

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

RAUL BARRERA CAMACHO OLIVEIRA

GENÉTICA MOLECULAR NA IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE RAIAS
EXPLORADAS COMERCIALMENTE NO ESTADO DE SÃO PAULO



MESTRADO

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**GENÉTICA MOLECULAR NA IDENTIFICAÇÃO DE
ESPÉCIES DE RAIAS EXPLORADAS COMERCIALMENTE
NO ESTADO DE SÃO PAULO**

RAUL BARRERA CAMACHO OLIVEIRA

MESTRADO

**Botucatu, SP
2020**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Genética molecular na identificação de espécies de raias exploradas comercialmente no estado de São Paulo

RAUL BARRERA CAMACHO OLIVEIRA

FÁBIO PORTO-FORESTI

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para a obtenção da qualificação em mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia).

**Botucatu, SP
2020**

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

Oliveira, Raul Barrera Camacho.

Genética molecular na identificação de espécies de
raias exploradas comercialmente no estado de São Paulo /
Raul Barrera Camacho Oliveira. - Botucatu, 2020

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

Orientador: Fábio Porto Foresti
Capes: 20400004

1. Raia (Peixe) - Identificação. 2. Elasmobrânquios.
3. DNA. 4. Contrabando.

Palavras-chave: Chondrichthyes; Comércio ilegal; DNA
Barcode.

*“A única coisa necessária para o mal
triunfar é que as pessoas boas não façam
nada.”*

Edmund Burke

***Dedico este trabalho ao meu avô Eustácio.
Você é um exemplo a ser seguido.***

Agradecimentos

O meu agradecimento especial às instituições e pessoas que contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho, em particular:

A Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, pela formação concedida ao longo de sete anos incríveis.

Aos professores do curso de Ciências Biológicas que me acompanharam durante a minha graduação, sendo fundamentais em meu desenvolvimento na vida acadêmica.

Ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, campus de Botucatu, pela oportunidade de ingressar na pós-graduação.

Aos funcionários do Instituto de Biociências de Botucatu, em especial ao Davi, por todo o auxílio durante os anos de mestrado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e CTG Brasil, pelo auxílio concedido.

Ao Laboratório de Genética de Peixes, por toda a estrutura e encaminhamento profissional, além de se tornar minha segunda casa em minha estadia em Bauru.

Ao apoio do IBAMA, em especial aos agentes Carlos Egberto Rodrigues Junior, Daniel Carvalho e Lucas Tino pela parceria. Sem vocês a construção desse trabalho não seria possível.

A banca examinadora, Prof. Dr. Mário Luís Orsi e Dra. Vanessa Paes da Cruz, pelas sugestões e correções.

Ao professor Fábio Porto-Foresti, pela oportunidade, amizade e por sua orientação. Em meio a tantos professores ausentes e displicentes com os orientandos, sou grato por ter um orientador que se importa com seus alunos tanto dentro quanto fora do laboratório. Acredito que independentemente do que eu escreva, eu ainda não conseguiria expressar minha gratidão por tudo que fez por mim. Por esses e outros motivos, muito obrigado, sem o seu apoio e confiança, essa conquista não seria possível.

A todos os companheiros e amigos do Laboratório de Genética de Peixes, que não são poucos. Gostaria de agradecer tanto a Aline, Andreia, Ari, Bruna, Carol Albano, Maíce, Manolo, Sandro e Will, que já se foram, quanto a Ana Luísa, Ana Paula, Caio Felipe, Caio Goes, Cahique, Carol, Diego, Fernanda, Gabriela, Júlia, Leonardo, Lilian, Mariana, Milan, Pedro, Rafael, Tarja, Yasmin e Zeni que ainda fazem parte desse laboratório. Todos vocês fizeram esses 5 anos de laboratório muito especiais. Dizem que a gente só brinca com quem a gente ama, então acho que deu pra notar que amo todos vocês.

A Bruna e ao Caio Felipe, por terem me ensinado tanto sobre genética molecular quando precisei.

Aos meus amigos de graduação Camila, Milena, Rafael e Thaís.

Ao Cahique, por ser meu parceiro de brincadeiras nos momentos de descontração no laboratório. Obrigado também pela companhia nas coletas na CEAGESP, você ajudou a fazer essas lembranças inesquecíveis!

Aos amigos que fiz em Bauru: Ana Júlia, Beca, Caio, Edgar, Eduardo, Giovanna, Ana Luísa e Karol. Muito obrigado pelos momentos de diversão. Um agradecimento especial ao Caio Goes, que se tornou um grande amigo em um momento em que não era esperado. Obrigado por ter sido um irmão quando precisei além de ter me dado um lar nesse último ano. Espero te levar como amigo pelo resto de minha vida.

Aos meus grandes amigos da Educação Física, Santiago, Drone e Camila, que fizeram meus horários de almoço muito felizes. Sentirei muita falta de vocês.

A todos os meus grandes amigos de Lins: André, Daniel, Edgar, Eduardo, Gabriel, Higor, Marcus, Santana. Eu não poderia ter pedido amigos melhores. Obrigado por todos os momentos e risadas. Apesar da distância, guardo vocês no coração.

Aos meus sogros, Jose e Marcos, por todo o apoio e acolhimento. Obrigado por serem tão carinhosos comigo e por todo apoio nesta jornada.

A minha irmã Heloisa, por me proporcionar momentos de alegria nas raras ocasiões em que nos encontramos.

Aos meus avós paternos (*in memoriam*), Mercedes e Leonel, e a minha avó materna Dora, pelo carinho e presença na minha infância. Agradeço especialmente ao meu avô Eustácio (*in memoriam*) por ter se mostrado um exemplo a ser seguido, pelo amor e zelo que demonstrou. Apesar de tudo, sempre estará presente em minha vida. À minha avó Verônica, por sempre ter se importado genuinamente comigo e ter me mostrado que não são laços de sangue que fazem uma família, mas sim o amor e a lealdade.

A minha namorada, Angela, que me deu força e coragem, me apoiando em momentos de cansaço, desânimo e dificuldade. Sei que as vezes não sou uma pessoa muito fácil, mas você sempre esteve presente por mim quando precisei, e por isso sou infinitamente grato e espero um dia poder fazer o mesmo por você! Obrigado também pela paciência e por, apesar da distância, fazer meus dias em Bauru mais felizes. Amo muito você!

Aos meus irmãos, Higor e Sarah, por apesar das brigas passadas, sempre estarem presentes em minha vida. Eu não poderia ter escolhido irmãos mais companheiros e carinhosos. Gostaria de agradecer também ao meu cunhado Vitor, por ter se tornado um irmão mais velho pra mim. Amo muito vocês.

E, finalmente, aos meus pais, Luiz Sérgio e Débora. Muito obrigado pelo carinho, apoio e amor incondicional. Em especial a você mãe, por ser uma mulher forte e não medir esforços em ajudar a mim e aos meus irmãos. Você é uma pessoa que sei que sempre posso contar e sua casa, um lugar que sempre posso voltar. Sei que fez muitos sacrifícios por mim e espero que hoje esteja orgulhosa. Amo muito vocês, e espero, um dia, poder retribuir tudo o que fizeram e fazem por mim.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte de minha formação, o meu muito obrigado.

RESUMO

As raias são elasmobrânquios que apresentam o corpo achatado dorso-ventralmente, além de cinco a sete pares de fendas branquiais que se encontram na região ventral do corpo e nadadeiras peitorais desenvolvidas e fundidas à cabeça. No Brasil, existem 29 espécies de raias em perigo de extinção de acordo com a Lista Vermelha da IUCN. As espécies de raias comercializadas muitas vezes são de difícil identificação devido à descaracterização, o que pode ser solucionado com o uso da técnica *DNA Barcode*, a qual é um sistema de identificação molecular baseado em uma sequência de DNA mitocondrial Citocromo Oxidase subunidade I (COI), atuando como código de barras de DNA de cada espécie. Esse sistema tem sido utilizado com êxito para identificar amostras que são comercializadas descaracterizadas e de forma ilegal. Desta forma, a técnica de *DNA Barcode* foi utilizada para a identificação de amostras de raias comercializadas em peixarias no estado de São Paulo e na CEAGESP, com o intuito de identificar quais são as espécies utilizadas no comércio e se atualmente ocorre a venda de espécies ameaçadas de extinção, assim como validar a técnica como ferramenta de rotina para controle de qualidade relacionado ao mercado de raias. Foram coletados 239 amostras, das quais 82 foram identificadas como espécies de raias, sendo elas *Paratrygon aiereba* (40,24%), *Gymnura altavela* (14,63%), *Potamotrygon motoro* (13,41%), *Hypanus dipterurus* (10,98%), *Atlantoraja castelnaui* (9,76%), *Hypanus americanus* (4,88%), *Atlantoraja platana* (2,44%) e *Bathytoshia centroura* (2,44%), das quais *B. centroura*, *P. aiereba*, *G. altavela* e *A. castelnaui* possuem o comércio proibido pela Portaria Portaria 445/2014 por estarem em risco de extinção no país. Das 157 amostras restantes, 151 não apresentaram uma extração de DNA de qualidade, provavelmente devido ao uso de aditivos alimentares com o uso comercial proibido ou restrito, além de 6 amostras identificadas como as espécies de bactérias *Shewanella putrefaciens* ou *Shewanella baltica*, as quais estão relacionadas ao estado de putrefação do pescado. A técnica de *DNA Barcode* se mostrou eficiente para a identificação para espécies de raias, sendo uma alternativa para substituir a identificação morfológica, usada atualmente pelos órgãos competentes responsáveis pela fiscalização desses produtos.

ABSTRACT

Skates and stingrays are elasmobranch fish that display the body dormant ventrally, as well as five to seven pairs of branchial staves that separate into the ventral region of the body and pectoral fins that are fused to the head. There are currently 29 endangered species of skates and stingrays in Brazil according to the IUCN Red List. The marketed species of the group are often difficult to identify due to decharacterization, which can be solved using the DNA Barcode analysis, a molecular identification system based on a mitochondrial Cytochrome Oxidase subunit I (COI) DNA sequence that acts as a barcode of the DNA of each species. This system has been successfully used to identify illegally uncharacterised types of products. Thus, the DNA Barcode technique was used to identify species of stingrays and skates that are traded in fishmongers in the state of São Paulo and CEAGESP, in order to identify which species are marketed and if the sale of endangered species currently occurs, as well as validate a technique as a routine tool for quality control related to the group species. 239 specimens were collected, of which 82 were identified as species of stingrays and rays, which were *Paratrygon aiereba* (40,24%), *Gymnura altavela* (14,63%), *Potamotrygon motoro* (13,41%), *Hypanus dipterurus* (10,98%), *Atlantoraja castelnaui* (9,76%), *Hypanus americanus* (4,88%), *Atlantoraja platana* (2,44%) and *Bathytoshia centroura* (2,44%), of which *B. centroura* and *P. aiereba*, *G. altavela* and *A. castelnaui* have their commercializations prohibited by Ordinance 445/2014 once they are in risk of extinction in the country. Of the 157 remaining samples, 151 did not show quality DNA extraction, probably due to the use of food additives with prohibited or restricted commercial use, in addition to 6 samples identified as the species of bacteria *Shewanella putrefaciens* or *Shewanella baltica*, which are related to the state of putrefaction of the fish. The DNA Barcode technique proved to be efficient for the identification of streak species, being an alternative to replace the morphological identification, currently used by the competent bodies responsible for the inspection of these products.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	Considerações gerais sobre as espécies de estudo	14
1.2	Comércio de pescado no Brasil com enfoque em raias.....	16
1.3	Uso de marcadores moleculares na identificação de pescado.....	19
1.4	A legislação e o comércio de raias	24
2	OBJETIVOS.....	28
2.1	Objetivo geral.....	28
2.2	Objetivos específicos	28
3	MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1	Coleta de amostras	30
3.1.1	Coleta no comércio atacadista	31
3.1.2	Coleta em peixarias.....	32
3.2	Análises moleculares.....	32
3.2.1	Extração de DNA.....	32
3.2.2	Amplificação do gene COI.....	34
3.2.3	Limpeza das amostras e sequenciamento do DNA	35
3.3	Identificação das espécies	38
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1	Análise das espécies de raias comercializadas	40
4.2	<i>Barcode</i> como técnica de identificação de espécies de raias comerciali- zadas.....	56
5	CONCLUSÃO.....	60
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
8	ANEXOS	87
9	APÊNDICE.....	90



INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais sobre as espécies de estudo

Os Chondrichthyes foram inicialmente caracterizada como um grupo primitivo e de baixo sucesso evolutivo (Mallatt, 1996). Entretanto, a classe se mostrou uma linhagem derivada de peixes adaptados aos ambientes que habitam, com uma ampla distribuição e grande diversidade de espécies (Dulvy *et al.*, 2014; Giles *et al.*, 2015). Dentro dos Chondrichthyes, o grupo dos elasmobrânquios é representado pelos tubarões e raias, os quais apresentam de 5 a 7 pares de fendas branquiais ao longo do corpo (Compagno, 1999). Relata-se que existam cerca de 1.405 espécies da subclasse distribuídas em 62 famílias (Frickle, 2020).

O grupo apresenta diversos hábitos alimentares, variando desde planctívoros até predadores de topo de cadeias tróficas, habitando ambientes pelágicos, abissais, demersais, estuarinos e dulcícolas (Ferretti *et al.*, 2010; Couturier *et al.*, 2012; Heithaus *et al.*, 2012). Apesar disso, raias e tubarões são animais que apresentam características como crescimento lento, maturidade sexual tardia e baixa produção de filhotes, o que acarretam em pequenas taxas de crescimento populacional (Cortés, 2000; Pikitch *et al.*, 2008). Assim, suas populações podem suportar moderados níveis de pesca sem sofrer uma diminuição e colapso de seus estoques (Dulvy & Forrest, 2010).

Dentro dos elasmobrânquios, a superordem Batoidea é composta pelas raias, peixes-serra e raias-viola, a qual compreende mais da metade da diversidade de espécies de Chondrichthyes (674 espécies distribuídas em 26 famílias) e apresenta algumas características apomórficas se comparada com os tubarões, como fendas

brânquiais na posição ventral do corpo e a presença da cartilagem sinarcual, a qual é formada pela fusão de um número variável das vértebras anteriores (Claeson, 2011; Last *et al.*, 2016; Frickle, 2020). O grupo inclui formas corporais díspares como peixes-serra com serras rostrais alongadas, mantas com 7 metros de largura e raias com o corpo em forma de pires, capazes de gerar fortes descargas elétricas a partir de músculos branquiais modificados (Aschliman *et al.*, 2012).

As raias apresentam grande importância ecológica, sendo classificadas como elementos terciários ou predadores de topo de cadeia, realizando importantes ligações entre níveis tróficos inferiores, determinando seus tamanhos através de efeitos diretos e indiretos das relações entre predadores e presas (Ferretti *et al.*, 2010). Por exercerem esse papel, as raias podem ser consideradas espécies-chave, uma vez que alterações em suas abundâncias podem modificar as relações tróficas da comunidade (Heithaus *et al.*, 2008).

No Brasil existem dois Planos de Ação Nacionais (PANs) que contemplam espécies de raias, sendo eles o Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Tubarões e Raias Marinhos Ameaçados de Extinção (2014) e o Plano Nacional de Ação Nacional para a Conservação dos Peixes da Amazônia Ameaçados de Extinção (2019). O primeiro abrange 55 espécies de elasmobrânquios marinhos que habitam o território nacional, enquanto o segundo é dirigido a 38 espécies ameaçadas na bacia amazônica, incluindo duas espécies de raias. Os planos contam com estratégias como estímulo à pesquisa e monitoramento para promover a conservação e uso sustentável das espécies-alvo, além da sensibilização dos pescadores e da sociedade acerca da importância dos elasmobrânquios e de sua conservação para a integridade dos ecossistemas marinhos (ICMBio 2014; 2019).

De acordo com o Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção (2018) existem 24 espécies de raias que habitam as águas brasileiras em risco de extinção (Apêndice 1), número que sobe para 29 de acordo com a Lista Vermelha da IUCN de 2019 (Apêndice 2). Ademais, o número de espécies ameaçadas se diferencia ainda mais se utilizarmos a plataforma da *Convention of International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora* – CITES (2019) como base, a qual apresenta um número inferior, com 20 espécies de elasmobrânquios ameaçados em território nacional (Apêndice 3).

Além das espécies ameaçadas, muitas outras, incluindo a maioria das espécies de raias dulcícolas, estão classificadas como DD (Dados Insuficientes). Se encontram nessa categoria os animais que carecem de informações adequadas acerca do estado de conservação com base no status das populações e distribuição. Portanto, apesar das espécies classificadas como DD não se encontrarem em um status de extinção, muitas delas podem estar nesse processo sem que haja conhecimento pela falta de estudos (IUCN, 2019).

1.2 Comércio de pescado no Brasil com enfoque em raias

O pescado está entre os mais importantes recursos renováveis do planeta, pois além das funções ecológicas essenciais que os peixes e crustáceos desempenham nos oceanos, os mesmos possuem grande importância para o bem-estar humano por gerarem empregos na cadeia produtiva da pesca e proporcionarem uma sólida segurança alimentar aos países costeiros por serem uma fonte de proteínas de alto valor biológico, sendo os produtos mais importantes de exportação em países em desenvolvimento (Sumaila *et al.*, 2012; Barbosa, 2015; FAO, 2018).

Por essas razões, a produção mundial de pescado aumentou significativamente desde o século passado, uma vez que na sua primeira década era de cerca de 8,5 milhões de toneladas anuais, e atualmente a produção mundial beira 170 milhões de toneladas por ano (FAO, 2019). Tal crescimento ocorreu especialmente em virtude do crescimento da aquicultura, que alcançou por volta de 80 milhões de toneladas em 2016, enquanto a pesca está estabilizada há algumas décadas em cerca de 90 milhões de toneladas, havendo também um incremento significativo no consumo *per capita* mundial de pescado que aumentou de 10 kg em 1960 para 20,3 kg em 2017 (FAO, 2019).

Entretanto, a pesca não manejada é uma das principais ameaças à biodiversidade marinha (Dulvy *et al.*, 2014). Além disso, as fraudes em seu comércio tem sido um dos grandes problemas vividos por processadores, comerciantes e consumidores. Fato que ocorre em parte pela não padronização de nomes comerciais e pela grande diversidade de espécies de peixes, crustáceos, moluscos e outros animais tidos como pescado (Brasil, 2008^a; Barbosa, 2015).

No Brasil, a pesca envolve mais de dois milhões de pessoas, fazendo com que grande parte das espécies com importância comercial esteja sob um cenário de sobre-exploração (IBGE, 2013). A falta de ordenamento e um histórico do setor é um dos principais fatores responsáveis por essa grave crise de sustentabilidade no uso dos recursos pesqueiros (Abdallah & Sumaila, 2007; Castello, 2007). Além de ações diretamente relacionadas à gestão pesqueira, estratégias baseadas no mercado, como guias de consumo e certificações para o comércio também podem ajudar a reverter esse quadro, alavancando mudanças importantes na cadeia produtiva da pesca (Gutiérrez *et al.*, 2012).

Nos últimos anos, a pesca se apresenta como a principal ameaça à espécies de raias e tubarões, juntamente com ameaças como a degradação do ambiente e mudanças climáticas, sendo que dos anos de 2007 até 2013, somente na Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo – CEAGESP foram vendidos 1.212.964 kg (R\$ 2.267.271,70) de cação raia (Simpfendorfer *et al.*, 2011; CEAGESP, 2016).

A CEAGESP é responsável por realizar grande parte do comércio atacadista de pescado no estado de São Paulo, possuindo a segunda mais importante feira atacadistas de pescado da América Latina. A mesma é responsável por comercializar diariamente 200 toneladas de aproximadamente 97 espécies de pescado, dos quais 27% vem do Sudeste, 19,97% do Sul, 7,47% do Nordeste, 0,24% do Centro-Oeste e 0,23% do Norte, onde apenas cerca de 10% correspondem a espécies dulcícolas (Neiva *et al.*, 2010; CEAGESP, 2016).

Além da sobrepesca, outro agravante no comércio brasileiro de raias é a falta de controle das espécies pescadas e vendidas, uma vez que tanto nos rótulos dos produtos quanto na Estatística de Pesca são utilizadas a nomenclatura de “raia”, não apresentando maiores informações sobre a classificação taxonômica dos indivíduos (MPA, 2011).

Além disso, o comércio de raias apresenta uma baixa especificidade do NCM (Nomenclatura Comum do Mercosul), que possui somente uma combinação de números que abrange todas as espécies de raias - NCM 0303.82.00 (Federal, 2018). O NCM é um número de oito dígitos que foi criado com o objetivo de classificar mercadorias para os países do bloco, facilitando a identificação de produtos comercializados e dos tributos que incidem sobre eles.

1.3 Uso de marcadores moleculares na identificação de pescado

A carne animal é frequentemente sujeita a longas cadeias de produção e distribuição, fazendo com que os sistemas de identificação sejam dificultados, visto que em grande parte das vezes a mesma é realizada com base na morfologia dos produtos. Assim, além de rótulos, que não fornecem garantias suficientes sobre o conteúdo real de um produto, são necessários métodos precisos para identificar a composição da carne e proteger os consumidores e produtores contra fraudes e amparar espécies animais contra exploração excessiva ou comércio ilegal (Galimberti *et al.*, 2013; Quinto *et al.*, 2016).

Em peixes, a identificação é de extrema importância, tanto em ovos, alevinos, adultos e em seus produtos, pois proporciona a detecção de substituições de espécies em operações comerciais, assistindo a sustentabilidade, o manejo e a pesca a longo prazo, assim como na solução de possíveis dúvidas taxonômicas, como é o caso do gênero *Rhamdia* e muitos outros (Metcalf *et al.*, 2007; Carvalho *et al.*, 2008; Smith *et al.*, 2008; Tresbach *et al.*, 2015; Almeida *et al.*, 2018). Na Europa e América do Norte, estudos recentes com marcadores genéticos relataram que as fraudes comerciais variam de 15% a 43% do total de pescados, com 75% de fraudes no caso do cioba - *Lutjanus campechanus* (Rasmussen & Morrissey, 2008; Hellberg & Morrissey, 2011).

Assim, uma variedade de abordagens baseadas no DNA para rastreabilidade de peixes e outros tipos de carnes foi desenvolvida, uma vez que o DNA normalmente é mais resistente a processos industriais do que outras moléculas, como proteínas (Teletchea *et al.*, 2005; Mane *et al.*, 2006; Novak *et al.*, 2007; Araújo, 2017). Como aplicado ao mercado de carne, as relações entre sequências de DNA e

nomes de espécies devem ser criticamente avaliadas, uma vez que o nome comercial do produto pode se referir a diferentes unidades moleculares (Casiraghi *et al.*, 2010).

Em geral, os métodos baseados em DNA usam sequências específicas como marcadores fundamentados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que envolvem a amplificação de loci-alvo usando primers específicos e uma enzima DNA polimerase, sendo extremamente sensíveis e frequentemente mais rápidos do que outras tecnologias, fazendo com que os mesmos sejam amplamente utilizados na agricultura e aquicultura (Mugimba *et al.*, 2018; Nikitin *et al.*, 2018; Leira *et al.*, 2019; López-Porras *et al.*, 2019).

Além disso, a identificação por meio desses marcadores tem se mostrado útil por poder ser realizada com pequenas amostras de tecido que independem do estado de modificação que o pescado possa apresentar. Diferentes regiões do genoma, tanto mitocondrial como nuclear, tem sido utilizadas para a identificação de espécies de organismos aquáticos de importância econômica (Kyle & Wilson, 2007; Sevilla *et al.*, 2007).

Um dos genes utilizados na identificação de organismos é o gene mitocondrial Citocromo Oxidase subunidade I (COI), que consiste em uma sequência de aproximadamente 650 pares de base. DNA mitocondrial é haploide, abundante e sua transmissão geralmente é materna com ausência de recombinação gênica, tornando-o menos diferenciado entre os indivíduos da mesma espécie (Kosmann, 2009).

Além disso, sua evolução ocorre cerca de 10 vezes mais rápido que a de genes nucleares de cópia única, o que torna este DNA excelente para a técnica de identificação genética denominada *DNA Barcode* (Hebert *et al.*, 2003^a, Hebert *et al.*,

2003^b), a qual é uma ferramenta utilizada com sucesso na identificação de diversos grupos de peixes (Darvish *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2019), aves (Hebert *et al.*, 2004^a; Johnsen *et al.*, 2010; Tavares *et al.*, 2011) e insetos (Virgilio *et al.*, 2012; Webb *et al.*, 2012; Vivero *et al.*, 2019).

O *DNA Barcode* é definido como um sistema de identificação microgenômica, 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), que posteriormente são inseridas em uma base de dados de sequências para a identificação efetiva das espécies amostradas. Critérios como nome da espécie, dados da instituição que detêm o material testemunho, dados da coleta, sequência com iniciadores usados na PCR e eletroferogramas são necessários para que aquele espécime obtenha a classificação de *Barcode* (Kosmann, 2009).

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 vasto. O levantamento de apenas 15 dessas posições de nucleotídeos cria a possibilidade aproximadamente um bilhão de códigos, 100 vezes o número necessário para discriminar um táxon existente de forma exclusiva (Hebert *et al.*, 2003^a).

Em pescados, o *DNA Barcode* tem sido utilizado com sucesso como ferramenta de identificação, como demonstrado em um trabalho realizado no Canadá, onde aproximadamente 200 espécies de peixes dulcícolas foram identificadas com sucesso utilizando a técnica (Hubert *et al.*, 2008). Outro estudo identificou mais de 200 espécies de peixes marinhos de três grupos na Austrália

(Ward *et al.*, 2005). Na China, a técnica foi utilizada na identificação de 121 espécies que compreendem a maioria dos peixes existentes no mar do Sul do país (Zhang, 2011). Na América do Sul, o *DNA Barcode* foi utilizado na identificação de 125 espécies de peixes na Argentina, solucionando possíveis incertezas taxonômicas acerca dos grupos do mesmos (Mabragaña *et al.*, 2011).

No caso de elasmobrânquios, a técnica tem se mostrado eficiente para discriminar a maioria das espécies do grupo, como comprovado em diversos estudos, uma vez que a divergência média da sequência de COI entre espécies de tubarões e raias é de 7,48% (Ward *et al.*, 2005; ; Holmes *et al.*, 2009; Ferrette *et al.*, 2019). Entretanto, apesar das aplicações da técnica de *DNA Barcode* e as vantagens de seu uso para a identificação de espécies no comércio de raias, atualmente não existe um protocolo a ser seguido pelos órgãos competentes responsáveis pela fiscalização da pesca e comércio das mesmas.

Seus benefícios como técnica de fiscalização se devem pelo fato da metodologia poder ser usada para analisar a qualidade da matéria-prima e a substituição de espécies, evidenciando fraudes comerciais, uma vez que a análise de músculo pode ocorrer mesmo após fervura, cozimento sob pressão ou fritura (Arslan *et al.*, 2006; Aslan *et al.*, 2009; Mane *et al.*, 2009). Barbuto *et al.* (2010) relatou o caso de duas espécies de *Mustelus* (*M. mustelus* e *M. asterias*) que são vendidas na Itália sob o mesmo nome comercial "Palombo". Em outros casos, diferentes nomes vernaculares estão associados à mesma espécie em diferentes regiões (Burgess *et al.*, 2005).

Entretanto, alguns conceitos empíricos sobre o *DNA Barcode* em trabalhos com invertebrados, aves e peixes apresentam controvérsias na efetividade desse sistema de identificação genética (Hebert *et al.*, 2004^b, Hogg & Hebert, 2004, Moritz

& Cicero, 2004, Ward *et al.*, 2005). Para que haja uma efetividade da técnica de *Barcode*, as sequências de DNA dentro de uma mesma espécie precisam apresentar maior similaridade do que entre espécies (Hurst & Jiggins, 2005). Além disso, em híbridos, por exemplo, isso pode gerar dúvidas taxonômicas, devido ao fato de que o mtDNA tem origem apenas materna (Carvalho *et al.*, 2008).

Outro elemento crítico pode ser a disponibilidade de repositórios de alta qualidade de sequências de referência. Por esta razão, uma amplitude de sequências de códigos de barras de DNA de animais e plantas (incluindo espécies cultivadas) foi submetido durante os últimos 10 anos para as bases de dados NCBI - *National Center for Biotechnology Information* (www.ncbi.nlm.nih.gov) e BOLD – *Barcode of Life Database* (v4.boldsystems.org/index.php), seguindo as orientações fornecidas pelo Database Working Group.

O BOLD é uma plataforma de bioinformática gratuita que auxilia na aquisição, armazenamento, análise e publicações de registros de *DNA Barcode* e reúne dados moleculares, morfológicos e de distribuição de um grande número de espécies, permitindo um fácil acesso a diversas informações obtidas de uma grande variedade de laboratórios de pesquisa que podem ser utilizadas tanto para fins de pesquisa quanto para aplicações práticas, como a rastreabilidade de produtos alimentícios (Ratnasingham & Hebert, 2007; Galimberti *et al.*, 2013).

Existem 21.413 espécies de peixes habilitadas na base de dados BOLD, das quais 619 são raias. Destas, 161 são encontradas no Brasil, das quais 94 fazem parte da ordem Rajiformes, 37 são representantes da ordem Myliobatiformes, 23 da ordem Pristiformes e 7 Torpediniformes (Ratnasingham & Hebert, 2007).

1.4 A legislação e o comércio de raias

O Brasil, por sua extensão territorial, proximidade de mercados exportadores de pescado e por apresentar uma economia emergente é um importante país importador e exportador de pescado, com produtos de alto valor no mercado externo, incluindo um significativo comércio de nadadeiras de tubarões, hipófises e outros produtos (Barbosa, 2015).

Contudo, apesar de sua importância, a cadeia nacional de comercialização do pescado possui alto nível de informalidade e baixa fiscalização, fazendo com que informações básicas como a identidade e características de identificação da grande variedade de espécies de pescado não estejam prontamente disponíveis para o consumidor e para os elos intermediários de comercialização, fazendo com que adquiram produtos adulterados ou sem procedência conhecida (Estrella *et al.*, 2016).

Do ponto de vista ambiental, erros na rotulagem mascaram um problema ainda maior, que é a comercialização de espécies proibidas ou capturadas em tamanho e épocas inadequados (Estrella *et al.*, 2016). Em muitos casos, a rotulagem errônea pode ser um simples equívoco do comerciante, mas frequentemente espécies de menor preço são rotuladas como de maior valor comercial (Neto, 2013).

No Brasil, existe um pequeno número de infrações relacionadas ao comércio de raias, sendo as principais delas: falsificação de mercadoria, venda de produtos sem nota fiscal, a proibição da prática do *finning* e comércio ilegal de espécies em extinção. O delito de falsificação de produtos alimentícios está previsto no artigo 272 do Código Penal, que descreve a conduta criminosa como crime o ato de corromper, adulterar, falsificar ou fraudar produtos alimentícios em geral, como comidas ou bebidas, com teor alcoólicos ou não, de modo que venha a trazer riscos à saúde das

pessoas ou que os produtos tenham seus valores nutritivos diminuídos (Brasil, 1998^a).

A Normativa Nº4 de 30 de maio de 2015 estabelece a obrigatoriedade do documento fiscal do pescado, tanto proveniente da atividade pesqueira quanto de aquicultura, para fins de controle de matéria-prima da fonte de produção para as indústrias beneficiadoras sob serviço de inspeção (Brasil, 2014^a).

A prática do *finning* consiste em capturar tubarões e raias para aproveitar apenas as barbatanas, que são removidas, descartando o restante do corpo do animal. O ato foi proibido junto com práticas relacionadas ao transporte e armazenamento de elasmobrânquios no país pela Instrução Normativa Interministerial MPA/MMA Nº 14, de novembro de 2012 (Brasil, 2012).

Já o monitoramento e a proibição das 24 espécies de raias ameaçadas em território nacional (Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção, 2018), junto à outras 446 espécies de animais aquáticos em risco de extinção, são assegurados pelos efeitos da portaria 445/2014 do Ministério do Meio Ambiente (Brasil, 2014^b).

É importante ressaltar que apesar de seu papel importante, desde sua publicação, a portaria deixou de considerar algumas espécies que inicialmente eram propostas, além de ter sido alvo de ações que suspenderam seus efeitos mais de uma vez, totalizando mais de um ano e meio de suspensão até 2017 (Brasil, 2016; 2017).

É importante ressaltar que tanto as infrações relacionadas à falsificação de produtos quanto à ausência do documento fiscal do pescado são classificadas como fraudes comerciais pelo Código Penal brasileiro, enquanto a venda de espécies

ameaçadas de extinção é julgada como crime ambiental (Brasil, 1998^a; Brasil, 2014^a
,^b).



OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Tendo em vista as características biológicas, evolutivas e taxonômicas dos elasmobrânquios, o crescente risco de algumas espécies de raias se tornarem extintas e o histórico sobre comércio de animais vendidos como outras espécies, este estudo buscou aplicar marcadores genéticos na identificação molecular de raias exploradas comercialmente no estado de São Paulo, podendo assim auxiliar com informações de interesse para a conservação de espécies do grupo por meio de uma fiscalização mais efetiva.

2.2 Objetivos Específicos

- 1) Identificar através da técnica genética, *DNA Barcode*, amostras de raias comercializadas na CEAGESP e em peixarias situadas em diferentes cidades do estado de São Paulo, a fim de detectar quais são as espécies de raias utilizadas no comércio, se há a venda trocada das mesmas e se ocorre a pesca de espécies ameaçadas de extinção;
- 2) Averiguar se existe uma variação nas espécies de raia de acordo com a localidade no estado de São Paulo e época do ano;
- 3) Padronizar um protocolo a ser seguido como ferramenta na fiscalização das espécies de raias comercializadas no Brasil.



MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta de amostras

No presente projeto, foram realizadas coletas em peixarias situadas em diferentes cidades do estado de São Paulo e na CEAGESP, a qual foi realizada com a parceria do IBAMA, órgão responsável pela fiscalização relacionadas à exploração, cultivo, conservação, processamento, transporte e comércio de animais aquáticos. O auxílio do órgão se deu pela disponibilidade de funcionários para acompanhar as coletas, intermediando o contato com os comerciantes dos entrepostos comerciais durante as coletas de tecido e obtenção de documentos fiscais na CEAGESP. As cidades escolhidas para as coletas em peixarias foram Bauru, Campinas e São José do Rio Preto pela distribuição das mesmas no estado (Figura 1).



Figura 1. Distribuição de cidades em que foram realizadas as coletas de amostras na América do Sul. 1) Brasil. 2) Estado de São Paulo. A) São José do Rio Preto. B) Bauru. C) Campinas. D) São Paulo.

Foram realizadas três coletas, divididas em março/abril de 2018, agosto/setembro de 2018 e dezembro de 2018/janeiro de 2019, onde foram retirados fragmentos de músculo de indivíduos comercializados com a Nomenclatura Comum do Mercosul (NCM) de raia (Nº 0303.82.00). Não foram coletadas espécies predefinidas, uma vez que as mercadorias foram vendidas somente como “raia”, não especificando a classificação a grupo de espécie.

3.1.1 Coleta no comércio atacadista

Para a coleta de amostras no comércio atacadista, foram realizadas vistorias na Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo – CEAGESP, em São Paulo, durante o ano de 2018 e janeiro de 2019 (Figura 2).

Fragmentos de músculos de raias descaracterizadas sem cabeça e cauda (NCM 0303.82.00) foram coletadas e armazenadas em tubos com álcool absoluto para fixação e posterior análise genética. Após a identificação, todo o material foi incorporado na coleção do Laboratório de Genética de Peixes (LaGenPe) da UNESP de Bauru/SP.



Figura 2. Comércio de raias morfologicamente descaracterizadas na CEAGESP em São Paulo.

3.1.2 Coleta em peixarias

Foram realizadas amostragens de músculos de postas, filés congelados inteiros e divididos em cubos de pescado comercializados como raia (NCM 0303.82.00), comercializadas em peixarias situadas em Bauru, Campinas e São José do Rio Preto durante o ano de 2018 e janeiro de 2019.

As amostras de tecidos coletadas foram fixadas em álcool absoluto visando a posterior análise molecular. Todas as amostras foram integradas à coleção do Laboratório de Genética de Peixes (LaGenPe), da UNESP de Bauru/SP.

3.2 Análises moleculares

3.2.1 Extração de DNA

Para extração de DNA foi utilizado um pequeno fragmento do tecido de aproximadamente 4 mm³ por cada amostra coletada. A extração de DNA realizada foi baseada no protocolo do Kit comercial “Wizard Genomic DNA Purification Kit – Promega”, com modificações nos tempos de ação da Proteinase K e RNase para 24 horas e 1 hora, respectivamente (Figura 3).

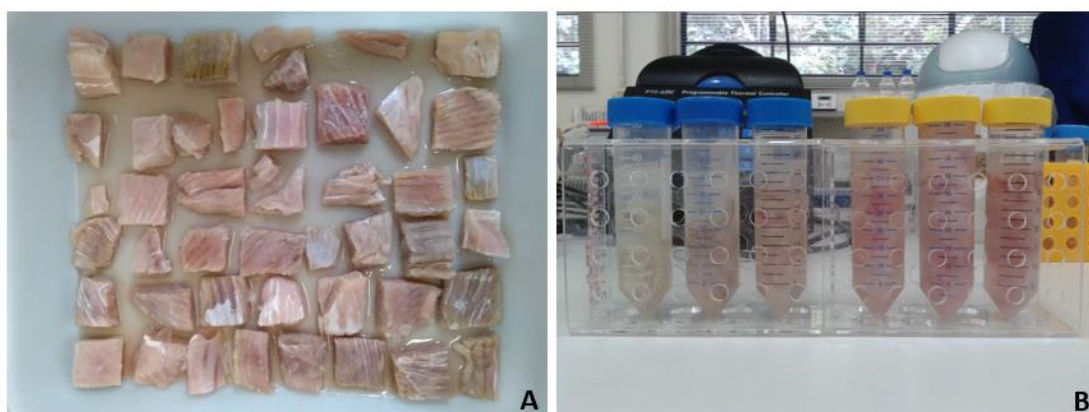


Figura 3. Fragmentos de músculos preparados para a extração de DNA. A) Conteúdo de uma embalagem comercializada em São José do Rio Preto. B) Fragmentos de músculos armazenados em álcool absoluto de exemplares coletados na CEAGESP.

Para a extração de DNA foi adotado o seguinte protocolo:

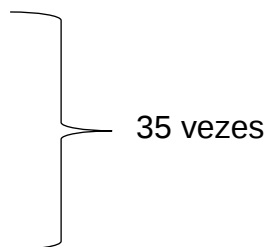
1. Numerar duas séries de microtubos de centrífuga (1,5 ml);
2. Retirar um pequeno fragmento de tecido, o adicionar aos tubos de microcentrífuga e colocar na estufa por aproximadamente 10 minutos;
3. Adicionar 300 µl de *nuclei lysis solution* ao tecido;
4. Adicionar 4,0 µl de proteinase K e passar pelo vortex;
5. Colocar em banho-maria à 60°C por aproximadamente 24 horas;
6. Retirar do banho-maria e deixar voltar à temperatura ambiente;
7. Adicionar 2,5 µl de RNase e colocar em banho-maria à 37°C por 30 minutos;
8. Retirar do banho-maria e deixar voltar à temperatura ambiente;

9. Adicionar 200 µl de *protein precipitation solution* e misturar;
10. Levar ao gelo por 10 minutos;
11. Centrifugar por 4 minutos à 13.000 rpm e descartar o sobrenadante;
12. Transferir o sobrenadante para a segunda série de microtubos de centrifuga contendo 600 µl de isopropanol e misturar por inversão;
13. Centrifugar por 4 minutos à 13.000 rpm e descartar o sobrenadante;
14. Adicionar 600 µl de etanol 70% à temperatura ambiente e centrifugar por 4 minutos à 13.000 rpm;
15. Descartar o sobrenadante e deixar secar em temperatura ambiente *overnight*;
16. Adicionar 35 µl de *DNA rehydration solution* por 12 horas em temperatura ambiente.

3.2.2 Amplificação do gene COI

Após a extração, Fragmentos de aproximadamente 650 pares de bases (bp) do gene COI foram amplificados por PCR (reação em cadeia da polimerase) testando diferentes combinações dos primers COI FishF1 Forward (5' 'ACGCCTGTTTATCAAAAACAC-3'), COI FishR1 Reverse (5' 'CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3 '), COI FishF2 Forward (5'- TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC-3') e COI FishR2 Reverse (5'- ACTTCAGGGTTACACGAGAAATCAGAA-3 ') descritos por Ward *et al.*, (2005). As reações de PCR foram conduzidas em um termociclador - Sistema ProFlex PCR (Applied Biosystems) a um volume total de 12,5 µl, incluindo 1 µl de DNA genômico na concentração de 10-30 ng / µl, 1,25 µl de tampão Taq 1X, 0,5 µl de dNTP, 0,37 µl de MgCl₂, 0,25 µl de cada primer e 0,1 µl de Taq polimerase 0,5 U (Invitrogen).

Para a reação de PCR foi adotado o programa abaixo:

- 1 - 94 °C por 3 minutos (desnaturação inicial)
 - 2 - 94 °C por 30 segundos (desnaturação)
 - 3 - 54 °C por 45 segundos (anelamento dos primers)
 - 4 - 68 °C por 1 minuto (extensão da cadeia nucleotídica)
 - 5 - 68 °C por 7 minutos (extensão final)
- 
- A vertical curly bracket on the right side of the list groups steps 2, 3, and 4. To the right of the bracket is the text "35 vezes".

Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 2% em um transluminador, sob luz ultravioleta e fotografadas com a câmera OLYMPUS, C-5060.

3.2.3 Limpeza das amostras e sequenciamento do DNA

A limpeza das amostras foi efetuada através das enzimas *Exo* e *SAP IT*[®] (*USB Corporation*) e posteriormente foi realizada a PCR para sequenciamento das amostras e purificação da PCR para sequenciamento, as quais foram analisadas em sequenciador de DNA automático ABI 3730 XL DNA Analyzer (Applied Biosystems), no Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica – CREBIO da UNESP de Jaboticabal/SP (Figura 4).



Figura 4. Ordem das práticas realizadas para montagem da placa de sequenciamento e análise dos resultados.

Os programas de limpeza das amostras e PCR para sequenciamento e o protocolo de purificação da PCR de sequenciamento estão listados à seguir.

Limpeza das amostras:

EXO-SAP

Reação: EXO – 0,05µl
 SAP – 0,05µl
H₂O MiliQ – 1,9µl
 Volume final = 2,0µl
 +
5µl de DNA (PCR)
 Volume final = 7µl

Programa: 1 hora 37°C
 15 min 80°C

PCR para sequenciamento:

Reação: H ₂ O MiliQ — 3,15µl	Programa: 2 min 96°C	} 35x
Buffer — 1,05µl	30 seg 96°C	
BigDye — 0,7µl	15 seg 54°C	
Primer — 0,7µl	4 min 60°C	
Total = 5,6µl + 1,4 DNA (purificado) = 7µl	∞ 12°C	

Protocolo de purificação da PCR de sequenciamento:

1. Adicionar 0,7 µl de EDTA (125mM) em cada poço da placa;
2. Adicionar 0,7 µl de Acetato de Sódio (3M) em cada amostra e homogeneizar bem;
3. Adicionar 17,5 µl de etanol 100% gelado;
4. Homogeneizar as amostras com leves batidas nas laterais da placa;
5. Cobrir com papel alumínio e incubar por 15 minutos a temperatura ambiente (adesivar);
6. Centrifugar por 1 hora a 3.500 rpm;
7. Retirar o excesso de líquido por inversão (usar papel toalha);
8. Adicionar 35 µl de etanol 70% gelado nas amostras;
9. Centrifugar por 30 minutos à 3.500 rpm;
10. Retirar o excesso de líquido por inversão (usar papel toalha);
11. Aquecer por 8 minutos à 95°C com a tampa do termociclador aberta e colocar papel alumínio sobre a placa para evitar luminosidade;
12. Guardar as placas em temperatura ambiente, coberta com adesivo e enrolada em papel alumínio (sequenciar o mais rápido possível).

3.3 Identificação das espécies

Para a identificação das espécies, as sequências *forward* ou *reverse* foram alinhadas no programa *Geneious 4.8.5* (Kearse *et al.*, 2012). As sequências foram submetidas nas base de dados das plataformas BOLD *The Barcode of Life Data System* – v4.boldsystems.org/index.php (Ratnasingham & Hebert, 2007) e NCBI – www.ncbi.nlm.nih.gov (NCBI, 1988), onde foram comparadas com as 100 sequências mais similares depositadas, obtendo assim uma identificação a grupo de espécie (Ratnasingham & Hebert, 2007). Foram consideradas as amostras que obtiverem similaridade acima de 98% com alguma sequência depositada na plataforma.



RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise das espécies de raias comercializadas

Durante as coletas realizadas na CEAGESP foram obtidas 43 amostras de raias, das quais 36 amostras coletadas foram vinculadas a um documento fiscal. As 7 amostras restantes estavam sendo comercializadas sem o documento necessário, fazendo com que uma multa fosse aplicada no ato (Anexo 1). Observou-se durante a coleta do material que todos os indivíduos expostos à venda se encontravam sem nadadeira caudal e cabeça, o que apesar de ser permitido por lei após o desembarque, dificulta a identificação morfológica. Já nas peixarias, não foi possível a verificação a presença do documento fiscal pela ausência de agentes do IBAMA nas amostragens. A quantidade de amostras coletadas por localidade e coleta está listada na tabela abaixo (Tabela 1):

Tabela 1. Número de exemplares coletados por época e localidade

	Bauru	São Paulo	São José do Rio Preto	Campinas
Coleta 1	32	25	46	6
Coleta 2	12	11	47	0
Coleta 3	13	7	40	0

Quantidade de indivíduos coletados em Bauru, São Paulo, São José do Rio Preto e Campinas, em março/abril de 2018, agosto/setembro de 2018 e dezembro de 2018/janeiro de 2019.

Do total de 239 amostras coletadas, 148 apresentaram problemas durante a PCR ou sequenciamento por fatores externos relacionados às condições de armazenamento durante a pesca e o comércio, além de 6 amostras que

apresentaram indícios da presença das espécies de bactérias *Shewanella putrefaciens* ou *Shewanella baltica* (Figura 5).

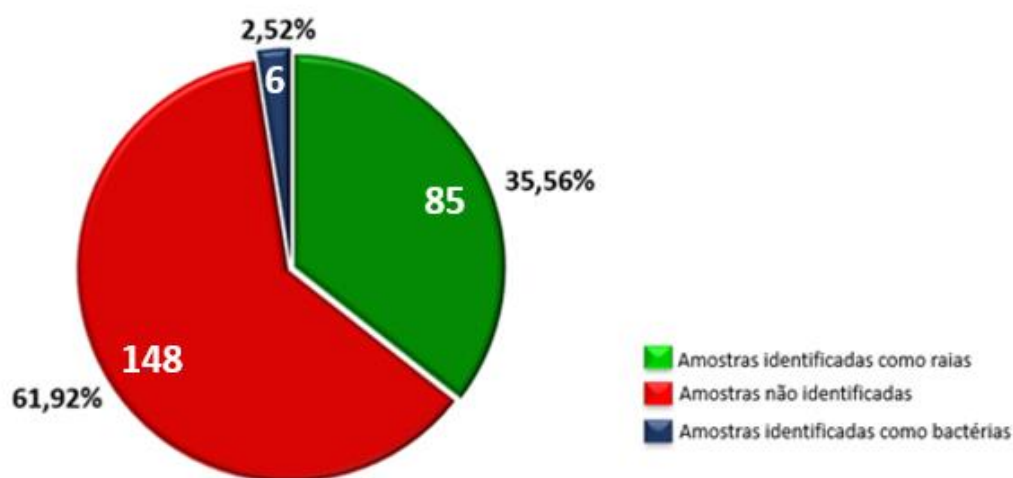


Figura 5. Porcentagem de amostras identificadas.

Apesar da identificação de bactérias em análises de tecidos de animais estar comumente relacionada à contaminação das amostras durante as práticas laboratoriais, a presença das bactérias *Shewanella putrefaciens* e *Shewanella baltica* estão, na realidade, associados ao estado de putrefação da carne, uma vez que essas espécies possuem um papel importante no processo de deterioração de alimentos congelados, como peixes, carne bovina e de aves (Gram & Huss, 1996; Gu et al., 2013; Paździor, 2016; Yang et al., 2019).

Assim como outras bactérias oportunistas, as espécies identificadas compõem a microbiota comum de peixes saudáveis, sendo encontradas em pequenas quantidades nas brânquias (Al-Harbi et al., 2008; Parkingking et al., 2015; Paździor, 2016). Entretanto, as mudanças fisiológicas acarretadas pelo início da putrefação possibilitam a multiplicação e colonização de *S. putrefaciens* e *S. baltica* em outras regiões do corpo, que produzem substâncias voláteis responsáveis pelo odor de peixe estragado (Bowman, 2005). Além disso, essas espécies são relacionadas a

cerca de 260 distúrbios de saúde descritos nos últimos 40 anos, demonstrando o significativo impacto na saúde humana (Holt *et al.*, 2005; Vignier *et al.*, 2013). Assim, a sua presença em quatro exemplares de Bauru e duas de São Paulo indicam que tais produtos estavam sendo comercializados em condições impróprias para o consumo.

A presença dessas espécies de bactérias no material comercializado em Bauru é desconhecida, enquanto na CEAGESP ela estar relacionada à prática diária de descongelamento e congelamento do material que não foi vendido, o que modifica os parâmetros de qualidade física da carne. Isso ocorre em partes pois a formação de cristais de gelo danifica a ultraestrutura e concentra os solutos na carne, o que, por sua vez, leva a alterações nas reações bioquímicas que ocorrem no nível celular e influenciam os parâmetros de qualidade física da carne, como perda de umidade, desnaturação de proteínas, oxidação de lipídios e proteínas, diferença na coloração da carne, mudança de pH e deterioração microbiana (Leygonie *et al.*, 2012).

Dentre as 85 amostras identificadas como raias, 56 obtiveram 100% de similaridade com alguma sequência depositada no *Bold Systems* ou no NCBI, 10 obtiveram similaridade entre 99% e 100%, 16 amostras obtiveram similaridade entre 98% e 99% e 3 apresentaram similaridade abaixo de 98%, as quais não foram consideradas confiáveis pelo seu relativo baixo nível de similaridade (Apêndice 4). A quantidade de amostras identificadas por coleta e localidade está listada na tabela abaixo (Tabela 2):

Tabela 2. Número de exemplares identificados como raia por coleta e localidade.

	Bauru	São Paulo	São José do Rio Preto	Campinas
Coleta 1	16	13	27	6

Coleta 2	1	3	3	0
Coleta 3	1	6	6	0

Quantidade de indivíduos coletados em Bauru, São Paulo, São José do Rio Preto e Campinas, em março/abril de 2018, agosto/setembro de 2018 e dezembro de 2018/janeiro de 2019.

O grande número de amostras não identificadas pode estar relacionado ao acréscimo de um ou mais aditivos alimentares para mascarar o estado da carne de forma ilegal, uma vez que a legislação proíbe qualquer tipo de aditivo em carnes congeladas por poderem propiciar aspectos atraentes à carne que sofreu alterações fraudulentas (Lederer, 1991; Brasil, 1998^b; Costa, 2014).

Um tipo de aditivo utilizado há décadas em carnes de peixe é o hipoclorito de sódio, também conhecido como água sanitária, que é adicionado com o intuito de clarear o material, fazendo com o mesmo aparente um falso frescor (Hughes *et al.*, 1979). Entretanto, além de ilegal, o hipoclorito de sódio promove a oxidação do DNA, dificultando a identificação por meio de marcadores moleculares (Rennick *et al.*, 2005).

Outros aditivos amplamente utilizados são o metabissufito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), o bissulfito de sódio (NaHSO_3) e o metabissulfito de potássio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$), os quais são adicionados principalmente para reduzir a melanose em camarões, além de serem incorporados ao pescado ainda no barco por inibirem a deterioração provocada por bactérias e fungos (Hardisson *et al.*, 2002).

Entretanto, o uso de agentes sulfitantes como conservantes é limitado por ocasionarem a diminuição da qualidade nutricional do alimento e da biodisponibilidade de algumas vitaminas, além de estarem relacionados a distúrbios neurológicos, irritação gástrica local, anafilaxia, urticária, angiodema, náusea, hipotensão, erupções cutâneas, diarreia, distúrbios comportamentais e

broncoespasmos em casos de indivíduos asmáticos sensíveis (Vally & Thompson, 2001; Scampicchio *et al.*, 2008).

A hipótese acerca do uso de aditivos é reforçada pela grande proporção de amostras não identificadas em lotes específicos, como na segunda e terceira coleta de Bauru e São José do Rio Preto, com 91,66%, 92,30%, 93,61% e 85,00% de exemplares não identificados, respectivamente (Anexo 2).

Dentre as amostras identificadas, oito espécies de raias foram detectadas, das quais 8 exemplares foram identificados como *Atlantoraja castelnaui* Miranda Ribeiro, 1907 (9,76%), 2 como *Atlantoraja platana* Günther, 1880 (2,44%), 2 como *Bathytoshia centroura* Mitchill, 1815 (2,44%), 12 como *Gymnura altavela* Linnaeus, 1758 (14,63%), 4 como *Hypanus americanus* Hildebrand & Schroeder, 1928 (4,88%), 9 como *Hypanus dipterurus* Jordan & Gilbert, 1880 (10,98%), 33 como *Paratrygon aiereba* Müller & Henle, 1841 (40,24%) e 11 como *Potamotrygon motoro* Müller & Henle, 1841 (13,41%), das quais as duas últimas são dulcícolas (Figura 6). As espécies identificadas podem ser observadas no anexo 3. Apenas um exemplar não foi identificado a grupo de espécie, sendo classificado apenas como pertencente a ordem Rajiformes (1,22%), o que pode ser explicado pela espécie da amostra em questão não ter sido catalogada nas bases de dado, sendo então classificada a grupo de ordem.

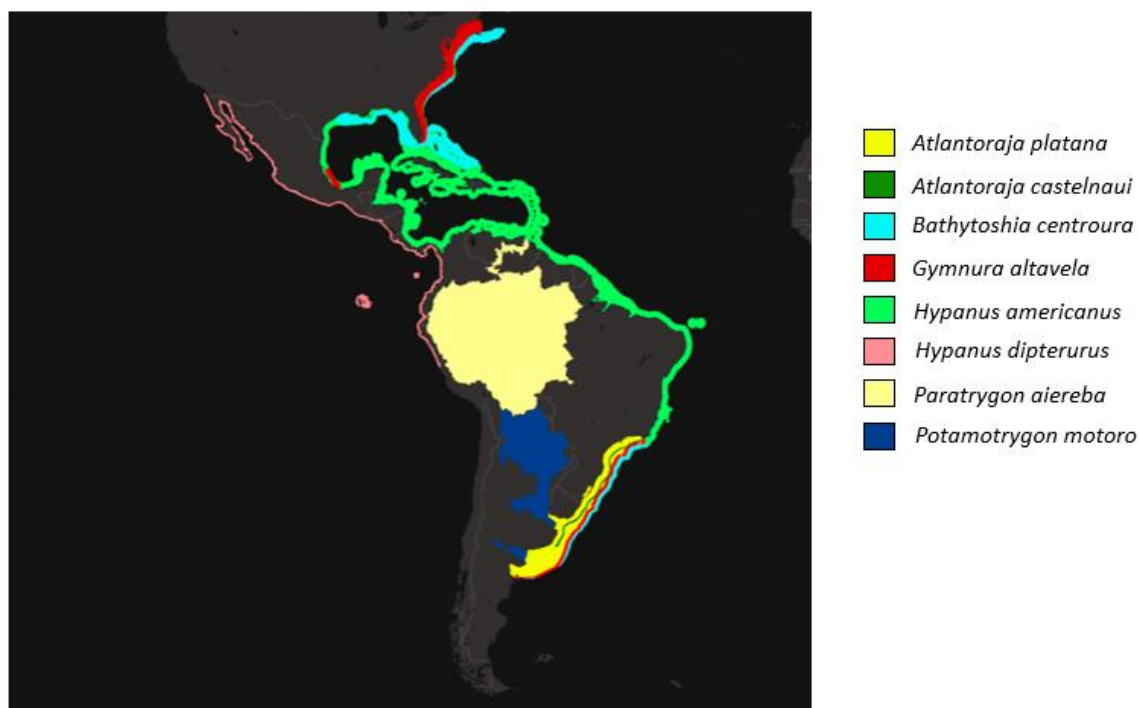


Figura 6. Mapa com local de ocorrência nas Américas de cada espécie identificada.

Das espécies de raias identificadas, apenas *Bathytoshia centroura* é classificada como “pouco preocupante” (LC) de acordo com a Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN. *Hypanus americanus*, *Hypanus dipterurus*, *Paratrygon aiereba* e *Potamotrygon motoro* são classificadas como “dados insuficientes” (DD), enquanto *Atlantoraja platana* e *Gymnura altavela* são classificadas como “vulnerável” (VU) e *Atlantoraja castelnaui* como “criticamente ameaçada” (CR), totalizando 26,83% de espécies ameaçadas (Figura 7).

Apesar da classificações das espécies identificadas na Lista Vermelha da IUCN, as espécies *A. castelnaui*, *A. platana*, *B. centroura*, *G. altavela*, *P. aiereba* e *P. motoro* se encontram em um nível diferente no Brasil de acordo com o Livro Brasileiro da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção (2018), onde a terceira e a quinta, inicialmente classificadas como “dados insuficientes” (DD), estão “criticamente ameaçadas” (CR) em território nacional, juntamente com a espécie *G.*

altavela. Já as espécies *A. castelnaui*, *A. platana* e *P. motoro* são classificadas como “em perigo” (EN), “dados insuficientes” (DD) e “pouco preocupante” (LC) no Brasil, respectivamente (Figura 7). Uma vez que as espécies presentes nessa lista são protegidas pela Portaria 445/2014, os exemplares proibidos de serem comercializados totalizam 67,07% das amostras identificadas.

A diferença entre a classificação de muitas das espécies identificadas demonstra a falta de associação entre as duas listas, o que é preocupante uma vez que para o controle ou proibição em nível nacional de uma espécie, deveria ser considerada a sua classificação em escala global de acordo com a IUCN, fazendo com que espécies ameaçadas nesse âmbito fossem protegidas em seus estados de ocorrência.

Além disso, a falta de associação entre as duas listas é algo notável, uma vez que para o controle ou proibição em nível nacional de uma espécie, deveria ser considerada a sua classificação em escala global de acordo com a IUCN, uma vez que espécies ameaçadas nessa âmbito deveriam ser protegidas em seus estados de ocorrência.

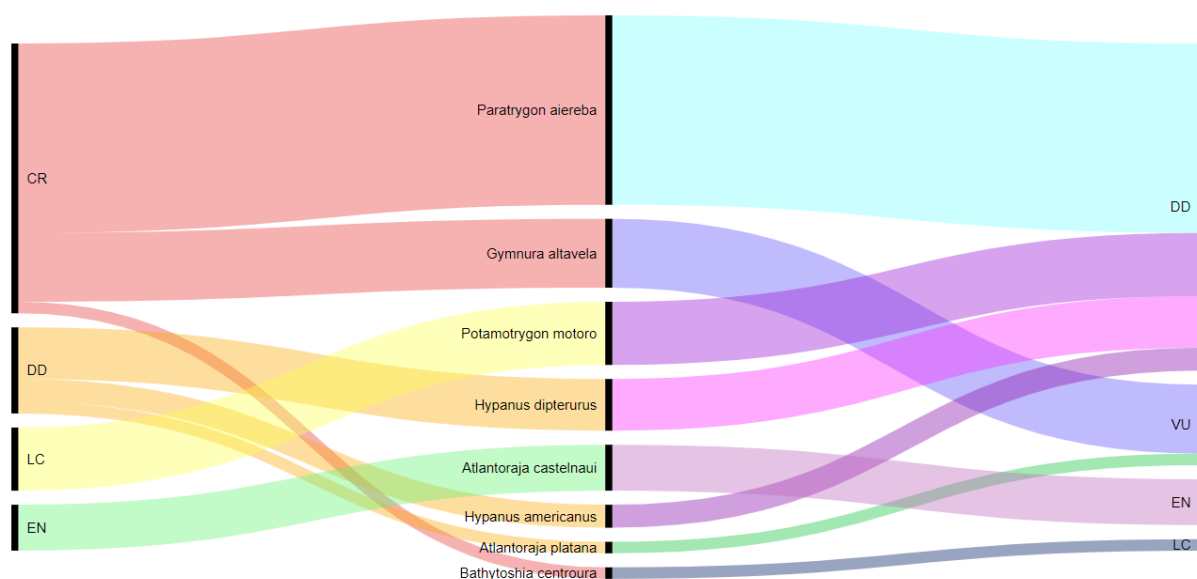


Figura 7. Diagrama aluvial com as espécies de raias identificadas e seus status de conservação. O lado esquerdo do gráfico corresponde às categorias de cada espécie de acordo com o Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. O lado direito corresponde às categorias de cada espécie de acordo com a Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN. O Gráfico foi construído com a ferramenta online RAWGraphs.

A grande proporção de indivíduos de espécies ameaçadas pode ser justificada em partes ao fato de que o comércio de raias no Brasil é muito negligenciado, como pode ser visto no caso de Santa Catarina, o qual apresentou um grande crescimento na captura de raias (de 452.367 kg em 2000 para 1.425.792 kg em 2010) e é o maior produtor de elasmobrânquios no país, onde no ano de 2010 foi relatado que mais de 2300 toneladas de exemplares do grupo foram desembarcadas, das quais mais de 85% não foram identificadas em nível de espécie (UNIVALI / CTTMar, 2011).

Além disso, grande quantidade de espécies ameaçadas pode ser explicada pois, muitas vezes, mesmo sem ser as espécies-alvo da pesca, as raias são capturadas como fauna acompanhante pelas redes e comercializadas para aumentar o lucro do pescador, sem que haja a identificação própria da espécie ou conhecimento sobre seu estado de conservação (Dulvy *et al.*, 2008; 2014).

Em um estudo recente de Ferrette *et al.*, (2019), foram observadas 16 espécies de raias capturadas como fauna acompanhante na costa do estado de São Paulo, das quais *A. castelnaui*, *B. centroura*, *H. americanus* e *G. altavela* fazem parte das espécies identificadas no presente trabalho. É importante ressaltar que ao menos cinco das espécies identificadas neste trabalho são endêmicas, fato que sobrealça a gravidade das mesmas estarem sendo comercializadas atualmente no estado.

Atlantoraja castelnaui

Além das classificações alarmantes em relação à *Atlantoraja castelnaui*, a qual representa 9,76% das amostras, a espécie apresenta tendências de diminuição em suas populações naturais, o que pode ser justificado por sua pesca excessiva com redes de arrasto (Hozbor & Massa, 2004). A espécie é a maior raia de águas costeiras e um dos maiores batoides bentônicos do sudoeste do Oceano Atlântico, atingindo 140 cm de comprimento, sendo endêmica do Atlântico sudoeste do Rio de Janeiro, Brasil até o Golfo de San Jorge, Argentina (Menni & Stehmann, 2000; Bovcon *et al.*, 2011).

Devido ao seu grande tamanho corporal, *A. castelnaui* tem um alto valor comercial e foi submetida a uma forte pressão de pesca, fazendo com que somente entre os anos de 1994 a 1999, a biomassa medida por redes de arrasto tenha diminuído 75% na Argentina e Uruguai. Além disso, é provável que a espécie esteja ameaçada pela pesca em um nível semelhante no Brasil, o que representa um risco ainda maior uma vez que é provável que o sul do Brasil seja a principal área de distribuição da espécie (Massa & Hozbor, 2003; Hozbor *et al.*, 2004).

Atlantoraja platana

Assim como a espécie citada anteriormente, *Atlantoraja platana*, a qual representa 2,44% das amostras, também apresenta tendências de diminuição em suas populações naturais, principalmente pela intensidade da pesca de arrasto ao longo do habitat dessa espécie, em especial no sul do Brasil, o que pode ser

explicado pelo aumento da demanda por carne de raias no mercado internacional (San Martín *et al.*, 2007).

Bathytoshia centroura

A espécie *Bathytoshia centroura*, que representa 2,44% das amostras, é uma das maiores raias marinhas e salobras de todo o Atlântico. Seu tamanho (máximo de 260 cm de largura de disco) somado a baixa fertilidade (de dois a seis filhotes por ninhada) a tornam intrinsecamente vulnerável ao declínio populacional. Entretanto, apesar da pressão de pesca ser intensa no Atlântico Sudoeste, a espécie é avaliada como “pouco preocupante” mundialmente pela estabilidade que apresenta em seus outros locais de ocorrência (Rosa *et al.*, 2016).

Gymnura altavela

Ainda que a espécie *Gymnura altavela* represente 14,63% das amostras, a espécie apresentou um declínio de 99% em abundância desde 1982 nas águas costeiras do sul do Brasil, o que justifica a avaliação de “criticamente ameaçada” em nível nacional. Além disso, a pressão da pesca intensa que a espécie sofre em toda a sua área de ocorrência faz com que declínios semelhantes em áreas onde faltam dados sejam prováveis, fazendo com que a tendência mundial de suas populações seja classificada como decrescente (Vooren *et al.*, 2007).

Hypanus americanus

Já a espécie *Hypanus americanus*, que representa 4,88% das amostras, é uma espécie marinha e estuarina costeira com uma ampla distribuição no Atlântico Oeste, do sul de Nova Jersey (EUA) até o sudeste do Brasil. A espécie é capturada como fauna acompanhante em toda a sua área de ocorrência e é espécie-alvo em algumas regiões da América do Sul, sendo também um importante recurso de ecoturismo em algumas áreas. As populações de *H. americanus* não tem apresentado um declínio nos EUA e, sem ameaças aparentes, é avaliada como “pouco preocupante” no país. No entanto, há pouca informação disponível sobre as tendências da população e os impactos da pesca em todo o restante de sua área de ocorrência e, portanto, é avaliada como “dados deficientes” globalmente (Grubbs *et al.*, 2016).

Hypanus dipterurus

A espécie *Hypanus dipterurus*, a qual representa 10,98% das amostras identificadas, é uma raia amplamente distribuída na costa oeste do México e norte da América do Sul. As informações biológicas e pesqueiras estão disponíveis principalmente no México, onde a espécie é comumente desembarcada como fauna acompanhante nas pescarias de arrasto de camarão (Mathews & Druck-Gonzalez, 1975). A espécie tem um ciclo de vida relativamente longo (podendo chegar a 28 anos) e baixa fertilidade (um a quatro filhotes por ninhada), fatores que indicam que as populações de *H. dipterurus* demonstram resiliência limitada à pressão da pesca. Com base na falta de informações relacionadas à biologia, distribuição e pesca

dessa espécie em grande parte de sua área de ocorrência, *H. dipterurus* é classificada como “dados deficientes” globalmente e possui suas tendências populacionais atuais desconhecidas (Smith *et al.*, 2016).

Paratrygon aiereba

A espécie mais abundante identificada, *Paratrygon aiereba*, a qual representa quase metade das amostras identificadas (40,24%), é uma espécie comum na bacia do Amazonas que sofre com o comércio ilegal para o comércio de peixes ornamentais, sendo regularmente exportada do Peru e da Colômbia, onde não ocorre na natureza. Além disso, a espécie é ameaçada pela pesca comercial, degradação de habitats e perseguição em áreas populares de turismo. Características como seu grande tamanho (130 cm de largura de disco) e baixa fertilidade (duas crias a cada dois anos), fazem com que a espécie seja potencialmente vulnerável aos efeitos dessas ameaças. No entanto, devido a uma falta geral de informações, a espécie é avaliada como “dados deficientes” mundialmente, tendo tendências desconhecidas de suas populações naturais (Araújo & Rincón, 2018).

É importante ressaltar que a grande quantidade de amostras identificadas como a espécie talvez seja justificada, em partes, por seu grande tamanho somado ao fato da espécie ter sido identificada somente em peixarias onde a mesma era comercializada em cubos, possibilitando que de fato mais de uma amostra representasse apenas a um indivíduo.

Potamotrygon motoro

Por fim, a espécie *Potamotrygon motoro*, que representa 13,41% das amostras, é a espécie com maior distribuição da família, ocorrendo nas três maiores bacias hidrográficas da América do Sul, sendo elas Amazonas, Orinoco e Paraná-Paraguai (Rosa, 1985; Compagno & Cook, 1995; Carvalho *et al.*, 2003). A espécie é a mais abundante e difundida do Parano-plata, e por ser um predador de topo de cadeia, se alimentar de uma grande variedade de animais e de ser uma das espécies com maior taxa de natalidade de sua família, tem potencial para ser uma espécie exótica invasora em diversas localidades (NG *et al.*, 2010; Lameiras *et al.*, 2013). A espécie invadiu grandes áreas a montante das Sete-Quedas de Guaíra/PR após a construção da Usina Hidrelétrica de Itaipu, em 1982, chegando a habitar afluentes em municípios do estado de São Paulo, paranaenses e sul-matogrossenses localizados às margens do Rio Paraná (Garrone Neto *et al.*, 2007; Lameiras *et al.*, 2013). Nesses locais, onde a espécie não fazia parte da fauna aquática nativa, o desconhecimento da população acerca desses animais favorece a ocorrência de acidentes (Garrone Neto *et al.*, 2007). Além disso, a invasão de uma espécie exótica, como *P. motoro*, pode acarretar na introdução de parasitas e patógenos associados à espécie, como é o caso do crustáceo parasita *Lernaea cyprinacea* Linnaeus, 1758, o qual ocorre tipicamente em carpas (*Carassius carassius* Linnaeus, 1758) mas foi identificada em ao menos outras 45 espécies de peixes (Leão *et al.*, 2011; Carriel *et al.*, 2014).

Assim, tendo em vista a problemática de invasão de *P. motoro* e o fato da mesma ser a única raia comercializada identificada como “pouco preocupante” no Brasil, uma solução para ambos os problemas seria o incentivo da pesca da espécie

em regiões onde a mesma é exótica, abastecendo assim o mercado com uma espécie autorizada pela lei e fazendo o controle das populações invasoras. Entretanto, é importante ressaltar que mais informações são necessárias para que a proposta seja eficiente e não afete populações das espécies onde a mesma ocorre naturalmente. Além disso, a implementação de uma lei com o intuito de proibir a venda de todas as espécies de raias em risco de extinção mundialmente, além daquelas em nível nacional, auxiliaria no restabelecimento dessas espécies em território nacional.

Durante as coletas de março e abril, a espécie encontrada com maior frequência foi *P. aiereba* (38,71%), seguida por *P. motoro* (17,74%), *H. dipterurus* (14,52%), *G. altavela* / *A. castelnaui* (9,68%), *H. americanus* (6,45%) e *B. centroura* (3,22%), respectivamente. As amostras coletadas em agosto e setembro foram identificadas somente como pertencentes à três espécies, sendo elas *P. aiereba* (42,86%), *A. castelnaui* (28,57%) e *A. platana* (28,57%). Nas coletas de dezembro e janeiro foram identificadas somente duas espécies, *P. aiereba* (53,85%) e *G. altavela* (46,15%) (Figura 8).

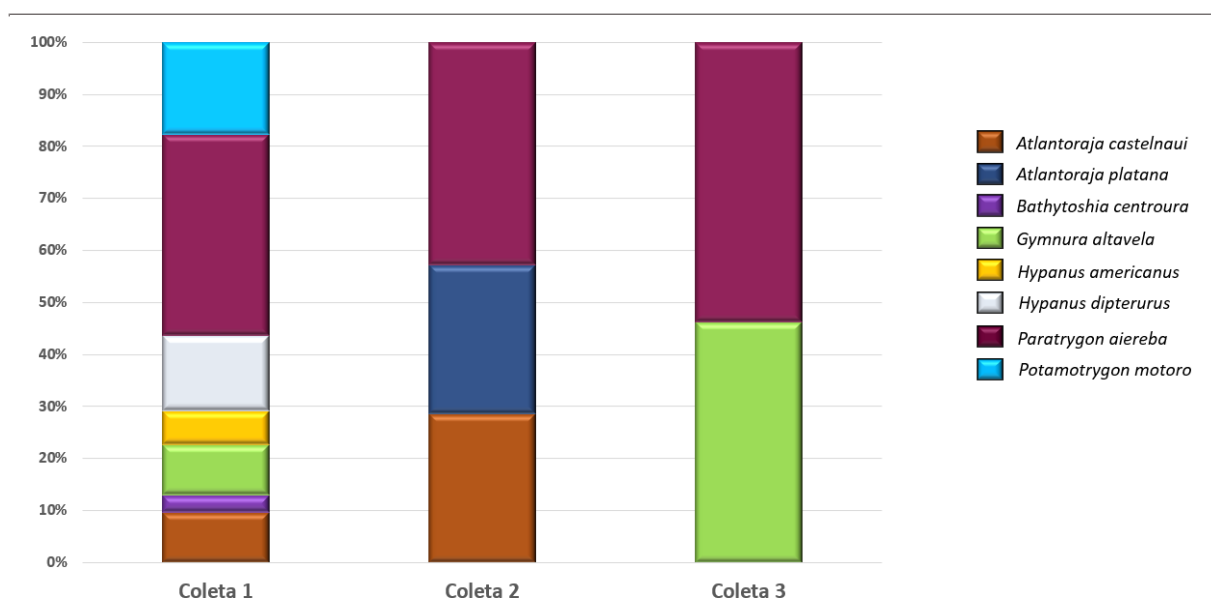


Figura 8. Porcentagem de espécies identificadas por coleta.

Quando analisamos os indivíduos de acordo com a época em que foram coletados, pudemos notar que a diversidade de espécies identificadas na primeira coleta foi muito elevada se comparada com a segunda e terceira coleta, o que pode ser explicado pela baixa porcentagem de exemplares identificados em Bauru e São José do Rio Preto nessas coletas, além da análise dos exemplares de Campinas ter sido interrompida após a primeira coleta pelo fato da única peixaria que comercializava o produto na cidade ter deixado de fazer sua venda.

As diferentes proporções não podem ser justificadas pelo comportamento reprodutivo das espécies, uma vez que os períodos de gestação não coincidem com as datas de coletas das espécies identificadas (Capapé, 1992, 1993; Peres & Vooren, 1993; Colonello, 2009).

Na cidade de Bauru, foram identificadas seis espécies de raias, das quais as mais frequentes foram *P. motoro* (27,78%) e *H. dipterurus* (22,22%), seguidas por *A. castelnaui* / *G. altavela* (16,67%), *P. aiereba* (11,11%) e *B. centroura* (5,55%), respectivamente. Já na cidade de São Paulo, foram identificadas cinco espécies, sendo elas *G. altavela* (42,86%), *A. castelnaui* (23,81%), *H. americanus* (19,05%), *A. platana* (9,52%) e *P. motoro* (4,76%). Em São José do Rio Preto e Campinas foram identificadas somente duas espécies, sendo *A. aiereba* (86,11%) e *P. motoro* (13,89%) em São José do Rio Preto e *H. dipterurus* (83,34%) e *B. centroura* (16,66%) em Campinas (Figura 9).

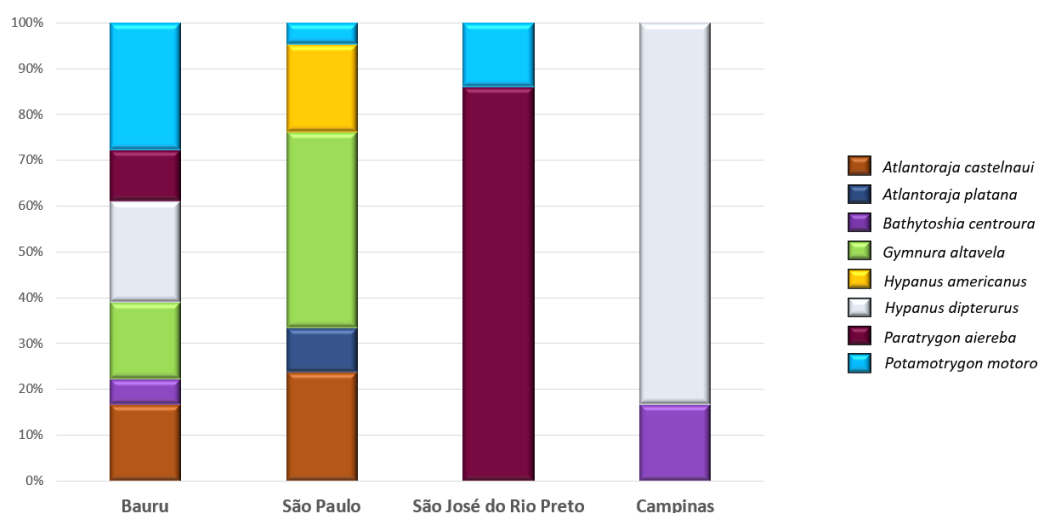


Figura 9: Porcentagem de espécies identificadas de acordo com a localização.

Quando analisamos os exemplares de acordo com a cidade de coleta, pudemos notar uma grande diferença entre as espécies identificadas, uma vez que as cidades de Bauru e São Paulo apresentaram uma ampla diversidade de espécies quando comparadas com as duas restantes, sendo as únicas cidades analisadas abastecidas tanto por espécies marinhas quanto dulcícolas.

A cidade de São José do Rio Preto é a única que aparenta ser abastecida apenas por espécies dulcícolas, sendo predominante a venda da espécie *P. aiereba*, o que pode ser justificado por ser a cidade analisada que se encontra mais distante do oceano, ao interior do estado. Já a peixaria de Campinas é a única aparentemente abastecida somente por espécies marinhas, sendo predominante a venda da espécie *H. dipterurus*. Entretanto, a quantidade de espécies identificadas na cidade pode estar relacionada a pequena quantidade de amostras coletadas, não representando a verdadeira diversidade de espécies de raias comercializadas no local.

4.2 Barcode como técnica de identificação de espécies de raia comercializadas

Para a aplicação da técnica, é necessário um investimento inicial para a obtenção dos seguintes equipamentos: pipetas, centrífuga, banho-maria, cuba e fonte para eletroforese, vortex, freezer para armazenamento das amostras, termociclador e sistema de ultrapurificação de H₂O MiliQ. Além disso, é necessária a obtenção de diversos reagentes e materiais para a aplicação da técnica de *Barcode*, somando aproximadamente R\$ 22,66 por amostra, totalizando R\$ 2.175,42 por placa (Tabela 3) dados esses, atualizados no no segundo semestre de 2019.

Tabela 3. Orçamento para cada placa analisada.

Extração de DNA		
Item	Valores atacado	Valores por placa (96 unidades)
Saco de ponteiros brancos	R\$ 70,00	R\$ 10,56
Saco de ponteiros amarelos	R\$ 55,00	R\$ 10,56
Saco de ponteiros azuis	R\$ 55,00	R\$ 0,66
Saco de microtubo de centrífuga 1,5 ml	R\$ 70,00	R\$ 26,88
Isopropanol	R\$ 35,00	R\$ 2,02
<i>Nuclei lysis solution</i>	R\$ 2.060,00	R\$ 0,62
Proteinase K	R\$ 510,00	R\$ 39,17
RNase	R\$ 205,00	R\$ 49,20
<i>Protein Precipitation Solution</i>	R\$ 1.793,00	R\$ 98,30
<i>DNA rehydration</i>	R\$ 298,00	R\$ 17,16
Etanol 70%	R\$ 62,95	R\$ 3,63
Reação de PCR		
Item	Valores atacado	Valores por placa (96 unidades)
Saco de ponteiros brancos	R\$ 70,00	R\$ 6,86
Saco de ponteiros amarelos	R\$ 55,00	R\$ 0,66
Saco de ponteiros azuis	R\$ 55,00	R\$ 0,11
Saco de microtubo de centrífuga 0,2 ml	R\$ 270,00	R\$ 25,92

Saco de microtubo de centrífuga 1,5 ml	R\$ 70,00	R\$ 0,28
<i>Primer Fish F1/F2 - Foward</i>	R\$ 70,00	R\$ 0,84
<i>Primer Fish R1/R2 - Reverse</i>	R\$ 70,00	R\$ 0,84
dNTP	R\$ R\$ 764,00	R\$ 0,46
Taq/ MgCl ₂ / Buffer	R\$ 206,00	R\$ 9,88
Eletroforese		
Item	Valores atacado	Valores por placa (96 unidades)
Saco de ponteiros brancos	R\$ 70,00	R\$ 7,49
Saco de microtubo de centrífuga 0,5 ml	R\$ 200,00	R\$ 0,80
Agarose	R\$ 1.516,00	R\$ 10,61
Solução TBE (Tris + H ₃ Bo ₃ + EDTA)	R\$ 1.230,48	R\$ 0,33
<i>Ladder 100 pb</i>	R\$ 612,00	R\$ 42,84
<i>Loading Buffer</i>	R\$ 180,00	R\$ 1,44
<i>Gel Red</i>	R\$ 1.374,00	R\$ 6,60
Sequenciamento		
Item	Valores atacado	Valores por placa (96 unidades)
Saco de ponteiros brancos	R\$ 70,00	R\$ 6,72
Saco de ponteiros amarelos	R\$ 55,00	R\$ 0,20
Saco de ponteiros azuis	R\$ 55,00	R\$ 0,05
Saco de microtubo de centrífuga 0,2 ml	R\$ 270,00	R\$ 25,92
Saco de microtubo de centrífuga 1,5 ml	R\$ 70,00	R\$ 0,07
Exo I + SAP	R\$ 17.347,50	R\$ 333,01
<i>BigDYE + Tampão BigDYE</i>	R\$ 4.585,70	R\$ 440,23
<i>Primer Fish F1/F2 ou R1/R2</i>	R\$ 70,00	R\$ 2,35
EDTA (125 mM)	R\$ 68,80	R\$ 0,01
Acetato de Sódio (3M)	R\$ 16,42	R\$ 0,01
Etanol 100%	R\$ 90,00	R\$ 0,15
Papel alumínio	R\$ 9,49	R\$ 0,17
Etanol 70%	R\$ 62,95	R\$ 0,21
Placa para sequenciamento	R\$ 304,00	R\$ 30,40
Adesivo para placa	R\$ 120,00	R\$ 1,20
Sequenciamento - CREBIO	R\$ 960,00	R\$ 960,00
Preço total por placa analisada (96 amostras)		
R\$ 2.175,42		

Orçamento para cada placa analisada, dividido em: extração de dna, reação de PCR, eletroforese, sequenciamento. Preços verificados no segundo semestre de 2019.

A multa para cada indivíduo de espécies constantes em listas oficiais de fauna brasileira ameaçada de extinção é de R\$ 5.000,00, de acordo com o Decreto nº 6.686 (Brasil, 2008^b). Desta forma, se considerarmos a proporção encontrada no presente estudo de 67,07% dos indivíduos com o comércio proibido, a análise de uma placa arrecadaria em média R\$ 321.936,00. Assim, o valor de R\$ 2.715,42 da análise de uma placa, poderia ser pago com um investimento de aproximadamente 0,84% do dinheiro gerado pelas multas produzidas por placa.

Além do investimento relativamente baixo se comparado ao retorno monetário das multas, a técnica apresenta como vantagem a velocidade para ser executada, uma vez que o resultado quanto a espécie de uma amostra pode ser obtido em menos de duas semanas após a sua coleta.

Além disso, nos últimos anos a técnica tem sido amplamente utilizada para a identificação de espécies de raias (Bineesh *et al.*, 2016; Cruz, 2013; Madduppa *et al.*, 2016; Serra-Pereira *et al.*, 2010) e tem se mostrado eficaz para análise de comércio irregular de elasmobrânquios, como visto por Barbuto *et al.*, (2010), que a utilizou para a identificação de substituições fraudulentas de tubarões na Itália, e Griffiths *et al.*, (2013) que a aplicou com o intuito de analisar a diversidade de raias comercializadas na Inglaterra.



CONCLUSÃO

5 CONCLUSÃO

De acordo com as análises de *DNA Barcode*, pode-se concluir que o comércio de raias no estado de São Paulo apresenta problemas graves como venda de produtos em estado de putrefação, comércio de produtos sem a apresentação da nota fiscal e venda de amostras possivelmente expostas à aditivos alimentares, os quais são proibidos por lei.

Ao menos oito espécies de raias são comercializadas no estado, das quais quatro estão em risco de extinção no país e possuem o comércio proibido de acordo com a Portaria 445/2014.

Das espécies restantes, uma é classificada como “vulnerável” em escala global, duas não apresentam dados acerca de seus estados de conservação, e a última, *P. motoro*, é invasora em algumas regiões do país. A falta de interlocução entre a classificação nacional e global é observada pelas diferença de categorias que as espécies apresentam, a qual a lista da IUCN e a CITES atualmente não são determinantes para a proibição do comércio de espécies de raias em território nacional.

As cidades que apresentaram maior diversidade de espécies comercializadas foram Bauru e São Paulo, com 6 e 5 espécies, respectivamente, se comparadas com São José do Rio Preto e Campinas, com 2 espécies por cidade. A cidade de São José do Rio Preto foi a única que apresentou somente espécies dulcícolas, enquanto Campinas apresentou somente espécies marinhas.

A coleta dos meses de março e abril de 2018 apresentou a maior diversidade, com 8 espécies, se comparada a o que provavelmente se comparada com as coletas de agosto e setembro de 2018 e dezembro de 2018 e janeiro de 2019, com 2

espécies, o que provavelmente se deu pela menor quantidade de indivíduos analisados nas últimas.

A análise de *DNA Barcode* se mostrou uma técnica eficiente para a identificação para espécies de raias, demonstrando grande potencial para substituir a identificação morfológica, usada atualmente pelos órgãos competentes responsáveis pela fiscalização desses produtos.



CONSIDERAÇÕES FINAIS

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para o cumprimento dos compromissos previstos no Artigo 225 da Constituição Brasileira de proteger a fauna e flora de práticas que provoquem a extinção de espécies, o Brasil dispõe de uma série de mecanismos voltados à conservação e proteção da biodiversidade, os quais incluem a elaboração de listas das espécies ameaçadas, além do monitoramento, planos de gestão e criação de programas para recuperação de espécies ameaçadas, incluindo espécies de raias.

A falta de controle sobre a pesca das espécies do grupo está levando a uma queda radical nos estoques pesqueiros de suas populações, aumentando seus riscos de extinção. Entretanto, apesar da fiscalização baseada na identificação morfológica das espécies realizada pelos órgãos competentes, muitas vezes a mercadoria não pode ser identificada a grupo de espécie devido à descaracterização do produto, a qual dificulta o reconhecimento da espécie e consequentemente o controle de seu comércio.

Assim, com o avanço da genética molecular nos últimos anos, amostras que seriam descartadas pela impossibilidade de sua identificação morfológica tradicional, atualmente podem ser identificadas a grupo de espécie, o que é de extrema importância para a correta avaliação dos estoques, e consequentemente um manejo adequado para as espécies ameaçadas.

Além da dificuldade acerca da identificação pelos métodos utilizados pelos órgãos competentes, outra adversidade a respeito do comércio de raias é a falta de informações básicas sobre a dinâmica de suas populações e principalmente acerca do estado de conservação de espécies dulcícolas que compõem o grupo, uma vez que grande parte delas é classificada como “dados deficientes” em escala global.

Apesar das espécies pertencentes a essa classificação não estarem oficialmente ameaçadas, elas podem estar, em partes, mais vulneráveis à extinção pela sobrepesca, uma vez que algumas espécies podem estar em risco sem que haja conhecimento, e consequentemente, não possuem seu comércio proibido por lei.

Além disso, apesar da existência de algumas leis que auxiliam na proteção do grupo, muitas vezes portarias que restringem o alcance dessas leis são criadas, como é o exemplo da Portaria 73/2018, que permite o manejo sustentável de espécies ameaçadas que possuem sua pesca originalmente proibida pela já citada Portaria 445/2014.

Nesse sentido, a ampliação do conhecimento sobre a composição de recursos vivos nos vários ecossistemas existentes é essencial e serviria como base para projetos de preservação e uso planejado e sustentável dos recursos naturais. Com um crescente interesse na sustentabilidade da pesca no âmbito internacional, foram desenvolvidos planos de manejo e conservação de elasmobrânquios, como por exemplo, o Plano de Ação Nacional para a Conservação de Tubarões e Raias Marinhos Ameaçados de Extinção (ICMBIO – Centro Nacional de Pesquisa e Conservação da biodiversidade Marinha do Sudeste e Sul), com o intuito de mitigar os impactos sobre os elasmobrânquios marinhos ameaçados de extinção no Brasil.

Neste contexto, o presente trabalho foi desenvolvido para que fossem produzidos dados fundamentais sobre o comércio de raias do estado de São Paulo. O método de identificação empregado no presente trabalho, o *DNA Barcode*, se mostrou eficiente na identificação de amostras de raias comercializadas descaracterizadas morfologicamente, demonstrando ser uma técnica rápida, confiável e com um baixo custo se comparado com seu retorno monetário

proveniente das multas aplicadas devido ao uso da técnica se utilizada como ferramenta de rotina para fiscalização.

Outro ponto importante é que os dados obtidos no presente trabalho evidenciaram ao menos 8 espécies de raias sendo comercializadas no estado de São Paulo, das quais quatro possuem a venda proibida por lei e totalizam 67,07% das amostras identificadas, além de uma espécie ameaçada globalmente com o comércio desimpedido no Brasil. Dentre as espécies restantes, somente uma (*Potamotrygon motoro*) é classificada como pouco preocupante no Brasil, a qual é uma espécie invasora em diversos ambientes aquáticos nos estados de São Paulo, Paraná e Mato Grosso do Sul.

Desse modo, para que ações de conservação relacionadas ao grupo sejam efetivas, torna-se fundamental e de grande urgência que, além de uma fiscalização mais rigorosa em pontos de desembarque e comércio e a implementação de uma técnica eficaz na identificação de amostras descaracterizadas morfológicamente, seja implementada uma lei com o intuito de proibir o comércio de espécies de raias ameaçadas globalmente e incentivar a pesca e venda de *P. motoro* em regiões onde é exótica, auxiliando no controle da espécie e diminuindo o comércio de espécies ameaçadas para que haja um restabelecimento de suas populações naturais longo do tempo.

Além das ações já citadas, outra medida de grande importância seria a implementação da Educação Ambiental em empresas pesqueiras e para pescadores, com o intuito de auxiliar na identificação de espécies de raias ameaçadas encontradas nas áreas de pesca e acerca das leis relacionadas a captura e venda irregular de pescado. Ademais, a criação de unidades de conservação em áreas que as populações de espécies de raias ameaçadas habitam

também possui um papel essencial para o restabelecimento dessas espécies no Brasil.

De uma forma geral o estudo realizado não só enfatiza os riscos na conservação das raias no Brasil, mas também nos dá algumas informações viáveis na melhoria da conservação deste grupo, tais como: espécies de raias comercializadas em diferentes cidades do estado de São Paulo, locais de comércio de espécies ilegais, ferramenta (*DNA Barcode*) ideal a ser utilizada na fiscalização, dentre outras.

Para mais, apesar do presente trabalho fechar algumas lacunas acerca do comércio de raias no estado, o mesmo gera alguns questionamentos, como: Os indivíduos comercializados representam diferentes populações de cada espécie ou está havendo a sobrepesca de populações específicas? Qual é o motivo do surgimento das espécies de bactérias nocivas no material comercializado em Bauru? As amostras não identificadas apresentam resquícios do uso de aditivos alimentares? Se sim, quais foram os aditivos e foram eles utilizados nas embarcações ou pela indústria ou pelos comerciantes? As espécies identificadas representam todas as espécies de raias comercializadas no estado de São Paulo ou uma quantidade maior de indivíduos analisados em outras localidades do estado revelaria um número maior de espécies? Novos estudos são necessários para que o comércio desse grupo seja melhor compreendido no estado, possibilitando assim a implementação de novas medidas mais eficientes de proteção para o consumidor e para as espécies no Brasil.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdallah PR, Sumaila UR (2007). An historical account of Brazilian public policy on fisheries subsidies. *Marine Policy*, v. 31, n. 4, p. 444-450.
- Al-Harbi AH, Uddin MM (2008). Aerobic bacterial flora of common carp (*Cyprinus carpio* L.) cultured in earthen ponds in Saudi Arabia. *Journal of applied aquaculture*, v. 20, n. 2, p. 108-119.
- Almeida FS, Frantini-Silva W, Lima SC, Garcia DA, Orsi ML (2018). DNA barcoding as a useful tool for identifying non-native species of freshwater ichthyoplankton in the neotropics. *Hydrobiologia*, v. 817, n. 1, p. 111-119.
- Araújo BLA (2017). Nanotecnologia de DNA: Estudo de quadruplexos. *Acta de Ciências e Saúde*, v. 2, n. 1, p. 1-12.
- Araújo MLG, Rincón G (2018). *Paratrygon aiereba* (amended version of 2009 assessment). The IUCN Red List of Threatened Species 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2009-2.RLTS.T161588A124329685.en>> Acesso em setembro de 2019.
- Arslan A, Ilhak OI, Calicioglu M (2006). Effect of method of cooking on identification of heat processed beef using polymerase chain reaction (PCR) technique. *Meat Science*, v. 72, n. 2, p. 326-330.
- Aslan O, Hamill RM, Sweeney T, Reardon W, Mullen AM (2009). Integrity of nuclear genomic deoxyribonucleic acid in cooked meat: Implications for food traceability. *Journal of animal science*, v. 87, n. 1, p. 57-61.

- Aschliman NC, Nishida M, Miya M, Inoue JG, Rosana KM, Naylor GJ (2012). Body plan convergence in the evolution of skates and rays (Chondrichthyes: Batoidea). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 63, n. 1, p. 28-42.
- Barbosa JM (2015). Fraudação na comercialização do pescado. *Acta of Fisheries and Aquatic Resources*, v. 3, n. 2, p. 89-99.
- Barbuto M, Galimberti A, Ferri E, Labra M, Malandra R, Galli P, Casiraghi M (2010). DNA barcoding reveals fraudulent substitutions in shark seafood products: the Italian case of “palombo” (*Mustelus spp.*). *Food research international*, v. 43, n. 1, p. 376-381.
- Bineesh KK, Gopalakrishnan A, Akhilesh KV, Sajeela KA, Abdussamad EM, Pillai NGK, Basheer VS, Jena JK, Ward RD (2017). DNA barcoding reveals species composition of sharks and rays in the Indian commercial fishery. *Mitochondrial Dna Part A*, v. 28, n. 4, p. 458-472.
- Bovcon ND, Cochia PD, Góngora ME, Gosztonyi AE (2011). New records of warm-temperate water fishes in central Patagonian coastal waters (Southwestern South Atlantic Ocean). *Journal of Applied Ichthyology*, v. 27, n. 3, p. 832-839.
- Bowman JP (2005). Genus XIII. *Shewanella* MacDonell and Colwell 1986, 355VP (Effective publication: MacDonell and Colwell 1985, 180).
- Brasil (1998)^a. Art. 272, Decreto-Lei 2.848, de 02 de julho de 1998. Código Penal. Diário Penal da União, Brasília.
- Brasil (1998)^b. Portaria nº 1.004, de 11 de dezembro de 1998. Ministério da Saúde. Diário Oficial da União, Brasília.
- Brasil (2008)^a. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem animal (Riispoa). Brasília: Mapa.

- Brasil (2008)^b. Decreto nº 6.686, de 22 de julho de 2008. Ministério do Meio Ambiente. Diário Oficial de União, Brasília.
- Brasil (2012). Instrução Normativa Interministerial Nº 14, de 26 de novembro de 2012. Ministério da Pesca e Aquicultura e Ministério do Meio Ambiente.
- Brasil (2014)^a. Instrução Normativa Interministerial Nº 4, de 30 de maio de 2014. Ministério da Pesca e Aquicultura.
- Brasil (2014)^b. Portaria nº 445, de 17 de dezembro de 2014. Ministério do Meio Ambiente. Diário Oficial da União, Brasília.
- Brazil (2016). Portaria nº 395, de 1 de setembro de 2016. Ministério do Meio Ambiente. Diário Oficial da União, Brasília.
- Brazil (2017). Portaria nº 161, de 20 de abril de 2017. Ministério do Meio Ambiente. Diário Oficial da União, Brasília.
- Burgess GH, Beerkircher LR, Cailliet GM, Carlson JK, Cortés E, Goldman KJ, Grubbs RD, Musick JA, Musyl MK, Simpfendorfer CA (2005). Is the collapse of shark populations in the Northwest Atlantic Ocean and Gulf of Mexico real?. Fisheries, v. 30, n. 10, p. 19-26.
- Capapé C, Zaouali J, Tomasini JA, Bouchereau JL (1992). Reproductive biology of the spiny butterfly ray, *Gymnura altavela* (Linnaeus, 1758)(Pisces: Gymnuridae) from off the Tunisian coasts. Scientia marina, v. 56, n. 4, p. 347-355.
- Capapé C (1993). New data on the reproductive biology of the thorny stingray, *Dasyatis centroura* (Pisces: Dasyatidae) from off the Tunisian coasts. In: The reproduction and development of sharks, skates, rays and ratfishes. Springer, Dordrecht, p. 73-80.

- Carriel KC (2014). Levantamento da presença de *Lernaea spp.*(Lernaeoidea: lernaeidae) em pisciculturas da Associação de Produtores de Peixes de Laranjeiras do Sul-PR (PEIXELAR).
- Carvalho MR, Lovejoy NR, Rosa RS (2003). Family Potamotrygonidae (river stingrays). Check list of the freshwater fishes of South and Central America. EDIPUCRS, Porto Alegre, p. 22-28.
- Carvalho DC, Seerig A, Melo DD, Sousa AB, Pimenta D, Oliveira DDA (2008). Identificação molecular de peixes: o caso do Surubim (*Pseudoplatystoma spp.*). Revista Brasileira de Reprodução Animal, v. 32, n. 4, p. 215-219.
- Casiraghi M, Labra M, Ferri E, Galimberti A, De Mattia F (2010). DNA barcoding: a six-question tour to improve users' awareness about the method. Briefings in bioinformatics, v. 11, n. 4, p. 440-453.
- Castello JP (2007). Gestão sustentável dos recursos pesqueiros, isto é realmente possível. Pan-American Journal of Aquatic Sciences, v. 2, n. 1, p. 47-52.
- CEAGESP (2016). Disponível em: <www.ceagesp.gov.br>. Acesso em: novembro de 2017.
- CITES (2019). Appendices. Disponível em <<https://www.cites.org/eng/app/appendices.php>>. Acesso em março de 2020.
- Claeson KM (2011). The synarcual cartilage of batoids with emphasis on the synarcual of Rajidae. Journal of morphology, v. 272, n. 12, p. 1444-1463.
- Colonello J (2009). Ecología reproductiva de tres batoideos (Chondrichthyes): *Atlantoraja castelnaui* (Rajidae), *Rioraja agassizi* (Rajidae) y *Zapteryx brevirostris* (Rhinobatidae). Implicancias de distintas estrategias adaptativas en un escenario de explotación comercial intensiva. Implicancias de distintas estrategias adaptativas en un escenario de explotación. Trabajo de Tesis de Doctorado en

- Ciencias Naturales. Facultad de Ciencias Naturales y Museo. Universidad Nacional de La Plata, v. 183.
- Compagno LJV (1999). Checklist of living elasmobranchs. Sharks, skates, and rays: the biology of elasmobranch fishes, p. 471-498.
- Compagno LJV, Cook SF (1995). The exploitation and conservation of freshwater elasmobranchs: status of taxa and prospects for the future. J. Aquacult. Aquat. Sci., v. 7, p. 62-90.
- Cortés E (2000). Life history patterns and correlations in sharks. Reviews in Fisheries Science, v. 8, n. 4, p. 299-344.
- Costa LC (2014). Avaliação higiênico-sanitária e físico-química de carne moída in natura comercializada em Campo Mourão–PR. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
- Couturier LIE, Marshall AD, Jaine FRA, Kashiwagi T, Pierce SJ, Townsend KA, Weeks MB, Richardson AJ (2012). Biology, ecology and conservation of the Mobulidae. Journal of fish biology, v. 80, n. 5, p. 1075-1119.
- Cruz VPD (2013). Estudos genéticos em raias do gênero *Potamotrygon* (Chondrichthyes: Myliobatiformes: Potamotrygonidae) na Bacia do Rio Paraná.
- Darvish F, Elmdoost A, Farahmand H, Changizi R, Soltani M (2018). Species Identification of Some Fish Processing Products in Iran by DNA Barcoding.
- Dulvy NK, Baum JK, Clarke S, Compagno LJ, Cortés E, Domingo A, Fordham S, Fowler S, Francis MP, Gibson C, Martínez J, Musick JA, Soldo A, Stevens JD, Valenti S (2008). You can swim but you can't hide: the global status and conservation of oceanic pelagic sharks and rays. Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems, v. 18, n. 5, p. 459-482.

- Dulvy NK, Forrest RE (2010). Life histories, population dynamics, and extinction risks in chondrichthyans. In: Sharks and their relatives II. CRC Press, 2010. p. 655-696.
- Dulvy NK, Fowler SL, Musick JA, Cavanagh RD, Kyne PM, Harrison LR, Carlson JK, Davidson LNK, Fordham SV, Francis MP, Pollock CM, Simpfendorfer CA, Burgess GH, Carpenter KE, Compagno LJV, Ebert DA, Gibson C, Heupel M, Livingstone SR, Sanciangco JC, Stevens JD, Valenti S, White WT (2014). Extinction risk and conservation of the world's sharks and rays. *elife*, v. 3, p. e00590.
- Estrella F, Raposo G, Pascolli J, Gonzalez JG, Motta FS, Moura RL (2016). Comercialização de pescado nas cidades de São Paulo e Rio de Janeiro.
- FAO (2018). The state of World Fisheries and Aquaculture 2018- Meeting the sustainable development goals.
- FAO (2019). FAO's Work on Climate Change – Fisheries & Aquaculture 2019.
- Federal, R (2018). Tabela NCM e respective Utrib (comércio exterior) – Vigência 01/01/2019 – Publicada em 09/11/2018. Disponível em <<http://www.nfe.fazenda.gov.br/portal/listaConteudo.aspx?tipoConteudo=ly/5Qol1YbE>> Acesso em: agosto de 2019.
- Ferrette BLS, Domingues RR, Rotundo MM, Miranda MP, Bunholi IV, De Biasi JB, Oliveira C, Foresti F, Mendonça FF (2019). DNA Barcode Reveals the Bycatch of Endangered Batoids Species in the Southwest Atlantic: Implications for Sustainable Fisheries Management and Conservation Efforts. *Genes*, v. 10, n. 4, p. 304.

- Ferretti F, Worm B, Britten GL, Heithaus MR, Lotze HK (2010). Patterns and ecosystem consequences of shark declines in the ocean. *Ecology letters*, v. 13, n. 8, p. 1055-1071.
- Frickle R (2020). Eschmeyer's Catalog of Fishes: Genera, Species, References, electronic version (3 January 2020).
- Galimberti A, De Mattia F, Losa A, Bruni I, Federici S, Casiraghi M, Martellos S, Labra M (2013). DNA barcoding as a new tool for food traceability. *Food Research International*, v. 50, n. 1, p. 55-63.
- Garrone Neto D, Haddad Jr V, Vilela MJA, Uieda VS (2007). Registro de ocorrência de duas espécies de potamotrigonídeos na região do Alto Rio Paraná e algumas considerações sobre sua biologia.
- Giles S, Friedman M, Brazeau MD (2015). Osteichthyan-like cranial conditions in an Early Devonian stem gnathostome. *Nature*, v. 520, n. 7545, p. 82.
- Gram L, Huss HH (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products. *International journal of food microbiology*, v. 33, n. 1, p. 121-137.
- Griffiths AM, Miller DD, Egan A, Fox J, Greenfield A, Mariani S (2013). DNA barcoding unveils skate (Chondrichthyes: Rajidae) species diversity in 'ray' products sold across Ireland and the UK. *PeerJ*, v. 1, p. e129.
- Grubbs RD, Snelson FF, Piercy A, Rosa R, Furtado M (2016). *Hypanus americanus*. The IUCN Red List of Threatened Species. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-3.RLTS.T60149A104123038.en>> Acesso em setembro de 2019.
- Gu Q, Fu L, Wang Y, Lin J (2013). Identification and characterization of extracellular cyclic dipeptides as quorum-sensing signal molecules from *Shewanella baltica*,

the specific spoilage organism of *Pseudosciaena crocea* during 4 C storage. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 61, n. 47, p. 11645-11652.

Gutiérrez NL, Valencia SR, Branch TA, Agnew DJ, Baum JK, Bianchi PL, Cornejo-Donoso J, Costello C, Defeo O, Essington TE, Hilborn R, Hoggarth DD, Larsen AE, Ninnes C, Sainsbury K, Selden RL, Sistla S, Smith ADM, Stern-Pirlot A, Teck SJ, Thorson JT, Williams NE (2012). Eco-label conveys reliable information on fish stock health to seafood consumers. *PLoS One*, v. 7, n. 8, p. e43765.

Hardisson A, Rubio C, Frias I, Rodrigues I, Reguera JI (2002). Content of sulphite in frozen prawns and shrimps. *Food control*, v. 13, n. 4-5, p. 275-279.

Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, de Waard JR (2003^a). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, v. 270, n. 1512, p. 313-321.

Hebert PDN, Ratnasingham S, de Waard, JR. (2003^b). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, v. 270, n. Suppl 1, p. S96-S99.

Hebert PDN, Stoeckle MY, Zemlak TS, Francis CM (2004^a). Identification of Birds through DNA Barcodes. *PLoS Biol* 2, v. 2, n. 10, p. e312.

Hebert PD, Penton EH, Burns JM, Janzen DH, Hallwachs W (2004^b). Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrartes fuligator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 101, n. 41, p. 14812-14817.

Heithaus MR, Frid A, Wirsing AJ, Worm B (2008). Predicting ecological consequences of marine top predator declines. *Trends in ecology & evolution*, v. 23, n. 4, p. 202-21.

- Heithaus MR, Wirsing AJ, Dill LM (2012). The ecological importance of intact top-predator populations: a synthesis of 15 years of research in a seagrass ecosystem. *Marine and Freshwater Research*, v. 63, n. 11, p. 1039-1050.
- Hellberg RSR, Morrissey MT (2011). Advances in DNA-based techniques for the detection of seafood species substitution on the commercial market. *JALA: Journal of the Association for Laboratory Automation*, v. 16, n. 4, p. 308-321.
- Hogg ID, Hebert PD (2004). Biological identification of springtails (Hexapoda: Collembola) from the Canadian Arctic, using mitochondrial DNA barcodes. *canadian Journal of Zoology*, v. 82, n. 5, p. 749-754.
- Holmes BH, Steinke D, Ward RD (2009). Identification of shark and ray fins using DNA barcoding. *Fisheries Research*, v. 95, n. 2-3, p. 280-288.
- Holt HM, Gahrn-Hansen B, Brunn B (2005). *Shewanella algae* and *Shewanella putrefaciens*: clinical and microbiological characteristics. *Clinical microbiology and infection*, v. 11, n. 5, p. 347-352.
- Hozbor N, Massa A, Vooren CM (2004). *Atlantoraja castelnaui*. The IUCN Red List of Threatened Species. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2004.RLTS.T44575A10921544.en>> Acesso em: setembro de 2019.
- Hubert N, Hanner R, Holm E, Mandrak NE, Taylor E, Burrridge M, Watkinson PD, Curry A, Bentzen P, Zhang J, April J, Bernatchez L (2008). Identifying Canadian Freshwater Fishes through DNA Barcodes. *PLoS one*, v. 3, n. 6, p. e2490.
- Hughes AR, McCrudden JE, Mayes BJ (1979). Process for bleaching dark fish meat. U.S. Patent n. 4,136,204.
- Hurst GD, Jiggins FM (2005). Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited

- symbionts. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 272, n. 1572, p. 1525-1534.
- IBGE (2013). Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <www.ibge.gov.br> Acesso em: novembro de 2019.
- ICMBio (2014). Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Tubarões e Raias Marinhos Ameaçados de Extinção. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade.
- ICMBio (2019). Plano Nacional de Ação Nacional para a Conservação dos Peixes da Amazônia Ameaçados de Extinção. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade.
- IUCN 2019. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2019.2. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acesso em: agosto de 2019.
- Johnsen, A, Rindal E, Ericson PG, Zuccon D, Kerr KC, Stoeckle MY, Lifjeld JT (2010). DNA barcoding of Scandinavian birds reveals divergent lineages in trans-Atlantic species. *Journal of Ornithology*, v. 151, n. 3, p. 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*, v. 28, n. 12, p. 1647-1649.
- Kosmann C (2009). Código de barras (DNA Barcode) de dípteros de interesse forense (Doctoral dissertation, Tesis de Maestría en Entomología. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, Brasil).
- Kyle CJ, Wilson CC (2007). Mitochondrial DNA identification of game and harvested freshwater fish species. *Forensic Science International* v. 166, n. 1, p. 68-76.

- Lameiras JLV, Costa OTF, Santos MCD, Duncan WLP (2013). Arraias de água doce (Chondrichthyes—Potamotrygonidae): Biologia, veneno e acidentes. *Scientia Amazonia*, v. 2, n. 3, p. 11-27.
- Last P, Naylor G, Séret B, White W, Carvalho M, Stehmann M (2016). *Rays of the World*. CSIRO publishing.
- Leão TCC, Almeida WR, Dechoum MDS, Ziller SR (2011). Espécies exóticas invasoras no Nordeste do Brasil: contextualização, manejo e políticas públicas. Centro de Pesquisas Ambientais do Nordeste e Instituto Hórus de Desenvolvimento e Conservação Ambiental. Recife, PE, p. 33.
- Lederer J (1991). *Enciclopédia moderna de higiene alimentar*. São Paulo: Monole Dois, p. 124-132.
- Leira MH, Botelho HA, Lago AA, de Freitas RTF, Garcia AM (2019). Identification of pathogens in fish polyculture systems in southern Minas Gerais, Brazil. *Acta Veterinaria Brasilica*, v. 13, n. 1.
- Leygonie C, Britz TJ, Hoffman LC (2012). Impact of freezing and thawing on the quality of meat. *Meat science*, v. 91, n. 2, p. 93-98.
- Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção (2018). Brasil.
- Lópes-Porras A, Elizondo C, Chaves AJ, Camus AC, Griffin MJ, Kenelty K, Barum S, Barquero-Calvo E, Soto E (2019). Application of multiplex quantitative Polymerase chain reaction methods to detect common bacterial fish pathogens in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, hatcheries in Costa Rica. *Journal of the World Aquaculture Society*, v. 50, n. 3, p. 645-658.
- Mabragaña E, de Astarloa JMD, Hanner R, Zhang J, Castro MG (2011). DNA Barcode identifies Argentine fishes from marine and brackish waters. *PLoS One*, v. 6, n. 12, p. e28655.

- Madduppa H, Ayuningtyas RU, Subhan B, Arafat D (2016). Exploited but unevaluated: DNA barcoding reveals skates and stingrays (Chordata, Chondrichthyes) species landed in the Indonesian fish market. *Indon J Mar Sci*, v. 21, n. 2, p. 77-84.
- Mallatt (1996). Ventilation and the origin of jawed vertebrates: a new mouth. *Zoological Journal of the Linnean Society*, v. 117, n. 4, p. 329-404.
- Mane BG, Tanwar VK, Girish PS, Dixit VP (2006). Identification of species origin of meat by RAPD–PCR technique. *Journal of Veterinary Public Health*, v. 4, n. 2, p. 87-90.
- Mane BG, Mendiratta SK, Tiwari AK (2009). Polymerase chain reaction assay for identification of chicken in meat and meat products. *Food Chemistry*, v. 116, n. 3, p. 806-810.
- Massa AM, Hozbor NM (2003). Peces cartilaginosos de la plataforma argentina, explotación, situación y necesidades para un manejo pesquero adecuado.[Biomass estimation of hake (*Merluccius hubbsi*) between 1994 and 1999 and North Management Unit characteristics. *Frente Marítimo*, v. 19, p. 199-206.
- Mathews CP, Druck-González J (1975). Potencial pesquero y estudios ecologicos de bahia magdalena iii. las existencias de rayas con especial interes a las ya aprovechadas. *Ciencias Marinas*, v. 2, n. 1, p. 67-72.
- Menni R, Stehmann M (2000). Distribution, environment and biology of batoid fishes off Argentina, Uruguay and Brazil. A review. *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales Nueva Serie*, v. 2, n. 1, p. 69-109.
- Metcalf JL, Pritchard VL, Silvestri SM, Jenkins JB, Wood JS, Cowley DE, Evans RP, Shiozawa DK, Martin AP (2007). Across the great divide: genetic forensics

- reveals misidentification of endangered cutthroat trout populations. *Molecular Ecology*, v. 16, n. 21, p. 4445-4454.
- Moritz C, Cicero C (2004). DNA barcoding: promise and pitfalls. *PLoS biology*, v. 2, n. 10, p. e354.
- MPA (2011). Boletim Estatístico de Pesca e Aquicultura.
- Mugimba KK, Chengula AA, Wamala S, Mwega ED, Kasanga CJ, Byarugaba DK, Mdegela RH, Tal S, Bornstein B, Dishon A, Mutoloki S, David L, Evensen Ø, Munang'andu (2018). Detection of tilapia lake virus (Ti LV) infection by PCR in farmed and wild Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from Lake Victoria. *Journal of fish diseases*, v. 41, n. 8, p. 1181-1189.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI). Bethesda (MD): National Library of Medicine (1988). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>> Acesso em: agosto de 2019.
- Neiva C, Tomita R, Cerqueira M, Miura M, Furlan E, Machado T, Lemos-Neto MJ (2010). O mercado de pescado da região metropolitana de São Paulo. São Paulo. FAO, INFOPESCA.
- Neto DAP (2013). Detecção de adulteração de espécies de pescado e derivados por meio da técnica de DNA Barcoding.
- NG HH, Tan HH, Yeo DC, NG PK (2010). Stingers in a strange land: South American freshwater stingrays (Potamotrygonidae) in Singapore. *Biological invasions*, v. 12, n. 8, p. 2385-2388.
- Nikitin MM, Statsyuk NV, Frantsuzov PA, Dzhabakhiya VG, Golikov AG (2018). Matrix approach to the simultaneous detection of multiple potato pathogens by real-time PCR. *Journal of applied microbiology*, v. 124, n. 3, p. 797-809.

- Novak J, Grausgruber-Gröger S, Lukas B (2007). DNA-based authentication of plant extracts. *Food research international*, v. 40, n. 3, p. 388-392.
- Parkingking R, Palma P, Usero R (2015). Quantitative and qualitative analyses of the bacterial microbiota of tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in earthen ponds in the Philippines. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 31, n. 2, p. 265-275.
- Paździor E (2016). *Shewanella putrefaciens*—a new opportunistic pathogen of freshwater fish. *Journal of Veterinary Research*, v. 60, n. 4, p. 429-434.
- Peres JA, Vooren CM (1993). Ciclo reproductivo de quatro espécies do gênero *Raja* do Sul do Brasil. Res. VI Reunião Grupo de Trabalho Pesca e Pesquisa Tubarões e Arraias no Brasil.
- Pikitch EK, Camhi MD, Babcock EA (2008). Introduction to sharks of the open ocean. *Sharks of the open ocean: biology, fisheries and conservation*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK, p. 1-13.
- Quinto CA, Tinoco R, Hellberg RS (2016). DNA barcoding reveals mislabeling of game meat species on the US commercial market. *Food Control*, v. 59, p. 386-392.
- Rasmussen RS, Morrissey MT (2008). DNA-based methods for the identification of commercial fish and seafood species. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, v. 7, n. 3, p. 280-295.
- Ratnasingham S, Hebert PDN (2007). BOLD: The barcode of life data system (www.barcodinglife.org). *Molecular Ecology Resources*, v. 7, n. 3, p. 355-364.
- Rennick SL, Fenton TW, Foran DR (2005). The effects of skeletal preparation techniques on DNA from human and non-human bone. *Journal of Forensic Science*, v. 50, n. 5, p. JFS2004405-4.

- Rosa RDS (1985). A systematic revision of the South American freshwater stingrays (chondrichthyes: potamotrygonidae)(batoidei, myliobatiformes, phylogeny, biogeography).
- Rosa RS, Furtado M, Snelson F, Piercy A, Grubbs RD, Serena F, Mancusi C (2016). *Bathytoshia centroura*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-3.RLTS.T63152A104065289.en>> Acesso em: setembro de 2019.
- San Martín JM, Stehmann MFW, Kyne PM (2007). *Atlantoraja platana*. The IUCN Red List of Threatened Species. <<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2007.RLTS.T63110A12608554.en>> Acesso em: setembro de 2019.
- Scampicchio M, Lawrence NS, Arecchi A, Mannino S (2008). Determination of sulfite in wine by linear sweep voltammetry. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, v. 20, n. 4, p. 444-447.
- Serra-Pereira B, Moura T, Griffiths AM, Serrano Gordo L, Figueiredo I (2011). Molecular barcoding of skates (Chondrichthyes: Rajidae) from the southern Northeast Atlantic. *Zoologica Scripta*, v. 40, n. 1, p. 76-84.
- Sevilla RG, Diez A, Noren M, Mouchel O, Jerome M, Verrezbagnis V, Van Pelth H, Favre-Krey L, Krey G, Consortium TF, Bautista JM (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* v. 7, n. 5, p. 730-734.
- Simpfendorfer CA, Heupel MR, White WT, Dulvy, NK (2011). The importance of research and public opinion to conservation management of sharks and rays: a synthesis. *Marine and Freshwater Research*, v. 62, n. 6, p. 518-527.

- Smith PL, McVeagh SM, Steinke D (2008). DNA barcoding for the identification of smoked fish products. *Journal of Fish Biology*, v. 72, n. 2, p. 464-471.
- Smith WD, Bizzarro JJ, Lamilla J (2016). *Hypanus dipterurus*. The IUCN Red List of Threatened Species. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-3.RLTS.T60152A104124276.en>> Acesso em setembro de 2019.
- Silva PC, Malabarba MC, Malabarba LR (2019). Integrative taxonomy: Morphology and ancient DNA barcoding reveals the true identity of *Astyanax taeniatus*, a tetra collected by Charles Darwin during the Beagle's voyage. *Zoologischer Anzeiger*, v. 278, p. 110-120.
- Sumaila UR, Cheung W, Dyck A, Gueye K, Huang L, Lam V, Pauly D, Srinivasan T, Swartz W, Watson R, Zeller D (2012). Benefits of rebuilding global marine fisheries outweigh costs. *PloS one*, v. 7, n. 7, p. e40542.
- Tavares ES, Goncalves P, Miyaki CY, Baker AJ (2011). DNA Barcode Detects High Genetic Structure within Neotropical Bird Species, v. 6, n. 12, p. e28543.
- Teletchea F, Maudet C, Hänni C (2005). Food and forensic molecular identification: update and challenges. *Trends in biotechnology*, v. 23, n. 7, p. 359-366.
- Tresbach RH, Cerqueira NM, Medeiros SR, Gutierrez HJP, Hernández NO, Rodrigues MDN (2015). DNA barcoding: uma ferramenta de apoio molecular para identificação de espécies de peixes. *Scientia Agraria Paranaensis*, v. 14, n. 2, p. 77-81.
- UNIVALI/CTTMar (2011). Boletim estatístico da pesca industrial de Santa Catarina – Ano 2010. Universidade do Vale do Itajaí, Centro de Ciências Tecnológicas da Terra e do Mar, Itajaí.
- Vally H, Thompson PJ (2001). Role of sulfite additives in wine induced asthma: single dose and cumulative dose studies. *Thorax*, v. 56, n. 10, p. 763-769.

- Virgilio M, Jordaens K, Breman FC, Backeljau T, De Meyer M. (2012). Identifying Insects with Incomplete DNA Barcode Libraries, African Fruit Flies (Diptera: Tephritidae) as a Test Case, v. 7, n. 2, p. e31581.
- Vignier N, Barreau M, Olive C, Baubion E, Théodose R, Hochedez P, Cabié A (2013). Human infection with *Shewanella putrefaciens* and *S. algae*: report of 16 cases in Martinique and review of the literature. The American journal of tropical medicine and hygiene, v. 89, n. 1, p. 151-156.
- Vivero RJ, Bejarano EE, Estrada LG, Florez F, Ortega-Gómez E, Aparicio Y, Torres-Gutiérrez C, Uribe-Soto S, Muskus-López C (2019). DNA barcode for identification of immature stages of sand flies (Diptera: Psychodidae) collected from natural breeding sites. *Articulo de revista*.
- Vooren CM, Piercy AN, Snelson Jr FF, Grubbs RD, Notarbartolo di Sciara G, Serena S (2007). *Gymnura altavela*. The IUCN Red List of Threatened Species. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2007.RLTS.T63153A12624290.en>> Acesso em setembro de 2019.
- Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PD (2005). DNA Barcode Australia's fish species. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences, v. 360, n. 1462, p.1847-1857.
- Webb JM, Jacobus LM, Funk DH, Zhou X, Kondratieff B, Geraci CJ, DeWalt E, Baird DJ, Richard B, Phillips I, Hebert PD. (2012). A DNA barcode library for North American Ephemeroptera: progress and prospects, v. 7, n. 5, p. e38063.
- Yang ZQ, Tao XY, Zhang H, Rao SQ, Gao L, Pan ZM, Jiao XA (2019). Isolation and characterization of virulent phages infecting *Shewanella baltica* and *Shewanella putrefaciens*, and their application for biopreservation of chilled channel catfish

(*Ictalurus punctatus*). International journal of food microbiology, v. 292, p. 107-117.

Zhang J. (2011). Species identification of marine fishes in China with DNA Barcode.

Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, v. 2011.



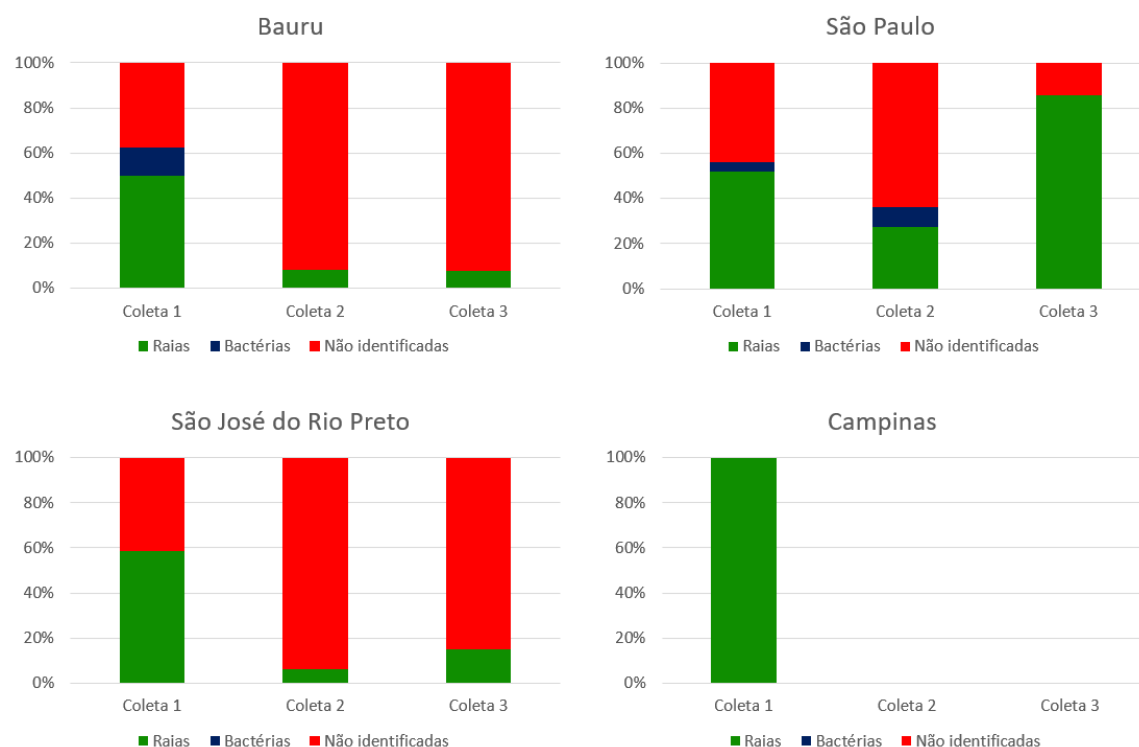
ANEXOS

Anexo 1.



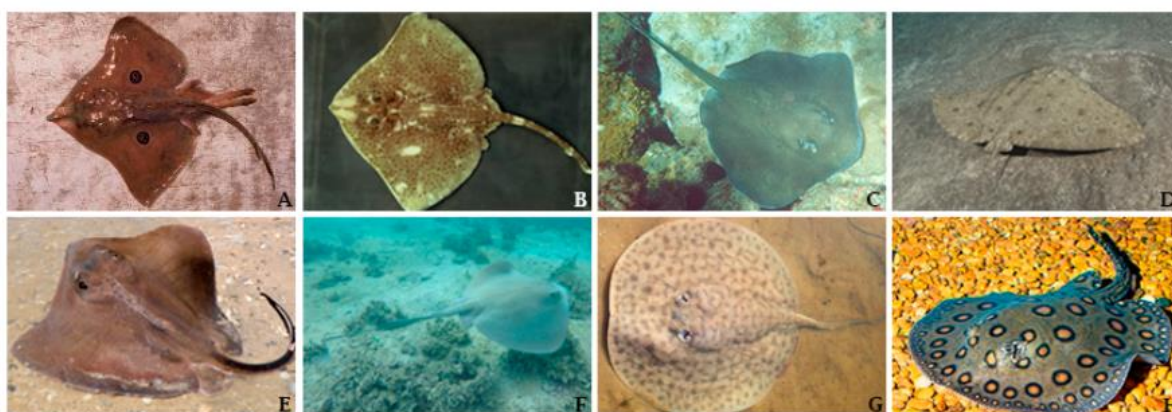
87

Anexo 2.



Porcentagem de amostras identificadas como raia e bactérias divididas por localidade e coleta.

Anexo 3.



Espécies de raia identificadas. A) *Atlantoraja castelnaui*. B) *Atlantoraja platana*. C) *Bathytoshia centroura*. D) *Gymnura altavela*. E) *Hypanus americanus*. F) *Hypanus dipterurus*. G) *Paratrygon aiereba*. H) *Potamotrygon motoro*.



APÊNDICES

9 APÊNDICE

Apêndice 1.

Arhynchobatidae		
<i>Atlantoraja castelnaui</i>	Raia-chita	EN
<i>Rioraja agassizii</i>	Raia-santa	EN
<i>Sympterygia acuta</i>	Raia-emplastro	EN
<i>Sympterygia bonapartei</i>	Emplastro-amarelo	EN
Dasyatidae		
<i>Bathytoshia centroura</i>	Raia-prego-de-cauda-áspera	CR
<i>Fontitrygon colarensis</i>	Raia	VU
Gymnuridae		
<i>Gymnura altavela</i>	Raia-borboleta	CR
Potamotrygonidae		
<i>Paratrygon aiereba</i>	Raia-aramaçá	CR
Mobulidae		
<i>Manta birostris</i>	Raia-manta	VU
<i>Mobula hypostoma</i>	Raia-manta	VU
<i>Mobula mobular</i>	Raia-manta	VU
<i>Mobula rochebrunei</i>	Raia-anã	VU
<i>Mobula tarapacana</i>	Raia-jamanta	VU
<i>Mobula thurstoni</i>	Raia-jamanta	VU
Mobulidae		
<i>Manta birostris</i>	Raia-manta	VU
<i>Mobula japanica</i>	Raia-manta	NT
<i>Mobula rochebrunei</i>	Raia-manta	VU
<i>Mobula tarapacana</i>	Raia-manta	VU
<i>Mobula thurstoni</i>	Raia-manta	NT
Myliobatidae		
<i>Myliobatis freminvillii</i>	Raia-sapo	EM
<i>Myliobatis goodei</i>	Raia-sapo	CR
<i>Myliobatis ridens</i>	Raia-sapo	CR
<i>Rhinoptera brasiliensis</i>	Raia-beiço-de-boi	CR
Pristidae		
<i>Pristis pectinata</i>	Peixe-serra	CR
<i>Pristis pristis</i>	Peixe-serra	CR
Rhinobatidae		
<i>Rhinobatos horkelii</i>	Raia-viola / Viola	CR

<i>Rhinobatos lentiginosus</i>	Raia-viola / Viola	VU
Trygonorrhinidae		
<i>Zapteryx brevirostris</i>	Banjo / Raia-viola-de-bico-curto	VU
Torpedinidae		
<i>Tetronarce puelcha</i>	Raia-elétrica	VU

Espécies de raias em risco de extinção no Brasil de acordo com o Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. Na primeira, segunda e terceira coluna encontram-se os nomes científicos das espécies, os nomes populares e seus estados de conservação, respectivamente. NT – Quase ameaçada. VU – Espécie vulnerável. EN – Espécie em perigo. CR – Criticamente em perigo.

Apêndice 2.

Aetobatidae		
<i>Aetobatus narinari</i>	Raia-pintada	NT
Arhynchobatidae		
<i>Atlantoraja castelnaui</i>	Raia-chita	EN
<i>Atlantoraja cyclophora</i>	Raia	VU
<i>Atlantoraja platana</i>	Raia	VU
<i>Rioraja agassizii</i>	Raia-santa	VU
<i>Rhinoraja multispinis</i>	Raia	NT
<i>Sympterygia acuta</i>	Raia-emplastro	VU
Dasyatidae		
<i>Fontitrygon colarensis</i>	Raia	VU
<i>Fontitrygon geijskesi</i>	Raia-bicuda	NT
Gymnuridae		
<i>Gymnura altavela</i>	Raia-manteiga	VU
Mobulidae		
<i>Manta birostris</i>	Raia-manta	VU
<i>Mobula japanica</i>	Raia-manta	NT
<i>Mobula rochebrunei</i>	Raia-manta	VU
<i>Mobula tarapacana</i>	Raia-manta	VU
<i>Mobula thurstoni</i>	Raia-manta	NT
Myliobatidae		
<i>Myliobatis ridens</i>	Raia-manteiga	CR
<i>Rhinoptera brasiliensis</i>	Raia-beiço-de-boi	EN
Narcinidae		
<i>Benthobatis krefftii</i>	Raia cega	VU
<i>Diplobatis pictus</i>	Raia elétrica variegada	VU

<i>Discopyge tschudii</i>	Raia elétrica	NT
<i>Narcine bancroftii</i>	Raia elétrica do Caribe	CR
Pristidae		
<i>Pristis pectinata</i>	Peixe-serra	CR
<i>Pristis pristis</i>	Peixe-serra	CR
Rajidae		
<i>Dipturus mennii</i>	Raia	VU
<i>Dipturus trachydermus</i>	Raia espinhuda	VU
<i>Gurgesiella dorsalifera</i>	Raia	VU
Rhinobatidae		
<i>Rhinobatos horkelii</i>	Raia-viola	CR
<i>Rhinobatos lentiginosus</i>	Raia-viola	CR
Rhinopteridae		
<i>Rhinoptera bonasus</i>	Raia nariz de vaca	NT
<i>Rhinoptera brasiliensis</i>	Raia brasileira nariz de vaca	EN
Trygonorrhinidae		
<i>Zapteryx brevirostris</i>	Raia-viola	VU

Espécies de raias em risco de extinção no Brasil de acordo com a Lista Vermelha da IUCN. Na primeira, segunda e terceira coluna encontram-se os nomes científicos das espécies, os nomes populares e seus estados de conservação, respectivamente. NT – Quase ameaçada. VU – Espécie vulnerável. EN – Espécie em perigo. CR – Criticamente em perigo.

Apêndice 3.

Alopiidae		
<i>Alopias superciliosus</i>	Zorro de olhos grandes	II
<i>Alopias vulpinus</i>	Tubarão-raposo	II
Carcharhinidae		
<i>Carcharhinus falciformis</i>	Tubarão lombo-preto	II
<i>Carcharhinus longimanus</i>	Tubarão galha-branca-oceânico	II
Cetorhinidae		
<i>Cetorhinus maximus</i>	Tubarão-elefante	II
Lamnidae		
<i>Carcharodon carcharias</i>	Tubarão-branco	II
<i>Isurus oxyrinchus</i>	Tubarão-mako	II
<i>Isurus paucus</i>	Tubarão-anequim	II
<i>Lamna nasus</i>	Tubarão-sardo	II
Myliobatidae		
<i>Manta birostris</i>	Raia-manta	II
<i>Mobula hypostoma</i>	Raia-manta	II
<i>Mobula japanica</i>	Raia-manta	II

<i>Mobula tarapanaca</i>	Raia-manta	II
<i>Mobula thurstoni</i>	Raia-manta	II
Potamotrygonidae		
<i>Paratrygon aiereba</i>	Raia-aramaçá	III
<i>Potamotrygon albimaculata</i>	Raia	III
<i>Potamotrygon amandae</i>	Raia	III
<i>Potamotrygon brachyura</i>	Raia-do-rio-de-cauda-curta	III
<i>Potamotrygon constellata</i>	Raia	III
<i>Potamotrygon falkneri</i>	Raia-pintada	III

Espécies de elasmobrânquios em risco de extinção no Brasil de acordo com a lista da CITES. Na primeira, segunda e terceira coluna encontram-se os nomes científicos das espécies, os nomes populares e suas classificações dentro da plataforma, respectivamente. II – Espécies não necessariamente ameaçadas de extinção, mas que o comércio deve ser controlado para evitar o uso incompatível com sua sobrevivência. III – Espécies protegidas em ao menos um país que solicitou a CITES por assistência no controle do comércio.

Apêndice 4.

Amostra	Localidade	Similaridade	Espécie identificada	Estado de conservação (IUCN)
10122	Bauru	100,00%	<i>Potamotrygon motoro</i>	Dados Insuficientes
10123	Bauru	98,15%	<i>Potamotrygon motoro</i>	Dados Insuficientes
10124	Bauru	94,00%	<i>Paratrygon aiereba</i>	Dados Insuficientes
10125	Bauru	100,00%	<i>Paratrygon aiereba</i>	Dados Insuficientes
10126	Bauru	100,00%	<i>Potamotrygon motoro</i>	Dados Insuficientes
10127	Bauru	98,15%	<i>Potamotrygon motoro</i>	Dados Insuficientes
10128	Bauru	99,17%	<i>Potamotrygon motoro</i>	Dados Insuficientes
10129	Bauru	100,00%	<i>Gymnura altavela</i>	Vulnerável
10130	Bauru	100,00%	<i>Gymnura altavela</i>	Vulnerável
10131	Bauru	100,00%	<i>Gymnura altavela</i>	Vulnerável
10524	Bauru	98,31%	<i>Atlantoraja castelnaui</i>	Em Perigo
10528	Bauru	100,00%	<i>Shewanella putrefaciens/baltica</i>	Contaminado
10529	Bauru	98,11%	<i>Shewanella putrefaciens/baltica</i>	Contaminado
10530	Bauru	100,00%	<i>Atlantoraja castelnaui</i>	Em Perigo

10531	Bauru	94,00%	<i>Hypanus dipterurus</i>	Dados Insuficientes
10532	Bauru	97,14%	<i>Shewanella putrefaciens/baltica</i>	Contaminado
10534	Bauru	99,28%	<i>Bathytoshia centroura</i>	Pouco Preocupante
10535	Bauru	99,00%	<i>Hypanus dipterurus</i>	Dados Insuficientes
10536	Bauru	100,00%	<i>Hypanus dipterurus</i>	Dados Insuficientes
10537	Bauru	98,58%	<i>Hypanus dipterurus</i>	Dados Insuficientes
10539	Bauru	97,15%	<i>Shewanella putrefaciens/baltica</i>	Contaminado
10542	Bauru	100,00%	<i>Hypanus dipterurus</i>	Dados Insuficientes
11745	Bauru	99,63%	<i>Atlantoraja castelnaui</i>	Em Perigo
11970	Bauru	99,05%	<i>Paratrygon aiereba</i>	Dados Insuficientes
10494	São Paulo	100,00%	<i>Atlantoraja castelnaui</i>	Em Perigo
10496	São Paulo	97,67%	<i>Shewanella putrefaciens/baltica</i>	Contaminado
10497	São Paulo	98,79%	<i>Atlantoraja castelnaui</i>	Em Perigo
10498	São Paulo	100,00%	<i>Potamotrygon motoro</i>	Dados Insuficientes
10501	São Paulo	100,00%	Rajiformes	-
10507	São Paulo	100,00%	<i>Atlantoraja castelnaui</i>	Em Perigo
10508	São Paulo	98,18%	<i>Atlantoraja castelnaui</i>	Em Perigo
10510	São Paulo	98,75%	<i>Hypanus americanus</i>	Dados Insuficientes
10512	São Paulo	100,00%	<i>Hypanus americanus</i>	Dados Insuficientes
10513	São Paulo	100,00%	<i>Hypanus americanus</i>	Dados Insuficientes
10514	São Paulo	100,00%	<i>Hypanus americanus</i>	Dados Insuficientes
10515	São Paulo	98,23%	<i>Gymnura altavela</i>	Vulnerável
10517	São Paulo	100,00%	<i>Gymnura altavela</i>	Vulnerável
10518	São Paulo	100,00%	<i>Gymnura altavela</i>	Vulnerável
11632	São Paulo	100,00%	<i>Atlantoraja platana</i>	Vulnerável
11634	São Paulo	100,00%	<i>Atlantoraja platana</i>	Vulnerável

11636	São Paulo	98,44%	<i>Atlantoraja castelnaui</i>	Em Perigo
11639	São Paulo	100,00%	<i>Shewanella putrefaciens/baltica</i>	Contaminado
11987	São Paulo	100,00%	<i>Gymnura altavela</i>	Vulnerável
11988	São Paulo	100,00%	<i>Gymnura altavela</i>	Vulnerável
11989	São Paulo	100,00%	<i>Gymnura altavela</i>	Vulnerável
11990	São Paulo	100,00%	<i>Gymnura altavela</i>	Vulnerável
11991	São Paulo	100,00%	<i>Gymnura altavela</i>	Vulnerável
11993	São Paulo	100,00%	<i>Gymnura altavela</i>	Vulnerável
11107	São José do Rio Preto	100,00%	<i>Paratrygon aiereba</i>	Dados Insuficientes
11109	São José do Rio Preto	100,00%	<i>Potamotrygon motoro</i>	Dados Insuficientes
11110	São José do Rio Preto	99,32%	<i>Potamotrygon motoro</i>	Dados Insuficientes
11111	São José do Rio Preto	99,00%	<i>Potamotrygon motoro</i>	Dados Insuficientes
11112	São José do Rio Preto	100,00%	<i>Paratrygon aiereba</i>	Dados Insuficientes
11113	São José do Rio Preto	100,00%	<i>Paratrygon aiereba</i>	Dados Insuficientes
11114	São José do Rio Preto	99,00%	<i>Potamotrygon motoro</i>	Dados Insuficientes
11116	São José do Rio Preto	100,00%	<i>Paratrygon aiereba</i>	Dados Insuficientes
11117	São José do Rio Preto	98,04%	<i>Paratrygon aiereba</i>	Dados Insuficientes
11118	São José do Rio Preto	100,00%	<i>Paratrygon aiereba</i>	Dados Insuficientes
11119	São José do Rio Preto	100,00%	<i>Paratrygon aiereba</i>	Dados Insuficientes
11121	São José do Rio Preto	100,00%	<i>Paratrygon aiereba</i>	Dados Insuficientes
11122	São José do Rio Preto	98,00%	<i>Paratrygon aiereba</i>	Dados Insuficientes
11123	São José do Rio Preto	95,00%	<i>Paratrygon aiereba</i>	Dados Insuficientes
11124	São José do Rio Preto	100,00%	<i>Paratrygon aiereba</i>	Dados Insuficientes
11125	São José do Rio Preto	100,00%	<i>Paratrygon aiereba</i>	Dados Insuficientes
11126	São José do Rio Preto	100,00%	<i>Paratrygon aiereba</i>	Dados Insuficientes
11127	São José do Rio Preto	100,00%	<i>Paratrygon aiereba</i>	Dados Insuficientes

11131	São José do Rio Preto	98,92%	<i>Potamotrygon motoro</i>	Dados Insuficientes
11132	São José do Rio Preto	100,00%	<i>Paratrygon aiereba</i>	Dados Insuficientes
11136	São José do Rio Preto	100,00%	<i>Paratrygon aiereba</i>	Dados Insuficientes
11137	São José do Rio Preto	100,00%	<i>Paratrygon aiereba</i>	Dados Insuficientes
11138	São José do Rio Preto	100,00%	<i>Paratrygon aiereba</i>	Dados Insuficientes
11139	São José do Rio Preto	100,00%	<i>Paratrygon aiereba</i>	Dados Insuficientes
11142	São José do Rio Preto	100,00%	<i>Paratrygon aiereba</i>	Dados Insuficientes
11145	São José do Rio Preto	100,00%	<i>Paratrygon aiereba</i>	Dados Insuficientes
11147	São José do Rio Preto	99,22%	<i>Paratrygon aiereba</i>	Dados Insuficientes
11149	São José do Rio Preto	98,00%	<i>Paratrygon aiereba</i>	Dados Insuficientes
11782	São José do Rio Preto	100,00%	<i>Paratrygon aiereba</i>	Dados Insuficientes
11791	São José do Rio Preto	100,00%	<i>Paratrygon aiereba</i>	Dados Insuficientes
11796	São José do Rio Preto	100,00%	<i>Paratrygon aiereba</i>	Dados Insuficientes
12688	São José do Rio Preto	100,00%	<i>Paratrygon aiereba</i>	Dados Insuficientes
12691	São José do Rio Preto	100,00%	<i>Paratrygon aiereba</i>	Dados Insuficientes
12702	São José do Rio Preto	100,00%	<i>Paratrygon aiereba</i>	Dados Insuficientes
12703	São José do Rio Preto	98,28%	<i>Paratrygon aiereba</i>	Dados Insuficientes
12708	São José do Rio Preto	100,00%	<i>Paratrygon aiereba</i>	Dados Insuficientes
12724	São José do Rio Preto	98,60%	<i>Paratrygon aiereba</i>	Dados Insuficientes
11153	Campinas	99,17%	<i>Hypanus diprerurus</i>	Dados Insuficientes
11154	Campinas	100,00%	<i>Hypanus dipterurus</i>	Dados Insuficientes
11155	Campinas	100,00%	<i>Hypanus dipterurus</i>	Dados Insuficientes
11156	Campinas	100,00%	<i>Bathytoshia centroura</i>	Pouco Preocupante
11157	Campinas	100,00%	<i>Hypanus dipterurus</i>	Dados Insuficientes
11158	Campinas	100,00%	<i>Hypanus dipterurus</i>	Dados Insuficientes

Identificação das amostras coletadas na CEAGESP e peixarias.

