<i>Xiphias gladius</i>	AAA6300
9158	<i>Xiphias gladius</i>	99,85%	<i>Xiphias gladius</i>	AAA6300
9159	<i>Xiphias gladius</i>	100%	<i>Xiphias gladius</i>	AAA6300
9160	<i>Xiphias gladius</i>	100%	<i>Xiphias gladius</i>	AAA6300
9161	<i>Xiphias gladius</i>	100%	<i>Xiphias gladius</i>	AAA6300
9162	<i>Xiphias gladius</i>	100%	<i>Xiphias gladius</i>	AAA6300
9163	<i>Xiphias gladius</i>	100%	<i>Xiphias gladius</i>	AAA6300
9164	<i>Xiphias gladius</i>	100%	<i>Xiphias gladius</i>	AAA6300
9165	<i>Istiophorus platypterus</i>	100%	<i>Istiophorus platypterus</i>	ABZ5150
9166	<i>Istiophorus platypterus</i>	99,85%	<i>Istiophorus platypterus</i>	ABZ5150
9167	<i>Istiophorus platypterus</i>	99,84%	<i>Istiophorus platypterus</i>	ABZ5150
9170	<i>Istiophorus platypterus</i>	100%	<i>Istiophorus platypterus</i>	ABZ5150
9171	<i>Istiophorus platypterus</i>	100%	<i>Istiophorus platypterus</i>	ABZ5150
9172	<i>Istiophorus platypterus</i>	100%	<i>Istiophorus platypterus</i>	ABZ5150

Apêndice 2- Identificação das amostras coletadas Aeroporto Internacional de São Paulo.

Número da amostra	Espécie declarada	Similaridade	Espécie identificada
8153	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8154	<i>Xiphias gladius</i>	99,84%	<i>Xiphias gladius</i>
8155	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8156	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8157	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8158	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8160	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8161	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8162	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8163	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8164	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8165	<i>Xiphias gladius</i>	99,38%	<i>Xiphias gladius</i>
8166	<i>Xiphias gladius</i>	99,66%	<i>Xiphias gladius</i>
8167	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8168	<i>Xiphias gladius</i>	99,65%	<i>Xiphias gladius</i>
8169	<i>Xiphias gladius</i>	99,51%	<i>Xiphias gladius</i>
8170	<i>Xiphias gladius</i>	99,69%	<i>Xiphias gladius</i>
8171	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8172	<i>Xiphias gladius</i>	99,53%	<i>Xiphias gladius</i>
8173	<i>Xiphias gladius</i>	99,83%	<i>Xiphias gladius</i>
8174	<i>Xiphias gladius</i>	99,85%	<i>Xiphias gladius</i>
8175	<i>Xiphias gladius</i>	99,65%	<i>Xiphias gladius</i>
8176	<i>Xiphias gladius</i>	99,14%	<i>Xiphias gladius</i>
8177	<i>Xiphias gladius</i>	99,55%	<i>Xiphias gladius</i>
8178	<i>Xiphias gladius</i>	99,67%	<i>Xiphias gladius</i>
8179	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8180	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8181	<i>Xiphias gladius</i>	99,83%	<i>Xiphias gladius</i>
8182	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8183	<i>Xiphias gladius</i>	99,68%	<i>Xiphias gladius</i>
8184	<i>Xiphias gladius</i>	99,63%	<i>Xiphias gladius</i>
8186	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8187	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8188	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8191	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8192	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8194	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8195	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>

8197	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8198	<i>Xiphias gladius</i>	99,85%	<i>Xiphias gladius</i>
8199	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8200	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8201	<i>Xiphias gladius</i>	98,71%	<i>Xiphias gladius</i>
8202	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8203	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8204	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8205	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8206	<i>Xiphias gladius</i>	98,53%	<i>Xiphias gladius</i>
8208	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8209	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8210	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8211	<i>Xiphias gladius</i>	99,85%	<i>Xiphias gladius</i>
8212	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8213	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8214	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8215	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8216	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8217	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8218	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8219	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8220	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8221	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8222	<i>Xiphias gladius</i>	99,52%	<i>Xiphias gladius</i>
8223	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8224	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8225	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8226	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8227	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8228	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8229	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8230	<i>Xiphias gladius</i>	99,85%	<i>Xiphias gladius</i>
8231	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8232	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8233	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8234	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8235	<i>Xiphias gladius</i>	99,84%	<i>Xiphias gladius</i>
8236	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8237	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8238	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8239	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8240	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8241	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>

8242	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8243	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8244	<i>Xiphias gladius</i>	99,66%	<i>Xiphias gladius</i>
8245	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8246	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8247	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8248	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8249	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8250	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8251	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8252	<i>Xiphias gladius</i>	99,85%	<i>Xiphias gladius</i>
8253	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8254	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8255	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8256	<i>Xiphias gladius</i>	99,85%	<i>Xiphias gladius</i>
8257	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8258	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8259	<i>Xiphias gladius</i>	99,85%	<i>Xiphias gladius</i>
8260	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8261	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8262	<i>Xiphias gladius</i>	99,85%	<i>Xiphias gladius</i>
8263	<i>Xiphias gladius</i>	99,84%	<i>Xiphias gladius</i>
8264	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8265	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8266	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8267	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8268	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8269	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8270	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8271	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8272	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8273	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8274	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8275	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8276	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8277	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8278	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8279	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8280	<i>Xiphias gladius</i>	99,67%	<i>Xiphias gladius</i>
8281	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8282	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8283	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8284	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8285	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>

8286	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8287	<i>Xiphias gladius</i>	99,63%	<i>Xiphias gladius</i>
8568	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8569	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8570	<i>Xiphias gladius</i>	99,85%	<i>Xiphias gladius</i>
8571	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8572	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8573	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8574	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8575	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8576	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8577	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8590	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8591	<i>Xiphias gladius</i>	99,62%	<i>Xiphias gladius</i>
8592	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8593	<i>Xiphias gladius</i>	99,85%	<i>Xiphias gladius</i>
8594	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8595	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8596a	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8596b	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8597	<i>Xiphias gladius</i>	99,35%	<i>Xiphias gladius</i>
8598	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8599	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8600	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8601	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8602	<i>Xiphias gladius</i>	99,84%	<i>Xiphias gladius</i>
8603	<i>Xiphias gladius</i>	99,84%	<i>Xiphias gladius</i>
8604	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8605	<i>Xiphias gladius</i>	99,67%	<i>Xiphias gladius</i>
8606	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8607	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8608	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8609	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8610	<i>Xiphias gladius</i>	99,85%	<i>Xiphias gladius</i>
8611	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8612	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8613	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8614	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8615	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8616	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8617	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8618	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8619	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8620	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>

8621	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8622	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8623	<i>Xiphias gladius</i>	99,85%	<i>Xiphias gladius</i>
8624	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8625	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8626	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8627	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8628	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8629	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8630	<i>Xiphias gladius</i>	99,85%	<i>Xiphias gladius</i>
8631	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8632	<i>Xiphias gladius</i>	99,85%	<i>Xiphias gladius</i>
8633	<i>Xiphias gladius</i>	99,85%	<i>Xiphias gladius</i>
8634	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8635	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8636	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8638	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8639	<i>Xiphias gladius</i>	99,85%	<i>Xiphias gladius</i>
8640	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8641	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8642	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8643	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8644	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8645	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8646	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8647	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8648	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8649	<i>Xiphias gladius</i>	99,85%	<i>Xiphias gladius</i>
8650	<i>Xiphias gladius</i>	99,85%	<i>Xiphias gladius</i>
8651	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8652	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8656	<i>Xiphias gladius</i>	99,83%	<i>Xiphias gladius</i>
8657	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8658	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8660	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8661	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8662	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8663	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8664	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8665	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8666	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8667	<i>Xiphias gladius</i>	99,85%	<i>Xiphias gladius</i>
8668	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8669	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>

8671	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8672	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8673	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8674	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8675	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8676	<i>Xiphias gladius</i>	99,85%	<i>Xiphias gladius</i>
8677	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8678	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>
8680	<i>Xiphias gladius</i>	100,00%	<i>Xiphias gladius</i>