

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP**

**Faculdade de Ciências - Campus de Bauru**

**GABRIELA IDALINE DE FREITAS**

**DNA Barcode na identificação de bexigas natatórias: uma  
abordagem no comércio internacional**

Bauru

2024

**GABRIELA IDALINE DE FREITAS**

**DNA Barcode na identificação de bexigas natatórias: uma  
abordagem no comércio internacional**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências, Bauru, para obtenção do título de Mestre(a) em Biociências.

Área de Concentração: Caracterização e Aplicação da Diversidade Biológica.

Orientador(a): Prof. Dr. Fabio Porto Foresti

Coorientador(a): Prof. Dr. Ricardo Utsunomia

Bauru

2024

D316d

de Freitas, Gabriela Idaline

DNA Barcode na identificação de bexigas natatórias : uma abordagem no comércio internacional / Gabriela Idaline de Freitas. -- Bauru, 2024  
60 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências, Bauru

Orientador: Fabio Porto Foresti


Coorientador: Ricardo Utsunomia

1. Genética animal. 2. Marcadores genéticos. 3. Peixes identificação. 4. Fraude na ciência. I. Título.

**ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE GABRIELA IDALINE DE FREITAS, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS - CÂMPUS DE BAURU.**

Aos 26 dias do mês de setembro do ano de 2024, às 09:00 horas, no(a) Espaço DCB, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de GABRIELA IDALINE DE FREITAS, intitulada "**DNA Barcode na identificação de bexigas natatórias: uma abordagem no comércio internacional**". A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. FABIO PORTO FORESTI (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências - Unesp/Câmpus de Bauru, Dra. LETÍCIA RAFAELA DE MORAIS (Participação Presencial) do(a) Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências - UNESP - Bauru, Profa. Dra. VANESSA PAES DA CRUZ (Participação Presencial) do(a) Departamento de Morfologia / Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP. Após a exposição pela mestranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final:     Aprovado    . Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. FABIO PORTO FORESTI

Documento assinado digitalmente  
 **FABIO PORTO FORESTI**  
Data: 25/10/2024 11:42:16-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço ao meu orientador, Fabio, por sempre me incentivar e tornar possível o desenvolvimento deste trabalho. Sua orientação foi fundamental, assim como seu apoio durante os muitos momentos difíceis ao longo desses anos.

À minha família, minha eterna gratidão, especialmente aos meus pais, que sempre me incentivaram a correr atrás dos meus sonhos. O apoio incondicional de vocês tornou possível a conquista deste título. À minha irmãzinha Liz, que é a principal razão pela qual eu busco sempre melhorar. Quero ser um bom exemplo para você.

Ao meu namorado, Eduardo, minha gratidão eterna. Você é muito mais do que eu sonhei, muito além do que eu sabia que precisava. Você foi minha luz quando eu já não acreditava que poderia haver um caminho para o amor. Me ensinou o que é amar e ser amada. Obrigada por ser minha casa, meu confidente e meu maior apoiador. Eu te amo incondicionalmente.

Aos meus amigos do laboratório, que estiveram ao meu lado em cada etapa deste trabalho, meu sincero agradecimento. Em especial, ao Zeni e ao Henriqueta, que sempre foram ótimos ouvintes e conselheiros, proporcionando um suporte muito importante para mim. À Nat Talia e à Mandinha, que, além de amigas de laboratório, se tornaram minhas irmãs. Obrigada por todo apoio, pelos conselhos e, acima de tudo, por serem meu porto seguro dentro e fora do laboratório. Sem vocês eu não conseguiria passar nem pelo primeiro ano.

À minha sogra, Mô, sou profundamente grata por me dar um lar e me acolher como filha. Nunca me senti tão em casa em Bauru como me sinto com vocês! Obrigada por ser tão amorosa, receptiva e cuidar de mim tão bem.

Por último, mas não menos importante, agradeço aos órgãos de fomento que forneceram o apoio financeiro e recursos necessários para que este trabalho fosse realizado: CAPES, FAPESP, FUNEP e CNPq.

*“Não importa o que os outros esperam de você. A questão é o que você quer para si mesmo.”*

– *A Casa de Hades* (Os Heróis do Olimpo, Rick Riordan)

## RESUMO

O consumo de recursos pesqueiros tem crescido globalmente, abrangendo desde moluscos até peixes de alto valor econômico. No Brasil, a partir do final do século XX, incentivos fiscais impulsionaram o desenvolvimento da pesca, principalmente voltada para exportação. Em 2024, o setor registrou um aumento de 48% no valor das exportações e de 20% no volume em relação ao ano anterior, destacando-se no comércio internacional de subprodutos como a bexiga natatória e barbatanas de tubarão, apreciados em mercados como China, Japão, EUA e Europa. No entanto, a identificação inadequada de espécies comercializadas, especialmente as ameaçadas, é um desafio recorrente. A análise genética se apresenta como uma solução eficaz para melhorar a classificação e manejo sustentável dos recursos pesqueiros, contribuindo para o controle da exploração e preservação ambiental. Como método para identificação de material biológico comercializado, temos a técnica de DNA Barcode, que é um sistema de identificação molecular espécie-específico que se baseia na sequência de um fragmento do DNA mitocondrial Subunidade I da Citocromo Oxidase (COI), onde é necessário apenas um pequeno fragmento de material biológico para sua execução. Essa técnica é a mais utilizada atualmente, por ser rápida, prática, efetiva e de baixo custo. Diante disso, o presente projeto visa analisar amostras de bexiga natatória, apreendidas pelo IBAMA, através da técnica de DNA Barcode, a fim de identificar e mapear quais espécies estão sendo comercializadas descaracterizadas morfologicamente, em especial, buscando identificar problemas no comércio de espécies superexploradas no território nacional. As análises resultaram na identificação de 8 espécies de peixes, incluindo *Cynoscion acoupa*, *Cynoscion leiarchus*, *Cynoscion microlepidotus*, *Cynoscion virescens*, *Macrodon ancylodon*, *Macrodon atricauda*, *Plagioscion auratus* e *Sciades parkeri*; e duas espécies de répteis, *Caiman crocodilus* e *Melanosuchus niger*. Os órgãos governamentais não regulamentam efetivamente a cadeia produtiva do grude, especialmente quanto à sua comercialização, ao alto valor no mercado internacional e ao impacto ambiental na fauna marinha do norte do Brasil. Políticas de preservação dessas espécies continuam gerando controvérsias entre os proprietários de embarcações e a comunidade local. Essa pesquisa revelou que muitos produtos desse comércio internacional são negociados sob falsas declarações dos remetentes,

destacando a necessidade de fiscalização mais rigorosa e o uso de técnicas moleculares para identificação. Além disso, incentivos fiscais podem incentivar os comerciantes a operarem de maneira mais regulamentada, minimizando os impactos negativos nas espécies envolvidas.

**Palavras-chave:** genética animal; marcadores genéticos; peixes identificação; fraude na ciência.

## ABSTRACT

The consumption of fishery resources has been globally increasing, ranging from mollusks to economically valuable fish species. In Brazil, since the late 20th century, fiscal incentives have fostered the development of fisheries, primarily targeting exports. In 2024, the sector recorded a 48% increase in export value and a 20% rise in volume compared to the previous year, with particular prominence in the international trade of by-products such as swim bladders and shark fins, highly valued in markets like China, Japan, the USA, and Europe. However, the inadequate identification of traded species, particularly endangered ones, remains a recurring challenge. Genetic analysis has emerged as an effective solution to enhance species classification and ensure the sustainable management of fishery resources, aiding in the control of exploitation and environmental preservation. As a method for identifying biological material in trade, DNA barcoding has proven particularly useful. This species-specific molecular identification system relies on the sequence of a mitochondrial DNA fragment, the Cytochrome Oxidase Subunit I (COI), and requires only a small biological sample for its execution. DNA barcoding is widely employed due to its speed, practicality, effectiveness, and low cost. In this context, the present study aimed to analyze swim bladder samples seized by IBAMA using DNA barcoding to identify and map which species are being morphologically mischaracterized in trade, with a special focus on detecting issues involving the trade of overexploited species within Brazil. Analyses identified eight fish species, including *Cynoscion acoupa*, *Cynoscion leiarchus*, *Cynoscion microlepidotus*, *Cynoscion virescens*, *Macrodon ancylodon*, *Macrodon atricauda*, *Plagioscion auratus*, and *Sciades parkeri*, as well as two reptile species, *Caiman crocodilus* and *Melanosuchus niger*. Governmental agencies currently do not effectively regulate the production chain of “grude” (a swim bladder derivative), particularly regarding its commercialization, high value in the international market, and environmental impact on marine fauna in northern Brazil. Conservation policies for these species continue to generate controversy among vessel owners and local communities. This study revealed that many products in the international trade are negotiated under false declarations from exporters, underscoring the need for stricter surveillance and the use of molecular techniques for identification. Moreover, fiscal

incentives could encourage traders to operate in a more regulated manner, minimizing negative impacts on the species involved.

**Keywords:** animal genetics; genetic markers; fish identification; scientific fraud.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	Comercialização de recursos pesqueiros.....	13
1.2	O Comercio ilegal de recursos biológicos .....	15
1.3	Uso dos subprodutos provenientes da bexiga natatória.....	17
1.4	DNA Barcode como ferramenta de identificação de espécies .....	19
2	JUSTIFICATIVA.....	22
3	OBJETIVOS.....	24
3.1	Objetivo geral .....	24
3.2	Objetivos específicos .....	24
4	MATERIAL E MÉTODO.....	25
4.1	Coleta das amostras .....	25
4.2	Análises Moleculares .....	26
4.2.1	Extração de DNA .....	26
4.2.2	Amplificação do gene mitocondrial COI .....	26
4.2.3	Sequenciamento.....	27
4.2.4	Análise das sequências e identificação das espécies .....	28
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	29
5.1	Artigo 1:.....	29
5.1.1	Introdução.....	30
5.1.2	Materiais e Métodos .....	33

5.1.3 Resultados e Discussão .....	34
5.2 Artigo 2: .....	43
5.2.1 Introdução.....	44
5.2.2 Materiais e Métodos .....	46
5.2.3 Resultados e Discussão .....	47
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	54
7 REFERÊNCIAS .....	55

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Comercialização de recursos pesqueiros

A pesca tem sido uma parte intrínseca da nossa cultura ao longo do tempo, desempenhando diversos papéis, como fornecer alimentos, sustentar meios de vida e representar a identidade de diferentes povos (da Silva et al., 2019). Infelizmente, as atividades humanas, como o desmatamento, o represamento de rios, a pesca excessiva, a poluição das águas por plásticos e resíduos domésticos, a caça ilegal e a degradação dos habitats, têm causado um impacto negativo significativo na diversidade de espécies de peixes (Marnis et al., 2024). Os peixes desempenham um papel crucial como fontes de proteína animal para o ser humano, sendo amplamente empregados na medicina complementar e alternativa, bem como na medicina tradicional (Zhang, 2011). Atualmente, o consumo global de frutos do mar e seus derivados está em constante crescimento, representando componentes comerciais de grande valor econômico (Da Silva et al., 2019).

Segundo Mcgoodwin (1990), há 3.000 anos, a costa peruana já apresentava sinais de sobrepesca, conforme registros históricos. Com a chegada da Revolução Industrial, ocorreram mudanças significativas no setor pesqueiro, incluindo a introdução de novas tecnologias que transformaram tanto a dinâmica técnica quanto social das comunidades de pesca (Murawski, 1990). O mesmo autor ainda cita que a modificação dos sistemas de propulsão das embarcações, a construção de portos pesqueiros e a adoção de métodos de captura como redes de arrasto impulsionaram o aprimoramento da pesca em pequena escala. Essas transformações tecnológicas tornaram a atividade pesqueira mais poderosa e eficiente, resultando em um aumento no consumo de peixes e criando as condições para o desenvolvimento do modo de produção capitalista nesse setor (Marrul Filho, 2003).

Marrul Filho (2003) ainda diz que a partir do final dos anos 1960, o governo brasileiro começou a impulsionar ativamente a atividade de pesca, facilitando o acesso a crédito e concedendo incentivos fiscais para estimular o crescimento da

indústria pesqueira nacional, com foco principalmente no mercado internacional; esse impulso resultou em um rápido aumento na produção da indústria pesqueira. De acordo com os dados mais recentes da Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO, 2022), a captura total da pesca marinha global foi de 81 milhões de toneladas em 2022, onde a produção total de pesca e aquicultura chegou a 223,2 milhões de toneladas, representando um aumento em comparação com anos anteriores. Quanto à sustentabilidade, em 2021, aproximadamente 62,3% dos estoques marinhos monitorados pela FAO estavam dentro de níveis biologicamente sustentáveis, uma redução de 2,3% em relação a 2019. Isso destaca a importância de ações efetivas para a gestão e recuperação dos estoques pesqueiros mundiais (FAO, 2022).

O Brasil, um dos 11 maiores importadores globais de pescado, importou cerca de R\$ 3 milhões em 2022 (Ribeiro & Martins, 2023). Segundo o World Wildlife Fund (WWF Brasil, 2024), aproximadamente 80% dos pescados estão sendo sobreexplorados, o que ameaça o declínio de várias espécies. Os dados mais recentes da FAO (2022) corroboram essa preocupante tendência global de sobrepesca e seus impactos a curto, médio e longo prazo.

Cerca de 34,2% dos recursos pesqueiros estão sendo explorados em níveis considerados insustentáveis, ressaltando a carência de dados quantitativos sobre a pesca no Brasil como uma questão de grande relevância que compromete negativamente tanto a gestão quanto o desenvolvimento sustentável do setor pesqueiro (Ribeiro & Martins, 2023). O mesmo trabalho ainda afirma que a escassez de informações precisas e atualizadas dificulta a avaliação adequada da magnitude das atividades pesqueiras. Ramos (2016), informa que a pesca predatória está causando um declínio significativo nos estoques e populações de várias espécies marinhas. A autora ainda relata que isso levou à inclusão constante dessas espécies nas Listas Vermelhas de Espécies Ameaçadas da IUCN (The International Union for Conservation of Nature, 2024), representando uma preocupação para o equilíbrio das comunidades desses organismos marinhos. Paralelamente a isso, temos a biopirataria emergindo como uma das atividades criminosas mais lucrativas globalmente, representando uma séria ameaça para a biodiversidade e segurança biológica (Gomes, 2007).

## 1.2 O Comercio ilegal de recursos biológicos

O comércio ilegal de animais silvestres representa uma das atividades criminosas mais lucrativas em escala global, constituindo uma séria ameaça para diversas espécies ao remover milhares de animais de seus habitats naturais a cada ano (Saldanha & Peixoto, 2021). O mesmo trabalho alega que no Brasil, o tráfico de animais é impulsionado pela vasta biodiversidade, desigualdade socioeconômica e falhas na fiscalização e aplicação das leis. Lisse & Billig (2023), afirmam que a biopirataria também afeta comunidades vulneráveis, como povos indígenas e jovens carentes, que muitas vezes dependem do comércio ilegal para sustento. Os referidos autores falam ainda que em áreas de baixa renda, o tráfico de recursos genéticos e culturais é uma fonte importante de renda, com traficantes explorando essa vulnerabilidade para expandir suas operações. Em um país conhecido por abrigar a maior biodiversidade do mundo, como o Brasil, essa prática é especialmente preocupante, destacando a necessidade urgente de examinar e fortalecer as medidas de combate a esse crime (Junior & Lima, 2021). Globalmente, o tráfico de animais silvestres é classificado como a terceira maior atividade criminosa, ficando atrás apenas do tráfico de armas e drogas, e no Brasil, é até mais prevalente do que o tráfico de pedras preciosas (Carneiro & Almeida, 2021).

A captura e comércio clandestino de animais silvestres e seus derivados não estão restritos a uma única área geográfica, ocorrendo em diversas localidades e envolvendo uma movimentação intensa de animais destinados a diferentes destinos, sendo que no Brasil, a Região Nordeste se destaca como um dos principais focos desse comércio ilícito (Saldanha & Peixoto, 2021). O trabalho citado também declara que a fauna brasileira é predominantemente retirada das regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste e direcionada para o Sudeste e Sul do país, onde se encontram os principais consumidores e rotas de transporte internacional. Os autores ainda sustentam que esse comércio clandestino representa uma séria ameaça à sobrevivência das espécies nativas, pois a remoção de animais de seus habitats naturais reduz a diversidade faunística e perturba o equilíbrio dos ecossistemas, colocando em risco as populações selvagens.

Renctas (2001), ressalta que durante os anos 2000, o Brasil testemunhou o tráfico de mais de quatro milhões de animais silvestres, com uma taxa de

sobrevivência alarmante de apenas um em cada dez animais, sendo que cada transação resulta, em média, na perda de três animais. O relatório pontua ainda que o país, que abriga cerca de 10% das espécies globais, incluindo 60% dos anfíbios, 35% dos répteis e macacos, e 10% das aves, enfrenta a retirada anual de mais de 38 milhões de animais de seus habitats, onde cerca de 90% perecem durante o transporte, com 40% destinados à exportação, principalmente para a Europa, Ásia e América do Norte.

O tráfico ilegal de animais selvagens causa danos significativos à biodiversidade e representa uma ameaça séria à segurança biológica, contribuindo para extinções e degradação ambiental em escala global (Vasconcelos, 2023). O referido trabalho também diz que essa atividade, desprovida de critérios, exerce uma pressão de exploração insustentável sobre as espécies, afetando a cadeia alimentar e reduzindo a biodiversidade dos habitats. A biopirataria, além de ameaçar a existência de espécies e desequilibrar ecossistemas, também prejudica a pesquisa científica e o desenvolvimento tecnológico nacional, limitando o potencial de inovação e progresso do país (Lisse & Billig, 2023).

A retirada contínua de animais de uma mesma espécie pode levar a extinções locais ou totais, afetando também outras espécies associadas; com isso, a diminuição das populações facilita o cruzamento entre parentes, reduzindo a diversidade genética e a capacidade de adaptação dos animais às mudanças ambientais (Vasconcelos, 2023). O tráfico de vida selvagem é altamente prejudicial para o Brasil, com milhões de espécimes retirados anualmente, resultando em perdas significativas na biodiversidade e na morte de muitos animais durante a captura e o comércio (Lisse & Billig, 2023).

A escassez de estudos que abordam o tráfico de animais na região Nordeste do Brasil torna essa questão pouco explorada e pouco compreendida, ressaltando a importância de investigar os impactos desse comércio na fauna local. Analisar os efeitos da exploração animal permite compreender como a biodiversidade é afetada e quais são as consequências dessa atividade para os ecossistemas, fornecendo subsídios para a implementação de estratégias mais eficazes de conservação e gestão ambiental. Em um contexto global, a preservação dos recursos biológicos é crucial para promover a estabilidade ambiental e melhorar as condições de vida, sendo a biodiversidade uma preocupação urgente na política global devido à sua rápida perda (Saldanha & Peixoto, 2021; Lisse & Billig, 2023).

Da Silva et al. (2019), destaca que no âmbito desse contexto, o tráfico ilegal de produtos provenientes da pesca se torna relevante. Pontua ainda que a valorização de partes específicas de animais marinhos, como bexigas natatórias e nadadeiras de peixes, são apreciadas em diversos países, como China, Japão, Reino Unido, EUA e Alemanha, sendo utilizadas na fabricação de produtos como argamassas, cosméticos, medicamentos e instrumentos musicais. No entanto, a comercialização dessas partes geralmente ocorre sem uma identificação adequada, o que pode resultar na inclusão acidental de espécies ameaçadas de extinção nas capturas e vendas, problema que é particularmente observado no comércio de barbatanas de tubarão, o qual tem experimentado um aumento significativo na demanda nos últimos anos (Ramos, 2016).

### **1.3 Uso dos subprodutos provenientes da bexiga natatória**

A bexiga natatória é um órgão presente em alguns peixes, que consiste em uma vesícula gasosa responsável por ajudá-los a manterem-se em determinadas profundidades (da Silva et al., 2019). A bexiga natatória desempenha diversas funções, sendo o equilíbrio hidrostático a mais importante delas (Oliveira et al., 2006). Ela é composta por várias camadas, sendo a camada externa espessa e fibrosa, e o colágeno presente nessa camada é a fonte da substância conhecida como "isinglass" (Tressler & Lemon, 1951).

O subproduto da bexiga natatória, conhecido como "grude", "isinglass", "ictiocola" ou "cola de peixe", passa por processos industriais para a obtenção de um colágeno hidrolisado de alta qualidade (Leather et al., 1993). O "isinglass" tem alto valor comercial e é amplamente utilizada na indústria de bebidas, especialmente na produção de cerveja e vinho como agente clarificante (Hickman et al., 2000), além de ser utilizado na produção de espumante, emulsificante, dispersante e gelificante, assim como na fabricação de cola e gelatina (Cervigón, 1993). Na China e em outros países da Ásia, o "grude" também é consumido como alimento, sendo considerada uma fonte significativa de recursos medicinais, com sua valorização variando de acordo com diferentes características, como espécie, tamanho, idade e origem do peixe (Diálogo Chino, 2022). Essa versatilidade destaca o colágeno como um recurso

valioso em várias indústrias, ressaltando seu potencial como uma matéria-prima sustentável e multifuncional (Jezowski & Kowalczewski, 2023). O método mais comum para extrair colágeno da bexiga natatória dos peixes é a solubilização em ácido acético, um processo que leva cerca de cinco dias e resulta em baixo rendimento (Oliveira et al., 2006).

Ainda a respeito da indústria alimentícia, a produção de gelatina a partir de peixes é uma opção viável para reduzir os resíduos gerados pela indústria pesqueira. Além disso, a gelatina de peixe possui uma qualidade comparável àquela obtida de fontes bovinas (mais comumente utilizadas na indústria), bem como de fontes suínas e aviárias (Leuenberger, 1991).

Segundo Schieber & Gareis (2007), o colágeno provido do “isinglass” desempenha um papel importante em diversas indústrias, incluindo a cinematográfica e fotográfica, onde é utilizado para revestir chapas fotográficas e fabricar papel fotográfico. Oliveira et al. (2006) afirma que o colágeno também é empregado no processo de encorpamento de papel, tecidos e chapéus de palha; na indústria farmacêutica e química, o colágeno é usado na fabricação de cápsulas e como emulsificante, além de ser utilizado na produção de cabeças de fósforos e lixas. O autor ainda destaca que é especialmente utilizado na preparação de cosméticos, alimentos e gelatinas com diversas finalidades farmacêuticas. Na medicina, o colágeno é empregado no tratamento de hemorragias, na cicatrização de feridas e no uso de fios cirúrgicos (Schieber & Gareis, 2007). Devido à sua baixa resposta imunológica e baixo índice de alergenicidade, o colágeno está sendo cada vez mais utilizado como biomaterial, substituindo parcial ou totalmente tecidos danificados (Oliveira et al., 2006).

A comercialização dos subprodutos derivados da bexiga natatória ocorre de forma descaracterizada, tornando difícil determinar a origem específica do animal. Nesse contexto, o emprego de técnicas moleculares de identificação emerge como uma ferramenta indispensável e valiosa para discernir quais espécies estão envolvidas nesse comércio.

#### 1.4 DNA Barcode como ferramenta de identificação de espécies

O sistema moderno de taxonomia molecular, introduzido por Tautz et al. (2003), utiliza o DNA como ferramenta para a identificação taxonômica em diversos grupos de organismos. As análises moleculares de DNA estão em destaque devido à sua capacidade de identificar amostras em diferentes condições, como produtos congelados, salgados ou processados termicamente (Zhao et al., 2024). A identificação precisa de espécies de peixes é fundamental em várias etapas, desde ovos e alevinos até os adultos e seus produtos (Marnis et al., 2024). Os mesmos autores destacam que isso ajuda a detectar substituições de espécies em transações comerciais, contribuindo para a sustentabilidade, o manejo adequado e a pesca de longo prazo. Além disso, a identificação correta também auxilia na resolução de questões taxonômicas (Lima et al., 2024). A delimitação e reconhecimento de espécies de peixes não são apenas importantes do ponto de vista taxonômico e sistemático, mas também são essenciais para a gestão da pesca, autenticação de produtos alimentícios e identificação de materiais processados (Zhang, 2011).

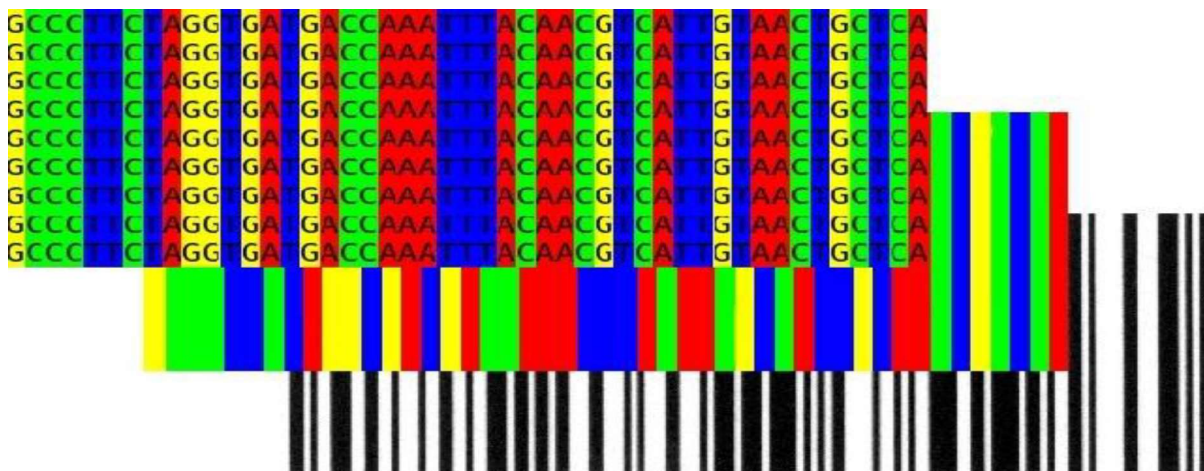
Devido à complexidade e às limitações da taxonomia tradicional baseada em características morfológicas, foram desenvolvidos vários métodos de análise de genótipos baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) para identificar espécies de peixes, especialmente em ovos, larvas e produtos comerciais (Marnis et al., 2024). A análise de sequências de DNA específicas da espécie (geralmente genes mitocondriais ou ribossomais) e à amplificação simultânea de fragmentos de DNA conservados por espécies através de PCR multiplex são métodos eficientes para a identificação de espécies de peixes (Zhang, 2011). A descoberta da utilidade do DNA mitocondrial (mtDNA) como marcador molecular revolucionou os estudos de genética de populações e evolução, sendo que atualmente, o DNA mitocondrial é amplamente utilizado em estudos de classificação e identificação de espécies, descoberta de novas espécies e na identificação da origem de organismos vivos e processados (Chac & Thinh, 2023).

Em 2003, Hebert et al. (2003a) propuseram a criação de um sistema de identificação molecular padronizado para espécies de animais que utiliza um fragmento de aproximadamente 650 pares de bases do gene Citocromo Oxidase

subunidade I (COI), localizado na extremidade 5' do gene. Os autores afirmam que a escolha desse gene mitocondrial foi baseada em suas características, como ampla distribuição entre os animais, alta quantidade de cópias por célula e taxas de mutação diferentes entre as espécies. O COI tem uma evolução rápida, o que permite distinguir não apenas espécies intimamente relacionadas, mas também grupos filogeográficos dentro de uma espécie (Hebert et al., 2003b). Essa técnica é considerada uma das mais recentes e promissoras para detectar unidades biológicas (Chac & Thinh, 2023).

Segundo Hebert et al. (2003a, 2003b) a ideia é a mesma do “código de barras” universal de produtos do mercado varejista (Figura 1), que emprega 10 números alternados em 11 posições para gerar 100 bilhões de identificadores únicos, no caso do DNA Barcode, pode haver até quatro possibilidades de nucleotídeos (Adenina, Citosina, Guanina e Timina) em cada posição, mas com uma cadeia de sítios mais longa que 11 posições; a combinação de apenas 15 dessas posições de nucleotídeos, por exemplo, criaria um bilhão de códigos únicos, um número muito maior do que o de espécies conhecidas, aproximadamente 15 milhões, permitindo que cada táxon seja identificado por apresentar uma sequência única de DNA Barcode.

Figura 1 - Analogia entre o *DNA Barcode* e o código de barras convencional.



Fonte: Ortiz (2010).

Essa metodologia permite a identificação de qualquer material portador de DNA, desde ovos, larvas, pequenos pedaços, intacto ou fragmentado, desde que uma matriz de sequências para a espécie já tenha sido estabelecida; isso facilitaria não só a identificação de espécies já catalogadas, independente do seu estágio de desenvolvimento, como também o reconhecimento de novas espécies e até mesmo

espécies crípticas (Hebert et al., 2003a, 2003b). Podendo contribuir, com a Taxonomia, Sistemática e Genética de populações, na taxonomia, por exemplo, pode ser utilizado para identificar espécimes atípicos e contribuir para revisão da nomenclatura de vários grupos, também utilizado como método de rotina para auxiliar na identificação de espécies (Hajibabaei et al., 2007).

Esse sistema de identificação microgenômica utiliza a análise de um pequeno segmento do genoma para identificar uma espécie; essas sequências são então inseridas em uma base de dados de sequências para uma identificação efetiva das espécies amostradas (Chac & Thinh, 2023). Frézal & Leblois (2008) ressaltam que o banco de dados universal do DNA Barcode, o BOLD (*Barcode of Life Database*), permite associar outros tipos de dados às amostras tais como: fotos do espécimen (voucher), ponto de coleta, data da coleta e coletor, número do espécimen, instituição na qual foi depositado, dados taxonômicos e informações moleculares (como eletroferogramas das sequências e primers utilizados na amplificação e no sequenciamento). Os referidos autores pontuam que o critério de qualidade máxima estabelece que as sequências diretas e reversas tenham uma sobreposição mínima de 500pb e mais que três indivíduos por espécie sequenciados.

Além disso, cabe ressaltar que, segundo Hebert et al. (2003a) e Hebert et al. (2003b), o DNA mitocondrial tem uma taxa de evolução aproximadamente 10 vezes mais rápida quando comparado a genes codificantes nucleares e, o COI possui taxas mutacionais estabelecidas entre diferentes espécies de animais e além disso, o DNA mitocondrial, de forma geral, apresenta várias cópias por célula, o que o torna adequado para análise de material degradado. Essas características fazem dele uma excelente ferramenta para a técnica de identificação genética (Hebert et al., 2005). Essa abordagem tem sido utilizada com sucesso em muitos campos além da identificação de espécies de peixes, incluindo o combate ao tráfico de fauna, a prevenção de fraudes alimentares, a detecção de invasões biológicas e o monitoramento da biodiversidade (Marnis et al., 2024).

## 2 JUSTIFICATIVA

No Laboratório de Genômica e Conservação de Peixes (LAGENPE) foram desenvolvidos, ao longo dos anos, trabalhos de identificação de espécies utilizando marcadores moleculares. O primeiro estudo foi realizado aplicando a técnica de PCR-*Multiplex* e possibilitou a identificação de espécies de tubarões comercializadas na região norte do litoral paulista, descrevendo a exploração pesqueira do local (Silvério, 2010). A partir de 2016, foram executados trabalhos com DNA *Barcode*, que viabilizou a identificação de peixes de bico comercializados em diferentes centros, como o Aeroporto Internacional de Guarulhos e CEAGESP, demonstrando a ineficácia das estratégias de fiscalização, uma vez que os animais eram vendidos ilegalmente (Rodrigues Junior, 2016). No mesmo ano, foram identificadas 13 espécies de tubarões comercializadas no litoral de São Paulo, inferindo a possibilidade de sobrepesca de algumas das espécies (Ramos, 2016). Em 2020, houve o desenvolvimento de dois estudos com amostras coletadas no CEAGESP, em que foram identificadas três espécies de tubarões (Daneluz, 2020) e oito espécies de raias, sendo que três destas possuem o comércio proibido (Oliveira, 2020). Vale ressaltar que em todos estes trabalhos, os produtos eram comercializados de forma descaracterizada.

Além disso, da Silva et al. em 2019, iniciou os trabalhos de análise de bexigas natatórias exploradas comercialmente entre as regiões Sul e Sudeste do Brasil, e de 78 amostras analisadas, 23 obtiveram sucesso na identificação a nível de espécie. Foi possível verificar a ocorrência de duas espécies diferentes, sendo elas *Pogonias cromis* (n=15) (Linnaeus, 1766) (Perciformes, Sciaenidae) popularmente conhecido como Miraguaia ou Corvina-preta e *Micropogonias furnieri* (n=8) (Perciformes, Sciaenidae) (Desmaret, 1823) popularmente conhecido como corvina. Porém, esses resultados não correspondiam ao grupo de peixes (bagres) que estava descrito no formulário de controle e rastreabilidade emitido pela empresa. Ambas as espécies que foram identificadas (*P. cromis* e *M. furnieri*) pertencem ao grupo dos Perciformes, e particularmente, a espécie *M. furnieri* encontra-se ameaçada e foi proibida pela portaria do IBAMA nº43, de 24 de setembro de 2007, nas regiões sudeste e sul de ser comercializada. Esse projeto mostrou que esses estudos de bexigas natatórias, mostraram que além de contrariar a identificação formal das espécies incluídas no

controle pesqueiro, também revelaram o comércio ilegal de uma dessas espécies, *M. furnieri* que está ameaçada e conseqüentemente tem sua captura proibida.

Nota-se, portanto, que a problemática relacionada à exploração pesqueira de subprodutos de animais marinhos, pode ser uma nova linha de pesquisa nos próximos anos. Sob tal perspectiva e em razão da demanda dos agentes do IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis), que atuam em operações de apreensão, no Aeroporto Internacional de Guarulhos, de produtos comercializados de forma ilegal, a aplicação da biologia molecular para a identificação de espécies constitui-se como um artifício para detalhar, monitorar e até mesmo fiscalizar as exportações de animais marinhos, principalmente peixes.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Tendo em vista a importância econômica dos subproduto da bexiga natatória, conhecido como "grude", "isinglass", "ictiocola" ou "cola de peixe" e sua crescente exploração comercial, a falta de dados oficiais de comercio, o presente estudo objetiva, de modo geral, aplicar marcadores moleculares na identificação de bexigas natatórias comercializadas e apreendidas pela fiscalização ambiental do setor de exportação do Aeroporto Internacional de Guarulhos, para assim fornecer dados referentes à sua comercialização.

#### 3.2 Objetivos específicos

1. Identificar através da técnica genética, DNA *Barcode*, amostras de bexigas natatórias comercializadas e apreendidas pela fiscalização ambiental do Aeroporto Internacional de Guarulhos, a fim de detectar quais são as espécies utilizadas no comércio e se está ocorrendo a pesca de espécies ameaçadas de extinção;
2. Realizar um controle das espécies identificadas, visando sua gestão e conservação;
3. Padronizar o protocolo desenvolvido como ferramenta na fiscalização ambiental.

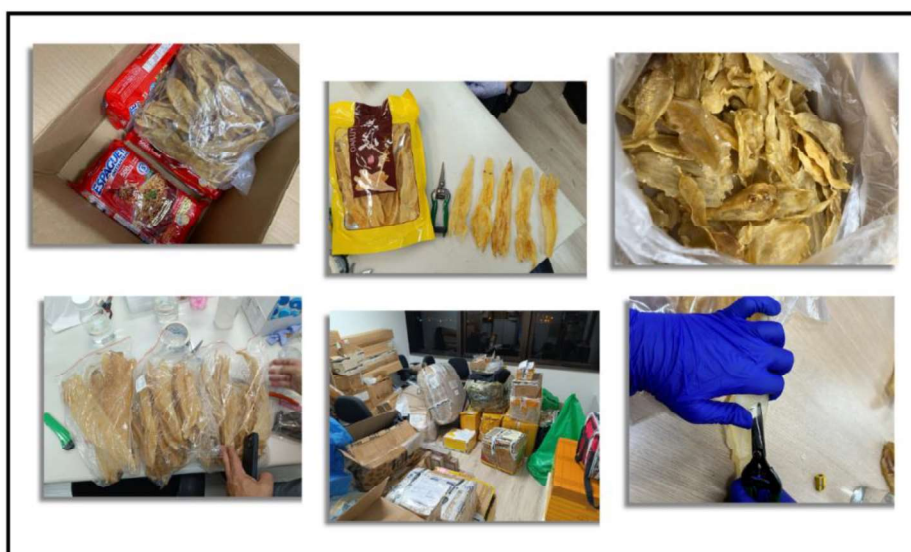
## 4 MATERIAL E MÉTODO

### 4.1 Coleta das amostras

A amostragem do presente projeto foi constituída de 2 coletas, no ponto de exportação do Aeroporto Internacional de Guarulhos - SP, a partir de uma parceria firmada com agentes do IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis). As coletas foram realizadas dependendo da demanda e disponibilidade dos funcionários do IBAMA, que além de efetuarem a triagem prévia das apreensões, nos auxiliaram com o acompanhamento no dia da coleta das amostras.

A primeira coleta foi realizada em setembro de 2022, anteriormente ao início do projeto, e a segunda em maio de 2023, nas quais foram amostrados tecidos de exportações provenientes de diferentes localidades (Figura 2). As amostras de tecidos foram fixadas em álcool absoluto, no momento da coleta, para assegurar a qualidade da posterior análise molecular, e integram o banco de tecidos do Laboratório de Genômica e Conservação de Peixes (LAGENPE), da Faculdade de Ciências - Unesp Bauru.

Figura 2 - Imagens das coletas realizadas em 2022 e 2023.



Fonte: Elaborado pelo autor do trabalho (2024).

## 4.2 Análises Moleculares

### 4.2.1 Extração de DNA

A extração de DNA realizada foi baseada no protocolo do PureLink™ Genomic DNA Mini Kit da ThermoFisher, estabelecendo-se 2 horas para o período de atuação da Proteinase K e 20 µl de volume do Elution Buffer. A técnica de gel de agarose não foi efetiva para verificar a integridade do DNA extraído, com isso as amostras passaram por análise de quantificação de DNA utilizando o Qubit™ dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen) e o Qubit® 2.0 Fluorometer com seus devidos protocolos, onde as concentrações variaram de 1ng/µl a 90ng/ µl. No que diz respeito às concentrações, constatou-se que quando a extração atingia uma concentração mínima de 1 ng/µl, a etapa subsequente de amplificação poderia ser realizada. Por outro lado, quando a extração apresentava uma concentração elevada superior a 90 ng/µl, a amplificação não era viável, exigindo a eluição da extração.

### 4.2.2 Amplificação do gene mitocondrial COI

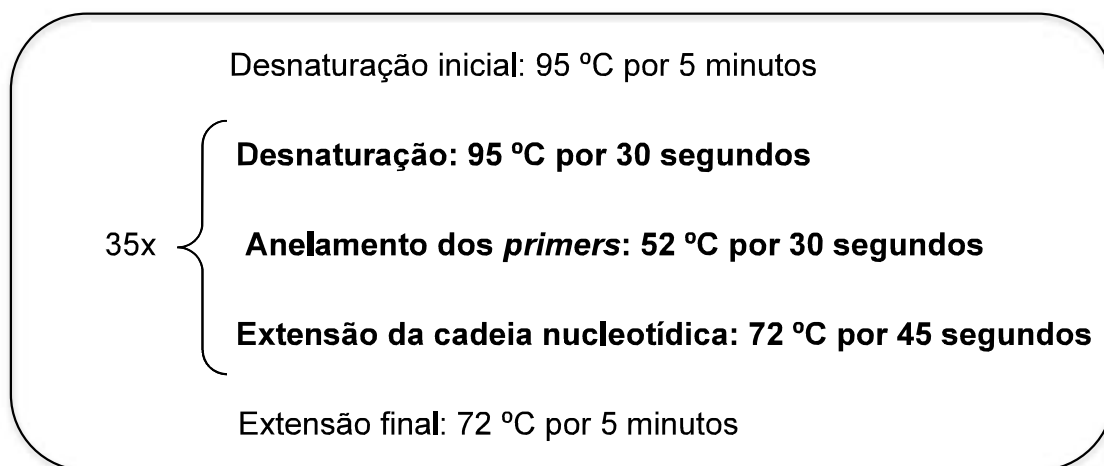
Subsequentemente a extração, foi executada a amplificação dos genes COI-Fish1 e COI-Fish2, em que foram utilizadas as seguintes concentrações e volumes de reagentes: 1,25 µl de 1xPCR *buffer* (20mM Tris-HCl, pH 8.4 e 50mM KCl); 0,38 µl de 1.5mM MgCl<sub>2</sub>; 150µM de cada dNTP com volume final de 1,5 µl; 0,75 µl de 0.4mM dos *primers forward* (F) de COI-Fish1 e *reverse* (R) de COI-Fish2, descritos por Ward *et al.* (2005) (Tabela 1); 1 µl de 10 a 30 ng/µl de DNA; 0,2 µl de taq platinum e 8,2 µl de H<sub>2</sub>O Milli-Q, para cada amostra.

Tabela 1 - Sequências F (*Forward*) e R (*Reverse*) dos primers COI-Fish1 COI-Fish2 utilizados durante o estudo para a identificação das amostras.

COI-Fish1	F	5'- TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC - 3'	Ward <i>et al.</i> , (2005)
	R	5'- TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA - 3'	Ward <i>et al.</i> , (2005)
COI-Fish2	F	5'- TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC - 3'	Ward <i>et al.</i> , (2005)
	R	5'- ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA - 3'	Ward <i>et al.</i> , (2005)

Fonte: Elaborado pelo autor do trabalho (2024).

Para a reação de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foi adotado o seguinte programa no termociclador *Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems)*:



Os produtos da amplificação foram visualizados a partir da eletroforese em gel de agarose em concentração 2% corado com *GelRed Nucleic Acid Gel Stain* (2,5 µL/mL), em um transluminador, sob luz ultravioleta, fotografadas com a câmera OLYMPUS C-5060 e comparado a um marcador de peso e concentração conhecidos: *Low DNA mass Ladder – Invitrogen*.

#### 4.2.3 Sequenciamento

Posteriormente à amplificação, as amostras foram submetidas à reação de PCR de sequenciamento, o qual possuiu um volume final de 10µL contendo: 4,5 µL

de H<sub>2</sub>O; 1,5 µL de 1X de tampão save money®; 0.4mM do primerb COI-Fish1 ou COI-Fish2; 1,0 µL de Big Dye® (vs. 3.1) e 2 µL do PCR. As PCRs foram submetidas ao seguinte programa no termocicladores Veriti 96- Well Thermal Cyclers (Applied Biosystems): desnaturaçãõ inicial a 96°C por 1 min, 40 ciclos de 96 °C por 30seg, 50°C por 30 seg e 60 °C por 2 min. Após a reaçãõ de sequenciamento, as amostras foram submetidas a uma etapa de limpeza através da enzima Exo-SAP IT® (*USB Corporation*), para eliminar excessos de reagentes utilizados, e suspendidas em formamida para em seguida serem colocadas em um sequenciador de DNA ou no Centro de Recursos Biológicõs e Biologia Genômica – CREBIO da UNESP de Jaboticabal/SP ou no Instituto de Biotecnologia – IBTEC da UNESP de Botucatu, os quais possuem os sequenciadores automáticõs ABI 3730 XL DNA Analyzer (*Applied Biosystems*) e ABI 3500 Genetic Analyzer (*Applied Biosystems*), respectivamente. O sequenciamento seguiu conforme recomendações sugeridas pelo fabricante para a realizaçãõ da corrida de leitura da seqüência.

#### **4.2.4 Análise das seqüências e identificaçãõ das espécies**

Para a identificaçãõ das espécies as seqüências *forward* e *reverse* foram curadas no programa *Geneious* 4.8.5 (Kearse *et al.*, 2012), resultando em seqüências *consensus*. As seqüências entãõ foram submetidas na base de dados da plataforma do BOLD (*The Barcode of Life Data System*) – [www.boldsystems.org](http://www.boldsystems.org) e NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>, onde a seqüência de DNA foi comparada com as 100 seqüências mais similares depositadas, obtendo assim uma identificaçãõ em nível de espécie. Para a análise, foram aceitas apenas seqüências com 98% ou mais de similaridade com as seqüências já depositadas nos bancos de dados.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão obtidos deste trabalho, que investiga o uso do DNA Barcode na identificação de bexigas natatórias como uma abordagem no contexto do comércio internacional, serão apresentados em forma de dois artigos científicos distintos:

### 5.1 Artigo 1:

#### **“Quais insights as análises genéticas revelam sobre o comércio ilegal de bexigas natatórias de peixes?”**

#### **Resumo**

O Brasil, com sua vasta extensão territorial e biodiversidade extraordinária, destaca-se como detentor da maior diversidade do planeta, influenciando significativamente sua economia. No entanto, essa riqueza ambiental também é alvo do tráfico de animais silvestres, causando impactos ambientais e econômicos. Apesar da relevância do problema, a legislação para combatê-lo ainda carece de rigidez. O tráfico de animais, classificado como o terceiro maior tráfico global, é uma ameaça significativa, superando até mesmo o tráfico de pedras preciosas no Brasil. A prática ilegal, que se intensificou com avanços tecnológicos, tem consequências drásticas na biodiversidade. Anualmente 38 milhões de animais silvestres são retirados da natureza no Brasil, movimentando cerca de 2 bilhões de dólares por ano. Análises moleculares, como o uso do gene COI, são ferramentas vitais para identificar produtos biológicos comercializados, enquanto o *DNA Barcode* se destaca como uma técnica eficaz de identificação de espécies, sendo crucial na luta contra o tráfico de animais silvestres. O presente trabalho analisou 77 amostras de produtos provenientes de apreensão por tráfico ilegal de produtos biológicos, onde as amostras foram identificadas como *Plagioscion auratus* (Corvina), *Cynoscion acoupa* (Pescada Amarela), *Caiman crocodylus* (Jacaretinga) e *Melanosuchus niger* (Jacaré-Açu), espécies presentes na costa brasileira, no Pantanal e na região da Bacia Amazônica.

### 5.1.1 Introdução

O território brasileiro não se destaca apenas por sua vasta extensão de 8,5 milhões de quilômetros quadrados, que ocupa uma grande porcentagem do continente sul-americano, ele se distingue principalmente por sua extraordinária biodiversidade, considerada a maior do planeta; essa riqueza se manifesta na diversidade de biomas, flora, fauna e na pluralidade socioambiental, com diferentes comunidades, algumas detentoras de conhecimento tradicional inestimável sobre o ambiente em que vivem (Junior & Lima, 2021). Os mesmos autores ressaltam que essa riqueza biológica não apenas contribui para a diversidade natural, mas também influencia a economia brasileira, sendo que até setembro de 2020, conforme dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, o Brasil já havia lucrado 77 bilhões de dólares com exportações de produtos naturais, como soja, carne, cereais, entre outros. Essa potencialidade biológica se traduz em benefícios econômicos, destacando a interligação entre a biodiversidade e a prosperidade do país.

Carneiro & Almeida (2021) falam que devido a essa vasta biodiversidade, a sociedade brasileira enfrenta sérios impactos do tráfico de animais, resultando em consequências ambientais drásticas, como alterações nos ciclos ecológicos, ameaça de extinção de espécies, possíveis transmissões de doenças por esses animais e desequilíbrios ambientais. Além disso, o trabalho citado pontua que o comércio ilegal de animais gera problemas econômicos para o país, sendo que a relevância da pesquisa sobre essa questão reside na constatação de que, apesar de influenciar significativamente a sociedade, ainda não existe uma legislação suficientemente rigorosa para resolver o problema.

O tráfico de animais silvestres é uma das atividades ilícitas mais lucrativas globalmente, representando uma ameaça considerável para diversas espécies ao retirar milhares de animais de seus habitats naturais anualmente, que, no contexto brasileiro, onde a maior biodiversidade do planeta está intrinsecamente ligada a essa prática, é crucial examinar as ações de combate a esse crime (Junior & Lima, 2021). Essa atividade é um grave problema global, classificado como o terceiro maior tráfico, superado apenas pelos de armas e drogas, o qual no Brasil, supera até mesmo o tráfico de pedras preciosas (Carneiro & Almeida, 2021).

Junior & Lima (2021) afirmam que ao longo do tempo, esse comércio evoluiu, expandindo-se nacional e internacionalmente com o avanço tecnológico nos transportes e na comunicação. Notam ainda que embora a prática ilegal tenha resquícios até os dias atuais, foi em 1967 que se tornou ilícita com a Lei Federal n.º 5.197, conhecida como Lei de Proteção à Fauna.

Segundo dados do Renctas (2001), nos anos 2000 mais de quatro milhões de animais silvestres foram traficados no Brasil, com apenas um em cada dez animais sobrevivendo ao processo, ressaltando que cada animal comercializado resulta, em média, na morte de três animais. O relatório continua afirmando que o país abriga cerca de 10% das espécies globais, incluindo 60% dos anfíbios, 35% dos répteis e macacos, e 10% das aves, onde estima-se que mais de 38 milhões de animais sejam retirados de seus habitats anualmente, sendo aproximadamente 12 milhões de espécies diferentes. Desse total, cerca de 90% morrem durante o transporte, sendo 40% destinados à exportação, principalmente para a Europa, Ásia e América do Norte.

Em 2010, o IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) identificou que os estados brasileiros mais afetados pela captura ilegal de animais silvestres são Bahia, Maranhão, Ceará, Piauí e Mato Grosso. Quanto à exportação, os principais compradores em 2001 foram países desenvolvidos, destacando-se os Estados Unidos como o maior consumidor global de vida silvestre, além de Alemanha, Holanda, Bélgica, França, Inglaterra e outros, sendo que esses animais frequentemente passam por países de trânsito, como Portugal, México, Arábia Saudita, Tailândia, Espanha, Grécia e Itália, antes de chegarem ao destino final (Junior & Lima, 2021).

Dentro do tráfico de animais silvestres, a comercialização de produtos derivados da pesca é de importância significativa devido à valorização de partes específicas de animais marinhos, tais como bexigas natatórias e nadadeiras de peixes, que são amplamente demandadas em vários países, como China, Japão, Reino Unido, EUA e Alemanha, para a produção de uma variedade de produtos, incluindo argamassas, cosméticos, medicamentos e instrumentos musicais (da Silva et al., 2019).

Esse material biológico é comercializado descaracterizado, o que dificulta, ou até mesmo impossibilita, sua identificação morfológica, podendo resultar na captura e venda inadvertida de espécies ameaçadas de extinção (da Silva et al., 2019). Com isso, a aplicação de práticas moleculares entra como uma ferramenta imprescindível

para a identificação desses produtos. Geralmente, os métodos de identificação molecular empregam sequências específicas como marcadores, fundamentados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que envolve a amplificação de loci-alvo por meio de primers específicos e uma enzima DNA polimerase (Marnis et al., 2024). O mesmo trabalho acrescenta que esses métodos são altamente sensíveis e frequentemente mais rápidos do que outras tecnologias, resultando em sua ampla aplicação em diversos setores de pesquisa.

Um dos genes frequentemente empregados na identificação de organismos é o gene mitocondrial Citocromo Oxidase subunidade I (COI), que compreende uma sequência de cerca de 650 pares de base (Hebert et al., 2005). O DNA mitocondrial é haploide e abundantemente presente, sendo geralmente transmitido de forma materna e sem recombinação gênica, o que resulta em uma menor diferenciação entre os indivíduos da mesma espécie e, além disso, sua taxa de evolução é aproximadamente 10 vezes mais rápida do que a dos genes nucleares de cópia única, o que o torna uma excelente escolha para a técnica de identificação genética conhecida como *DNA Barcode* (Hebert et al., 2003a, Hebert et al., 2003b).

O DNA Barcode é um sistema elaborado para oferecer identificações de espécies de forma rápida, precisa e automatizada, utilizando regiões genéticas curtas e padronizadas como marcadores específicos de espécies (Hebert et al., 2005). Desde a introdução do conceito de *DNA Barcode* por Hebert (2003a), foram disponibilizadas dezenas de milhões de sequências de códigos de barras em bancos de dados de referência, facilitando aplicações de pesquisa comparativa em toda a diversidade da vida.

O aumento dos dados de códigos de barras de DNA em repositórios públicos foi impulsionado por vários fatores, incluindo avanços na tecnologia de sequenciamento, inovações na gestão de bancos de dados e outros softwares computacionais, bem como a expansão de consórcios nacionais e internacionais que promovem o sequenciamento de códigos de barras de DNA (Gostel & Kress, 2022), o que torna essa uma técnica bem consolidada e eficaz para identificação de diversos grupos de espécies (Chac & Thinh, 2023).

### 5.1.2 Materiais e Métodos

Os produtos da pesquisa foram amostrados no ponto de exportação do Aeroporto Internacional de Guarulhos - SP, a partir de uma parceria firmada com agentes do IBAMA. As amostras de tecidos foram coletadas em maio do ano de 2023 e fixadas em álcool absoluto, no momento da coleta, para assegurar a qualidade da posterior análise molecular, e integraram o banco de tecidos do Laboratório de Genômica e Conservação de Peixes (LAGENPE), da Faculdade de Ciências - Unesp Bauru. Para a obtenção do DNA, foi empregado um pequeno fragmento de tecido, aproximadamente 4 mm<sup>3</sup> para cada amostra coletada.

O procedimento de extração de DNA seguiu o protocolo do Kit comercial "PureLink™ Genomic DNA Mini Kit - Thermofisher", com ajustes nos períodos de atuação da Proteinase K, estabelecendo-se 2 horas. A fim de avaliar a integridade do DNA extraído, as amostras foram submetidas a uma análise de quantificação de DNA por meio do Qubit™ dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen) e do Qubit® 2.0 Fluorometer, seguindo os protocolos específicos correspondentes. Posteriormente à extração de DNA, os fragmentos de DNA alvo foram amplificados utilizando os primers COI Fish F1 e Fish R2, e os reagentes nas seguintes concentrações: 1xPCR *buffer* (20mM Tris-HCl, pH 8.4 e 50mM KCl), 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 150µM de cada dNTP, 0.4mM dos *primers* COI-FishF1 e COI-FishR2, descritos por Ward *et al.* (2005), e 10 a 30 ng/µ de DNA.

Para a execução da reação de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), foi utilizado o seguinte programa no termociclador *Veriti 96-Well Thermal Cycler* da *Applied Biosystems*: desnaturação inicial a 95°C por 5 min, 35 ciclos das seguintes etapas, sendo desnaturação a 95°C por 30s, anelamento dos primers a 56°C por 30s e extensão da cadeia nucleotídica a 72°C por 45s, com uma extensão final a 72°C por 5min. Os produtos resultantes da amplificação foram observados por meio de eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com *GelRed Nucleic Acid Gel Stain* (2,5 µL/mL), utilizando um transluminador sob luz ultravioleta. As imagens foram capturadas com a câmera OLYMPUS, modelo C-5060, e comparadas a um marcador de peso molecular e concentração conhecidos, o *Low DNA mass Ladder* da *Invitrogen*.

Após a etapa de amplificação, as amostras passaram pela reação de PCR de sequenciamento. Em seguida, foram submetidas a um processo de purificação

utilizando a enzima Exo-SAP IT® (USB Corporation), visando remover os excessos de reagentes utilizados. Posteriormente, as amostras foram ressuspensas em formamida e encaminhadas para sequenciamento em um dos seguintes locais: o Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica – CREBIO da UNESP de Jaboticabal/SP ou o Instituto de Biotecnologia – IBTEC da UNESP de Botucatu. Ambos locais estão equipados com os sequenciadores automáticos ABI 3730 XL DNA Analyzer (Applied Biosystems) e ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), respectivamente. O sequenciamento foi conduzido conforme as recomendações do fabricante para a realização da corrida de leitura da sequência. Para a identificação das espécies, as sequências forward e reverse foram curadas utilizando o programa Geneious 4.8.5 (Kearse et al., 2012).

Essas sequências foram submetidas às bases de dados da plataforma BOLD (*The Barcode of Life Data System*) – [www.boldsystems.org](http://www.boldsystems.org) utilizando o BIN e NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> utilizando o BLAST. Nesses bancos de dados, a sequência de DNA foi comparada com as 100 sequências mais semelhantes já depositadas, proporcionando assim uma identificação em nível de espécie. Para a análise, apenas sequências com 98% ou mais de similaridade com as sequências previamente registradas no banco de dados do BIN e BLAST foram consideradas.

### 5.1.3 Resultados e Discussão

Um total de 77 amostras foram coletadas e submetidas à análise, onde 38 foram identificadas como *Plagioscion auratus*, 7 como *Cynoscion acoupa*, 17 como *Melanosuchus niger* e 15 foram identificadas como *Caiman crocodylus* (Anexo 1), conhecidos popularmente como Corvina, Pescada-Amarela, Jacaré-Açu e Jacaretinga, respectivamente (Figura 2). Dentre as espécies identificadas, a *C. acoupa* está atualmente classificada como vulnerável na lista vermelha da IUCN, com sua população em declínio e avaliada como Quase Ameaçada na Lista Vermelha Nacional Brasileira, onde as medidas regulatórias são inexistentes ou insuficientes em sua abrangência (IUCN, 2023).

Os materiais coletados encontravam-se desidratados e desprovidos de características distintivas, resultando na inviabilidade de sua identificação morfológica (Figura 1). Os produtos estavam sendo comercializados como bexiga natatória, cuja

transação é legalmente permitida; no entanto, foi objeto de apreensão devido à ausência, em sua documentação, de informações referentes à origem do material.

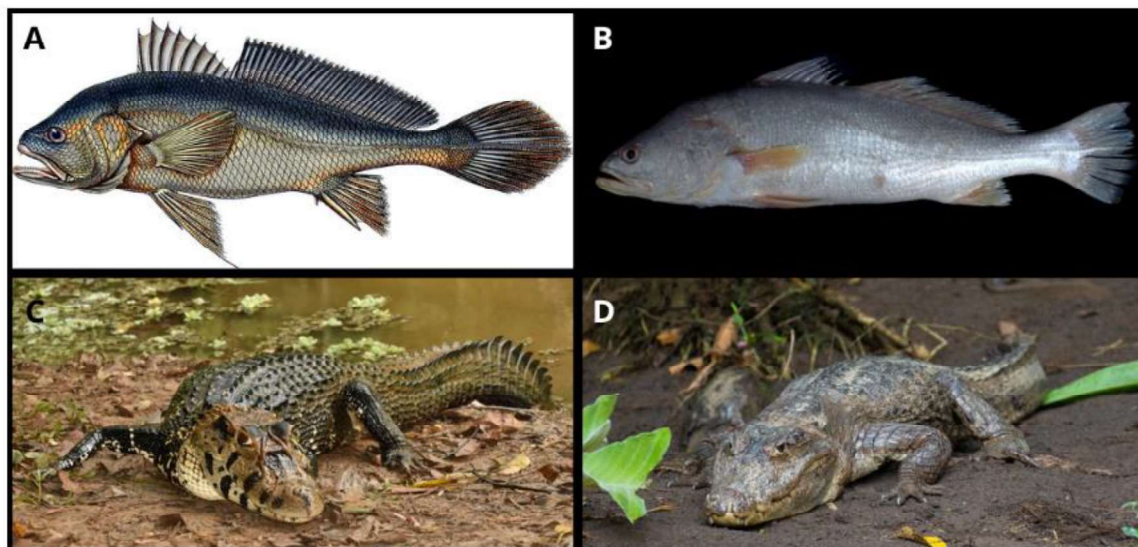
Figura 1 - Material coletado, condicionado em caixas ou malas no Aeroporto Internacional de Guarulhos, SP.



Fonte: Elaborado pelo autor do trabalho (2024).

Legenda: A – Caixas e bagagens apreendidas no Aeroporto Internacional de Guarulhos; B – Produto comercializado juntamente a bexigas natatórias, posteriormente identificado como pele de jacarés; C – Bexigas natatórias embaladas para envio; D – Amostragem dos produtos.

Figura 2 - Espécies identificadas molecularmente neste estudo.



Fonte: Modificado de Biodiversity4all (2024).

Legenda: A – *P. auratus*; B – *C. acoupa*; C – *M. niger*; D – *C. crocodilos*. Fonte: modificado de Biodiversity4all (2024).

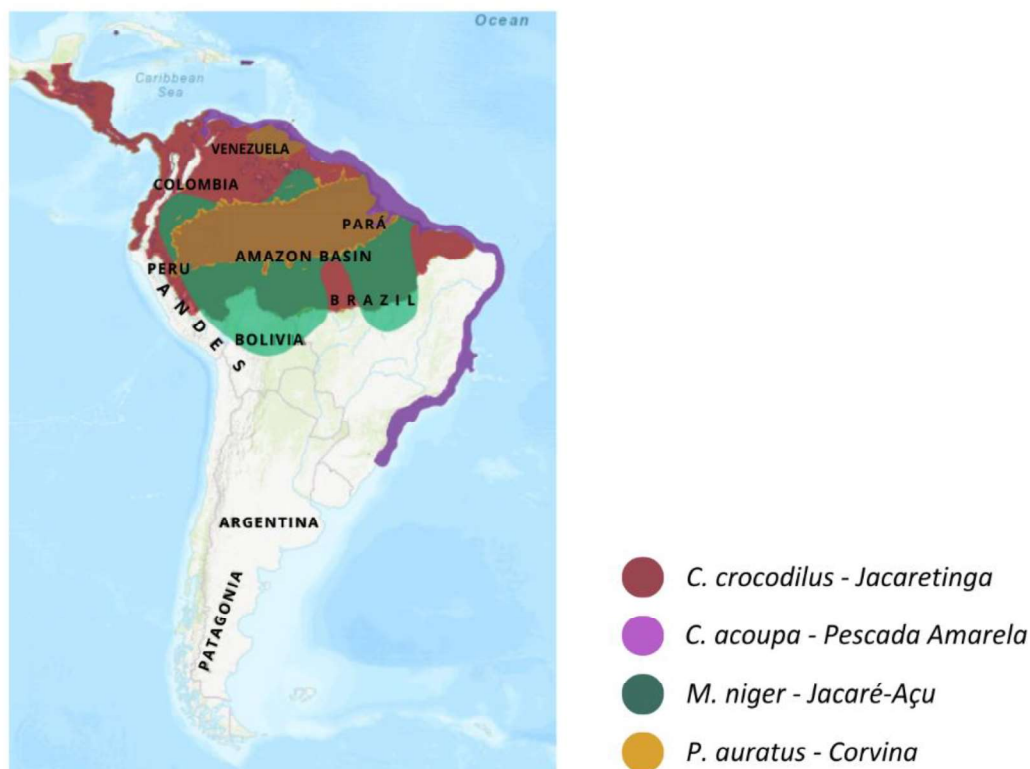
A bexiga natatória é um órgão fundamental em alguns peixes, proporcionando a flutuabilidade necessária em diferentes profundidades (da Silva et al., 2019). Seu subproduto, conhecido como "grude" ou "isinglass", é valioso na indústria de bebidas, sendo usado na clarificação de cerveja e vinho, além de ser a matéria-prima para a produção de gelatina de peixe, uma alternativa promissora para reduzir os resíduos gerados pela indústria pesqueira (Leather et al., 1994, Hickman et al., 2000). O colágeno derivado da bexiga natatória é amplamente utilizado em várias outras indústrias, incluindo cinematográfica, fotográfica, farmacêutica e cosmética, devido às suas propriedades como agente emulsificante, cicatrizante e biomaterial de baixa resposta imunológica (Schrieber & Gareis, 2007, Oliveira et al., 2006)

Além disso, o colágeno proveniente da bexiga natatória desempenha um papel importante em diversas aplicações, como na fabricação de cápsulas farmacêuticas, emulsões sensíveis à luz para a indústria cinematográfica e fotográfica, e na produção de cosméticos e gelatinas com diversas finalidades farmacêuticas (Schrieber & Gareis, 2007). Também é empregado na medicina, auxiliando na cicatrização de feridas e no tratamento de hemorragias, além de ser utilizado como biomaterial devido à sua baixa resposta imunológica e baixo índice de alergenicidade (Oliveira et al., 2006).

Na China, a bexiga natatória desidratada é amplamente reconhecida como uma fonte potencial de recursos medicinais, cuja valorização varia conforme características específicas, incluindo espécie, tamanho, idade e origem do peixe (Diálogo Chino, 2022). Essa versatilidade torna o colágeno um recurso valioso em várias áreas industriais, destacando seu potencial como matéria-prima sustentável e multifuncional (Jezowski & Kowalczewski, 2023).

De acordo com o Diálogo Chino (2022), durante o período compreendido entre 2015 e 2020, foi registrada a importação de um total de 20 mil toneladas de bexigas natatórias, com um valor declarado de 14 bilhões de dólares de Hong Kong (equivalente a R\$ 9,95 bilhões). A mesma matéria ainda diz que essas importações abrangeram mais de cem países, com o Brasil destacando-se como o principal, contribuindo com 3.300 toneladas, avaliadas em 3 bilhões de dólares de Hong Kong (R\$ 2,13 bilhões), sendo que em 2020, o Brasil registrou a exportação de 637 toneladas de bexiga natatória, apresentando um aumento significativo de 398% em relação ao volume exportado em 2012, que totalizou 127 toneladas, com a vasta maioria, correspondendo a 95% do total exportado, originando-se do estado do Pará. Estado o qual está alinhado com a distribuição de todas as espécies identificadas neste estudo, sugerindo fortemente ser o principal local de captura desses animais (Figura 3).

Figura 3 - Mapa de distribuição das espécies identificadas



Fonte: Modificado de IUCN (2024).

No contexto dos jacarés, na década de 80 o aumento nos preços das peles gerou uma extração ilegal significativa de jacarés no Pantanal, em resposta à demanda internacional. A pressão pública resultou em restrições à caça clandestina, promovendo a criação de jacarés como alternativa, vista como lucrativa e conservacionista (Mourão, 2000). O referido trabalho ainda declara que em fevereiro de 1990, o IBAMA emitiu a Portaria nº 126 para regular a produção de jacarés do Pantanal, estabelecendo cotas para a extração de ovos e o modelo em ciclo aberto como padrão, incentivando produtores a obter licenças para operar criadouros comerciais. Programas eficazes de gestão também adotam sistemas de "pecuária", criando jacarés em cativeiro e reintroduzindo parte deles na natureza. (Campos et al., 2015; Thorbjarnarson, 1999).

Além do uso de sua pele para peças de vestuário, Medeiros et al. (2021) expõe que a carne de jacaré proveniente de cativeiro destacou-se como uma fonte valiosa de proteína para consumo humano, caracterizando-se por baixo teor de gordura intramuscular e benefícios para dietas com baixo teor de gordura, reduzindo as taxas de colesterol e oferecendo altas concentrações de ácidos graxos poli-insaturados,

comparáveis ou superiores à qualidade nutricional da carne de animais domésticos. Além disso, a farinha de carne, composta por proteínas de alto valor biológico, sais minerais e vitaminas do complexo B, poderia desempenhar um papel essencial na produção de rações para animais domésticos (Romanelli & Schmidt, 2003).

Das espécies identificadas, *M. niger* demonstra ser menos resiliente à caça em comparação com *C. crocodilus*, principalmente devido ao período mais prolongado que as fêmeas necessitam para atingir a maturidade sexual (Magnusson & Rebêlo, 1983). Uma pesquisa realizada quase três décadas depois, com base nos registros de exportação de peles, reforçou a constatação de que *M. niger* é uma das espécies menos capazes de resistir à exploração comercial, destacando-se entre os diversos vertebrados amazônicos historicamente envolvidos no comércio (Antunes et al., 2016).

As populações de crocodilianos na bacia amazônica foram afetadas por mudanças socioeconômicas e políticas ao longo do último século, sofrendo variações devido à exploração e às estratégias de conservação. A comercialização de jacarés na região mostrou-se economicamente promissora, levando à caça sem restrições e à redução severa das populações selvagens. O comércio, por décadas, ocorreu sem regulamentação, culminando em um declínio da caça ilegal na década de 1990, coincidindo com uma conscientização ambiental global. No entanto, a ausência de uma legislação ambiental consolidada destaca a necessidade de revisão das leis relacionadas à proteção da fauna silvestre (Marioni et al., 2021; Carreira & Sabbag, 2015; Mourão, 2000; Junior & Lima, 2021).

Desde os anos 2000, o Brasil testemunha o tráfico exorbitante de animais silvestres. De acordo com a Renctas (Rede Nacional de Combate ao Tráfico de Animais Silvestres, 2001), a projeção anual é de 38 milhões de espécimes retirados da natureza brasileira. Essas vítimas do tráfico e da desigualdade social no Brasil representam ameaças ecológicas, transformando-se em potenciais desequilíbrios que podem reverberar globalmente (Rodrigues, 2020).

Durante a investigação deste comércio ilegal, foram identificadas espécies de peixe que requerem monitoramento mais rigoroso para evitar riscos à sua preservação (*C. acoupa*). Além disso, pela primeira vez, detectou-se carne de jacaré sendo comercializada como bexiga natatória. É importante ressaltar que a comercialização de carne de jacaré é permitida apenas quando proveniente de animais criados em cativeiro, o que exige uma logística específica para a coleta de ovos em um período

determinado, bem como a observância de protocolos e a obtenção de autorizações do IBAMA e dos órgãos ambientais regionais (Mourão, 2000), condições que não foram atendidas no caso desses produtos apreendidos.

Por meio desta pesquisa, constatou-se que muitos dos produtos envolvidos nesse comércio internacional estão sendo transacionados sob falsas declarações por parte dos remetentes. Isso ressalta a necessidade não apenas de uma fiscalização mais rigorosa, mas também da implementação de abordagens colaborativas para identificação utilizando técnicas moleculares, como a do presente estudo, que demonstram sua importância ao auxiliar as autoridades de fiscalização na identificação desse material. Além disso, a implementação de incentivos fiscais constitui uma estratégia eficaz para estimular os comerciantes a conduzirem essa atividade de maneira mais regulada, cumprindo as normas necessárias para evitar impactos negativos nas espécies envolvidas nesse comércio.

#### **5.1.4 Referências**

ANTUNES, André P. et al. Empty forest or empty rivers? A century of commercial hunting in Amazonia. *Science advances*, v. 2, n. 10, p. e1600936, 2016.

CAMPOS, Zilca et al. Spatial and temporal variation in reproduction of a generalist crocodylian, *Caiman crocodylus yacare*, in a seasonally flooded wetland. *PLoS One*, v. 10, n. 6, p. e0129368, 2015.

CARNEIRO, Auner Pereira; ALMEIDA, Amanda Cunha. Comércio ilegal de animais silvestres no Brasil 1990-2010. *Revista Eletrônica da Faculdade de Direito de Campos-ISSN: 1980-7570*, v. 6, n. 1, p. 44-58, 2021.

CARREIRA, Laura BT; SABBAG, Omar J. Economic aspects of production of *Caiman crocodylus yacare*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 87, p. 495-502, 2015.

CHAC, L. D.; THINH, B. B. Species identification through DNA barcoding and its applications: A review. *Biology Bulletin*, v. 50, n. 6, p. 1143-1156, 2023.

DA SILVA, Caio F. et al. DNA Barcode reveals mislabelling in the identification of marine fish swimming bladders for commercialization. *Forensic science international*, v. 299, p. 41-43, 2019.

DIÁLOGO CHINO. Grude movimentando mercado milionário no Brasil e leva chineses à Amazônia: Pescadores do Pará aproveitam crescente apetite chinês por bexigas natatórias de peixes amazônicos, mas comércio pode minguar sem regulamentação e fiscalização. 01/12/2023. COLABORA, 20 jan. 2022. Disponível em: <https://projetcollabora.com.br/ods12/grude-movimentando-mercado-milionario-no-brasil-e-leva-chineses-a-amazonia/>. Acesso em: 5 maio 2024.

GOSTEL, Morgan R.; KRESS, W. John. The expanding role of DNA barcodes: Indispensable tools for ecology, evolution, and conservation. *Diversity*, v. 14, n. 3, p. 213, 2022.

GRIGG, G., KIRSHNER, D. *Biology and evolution of crocodylians*. Australia: CSIRO Publishing, 2015.

HEBERT, Paul DN et al. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, v. 270, n. 1512, p. 313-321, 2003 (a).

HEBERT, Paul DN; RATNASINGHAM, Sujeevan; DE WAARD, Jeremy R. 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, 2003 (b).

HEBERT, Paul DN; GREGORY, T. Ryan. The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Systematic biology*, v. 54, n. 5, p. 852-859, 2005.

HICKMAN, D. et al. Isinglass/collagen: denaturation and functionality. *Journal of biotechnology*, v. 79, n. 3, p. 245-257, 2000.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS (IBAMA). Página inicial. Disponível em: <https://www.ibama.gov.br/>. Acesso em: 25. jul. 2023.

JEŻOWSKI, Paweł; KOWALCZEWSKI, Przemysław Łukasz. Isinglass as an alternative biopolymer membrane for green electrochemical devices: initial studies of application in electric Double-Layer capacitors and future perspectives. *Polymers*, v. 15, n. 17, p. 3557, 2023.

JOANEN, Ted et al. *The commercial consumptive use of the American alligator (Alligator mississippiensis) in Louisiana, its effects on conservation. Harvesting wild species—implications for biodiversity*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, p. 465-506, 1997.

JUNIOR, Sergio Alexandre de Moraes Braga; LIMA, Luiz Eduardo Pereira. Comércio ilegal de animais silvestres na internet e a legislação brasileira. *Revista Brasileira de Direito Animal*, v. 16, n. 2, p. 33-52, 2021.

KEARSE, Matthew et al. 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, 2012.

LEATHER, R. V. et al. Analysis of the collagen and total soluble nitrogen content of isinglass finings by polarimetry. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 100, n. 5, p. 331-334, 1994.

LISSI, Alessandra Hanselmann; BILLIG, Osvaldo Alencar. REPRESSÃO DA BIOPIRATARIA NO BRASIL. *Jures*, v. 16, n. 29, p. 188-208, 2023.

MAGNUSSON, William Ernest; REBÊLO, G. H. Brazilian Crocodilians: The Problems of Conservation In A Multispecies System. Volume 17, Número 3, Pags. 56-57, 1983.

MARIONI, Boris et al. Science and conservation of Amazonian crocodilians: a historical review. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, v. 31, n. 5, p. 1056-1067, 2021.

MARNIS, Huria et al. DNA barcoding of fish diversity from Batanghari River, Jambi, Indonesia. *Fisheries and Aquatic Sciences*, v. 27, n. 2, p. 87-99, 2024.

MEDEIROS, Natalia BC et al. Carcass and commercial cuts yields of caiman (*Caiman crocodilus yacare*) farmed in a ranching system in the Brazilian Pantanal. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 93, 2021.

MEDEM, F.. *Los Crocodylia de sur América*. Bogotá, Colombia: Ministerio de Educación Nacional, Fondo Colombiano de Investigaciones Científicas y Proyectos Especiales, 1981.

MEDEM, Federico. *Los crocodylia de sur America*. Colciencias, 1983.

OLIVEIRA, J. R. S. et al. Solubilização, precipitação e determinação de massas moleculares de colágenos da bexiga natatória de peixes. *Mens Agitat*, v. 1, n. 2, p. 11-17, 2006.

MOURÃO, G. de M. *Utilização econômica da fauna silvestre no Brasil: o exemplo do Jacaré-do-Pantanal*. 2000.

PEREIRA, Nunes. A utilização da carne do jacaré na Amazônia. Boletim Geográfico Rio de Janeiro, v. 2, p. 150-152, 1944.

RENTAS. 1º Relatório Nacional sobre o Tráfico de Fauna Silvestre. Brasília: 2001. Disponível em: <https://renctas.org.br/>. Acesso em: 05 mai. 2024.

RODRIGUES, Paula. A máfia dos bichos: Muito além de reality, tráfico de animais no Brasil tira 38 milhões de bichos da mata por ano e gira R\$ 3 bi. UOL: Fernanda Schimidt, 11 maio 2020. Disponível em: <https://www.uol.com.br/ecoa/reportagens-especiais/trafico-no-brasil-tira-por-ano-35-milhoes-de-animais-da-floresta-e-gira-r-3-bilhoes/#cover>. Acesso em: 7 fev. 2024.

ROMANELLI, Pedro Fernando; SCHMIDT, Juliana. Estudo do aproveitamento das vísceras do jacaré do pantanal (*Caiman crocodilus yacare*) em farinha de carne. Food Science and Technology, v. 23, p. 131-139, 2003.

SADOVY DE MITCHESON, Yvonne et al. Emerging from the murk: threats, challenges and opportunities for the global swim bladder trade. Reviews in Fish Biology and Fisheries, v. 29, p. 809-835, 2019.

SCHRIEBER, R.; GAREIS, H. Gelatine Handbook. Wiley-VCH, GmbH and Co, Weinheim. 2007.

THE INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE (IUCN). IUCN Red List of Threatened Species. [S. l.], 10 out. 2019. Disponível em: <https://www.iucnredlist.org/>. Acesso em: 6 maio 2024.

THORBJARNARSON, John. Crocodile tears and skins: international trade, economic constraints, and limits to the sustainable use of crocodylians. Conservation Biology, v. 13, n. 3, p. 465-470, 1999.

## 5.2 Artigo 2:

**“DNA Barcode na identificação de bexigas natatórias: uma abordagem no comércio internacional”**

### Resumo

Nos últimos anos, houve um aumento global no consumo de recursos provenientes da pesca, que abrange desde moluscos até diferentes tipos de peixes, muitos dos quais têm alto valor comercial. Em 2011, o Brasil registrou uma produção total de 803.270,2 toneladas de pesca, sendo 87% provenientes da pesca marítima. Entretanto, um relatório de auditoria da pesca no Brasil em 2021 apontou que o país não está progredindo na criação de políticas públicas sustentáveis, aumentando o risco de superexploração de espécies significativas. A venda de produtos da pesca, como a bexiga natatória e as barbatanas de peixes cartilagosos, é principalmente comercializada em países como China, Japão, Reino Unido, EUA e Alemanha. A bexiga natatória é usada em cosméticos, argamassas, medicamentos e outros produtos. No entanto, muitas vezes, esses produtos são comercializados sem uma identificação adequada, o que pode levar à inclusão acidental de espécies ameaçadas nas capturas e vendas, como ocorre no comércio de barbatanas de tubarão. A identificação baseada apenas em características morfológicas muitas vezes é imprecisa. Portanto, a análise genética, em particular a técnica de DNA Barcode, que se baseia na sequência do DNA mitocondrial da Citocromo Oxidase (COI), é uma alternativa sólida para a identificação precisa desses produtos, sendo uma técnica amplamente usada por ser rápida, prática, eficaz e de baixo custo. O presente trabalho analisou 120 amostras, as quais foram identificadas oito espécies de peixes, sendo elas: *Cynoscion acoupa* (Pescada-amarela), *Cynoscion leiarchus* (Pescada-branca), *Cynoscion microlepidotus* (Pescada-dentão), *Cynoscion virescens* (Pescada-cambucu), *Macrodon ancylodon* (Pescada-foguete), *Macrodon atricauda* (Pescada-rei), *Plagioscion auratus* (Corvina) e *Sciades parkeri* (Gurijuba).

### 5.2.1 Introdução

A pesca marítima, ao longo da história, desempenhou múltiplos papéis fundamentais, fornecendo alimentos, sustentando comunidades e refletindo a identidade cultural de povos diversos (da Silva et al., 2019). No entanto, globalmente, tem sido associada a práticas insustentáveis que ameaçam a biodiversidade dos ecossistemas marinhos (Marnis et al., 2024). O desenvolvimento tecnológico, desde a Revolução Industrial, transformou a pesca, aumentando sua eficiência e produção, porém, também exacerbou a exploração dos recursos pesqueiros (Marrul Filho, 2003).

No Brasil, a indústria pesqueira e aquícola cresceu significativamente, refletido em um aumento nas exportações (FAO, 2022), fazendo com que a sobre-exploração dos recursos pesqueiros levante preocupações sobre a sustentabilidade do setor.

A falta de dados precisos sobre a pesca no país compromete ainda mais a gestão adequada desses recursos (Ribeiro & Martins, 2023), enquanto a pesca predatória emerge como ameaça adicional à biodiversidade e estabilidade dos ecossistemas marinhos (WWF Brasil, 2024). Nesse contexto, a comercialização de partes específicas de animais marinhos, como bexigas natatórias e nadadeiras, têm sido valorizadas em diversos países, como China, Japão, Reino Unido, EUA e Alemanha, podendo ser utilizada em diversas indústrias (da Silva et al., 2019). A bexiga natatória é um órgão presente em peixes, fundamental para manter seu equilíbrio hidrostático, composta por várias camadas, incluindo uma externa espessa e fibrosa, rica em colágeno (Oliveira et al., 2006). Os autores citados acrescentam que os subprodutos, como o "isinglass", são amplamente utilizados em várias indústrias, incluindo alimentos e bebidas, com destaque na clarificação de cerveja e vinho, e até mesmo na medicina tradicional em alguns países asiáticos.

Esse colágeno, extraído principalmente através de processos com ácido acético, possui aplicações diversificadas, desde a indústria cinematográfica até a medicina, sendo um recurso valioso e multifuncional (Jezowski & Kowalczewski, 2023, Oliveira et al., 2006). No entanto, a comercialização desses subprodutos é de forma descaracterizada, dificultando a identificação da origem específica dos animais envolvidos, com isso, técnicas moleculares de identificação se tornam uma ferramenta indispensável para verificar quais espécies estão envolvidas nesse comércio (Zhao et al., 2024). A taxonomia molecular moderna, introduzida por Tautz et al. (2003), usa o DNA como a principal ferramenta na identificação de espécies. A análise de DNA mitocondrial é especialmente útil para a identificação precisa de espécies de peixes, auxiliando na gestão da pesca e na autenticação de produtos alimentícios (Chac & Thinh, 2023). O DNA Barcode, proposto por Hebert et al. em 2003, permite a identificação de espécies através de sequências únicas de DNA. Esse método é altamente eficaz para identificar espécies já catalogadas e até mesmo novas espécies (Hebert et al., 2003a, 2003b).

O BOLD (Barcode of Life Database) entra como uma base de dados universal para essas sequências, facilitando a associação de outros dados às amostras e estabelecendo critérios de qualidade para garantir a precisão da identificação (Frézal

& Leblois, 2008). O DNA mitocondrial é particularmente vantajoso devido à sua rápida taxa de evolução, sendo amplamente utilizado com sucesso na identificação genética de vários grupos de organismos, incluindo peixes (Hebert et al., 2003a).

### 5.2.2 Materiais e Métodos

Os materiais da pesquisa foram coletados no Aeroporto Internacional de Guarulhos - SP, em uma parceria firmada com os agentes do IBAMA, nos anos de 2022 e 2023 (Figura 1). As amostras de tecido foram coletadas no local e preservadas em álcool absoluto para garantir sua qualidade para a posterior análise molecular. Após a coleta, o material foi portado para integrar o banco de tecidos do Laboratório de Genômica e Conservação de Peixes (LAGENPE) da Unesp Bauru. Para a extração do DNA, utilizou-se o Kit comercial "PureLink™ Genomic DNA Mini Kit - Thermofisher", seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante, com ajustes nos períodos de atuação da Proteinase K, estabelecendo-se 2 horas. A integridade do DNA extraído foi avaliada por meio do Qubit™ dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen) e do Qubit® 2.0 Fluorometer.

Os fragmentos de DNA alvo foram amplificados utilizando os seguintes reagentes: 1xPCR buffer (20mM Tris-HCl, pH 8.4 e 50mM KCl), 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 150μM de cada dNTP, 0.4mM dos primers COI-FishF1 e COI-FishR2, descritos por Ward et al. (2005), e 10 a 30 ng/μ de DNA, com a execução da reação de PCR no termociclador Veriti 96-Well Thermal Cycler da Applied Biosystems: desnaturação inicial a 95°C por 5 min, 35 ciclos das seguintes etapas, sendo desnaturação a 95°C por 30s, anelamento dos primers a 56°C por 30s e extensão da cadeia nucleotídica a 72°C por 45s, com uma extensão final a 72°C por 5min. Os produtos resultantes da amplificação foram observados por eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com GelRed Nucleic Acid Gel Stain (2,5 μL/mL), e visualizados utilizando um transluminador sob luz ultravioleta. As imagens foram capturadas com a câmera OLYMPUS, modelo C-5060, e comparadas a um marcador de peso molecular e concentração conhecidos: Low DNA mass Ladder da Invitrogen.

Após a etapa de amplificação, as amostras foram submetidas à reação de PCR para sequenciamento. Em seguida, passaram por uma fase de purificação utilizando a enzima Exo-SAP IT® (USB Corporation) para remover os resíduos de reagentes

utilizados. Posteriormente, foram suspendidas em formamida e inseridas em um dos seguintes locais para sequenciamento: no Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica – CREBIO da UNESP de Jaboticabal/SP ou no Instituto de Biotecnologia – IBTEC da UNESP de Botucatu. Ambos os locais estão equipados com os sequenciadores automáticos ABI 3730 XL DNA Analyzer (Applied Biosystems) e ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), respectivamente. O sequenciamento foi realizado de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante para a execução da corrida de leitura da sequência. As sequências forward e reverse foram curadas utilizando o programa Geneious 4.8.5 (Kearse et al., 2012) e em seguida foram submetidas às bases de dados da plataforma BOLD (The Barcode of Life Data System) e NCBI (National Center for Biotechnology Information) para identificação da espécie, considerando apenas sequências com 98% ou mais de similaridade com as sequências previamente registradas no banco de dados do Bold System (Anexo 2).

### 5.2.3 Resultados e Discussão

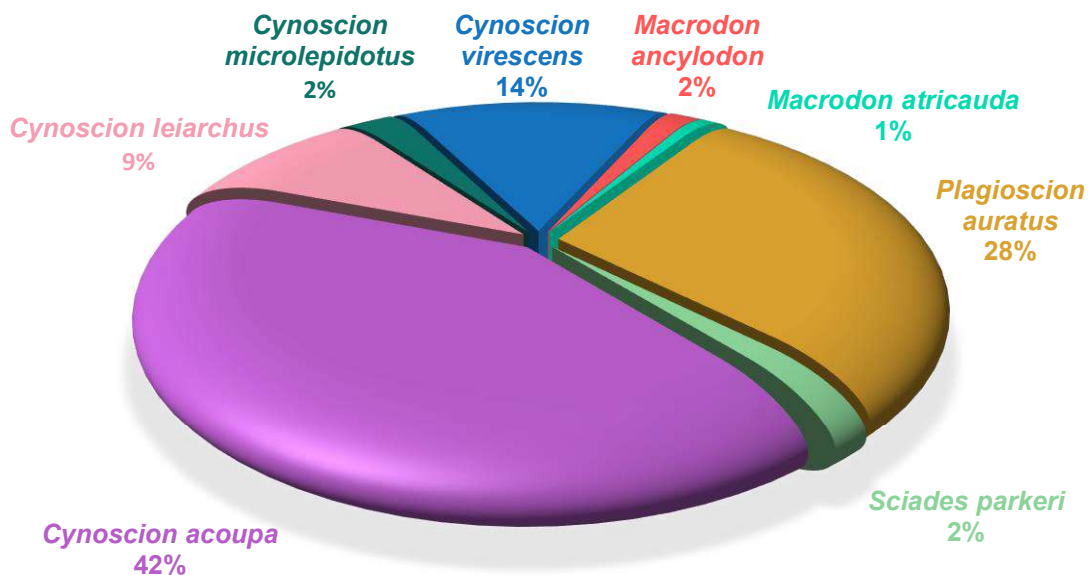
Os materiais coletados estavam desidratados e não apresentavam características distintivas, dificultando sua identificação morfológica. Este material estava sendo transportado por meio do serviço postal internacional, em conjunto com produtos alimentícios (tais como macarrão instantâneo), com eletrônicos, ou dentro de bagagens de passageiros (Figura 1). Os quais estavam sendo comercializados como bexiga natatória, uma transação legalmente permitida, porém foram apreendidos devido à falta de documentação que indicasse a origem do material. No total, foram analisadas 120 amostras, as quais foram identificadas oito espécies de peixes, sendo: 50 *Cynoscion acoupa*, 11 *Cynoscion leiarchus*, 3 *Cynoscion microlepidotus*, 17 *Cynoscion virescens*, 2 *Macrodon ancylodon*, 1 *Macrodon atricauda*, 34 *Plagioscion auratus* e 2 *Sciades parkeri* (Figura 2), conhecidas popularmente como Pescada-amarela, Pescada-branca, Pescada-dentão, Pescada-cambucu, Pescada-foguete, Pescada-rei, Corvina e Gurijuba, respectivamente.

Figura 1 - Materiais apreendidos pelos agentes do IBAMA.



Fonte: Elaborado pelo autor do trabalho (2024).

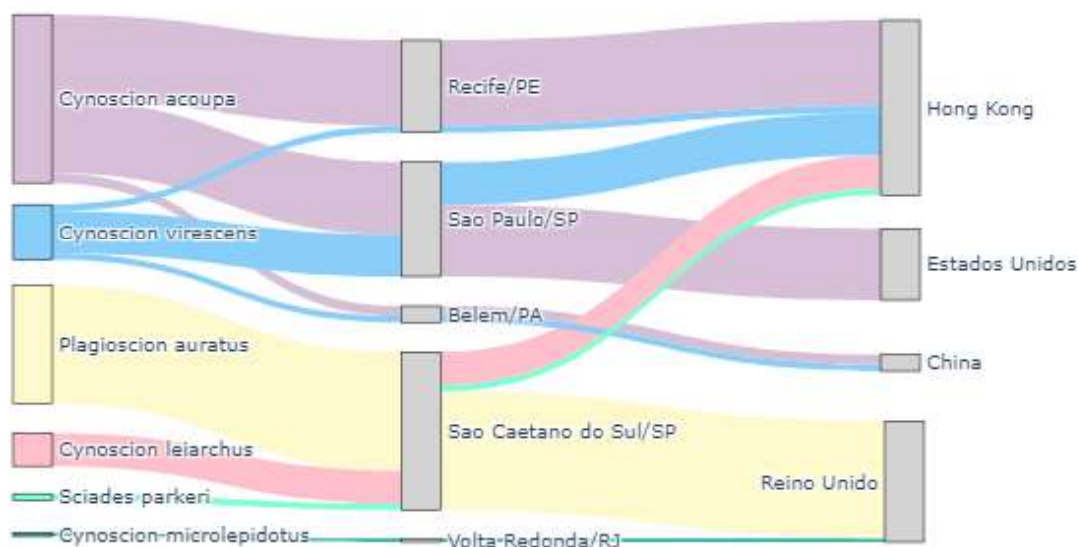
Figura 2 - Gráfico da abundância de indivíduos por espécie.



Fonte: Elaborado pelo autor do trabalho (2024).

Esses produtos foram despachados das localidades brasileiras de Recife/PE, São Paulo/SP, Belém/PA, São Caetano do Sul/SP e Volta Redonda/RJ, com destino a Hong Kong, Estados Unidos, Reino Unido e China (Figura 3).

Figura 3 - Diagrama de fluxo representando as amostras coletadas, as cidades de origem no Brasil e as cidades de destino internacional.



Fonte: Elaborado pelo autor do trabalho (2024).

Conforme reportagem do Diálogo Chino (2022), entre 2015 e 2020, a importação global de bexigas natatórias atingiu 20 mil toneladas, com um valor declarado de 14 bilhões de dólares de Hong Kong (aproximadamente R\$ 9,95 bilhões), onde essas importações envolveram mais de cem países, sendo o Brasil o principal contribuinte com 3.300 toneladas, avaliadas em 3 bilhões de dólares de Hong Kong (cerca de R\$ 2,13 bilhões). Essa dinâmica comercial baseia-se na oferta e demanda do grude, extraído de determinadas espécies de peixes da região, que vem sendo explorado de forma crescente desde a década de 1970, onde esse produto é destinado tanto a mercados nacionais quanto internacionais, com destaque para a exportação para países da Ásia Oriental (dos Santos & de Oliveira, 2022).

Em 2020, as exportações brasileiras de bexiga natatória atingiram 637 toneladas, marcando um notável aumento de 398% em comparação com o volume exportado em 2012, que foi de 127 toneladas (Diálogo Chino, 2022). A esmagadora maioria teve origem no estado do Pará (dos Santos & de Oliveira, 2022), estado onde é encontrado a maioria das espécies identificadas neste estudo (Figura 4), sugerindo intimamente que esses animais foram capturados nessa região.

Figura 4 - Mapa de distribuição das espécies identificadas.



Fonte: modificado de IUCN (2024).

Dos Santos e de Oliveira (2022), afirmam que a produção de grude das espécies comercializadas em Vigia (Pará, Brasil) resulta em uma dinâmica econômica centrada na lógica capitalista, caracterizada pela concentração de renda nas mãos de grandes comerciantes. Ainda completam que esses atores detêm a maior parte do capital necessário para sustentar o sistema de aviamento até que a matéria-prima alcance as indústrias, sem gerar benefícios significativos para os pescadores de pequena escala e as comunidades ribeirinhas, evidenciando-se, assim, a fragilidade das políticas públicas no Brasil que visam regular e promover a comercialização do grude de peixes.

Tal como observado anteriormente na China com a *Bahaba taipingensis*, cuja espécie possuía a bexiga natatória mais valorizada, sua sobrepesca decorrente desse comércio levou-a a ser incluída, em 2006, na lista vermelha da IUCN (Diálogo Chino, 2022). Um cenário similar emerge com a *C. acoupa* e *S. parkeri*, atualmente classificadas como “vulnerável” na lista vermelha da IUCN, com suas populações em declínio. Além disso, *C. acoupa* está avaliada como Quase Ameaçada na Lista

Vermelha Nacional Brasileira, onde as medidas regulatórias são inexistentes ou insuficientes em sua abrangência (IUCN, 2023).

Atualmente, os órgãos governamentais responsáveis pela exportação de commodities não exercem uma regulamentação efetiva sobre a cadeia produtiva do grude, especialmente em relação à sua comercialização, ao elevado valor no mercado internacional e à pressão ambiental que sua produção exerce sobre a fauna marinha no norte do Brasil, onde as políticas públicas voltadas para a preservação e proteção dessas espécies continuam a gerar controvérsias entre os proprietários das embarcações e a comunidade local (dos Santos & de Oliveira, 2022).

Isso evidencia a relevância de pesquisas como esta, que contribuem para a fiscalização ao identificar as espécies comercializadas de maneira não identificada. Assim, torna-se essencial não apenas a adoção e vigilância rigorosa das leis de conservação e fiscalização, mas também a condução de estudos de identificação utilizando técnicas moleculares, como o presente, para determinar e caracterizar os produtos envolvidos no comércio ilegal, principalmente no que concerne à necessidade de estabelecer controle e manejo dessas espécies, cujas populações estão em declínio devido a esse comércio. Ademais, adotar incentivos fiscais pode ser uma estratégia eficiente para motivar os comerciantes a operarem de forma mais regulamentada, garantindo o cumprimento das diretrizes necessárias para minimizar os impactos negativos nas espécies associadas a essa atividade comercial.

#### **5.2.4 Referências**

BOLD SYSTEMS. Identification - Barcode of Life Data System. Disponível em: [https://boldsystems.org/index.php/IDS\\_OpenIdEngine](https://boldsystems.org/index.php/IDS_OpenIdEngine). Acesso em: 20 jul. 2023.

CHAC, L. D.; THINH, B. B. Species identification through DNA barcoding and its applications: A review. *Biology Bulletin*, v. 50, n. 6, p. 1143-1156, 2023.

DA SILVA, Caio F. et al. DNA Barcode reveals mislabelling in the identification of marine fish swimming bladders for commercialization. *Forensic science international*, v. 299, p. 41-43, 2019.

DIÁLOGO CHINO. Grude movimentado mercado milionário no Brasil e leva chineses à Amazônia: Pescadores do Pará aproveitam crescente apetite chinês por bexigas

natatórias de peixes amazônicos, mas comércio pode minguar sem regulamentação e fiscalização. 01/12/2023. COLABORA, 20 jan. 2022. Disponível em: <https://projeto colabora.com.br/ods12/grude-movimenta-mercado-milionario-no-brasil-e-leva-chineses-a-amazonia/>. Acesso em: 5 maio 2024.

DOS SANTOS, João Paulo Siqueira; DE OLIVEIRA, Christian Dennys Monteiro. Dinámica desigual del comercio pesquero Brasil/China en la explotación del grude en Vigia (Pará, Brasil). *Revista de Estudios Brasileños*, v. 9, n. 20, p. 17-29, 2022.

FAO. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards Blue Transformation*. Rome, FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0461en>. 2022.

FRÉZAL, Lise; LEBLOIS, Raphael. Four years of DNA barcoding: current advances and prospects. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 8, n. 5, p. 727-736, 2008.

HEBERT, Paul DN et al. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, v. 270, n. 1512, p. 313-321, 2003 (a).

HEBERT, Paul DN; RATNASINGHAM, Sujeevan; DE WAARD, Jeremy R. 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, 2003 (b).

JEŻOWSKI, Paweł; KOWALCZEWSKI, Przemysław Łukasz. Isinglass as an alternative biopolymer membrane for green electrochemical devices: initial studies of application in electric Double-Layer capacitors and future perspectives. *Polymers*, v. 15, n. 17, p. 3557, 2023.

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. 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, 2012.

MARNIS, Huria et al. DNA barcoding of fish diversity from Batanghari River, Jambi, Indonesia. *Fisheries and Aquatic Sciences*, v. 27, n. 2, p. 87-99, 2024.

MARRUL FILHO, Simão. *Crise e sustentabilidade no uso dos recursos pesqueiros*. Brasília: IBAMA/MMA, 2003.

OLIVEIRA, J. R. S. et al. Solubilização, precipitação e determinação de massas moleculares de colágenos da bexiga natatória de peixes. *Mens Agitat*, v. 1, n. 2, p. 11-17, 2006.

RAMOS, Maíce Giovanini. DNA Barcoding na identificação de espécies de tubarões exploradas comercialmente no litoral de São Paulo. 2016.

RIBEIRO, Anna Julia dos Santos; MARTINS, Lohane Rodrigues. O Mar como um tesouro econômico: A pesca e seu impacto vital na economia. [S. l.], 1 jul. 2023. Disponível em: <https://ceemar.ufrrj.br/a-pesca-e-seu-impacto-vital-na-economia/>. Acesso em: 7 maio 2024.

TAUTZ, Diethard et al. A plea for DNA taxonomy. *Trends in ecology & evolution*, v. 18, n. 2, p. 70-74, 2003.

THE INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE (IUCN). IUCN Red List of Threatened Species. [S. l.], 10 out. 2019. Disponível em: <https://www.iucnredlist.org/>. Acesso em: 6 maio 2024.

WARD RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PD. DNA Barcode Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, v. 360, n. 1462, p.1847-57, 2005.

WORLD WILDLIFE FUND (WWF). Página inicial. Disponível em: <https://www.wwf.org.br/>. Acesso em: 5 set. 2024.

ZHAO, Shu et al. Integrated DNA barcoding methods to identify species in the processed fish products from Chinese market. *Food Research International*, v. 182, p. 114140, 2024.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A aplicação da técnica de DNA Barcode mostrou-se extremamente eficiente na identificação das espécies envolvidas no comércio de bexigas natatórias. Esse método de análise molecular permitiu a diferenciação precisa de espécies que, de outra forma, seriam impossíveis de identificar por meio de técnicas morfológicas tradicionais, dada a natureza do produto comercializado. A correta identificação das espécies envolvidas neste comércio é essencial para o desenvolvimento de medidas de controle adequadas e para a conservação da biodiversidade. Como resultado deste trabalho, foi possível o desenvolvimento de um protocolo específico com o uso de técnicas moleculares, voltado para o auxílio na fiscalização ambiental, tornando-se uma ferramenta valiosa para apoiar as agências regulatórias na proteção dos recursos naturais.

Um aspecto notável identificado neste estudo foi a comercialização de carne de jacaré como bexiga natatória. Este achado inédito evidencia o quanto é essencial a aplicação dessas tecnologias para coibir fraudes no mercado e assegurar a conservação das espécies envolvidas.

A produção do "grude", derivado das bexigas natatórias e que gera altos lucros, está concentrada nas mãos de grandes comerciantes, tanto no Brasil quanto no exterior. Nas regiões de base produtiva, os benefícios econômicos desse comércio são mínimos, restando apenas o resíduo da produção. Não há, portanto, um desenvolvimento socioespacial significativo, uma vez que a própria sociedade local muitas vezes desconhece o potencial econômico e os destinos internacionais deste produto. Isso ressalta a necessidade de políticas de redistribuição de renda e de conscientização local sobre o valor do "grude" no mercado global.

Além disso, observa-se que há uma lacuna significativa na legislação ambiental específica para este tipo de comércio. O aumento contínuo da comercialização de bexigas natatórias sublinha a urgência de políticas públicas mais robustas e voltadas para a fiscalização e regulamentação desse setor. O governo deve priorizar a criação de normativas que contemplem as particularidades deste mercado, a fim de evitar a exploração descontrolada das espécies.

## 7 REFERÊNCIAS

ANTUNES, André P. et al. Empty forest or empty rivers? A century of commercial hunting in Amazonia. **Science advances**, v. 2, n. 10, p. e1600936, 2016.

BIODIVERSITY4ALL. Disponível em: <<https://www.biodiversity4all.org/>>. Acesso em: 20 jul. 2024.

BOLD SYSTEMS. *Identification - Barcode of Life Data System*. Disponível em: [https://boldsystems.org/index.php/IDS\\_OpenIdEngine](https://boldsystems.org/index.php/IDS_OpenIdEngine). Acesso em: 20 jul. 2024.

CAMPOS, Zilca et al. Spatial and temporal variation in reproduction of a generalist crocodilian, *Caiman crocodilus yacare*, in a seasonally flooded wetland. **PLoS One**, v. 10, n. 6, p. e0129368, 2015.

CARNEIRO, Auner Pereira; ALMEIDA, Amanda Cunha. Comércio ilegal de animais silvestres no Brasil 1990-2010. **Revista Eletrônica da Faculdade de Direito de Campos-ISSN: 1980-7570**, v. 6, n. 1, p. 44-58, 2021.

CARREIRA, Laura BT; SABBAG, Omar J. Economic aspects of production of *Caiman crocodilus yacare*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, p. 495-502, 2015.

CERVIGÓN, F. **Los peces marinhos de Venezuela**. Vol. II. 2ª ed. Venezuela: Editora ExLibris. 497p. 1993.

CHAC, L. D.; THINH, B. B. Species identification through DNA barcoding and its applications: A review. *Biology Bulletin*, v. 50, n. 6, p. 1143-1156, 2023.

DANELUZ, Cahique M. DNA Barcode utilizado na identificação de tubarões comercializados no CEAGESP, São Paulo. 2020.

DA SILVA, Caio F. et al. DNA Barcode reveals mislabelling in the identification of marine fish swimming bladders for commercialization. **Forensic science international**, v. 299, p. 41-43, 2019.

DIÁLOGO CHINO. Grude movimentado mercado milionário no Brasil e leva chineses à Amazônia: Pescadores do Pará aproveitam crescente apetite chinês por bexigas natatórias de peixes amazônicos, mas comércio pode minguar sem regulamentação

e fiscalização. 01/12/2023. COLABORA, 20 jan. 2022. Disponível em: <https://projetcocolabora.com.br/ods12/grude-movimenta-mercado-milionario-no-brasil-e-leva-chineses-a-amazonia/>. Acesso em: 5 maio 2024.

DOS SANTOS, João Paulo Siqueira; DE OLIVEIRA, Christian Dennys Monteiro. Dinámica desigual del comercio pesquero Brasil/China en la explotación del grude en Vigia (Pará, Brasil). **Revista de Estudios Brasileños**, v. 9, n. 20, p. 17-29, 2022.

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards Blue Transformation. Rome, FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0461en>. 2022.

FRÉZAL, Lise; LEBLOIS, Raphael. Four years of DNA barcoding: current advances and prospects. *Infection*, **Genetics and Evolution**, v. 8, n. 5, p. 727-736, 2008.

GOMES, Rodrigo Carneiro. O controle e a repressão da biopirataria no Brasil. 2007.

GOSTEL, Morgan R.; KRESS, W. John. The expanding role of DNA barcodes: Indispensable tools for ecology, evolution, and conservation. **Diversity**, v. 14, n. 3, p. 213, 2022.

HAJIBABAEI, Mehrdad et al. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. **TRENDS in Genetics**, v. 23, n. 4, p. 167-172, 2007.

HEBERT, Paul DN et al. Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society of London. **Series B: Biological Sciences**, v. 270, n. 1512, p. 313-321, 2003 (a).

HEBERT, Paul DN; RATNASINGHAM, Sujeevan; DE WAARD, Jeremy R. 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, 2003 (b).

HEBERT, Paul DN; GREGORY, T. Ryan. The promise of DNA barcoding for taxonomy. **Systematic biology**, v. 54, n. 5, p. 852-859, 2005.

HICKMAN, D. et al. Isinglass/collagen: denaturation and functionality. **Journal of biotechnology**, v. 79, n. 3, p. 245-257, 2000.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS (IBAMA). *Página inicial*. Disponível em: <https://www.ibama.gov.br/>. Acesso em: 25. jul. 2024.

JEŻOWSKI, Paweł; KOWALCZEWSKI, Przemysław Łukasz. Isinglass as an alternative biopolymer membrane for green electrochemical devices: initial studies of application in electric Double-Layer capacitors and future perspectives. **Polymers**, v. 15, n. 17, p. 3557, 2023.

JUNIOR, Sergio Alexandre de Moraes Braga; LIMA, Luiz Eduardo Pereira. Comércio ilegal de animais silvestres na internet e a legislação brasileira. **Revista Brasileira de Direito Animal**, v. 16, n. 2, p. 33-52, 2021.

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. 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, 2012.

LEATHER, R. V. et al. Analysis of the collagen and total soluble nitrogen content of isinglass finings by polarimetry. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 100, n. 5, p. 331-334, 1994.

LEUENBERGER, Bruno H. Investigation of viscosity and gelation properties of different mammalian and fish gelatins. **Food hydrocolloids**, v. 5, n. 4, p. 353-361, 1991.

LIMA, Renato Corrêia et al. Identification of fish specimens of the Tocantins River, Brazil, using DNA barcoding. **Journal of Fish Biology**, 2024.

LISSI, Alessandra Hanselmann; BILLIG, Osvaldo Alencar. REPRESSÃO DA BIOPIRATARIA NO BRASIL, **REVISTA JurES**, v. 16, n. 29, p. 188-208, junho 2023.

MAGNUSSON, William Ernest; REBÊLO, G. H. Brazilian Crocodilians: The Problems of Conservation In A Multispecies System. Volume 17, Número 3, Pags. 56-57, 1983.

MARIONI, Boris et al. Science and conservation of Amazonian crocodilians: a historical review. **Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems**, v. 31, n. 5, p. 1056-1067, 2021.

MARNIS, Huria et al. DNA barcoding of fish diversity from Batanghari River, Jambi, Indonesia. **Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 27, n. 2, p. 87-99, 2024.

MARRUL FILHO, Simão. **Crise e sustentabilidade no uso dos recursos pesqueiros**. Brasília: IBAMA/MMA, 2003.

MCGOODWIN, James R. **Crisis in the World's Fisheries: People, Problems and Polices**. Stanford, CA: Stanford University Press, 1990.

MEDEIROS, Natalia BC et al. Carcass and commercial cuts yields of caiman (*Caiman crocodilus yacare*) farmed in a ranching system in the Brazilian Pantanal. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 93, 2021.

MOURÃO, G. de M. Utilização econômica da fauna silvestre no Brasil: o exemplo do Jacaré-do-Pantanal. 2000.

MURAWSKI, Steven A. **Brief history of the groundfishing industry of New England**. Inglaterra: Northeast Fisheries Science Center (NEFSC), 1990. Disponível em: <http://www.nefsc.noaa.gov/history/stories/groundfish/grndfsh1.html>. Acesso em: 05 set. 2024.

OLIVEIRA, J. R. S. et al. Solubilização, precipitação e determinação de massas moleculares de colágenos da bexiga natatória de peixes. **Mens Agitat**, v. 1, n. 2, p. 11-17, 2006.

OLIVEIRA, Raul Barrera Camacho. Genética molecular na identificação de espécies de raias exploradas comercialmente no estado de São Paulo. 2020.

ORTIZ, Mauro de Freitas. Validação do DNA Barcoding como identificador de espécies: um estudo de ampla amostragem com o gênero *Pseudoplatystoma* (Siluriformes; Pimelodidae) na Amazônia. 2010.

RAMOS, Maíce Giovanini. DNA Barcoding na identificação de espécies de tubarões exploradas comercialmente no litoral de São Paulo. 2016.

RENTAS. 1º Relatório Nacional sobre o Tráfico de Fauna Silvestre. Brasília: 2001. Disponível em: <https://renctas.org.br/>. Acesso em: 05 mai. 2024.

RIBEIRO, Anna Julia dos Santos; MARTINS, Lohane Rodrigues. O Mar como um tesouro econômico: A pesca e seu impacto vital na economia. [S. l.], 1 jul. 2023. Disponível em: <https://ceemar.ufrj.br/a-pesca-e-seu-impacto-vital-na-economia/>. Acesso em: 7 maio 2024.

RODRIGUES, Paula. A máfia dos bichos: Muito além de reality, tráfico de animais no Brasil tira 38 milhões de bichos da mata por ano e gira R\$ 3 bi. UOL: Fernanda Schimidt, 11 maio 2020. Disponível em: <https://www.uol.com.br/ecoa/reportagens-especiais/trafico-no-brasil-tira-por-ano-35-milhoes-de-animais-da-floresta-e-gira-r-3-bilhoes/#cover>. Acesso em: 7 fev. 2024.

RODRIGUES JUNIOR, C. E. DNA Barcode na identificação de Peixes de Bico explorados comercialmente: uma abordagem forense. 2016.

ROMANELLI, Pedro Fernando; SCHMIDT, Juliana. Estudo do aproveitamento das vísceras do jacaré do pantanal (*Caiman crocodilus yacare*) em farinha de carne. **Food Science and Technology**, v. 23, p. 131-139, 2003.

SALDANHA, Polliana de Oliveira; PEIXOTO, Rosana da Silva. Análise bibliográfica do tráfico de animais silvestres no Nordeste do Brasil na última década, **Revista Multidisciplinar do Núcleo de Pesquisa e Extensão (RevNUPE)**, v. 1, n. 1, ed. 202102, 23 jun. 2021.

SCHRIEBER, R.; GAREIS, H. **Gelatine Handbook**. Wiley-VCH, GmbH and Co, Weinheim. 2007.

SILVÉRIO, J. Identificação genética de espécies de tubarões e monitoramento da pesca no litoral de São Paulo. 2010.

TAUTZ, Diethard et al. A plea for DNA taxonomy. **Trends in ecology & evolution**, v. 18, n. 2, p. 70-74, 2003.

THE INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE (IUCN). IUCN Red List of Threatened Species. [S. l.], 10 out. 2019. Disponível em: <https://www.iucnredlist.org/>. Acesso em: 6 maio 2024.

THORBJARNARSON, John. Crocodile tears and skins: international trade, economic constraints, and limits to the sustainable use of crocodilians. **Conservation Biology**, v. 13, n. 3, p. 465-470, 1999.

TRESSLER, D. K. E.; LEMON, J. M. **Marine products of commerce. Their acquisition, handling, biological aspects and the science and technology of their preparation and preservation**. New York, Ed. Book division, Second edition, Chapter 24, p.524. 1951.

VASCONCELOS, Antony Stone Souza de. TRÁFICO INTERNACIONAL DE ANIMAIS SILVESTRES NO BRASIL, **Revista Ibero- Americana de Humanidades, Ciências e Educação- REASE**, v. 9, n. 05, p. 4349-4413, 5 maio 2023.

WARD RD, Zemplak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PD. DNA Barcode Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, v. 360, n. 1462, p.1847-57, 2005.

WORLD WILDLIFE FUND (WWF). *Página inicial*. Disponível em: <https://www.wwf.org.br/>. Acesso em: 5 julho. 2024.

ZHANG, Junbin. Species identification of marine fishes in China with DNA barcoding. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, 2011.

ZHAO, Shu et al. Integrated DNA barcoding methods to identify species in the processed fish products from Chinese market. **Food Research International**, v. 182, p. 114140, 2024.