

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

MESTRADO

***DNA Barcoding* na identificação de espécies de tubarões  
exploradas comercialmente no litoral de São Paulo.**

Maíce Giovanini Ramos

Botucatu- SP

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

***Maíce Giovanini Ramos***

***DNA Barcoding* na identificação de espécies de tubarões  
exploradas comercialmente no litoral de São Paulo.**

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

***Orientador: Dr. Fábio Porto-Foresti***

Botucatu- SP

2016

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

Ramos, Maíce Giovanini.

DNA Barcoding na identificação de espécies de tubarões exploradas comercialmente no litoral de São Paulo / Maíce Giovanini Ramos. - Botucatu, 2016

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

Orientador: Fábio Porto-Foresti

Capes: 20204000

1. Tubarão - Identificação. 2. Marcadores genéticos.  
3. Raia (Peixe) - Identificação. 4. Biodiversidade marinha - Conservação.

Palavras-chave: COI; Conservação genética;  
Elasmobrânquios; Identificação molecular; Marcadores moleculares.

Laboratório de  
Genética de Peixes  
Unesp Bauru



*Dedico esse trabalho à minha família,  
meu porto seguro.*

*“O homem é a mais insana das espécies. Adora um Deus invisível e mata a Natureza visível...sem perceber que a Natureza que ele mata é esse Deus invisível que ele adora.”*

*Hubert Reeves*

## *AGRADECIMENTOS*

*Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para que fosse possível completar essa jornada, em especial:*

*À FAPESP, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela bolsa de estudos e auxílio financeiros concedidos (processo: 2014/00552-6).*

*Ao CNPq pela bolsa de estudos no início do projeto.*

*Ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Botucatu, ao Curso de Pós - graduação em Ciências Biológicas/Zoologia.*

*Ao meu orientador Prof. Dr. Fábio Porto Foresti, por abrir as portas de seu laboratório, pela oportunidade oferecida de poder trabalhar junto todos esses anos, e também pelos incentivos, conselhos, dedicação e orientação. Principalmente nesses últimos meses, obrigada por acreditar em mim!*

*Ao Prof. Dr. Fausto Foresti por ser uma grande inspiração pelo amor que dedica a ciência. Ao Prof. Dr. Cláudio Oliveira por me socorrer todos os momentos em que tive dúvidas, seus ensinamentos me ajudaram a amadurecer meu trabalho. Ao Prof. Dr. Fernando Fernandes Mendonça, pela ajuda nas coletas de Santos e sua disponibilização em ajudar sempre, principalmente em ter aceitado ser meu co-orientador em nossa tentativa de Doutorado Direto. Obrigada!*

*Aos meus colegas de trabalho, a família LaGenPe, aos que já saíram do laboratório, Rosângela, Tati, Diogo, Dani, Milena, Raquel, e aos que ainda permanecem, Andrea, Aline, Bruna, Fernanda, Diego, Sandro, Manolo, Egberto, Will, Caio e a todo pessoal de iniciação científica, obrigada pelos momentos de descontração, pelas viagens, congressos, e mais ainda, pela ajuda que me deram durante meus anos no laboratório. Nada disso seria possível sem uma boa convivência, vocês foram minha segunda família e minha segunda casa durante todo esse tempo. Em especial a Bruna, que se tornou uma grande amiga, obrigada pelo carinho, amizade, pelas conversas, conselhos e por nunca me deixar sozinha!*

*Aos técnicos e amigos do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista -*

*UNESP, Câmpus de Botucatu, pela amizade e pelo auxílio em algumas etapas práticas imprescindíveis ao desenvolvimento deste trabalho. Principalmente a Dra. Cristiane Shimabukuro, pelos sequenciamentos e por me auxiliar nos momentos que precisei, muito obrigada!*

*Ao Prof. Dr. Paulino Martínez Portela da Facultad de Veterinária de la Universidad de Santiago de Compostela, Lugo, por ter concedido a oportunidade de poder conhecer seu laboratório e me receber tão bem. Ao prof. Dr. Manuel Vera Rodríguez por estar sempre disposto a ajudar, por sua preocupação no período em que permaneci na Espanha. À Dra. Fernanda Dotti do Prado, pela amizade e por me acolher em sua casa na minha breve permanência em Lugo. À todos que fizeram de Lugo uma experiência incrível e única!*

*Às minhas irmãs de república, Gabi Tibúrcio, Gabrielle, Ariadne e Marina, obrigada por fazer de Bauru a melhor época da minha vida, o 1304 será eterno, assim como vocês!*

*Aos meus amigos de faculdade, Livia, Wesley, Gabi Neubern, Aneli (Japa), Aline, Naty Gallo, Naty Lopes, Naty (Bartira), Gabi Erazo, Stéphanie, Danilo e André vou levar vocês pro resto da vida comigo!*

*Aos meus amigos de Porto Ferreira, Pirassununga, Ribeirão Preto, pois mesmo longe, vocês nunca me abandonaram. Em especial à Carol, Naná, Gabizinha, Prika, Marcela, minhas amigas de infância. Ninguém caminha sozinho e vocês estarão comigo em cada nova etapa.*

*À minha mestra Marina Engler e aos colegas de yoga, por todos os ensinamentos, práticas e por me ajudar a ser mais forte e compreender melhor o meu caminho. Namastê!*

*À minha família, Giovanini, Ramos e Fadel, obrigada por sempre estarem por perto. Aos meus avôs, sei que onde estiverem, hoje devem estar muito felizes por mais essa conquista. Em especial: a minha avó Maria e ao meu avô Ricardo que foram meus segundos pais, sempre me incentivando a seguir em frente com meus estudos. Ao meu tio Renan, por seus conselhos que me ajudaram a enfrentar a pós-graduação, ele bem sabe que não é nada fácil! À minha tia Kuka por ter me acompanhado e me ajudado em uma das coletas mais exaustiva. Eu amo muito cada um de vocês!*

*À minha irmã Leticia, por sempre estar por perto e que junto com meu querido cunhado, João, ter me dado um dos maiores presentes, meu sobrinho Joaquim. É por sermos tão diferentes, que nos completamos, sister! Aos meus irmãos, César e André, que sempre serão meus pequeninos, amo vocês.*

*E, finalmente, aos meus pais, Neure, Rui, Fadel, vou ser eternamente grata ao apoio, incentivo, dedicação e o amor que sempre tiveram por mim. Obrigada por me permitir sempre... A estrada ainda vai ser longa, mas sei que ela brilhará enquanto caminharem comigo!*

*Enfim...*

*...“Quando uma porta se fecha, outra se abre; quando um caminho termina, outro começa. Nada é estático no Universo, tudo se move sem parar e tudo se transforma sempre para melhor. Habitue-se a pensar desta forma: tudo que chega é bom, tudo que parte também. É a dança da vida...” André Luiz.*

*Obrigada à todos!*

## **RESUMO**

Atualmente estamos em uma corrida entre a descrição da biodiversidade da Terra e sua extinção. Estima-se que a maior parte dessa biodiversidade está sendo extinta antes mesmo de ser descrita. Dentre essa grande diversidade, os peixes são os vertebrados de maior sucesso evolutivo, caracterizando uma diversidade impressionante. Os tubarões, por exemplo, caracterizam em predadores do topo de cadeia alimentar, sendo descritas atualmente aproximadamente 500 espécies, e cada vez mais novas descobertas são feitas com relação a novas espécies. Porém as populações de tubarões estão em declínio devido ao consumo desenfreado de suas nadadeiras pelo mercado e comércio asiático. Soma-se a isso a grande dificuldade na identificação morfológica que é associada à prática de remoção da cabeça e de partes do corpo. A descaracterização pode dificultar, ou no caso de algumas espécies, até mesmo impossibilitar sua identificação. Portanto a necessidade de identificar as espécies de forma mais rápida e eficiente levou ao desenvolvimento de marcadores moleculares, que pudessem servir de respaldo para o monitoramento e controle do comércio desses animais. Uma dessas ferramentas é o DNA Barcode, o qual foi utilizado nesse trabalho para a identificação de nadadeiras coletadas no mercado de peixe de algumas cidades como Santos, Ubatuba e Cananéia do estado de São Paulo. O sequenciamento do gene mitocondrial Citocromo Oxidase subunidade I foi realizado. Posteriormente foram analisadas as sequências no site do *System BOLD* para identificação das espécies. Com isso foi possível a identificação de 13 espécies distintas, algumas delas no Anexo II da CITES, na lista vermelha da IUCN e na lista oficial de espécies ameaçadas de extinção do Ministério do Meio Ambiente, observando a grande necessidade de uma fiscalização maior com relação a suas capturas. Também foi feita uma comparação para saber quais espécies eram mais coletadas e que atualmente não são mais, inferindo assim que pode ter havido a sobrepesca de algumas dessas espécies. Por fim, além da caracterização da exploração pesqueira regional, a utilização de técnicas moleculares de identificação pode viabilizar estatísticas mais abrangentes determinando os níveis de exploração por espécie e permitindo a aplicação de planos de manejo e a ordenação da exploração pesqueira.

## **ABSTRACT**

Nowadays we are in a race between the description of the Earth's biodiversity and extinction. It is estimated that most of this biodiversity is being extinguished before being described. Among this great diversity, fishes are vertebrate's greatest evolutionary success, featuring a striking diversity. Sharks, for example, are characterized as top predators of the food chain. There are 500 described species of them and more and more new discoveries are made with respect to new species. However, shark populations are declining due to unbridled consumption of their fins by the market and Asian trade. Moreover, the practice of removing the head and body part adds great difficulty in morphological identification. The mischaracterization can make it difficult or, in the case of some species, even impossible identification. Therefore, the need to identify species faster and more efficiently led to the development of molecular markers that can serve as support for the monitoring and control of trading of these animals. One such tool is the DNA barcode. It was used in this work for fins identification collected at fish markets in some cities such as Santos, Ubatuba and Cananéia from São Paulo State. Firstly, the sequencing of the mitochondrial gene Cytochrome Oxidase subunit I was made. Afterwards the sequences were analyzed in the System BOLD site for species identification. It was possible to identify 13 different species, some of them in Appendix II of CITES, IUCN red list and the official list of endangered species of the Ministry of Environment. Observing the great need for greater oversight regarding their catch. A comparison was also made to identify which species were more collected and are no longer, inferring over-fishing of some of the remaining species. Finally, besides the characterization of regional fisheries exploitation, molecular identification techniques may enable more comprehensive statistics to determine the right exploration levels per species and allowing the implementation of management plans and organization of fisheries exploitation.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.2 INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.2 BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO.....	2
1.2.1 Enfoque na conservação dos elasmobrânquios.....	4
1.3 EXPLORAÇÃO PESQUEIRA.....	8
1.4 TÉCNICAS MOLECULARES NA IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES.....	11
1.4.1 DNA Barcoding.....	11
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>18</b>
2. 1 Objetivo geral.....	18
2.2 Objetivos específicos.....	18
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>19</b>
3.1 COLETA DE DADOS.....	19
3.2 METODOLOGIA.....	20
3.2.1 Extração do DNA.....	20
3.2.2 Amplificação e sequenciamento do gene mitocondrial COI.....	22
3.2.3 Purificação das amostras amplificadas.....	23
3.2.4 Reação de sequenciamento.....	23
3.2.5 Preparação das amostras amplificadas por precipitação em EDTA/acetato de sódio/etanol.....	24
3.2.6 Sequenciamento de DNA.....	25
3.2.7 DNA Barcode na identificação das espécies.....	25
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>27</b>
4.1 Capítulo – Identificação pelo método de DNA Barcode, de tubarões explorados pela pesca artesanal e industrial do Litoral de São Paulo – Brasil.....	27
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>42</b>
<b>6 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>45</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>58</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>60</b>

# *INTRODUÇÃO*

## **1 INTRODUÇÃO**

### **1.1 INTRODUÇÃO GERAL**

A classificação das espécies é um dos feitos mais antigos do intelecto humano (Bock 1973). A aplicação dessa habilidade aos seres vivos remonta à própria origem, sendo encontrada em todas as culturas humanas, civilizadas ou não (Diamond 1966, Hunn 1982). Surgindo vários conceitos para delimitar ou reconhecer espécies, que foram delimitados ao longo da história.

No processo de reconhecimento do conceito de espécies, muitas vezes seus limites parecem estar condicionados a visão de mundo do próprio estudioso, deixando de lado, por vezes, o seu real significado biológico (Brothers 1983, Bezerra e Fernandes 1984, Mayr 1998, Judd *et al.* 2009).

Dois avanços marcaram a história da classificação de espécies, buscando uma unidade conceitual de significado biológico, um baseia-se na difusão das ideias darwinistas, que o conceito de espécies reflita sua evolução (Bock 1973). Outro, busca a necessidade de métodos objetivos para a inferência taxonômica (Holmes 1980). Estes dois aspectos foram contemplados na sistemática filogenética, originalmente proposta por Hennig (1966), que apesar das desvantagens, tem uma capacidade de recuperar a melhor explicação evolutiva (Wiley 1975).

Observando esses aspectos, estava pronto toda a estrutura para a utilização de técnicas moleculares, as quais são amplamente utilizadas nos últimos 30 anos na detecção de unidades biológicas. Sendo uma das principais ferramentas de reconstrução

filogenética, permitindo inferências evolutivas nos mais variados organismos e níveis hierárquicos (Hall 2001, Amorim 2002, Schneider 2003, Avise 1997, Judd *et al.* 2009).

Apesar de 250 anos de estudos taxonômicos, a grande maioria da diversidade biológica continua sem descrição ou sem ser descoberta, em parte devido à um menor número de taxonomistas, e em parte devido à natureza tediosa da pesquisa (Wilson, 2000). Portanto, algumas tentativas para quantificar a extensão da biodiversidade desconhecida têm sido feitas, por exemplo, Mora *et al.* (2011) sugerem que 86% das espécies do planeta e 91% das espécies nos oceanos ainda não foram descobertas.

Esta perturbação ambiental é cada vez mais evidenciada pela perda ou deterioração dos recursos e serviços relacionados com a biodiversidade, tentativas recentes e de longa data tentam destacar e solucionar o problema aos mais altos níveis internacionais, portanto as técnicas moleculares de descrição de espécies são de extrema importância para resolver a questão. Do total de espécies conhecidas, 25% corre sério risco de extinção nos próximos vinte anos (Bisby *et al.* 2010).

Mesmo com toda a evolução molecular e com toda a ação antrópica, a biodiversidade no mundo ainda se faz expressiva, não tendo sido identificado o número total das espécies existentes.

## **1.2 BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO**

De acordo com a Convenção sobre a Diversidade Biológica (CDB), a biodiversidade, por definição, significa “a variabilidade de organismos vivos de todas as origens, compreendendo, dentre outros, os ecossistemas terrestres, marinhos, demais ecossistemas aquáticos e os complexos ecológicos de que fazem parte bem como a

diversidade dentro de espécies, entre espécies e de ecossistemas”, definição incorporada ao ordenamento jurídico pelo Decreto n.º 2.519 de 1998 que promulgou a CDB no Brasil.

Mais especificamente, a biodiversidade refere-se à variedade de vida no planeta Terra, incluindo a variedade genética dentro das populações e espécies, a variedade de espécies da flora, da fauna e de microrganismos, a variedade de funções ecológicas desempenhadas pelos organismos nos ecossistemas e a variedade de comunidades, habitats e ecossistemas formados pelos organismos. Biodiversidade inclui, assim, a totalidade dos recursos vivos, ou biológicos, e dos recursos genéticos, e seus componentes (MMA 2010).

Cientistas do Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (PNUMA), estimam que o número situa-se entre 10 e 100 milhões de espécies distintas no planeta, sendo que das cerca de 1,9 milhões identificadas, menos da metade foi estudada.

O Brasil assume papel de destaque uma vez que possui a maior biodiversidade do mundo, estimada em cerca de 20% do número total de espécies, sendo muitas destas endêmicas (Calixto 2003), abrigando a maior diversidade biológica entre os 17 países considerados megadiversos que reúnem 70% de espécies de animais e vegetais catalogados no mundo, tendo um papel primordial na conservação da biodiversidade. Diante disso, o grande desafio para a comunidade conservacionista é de alcançar uma definição de espécies e de uma unidade dentro de espécies para fins de conservação (Frankham 2010).

Certas espécies desempenham um papel crucial nos ecossistemas, sendo que o desaparecimento destas acabariam causando um efeito cascata na biodiversidade. Cada ecossistema tem uma característica e cada espécie tem um papel a desempenhar,

diante disso o número de espécies que será influenciada pelo desaparecimento de outra e como esses efeitos irão ocorrer, dependem desses fatores. Portanto esse efeito é evidente nos casos em que a espécie desaparecida é um “predador chave”.

Heithaus *et al.* (2008), fizeram uma revisão sobre estudos que mostram que o declínio sem precedentes de predadores de topo de cadeia pode iniciar uma cascata trófica. Portanto a previsão precisa das consequências ecológicas e potenciais declínios futuros é fundamental para a gestão das pescas e para o ecossistema marinho. Por exemplo, uma pesquisa feita na costa leste dos EUA, conduzida de 1970 a 2005, indicou um rápido declínio em 11 espécies abundantes de grandes tubarões e consequentemente aumentos simultâneos de 12 para 14 pequenos elasmobrânquios meso-consumidores (Myers *et al.* 2007). Como sabiam que todos esses tubarões grandes predavam os pequenos, isso sugeriu que havia uma ligação entre essa trajetória contrastante dessas populações (Myers *et al.* 2007).

Entretanto as consequências da remoção dos predadores de topo da cadeia alimentar, pode variar entre as comunidades (Frank *et al.* 2007), devido a isso, cada vez mais estudos estão detectando uma grande escala de efeito cascata (Heithaus *et al.* 2008).

### 1.2.1 *Enfoque na conservação dos elasmobrânquios*

Inicialmente, a classe dos *Chondrichthyes* foi caracterizada como um grupo de peixes primitivos e de pouco sucesso evolutivo, sendo que na verdade, constituem exatamente o oposto, uma linhagem derivada de peixes extremamente adaptada ao seu ambiente, amplamente distribuída e diversificada (Compagno 1973, 2000). Peixes de morfologia muito semelhante à dos tubarões modernos já nadavam nos oceanos

quando os dinossauros caminhavam sobre a Terra há pelo menos 150 milhões de anos (Grogan e Lund 2004).

As informações disponíveis relatam a existência de aproximadamente 1.182 espécies de elasmobrânquios no mundo, compondo uma distribuição que abrange pelo menos dez ordens, 58 famílias e 189 gêneros (Compagno *et al.* 2005). Das espécies conhecidas, cerca de 5% são oceânicas, podendo realizar grandes migrações (Cortez 2000). De acordo com o último levantamento realizado por Ebert e Compagno (2007), o grupo dos tubarões é composto por 8 ordens, 34 famílias e aproximadamente 500 espécies.

Dentre as publicações taxonômicas que abordam a totalidade dos peixes marinhos brasileiros a mais recente é o Catálogo das espécies de peixes marinhos do Brasil, organizado por Menezes *et al.* (2003). Esta obra inclui 81 espécies de cações, 54 de raias e três de quimeras. Dessas, 63 espécies de cações, 38 de raias e duas de quimeras, ocorrem no estado de São Paulo (Menezes 2011). O que corresponde à segunda maior diversidade no mundo (Gadig 2001).

Informações sobre a história de vida e dinâmica populacional estão disponíveis, sobretudo, para as espécies com interesse pesqueiro. Entretanto, a importância ecológica, como o papel dos tubarões e raias em comunidades complexas, só foi ter reconhecimento na década de 90 com Hoening e Gruber (1990), em decorrência das alterações geradas pela pesca intensiva.

Os elasmobrânquios são considerados predadores em sua grande maioria, frequentemente ocupando posições de topo das cadeias tróficas em ambientes pelágicos, demersais, abissais, costeiros, estuarinos ou dulcícolas (Compagno 1991, Camhi *et al.* 1998, Holmgren e Nilsson 1999, Wetherbee e Cortés 2004), a maioria vive

no ambiente marinho, entretanto, muitos utilizam áreas estuarinas como áreas de berçário.

Apresentam diversos hábitos alimentares, variando desde planctívoros até predadores do topo de cadeia alimentar e exibem todas as estratégias reprodutivas conhecidas em vertebrados, desde a postura de ovos até a viviparidade placentária (Snelson *et al.* 2008).

A partir de 2012 o Ministério do Meio Ambiente regulamentou a lei da pesca e comercialização de tubarões e raias no Brasil visando coibir a prática do “*finning*”, onde se retiram as nadadeiras dos animais, sendo as carcaças descartadas no mar. De acordo com a Instrução Normativa Interministerial MPA/MMA N° 14, de 26 de Novembro de 2012, todos os espécimes de tubarões e raias capturados no litoral brasileiro devem ser desembarcados, seja em infraestrutura portuária, terminal pesqueiro nacional público ou particular, ou em qualquer outro local de desembarque utilizado pela frota nacional e estrangeira arrendada, com todas as suas barbatanas naturalmente aderidas ao corpo do animal.

Em escala mundial, o manejo dos estoques de elasmobrânquios é complicado pela falta de informações básicas sobre a dinâmica de suas populações. Em todo o globo, devido à atividade pesqueira, a cada dia, novas espécies de elasmobrânquios são incluídas na lista vermelha das espécies ameaçadas da *International Union for Conservation of Nature and Natural Resources* - IUCN (Camhi *et al.* 1998).

As espécies de tubarões mais pescadas são *Prionace glauca* (Linnaeus, 1758), *Isurus oxyrinchus* (Rafinesque, 1810), *Carcharhinus falciformes* (Müller e Henle, 1839), *Carcharhinus plumbeus* (Nardo, 1827) e *Galeocerdo cuvier* (Péron e Lesueur, 1822). Estes tubarões são muito explorados em todo mundo, muitas vezes sem identificação e sem

uma quantificação a respeito das espécies, o que dificulta o estabelecimento de um equilíbrio entre a pesca e a recuperação dos estoques.

Estudos demonstraram que devido à idade de maturação precoce, o tubarão azul (*Prionace glauca*) tem alta capacidade de se recompor, em consequência do aumento da intensidade da pesca (Silva 2001). Porém, por ser tratar de uma espécie que era comumente descartada pela prática do *finning* e mesmo hoje ela sendo uma das espécies mais capturadas, as amostras obtidas nos desembarques podem não representar o estoque real, sugerindo que as mortalidades estimadas talvez não representem os valores corretos.

Além da ausência de informações sobre a pesca, os elasmobrânquios estão sob constante pressão ambiental, uma vez que a perda ou destruição de habitats essenciais é uma constante na costa. Somente no Rio de Janeiro, cinco espécies foram extintas, com destaque aos tubarões martelo de pequeno porte e com hábitos costeiros pertencentes ao gênero *Sphyrna* e do tubarão-lixia (*Ginglymostoma cirratum*) outrora abundantes em boa parte da costa central (SBEEL 2005). Várias espécies já demonstram indícios de diminuições populacionais drásticas em algumas regiões do planeta e, em um contexto global, várias espécies de tubarões e raias têm sido progressivamente incluídas nas listas de risco iminente de extinção pela IUCN (Compagno 2001, Baum *et al.* 2003, Camhi *et al.* 1998).

A Convenção sobre o Comércio Internacional de espécies da Flora e da Fauna Selvagens em Perigo de Extinção (CITES), a qual o Brasil é um dos países signatários, lista várias espécies de tubarões em seus anexos, demonstrando que muitas delas correm risco de extinção e mesmo as que não necessariamente estão, um dia podem entrar se não houver a correta manutenção de seus estoques, pelo negligenciamento da pesca

predatória. Ao todo 8 espécies de tubarões (*Cetorhinus maximus*, *Rhcodon typus*, *Carcharodon carcharias*, listadas em 2003) (*Carcharhinus longimanus*, *Lamna nasus*, *Sphyrna lewini*, *Sphyrna zygaena*, *Sphyrna mokarran*, listadas em 2013) estão incluídas no Anexo II da CITES (CITES 2013).

Nesse anexo são incluídas espécies que não necessariamente estão em risco de extinção, mas que um dia podem vir a correr esse risco, portanto necessitam de um comércio rigorosamente controlado (Decreto Nº 3.607, de 21 de setembro de 2000, Seção 2, Art. 8º).

### 1.3 EXPLORAÇÃO PESQUEIRA

Atualmente a indústria pesqueira, com o surgimento dos barcos a vapor, pode atuar cada vez mais longe do continente e com equipamentos mais eficientes, dando início à exploração dos recursos pesqueiros em larga escala. Sendo essa atividade uma das mais antigas exercidas pelo homem, visando obter recursos alimentares a partir do meio aquático, voltada exclusivamente para fins alimentares. A sustentabilidade da pesca marítima não tem apenas importância política e social, mas também é de importância econômica e ecológica, devendo assim, manter a prosperidade desse recurso a longo prazo (FAO 2010).

A pesca apresenta ser a principal ameaça a população de tubarões e raias, frente a outras ameaças, como degradação do ambiente, poluição e mudanças climáticas (Simpfendorfer *et al.* 2011). Mas infelizmente, muitas populações não são frequentemente reportadas nas estatísticas de pesca, apenas 15% são identificadas e reportadas em nível de espécie, de acordo com a FAO (Dulvy *et al.* 2008).

Alguns anos atrás, mesmo havendo a comercialização da carne e subprodutos, a captura de tubarões podia ser considerada totalmente incidental. Nas últimas décadas, entretanto, diversas espécies tornaram-se alvo da pesca comercial, em adição às capturas de peixes ósseos, cujos estoques estão sobreexplotados (Lessa *et al.* 2005). O grande interesse dos povos asiáticos pelas nadadeiras e os altos preços praticados no comércio, talvez sejam, o maior incentivo a captura dessas populações, em todos os mares.

O desenvolvimento da pesca de atuns e afins com espinhel de superfície no Brasil, desde a sua introdução em 1956, sofreu grandes oscilações no que diz respeito ao número de embarcações componentes da frota, aos avanços tecnológicos do petrecho de pesca e ao direcionamento das capturas. De acordo com Meneses de Lima *et al.* (2000), o desenvolvimento dessa modalidade de pesca no Brasil pode ser dividido em quatro períodos distintos. Durante a primeira fase (1972-1976), os atuns (*Thunnus* spp.) foram as espécies-alvo. Neste período os tubarões não tinham valor comercial e boa parte da captura deste grupo era descartada.

A partir de meados da década de 1980 houve uma ampliação do mercado interno para a carne de tubarão, a partir de um esforço objetivo de estímulo ao consumo desse tipo de carne, já que esse grupo de espécies era muito capturado devido ao elevado preço das nadadeiras (barbatanas) destinadas à exportação. Assim, houve um aumento gradual da captura de tubarões, sendo o tubarão-azul, *Prionace glauca* o principal contribuinte para tal aumento, pois os pescadores deixaram de evitá-lo ou de descartá-lo (Amorim e Arfelli 1992, Arfelli 1996).

Em função do seu comportamento altamente migratório, os grandes peixes pelágicos, tal como o tubarão-azul, são capturados por vários países e diferentes artes

de pesca, o que faz com que a avaliação e o manejo de seus estoques só sejam possíveis através de esforços conjuntos de várias nações.

Considerando que cada espécie responde de forma independente às pressões exercidas pelo ambiente e, neste caso, principalmente pela ação do homem, é fundamental que se conheça de forma mais refinada a composição das capturas de tubarões por espécie e abundância relativa, de forma que se estabeleçam planos de recuperação dessas populações e o conseqüente ordenamento dessas atividades (Lessa *et al.* 1999).

Atualmente, a pesca predatória vem se constituindo num fator preocupante para o equilíbrio das comunidades desses organismos marinhos ocasionando assim um enorme declínio de estoques e populações de inúmeras espécies que vem sendo incluídas constantemente nas Listas Vermelhas de Espécies Ameaçadas da IUCN (*International Union for Conservation of Nature*).

Dados estatísticos sobre a exploração pesqueira da FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) registraram no ano de 2011 a captura mundial de 750.000 toneladas de elasmobrânquios no mundo, sendo dois terços desse valor correspondente a tubarões (FAO 2011).

De acordo com a IUCN, 10 espécies de tubarões constam na lista vermelha como “criticamente em perigo” (*critically endangered*), 15 como “em perigo” (*endangered*), 47 como “vulnerável” (*vulnerable*), 62 “quase ameaçadas” (*near threatened*) e 136 “pouco preocupante” (*least concern*), o resto das espécies globais aparecem como “dados insuficientes” (*data deficiente*). O Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) avaliou nos últimos três a quatro anos no Brasil, que cerca de 40% das espécies brasileiras de elasmobrânquios estão ameaçadas, sendo 18%

criticamente ameaçadas, 5% estão em perigo, 16%, vulneráveis, 34% foram classificados como dados insuficientes e 1% já é considerado regionalmente extinto (MMA 2013). O que demonstra que a maior parte das populações de tubarões não possuem dados suficientes para um plano de manejo e conservação adequado para manutenção do equilíbrio dessas populações, mesmo muitas das espécies sendo coletadas como fauna acompanhante. No caso de tubarões e raias, a avaliação de seus estoques fica prejudicada pela limitação das estatísticas pesqueiras (Rosa e Lima 2008).

Mesmo com a crescente conscientização sobre a vulnerabilidade da maioria das espécies de tubarões e raias à exploração pesqueira (Castro *et al.* 1987, Camhi *et al.* 1998), trabalhos de controle e manejo da exploração das espécies deste grupo são raros, tendo como maior dificuldade a falta de informações básicas sobre captura, desembarque e sua comercialização.

#### **1.4 TÉCNICAS MOLECULARES NA IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES**

##### **1.4.1 DNA Barcoding**

O sistema moderno de taxonomia molecular foi apresentado por Tautz *et al.* (2003), baseado no uso do DNA como ferramenta para a identificação taxonômica nos diversos grupos de organismos, sendo hoje aceita mundialmente. Neste contexto, as análises moleculares por DNA, vêm ganhando destaque entre as metodologias utilizadas, devido à necessidade de pequenas quantidades amostrais (fragmentos de tecido animal) e por permitirem a identificação do produto em circunstâncias diversas, como: produtos congelados, salgados ou processados por aquecimento ou cozimento.

A descoberta da utilidade do DNA mitocondrial (mtDNA) como marcador molecular no final da década de 70 (Avise *et al.* 1979, Brown *et al.* 1979), produziu um

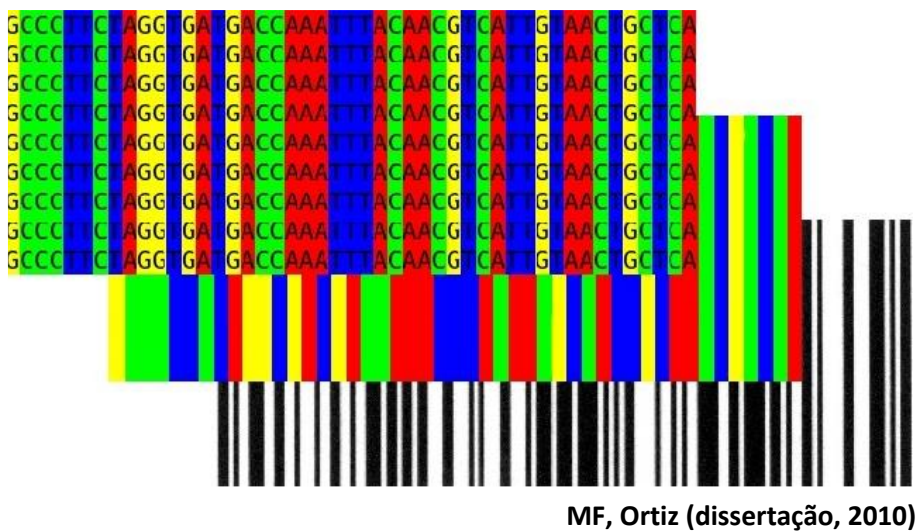
grande impacto nos estudos moleculares de genética de populações e evolução. Muitos estudos, hoje, são possíveis devido a utilização do DNA mitocondrial, como: estudos de biogeografia histórica (Bermingham e Beheregaray *et al.* 2002), de caracterizações de estrutura populacional (Graves 1998, Pestano e Brown 1999), dentre outros.

Além do que, a uma crescente utilização no campo da sistemática molecular, para inferência de relações filogenéticas (Alves-Gomes *et al.* 1995, Saitoh *et al.* 2003, Thacker 2003) e em estudos de conservação (Dudgeon *et al.* 2012, Bornatowski *et al.* 2014, Ferrette *et al.* 2015) e estudos de substituição de produtos (Barbutto *et al.* 2010, Galimberti *et al.* 2013).

Na tentativa de padronizar o marcador utilizado na identificação molecular de espécies animais, em 2003, pesquisadores da Universidade de Guelph (Ontário, Canadá) propuseram a criação de um sistema diagnóstico universal, baseado em um fragmento de aproximadamente 650 pares de bases, a partir da base 58 da extremidade 5' do gene Citocromo Oxidase subunidade I (COI). A ideia em se utilizar um gene mitocondrial, baseou-se nas características apresentadas pelo genoma mitocondrial tais como: ser amplamente distribuído entre os animais, alto número de cópias por célula, apresentar taxa de mutação diferente entre espécies. De fato, a evolução deste gene é suficientemente rápida para permitir a discriminação não apenas de espécies intimamente associadas, mas também de grupos filogeográficos dentro de uma única espécie (Cox e Hebert 2001, Wares e Cunningham 2001). Sendo uma das mais recentes e promissoras técnicas de aplicações na detecção de unidades biológicas.

Segundo Hebert *et al.* (2003) a ideia é a mesma do código de barras universal de produtos do mercado varejista, 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. Isso permite que cada táxon seja identificado por apresentar uma sequência única de DNA Barcode (Hebert *et al.* 2003).



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

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).

O DNA Barcode fornece uma oportunidade para identificar, inventariar e estudar espécimes afim de compreender a diversidade de espécies dentro de um ecossistema, e avaliar a variabilidade genética dentro das espécies (Krishnamurthy e Francis 2012). Mais especificamente, códigos de barras de DNA fornecem uma útil informação para as diferentes partes interessadas na conservação: pesquisadores puderam identificar espécies mais rapidamente; taxonomistas poderia determinar grupos de espécies que requerem estudos mais detalhados; e os “formuladores de políticas” podem utilizar dados de código de barras para determinar as escalas adequadas para conservação (Francis *et al.* 2010).

O NCBI, ou Centro Nacional para Informação Biotecnológica dos EUA, é considerado o banco de dados central sobre informações genômicas. O *GenBank* é o principal banco de dados do NCBI e armazena todas sequências disponíveis publicamente de DNA (de sequências pequenas a genomas inteiros), RNA e proteínas. Várias ferramentas desenvolvidas pela bioinformática permitem o acesso e análise dos dados no *GenBank*.

A partir daí, foi criado um banco de dados universal do DNA Barcode, o BOLD (*Barcode of Life Database*), que 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). O critério de qualidade máxima proposto pelos autores do projeto, estabelece que as sequencias diretas e reversas tenham uma

sobreposição de mínima de 500pb e mais que três indivíduos por espécie sequenciados (Frézal e Leblois 2008). E de acordo com um levantamento feito por esses mesmos autores, de 363.584 sequências (50.039 espécies), 136.338 satisfazem esse critério.

O BOLD estima a distância e a similaridade genética entre pares de sequências a fim de identificar as sequências iguais, utilizando o método de evolução de Kimura-2-parâmetros e o algoritmo de Neighbor-Joining. Porém, tais métodos são dependentes da amostragem e da variação intra e interespecífica dos grupos, o que pode levar a atribuição de falsos positivos (Frézal e Leblois 2008).

Portanto métodos alternativos foram propostos para analisar esses dados. De acordo com Elias *et al.* (2007), deveriam ser analisados através de métodos filogenéticos clássicos, baseados em algoritmos de distância ou máxima verossimilhança, assumindo modelos mutacionais diferentes. Já para Abdo e Golding (2007), métodos genealógicos baseados na teoria da coalescência utilizando modelos genéticos e algoritmos de máxima verossimilhança, deveriam ser adotados. Rach *et al.* (2008), aborda que métodos estatísticos baseados em algoritmos sem qualquer suposição ou modelo biológico, seria a melhor forma.

Isso tornou-se cada vez mais popular como uma forma eficiente de estudar e classificar espécies e de priorizar os esforços de conservação (Krishnamurthy e Francis 2012). É neste contexto que o DNA Barcode é recomendado como um método barato, rápido e objetivo (Yao *et al.* 2009, Dentinger *et al.* 2010, Li e Dao 2011) para ajudar os esforços de conservação, embora tenha incentivado muito debate a respeito do seu potencial (Moritz e Cícero 2004, Smith *et al.* 2005, Hebert e Gregory 2005, Rubinoff *et al.* 2006, Pilgrim *et al.* 2011).

O uso do DNA Barcode tem apresentado alta taxa de sucesso na identificação rápida de espécies de diversos grupos de artrópodes, aves, peixes e anfíbios (Hebert *et al.* 2003, 2004, Kerr *et al.* 2007, Ward *et al.* 2005, Smith *et al.* 2008). A taxa de evolução molecular do gene COI permite distinguir espécies próximas e também grupos filogeográficos dentro de uma mesma espécie (Hebert *et al.* 2004, Hogg e Hebert 2004, Ward *et al.* 2005).

Para o setor comercial, a aplicação do DNA Barcode e taxonomia molecular para autenticação de alimentos é destinada principalmente a proteger os consumidores contra a fraude (Lockley e Bardsley 2000, Gil 2007). Nos últimos anos, tem sido utilizado com êxito para identificar amostras que são comercializadas ilegalmente, como tubarões e outras espécies ameaçadas de extinção (Carvalho *et al.* 2013).

*DNA Barcoding* determinou com sucesso a identidade de 582 nadadeiras de tubarões em mercados da Indonésia, identificando 40 espécies diferentes, a maioria delas vulneráveis ou ameaçadas de extinção, dentre elas as mais coletadas foram tubarões azuis, martelo e lombo-preto (Sembiring *et al.* 2015), como também foi utilizado por Lamendin *et al.* (2015), para fazer uma precisa identificação de frutos do mar na Tasmânia, Austrália. Já Fields *et al.* (2015), fizeram um ensaio de mini-barcode validado com base em sequências parciais do gene Citocromo Oxidase subunidade I, que podem identificar com segurança as barbatanas de sete das oito espécies de tubarões listadas no anexo da CITES.

A construção de bancos de dados para armazenamento de informações de sequências de DNA e genomas inteiros, proteínas e suas estruturas tridimensionais, bem como vários outros produtos da era genômica, tem sido um grande desafio que tem

extrema importância para o conhecimento das espécies, que implicará um dia na sua possível conservação.

*OBJETIVOS*

## **2 OBJETIVOS**

### *2.1 Objetivo geral*

Considerando-se as características biológicas, evolutivas e taxonômicas dos elasmobrânquios, a crescente exploração pesqueira e os problemas relacionados às estatísticas de captura e de controle da pesca, este estudo buscou a identificação genética das espécies de tubarões coletadas na costa do Estado de São Paulo e principalmente a constatação do uso de um método viável de identificação genética para diversas espécies de tubarões, o DNA Barcode, fornecendo uma forma de avaliação e de quantificação da captura e comercialização de elasmobrânquios na costa do Estado de São Paulo.

### *2.2 Objetivos específicos*

- 1)** Identificação dos tubarões capturados pelas frotas pesqueiras do litoral paulista, caracterizando a frequência relativa por espécies;
- 2)** Identificação em nível de espécie através da metodologia do DNA Barcode;
- 3)** Gerar subsídios para programas de manejo adequado e exploração sustentável dos estoques pesqueiros dessas espécies.

*MATERIAIS E*

*MÉTODOS*

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 COLETA DE DADOS**

Foram realizadas coletas em períodos distintos durante o ano de 2014, de tecidos (nadadeiras ou pequenos pedaços de músculo) de tubarões. Uma coleta ocorreu no período de fevereiro em Ubatuba, em um ponto de desembarque, outra no período de novembro em Santos, na rua do comércio de peixes (Figura 2). Outras coletas ocorreram no período de janeiro a junho de 2015 na rua dos peixes de Santos, uma delas sendo feita no Terminal Pesqueiro Público de Santos (TPPS), mas conhecido como “Entrepasto” (Figura 3), de acordo com o capitão do barco, a captura dos exemplares ocorreu na costa de Santa Catarina, mas o desembarque ocorreu em Santos. Os exemplares foram desembarcados sem cabeça e sem vísceras, apenas com as nadadeiras parcialmente presas ao corpo e separadas para a exportação, assim como parte da carne.

Após coletados, os tecidos foram conservados em álcool 100% e armazenados no Laboratório de Genética de Peixes (LaGenPe) de Bauru-SP. A partir dessas amostras, junto as que já integravam a coleção do laboratório referentes aos anos de 2008 e 2009, coletadas em pontos de desembarques locais nas cidades de Santos, Ubatuba e Cananéia, o DNA de cada indivíduo foi extraído utilizando o Kit comercial “*Wizard Genomic DNA Purification Kit – Promega*”, a partir de pequenos fragmentos de nadadeiras. Subsequentemente foi realizado o sequenciamento do gene mitocondrial Citocromo Oxidase subunidade I (COI), para posteriormente serem comparadas no site online *BOLD System*.



**FIGURA 2.** Coleta na rua do peixe, em Santos (novembro de 2014).



**FIGURA 3.** Coleta no Terminal Pesqueiro Público de Santos.

## 3.2 METODOLOGIA

### 3.2.1 Extração do DNA

A extração de DNA foi feita a partir de fragmentos de nadadeira coletados dos indivíduos amostrados, através do kit comercial “*Wizard Genomic DNA Purification kit-Promega*”.

#### Protocolo de extração de DNA:

- 1) Uma pequena quantidade de tecido foi colocada em tubo de microcentrífuga de 1,5  $\mu$ l, em seguida foram adicionados 300  $\mu$ l de *Nuclei Lysis Solution*;

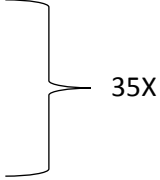
- 2) Adicionados 4,0 µl de *Proteinase K*, sendo as amostras incubadas de 2 horas a 3 horas à 60°C.
- 3) Após esse período foram adicionados 2,5 µl de RNase, sendo incubado no banho-maria a 37°C por 30 minutos.
- 4) Posteriormente foram adicionados 200 µl de *Protein Precipitation Solution* e levados ao gelo por 5 minutos no freezer -80°C.
- 5) Seguiu-se uma etapa de centrifugação a 13.000 rpm por 4 minutos, retirando posteriormente o sobrenadante.
- 6) Transferindo-o para outro tubo com 600 µl de isopropanol a temperatura ambiente.
- 7) Uma nova centrifugação de 4 minutos a 13.000 rpm foi realizada, descartando novamente o sobrenadante após a centrifugação.
- 8) Foram adicionados 600 µl de etanol 70%.
- 9) Os tubos foram centrifugados por 4 minutos a 13.000 rpm e o sobrenadante foi descartado, tomando cuidado para que o pallet do fundo não se desprendesse do fundo do tubo.
- 10) O material foi secado em estufa a 37°C, por um período de 1 hora e após isso foram adicionados 30 µl da solução de DNA *Rehydration Solution*, e colocado no banho-maria à 60°C.

A integridade e a quantidade das amostras de DNA foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose 1% corado com Nancy-520 DNA (2,5µL/ ml), e visualizadas em transiluminador, sob luz ultravioleta. Para quantificação do DNA foram utilizadas comparações diretas com um marcador padrão de peso molecular e

concentrações conhecidas (*Low DNA Mass Ladder* - Invitrogen). As amostras de DNA obtidas encontram-se mantidas no Laboratório de Genética de Peixes do Departamento de Ciências Biológicas de Bauru - UNESP, formando um banco de tecidos.

### 3.2.2 Amplificação e sequenciamento do gene mitocondrial COI

Após a extração de DNA, foi realizada a amplificação do gene COI utilizando a seguinte concentração de 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* indicados na tabela I, 0.5 U de *Taq Polimerase* (Invitrogen) e 10 a 30 ng/μ de DNA. A reação de PCR (Polymerase Chain Reaction) inicialmente seguiu o seguinte programa:

- 1) 95°C por 5 minutos (desnaturação inicial)
  - 2) 95°C por 30 segundos (desnaturação)
  - 3) 50 a 60°C por 30 segundos (anelamento dos *primers*)
  - 4) 72°C por 45 segundos (extensão da cadeia nucleotídica)
  - 5) 72°C por 5 minutos (extensão final)
- 

Foram feitos testes utilizando diferentes combinações dos *primers* FishF1, FishR1, FishF2 e FishR2 em diferentes temperaturas de anelamento (entre 50°C a 60°C), a fim de verificar o melhor resultado, verificando uma melhor resolução a 57°C. O outro conjunto de *primers*, L6252-Asn e H7271-COXI, foi utilizado a uma temperatura de anelamento de 55°C. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 1,5% corado com Nancy-520 DNA (2,5μL/ ml), e visualizadas em transluminador, sob luz ultravioleta e fotografadas com a câmera OLYMPUS, C-5060.

**Tabela 1.** Sequências dos *primers* utilizados para a obtenção das sequências barcode.

Gene	Primer	Sequência (5' -3')	Referência
COI	FishF1	ACGCCTGTTTATCAAAAACAT	Ward <i>et al.</i> (2005)
	FishR1	CCGGTCTGAACTCAGATCACGT	Ward <i>et al.</i> (2005)
	FishF2	TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC	Ward <i>et al.</i> (2005)
	FishR2	ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA	Ward <i>et al.</i> (2005)
COI	L6252-Asn	AAGGCGGGGAAAGCCCCGGCAG	Melo <i>et al.</i> (2011)
	H7271-COXI	TCCTATGTAGCCGAATGGTTCTTTT	Melo <i>et al.</i> (2011)

### 3.2.3 Purificação das amostras amplificadas

Posteriormente, os produtos de PCR foram purificados através da enzima *Exo-SAP IT*<sup>®</sup> (*USB Corporation*). Em um microtubo para PCR (0,2 ml) foram colocados 5 µL do produto amplificados juntamente com 2,0 µL da solução de purificação (0,13 µL de ExoSap + 1, 87 µL de água ultrapura). As amostras foram colocadas em termociclador por 1 hora a 37°C seguida de 15 minutos à 80°C.

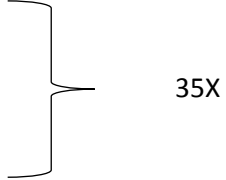
### 3.2.4 Reação de sequenciamento

A reação de sequenciamento foi realizada com o Kit “*Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction*” (*Applied Biosystems*). A reação consistiu de um volume final de 7 µL:

- 1) 1,0 µL do produto amplificado (concentração de aproximadamente 40ng);
- 2) 0,35 µL de primer (*Forward* ou *Reverse*, 10 uM);
- 3) 0,7 µL de BigDye;
- 4) 1,05 µL de Tampão 5X para sequenciamento;

5) 3,9  $\mu$ L de água ultrapura.

A reação seguiu-se em termociclador sob o seguinte perfil:

- 1) 96°C por 2 minutos (desnaturação inicial)
  - 2) 96°C por 30 segundos (desnaturação)
  - 3) 50°C por 15 segundos (anelamento dos *primers*)
  - 4) 60°C por 4 minutos (extensão da cadeia nucleotídica)
  - 5) 12°C até a retirada do material do aparelho (extensão final)
- 
- A diagram consisting of a large right-facing curly bracket that groups the three steps listed above it (steps 2, 3, and 4). To the right of the middle of the bracket, the text '35X' is written, indicating that the grouped steps are repeated 35 times.

Os *primers* utilizados na reação de sequenciamento foram os mesmos utilizados na reação de PCR para amplificação dos produtos (tabela I). Ambas as direções (5' e 3') foram sequenciadas, conforme exigência para a validação da sequência barcode junto ao BOLD.

### 3.2.5 Preparação das amostras amplificadas por precipitação em EDTA/acetato de sódio/etanol:

Após o término da reação de sequenciamento, seguiu-se uma etapa de limpeza das amostras para eliminação de excessos de reagentes utilizados na reação de sequenciamento, seguindo as etapas: adicionar 0,7  $\mu$ L de EDTA (125mM) e depois adicionar 0,7  $\mu$ L de acetato de sódio (3M), homogeneizar e centrifugar brevemente; então adicionar 17,5  $\mu$ L de etanol 100% e incubar por 15 minutos a temperatura ambiente; centrifugar por 15 minutos a 13.000 rpm à 25°C, descartar o etanol e secar em papel toalha; adicionar 24,5  $\mu$ L de etanol 70% gelado e centrifugar por 10 minutos a 13.000 rpm à 20°C; descartar o etanol e secar em papel toalha e colocar no

termociclador por 8 minutos a 96°C com a tampa do termociclador aberta (para a completa evaporação do etanol); guardar os tubos à temperatura ambiente envolto em papel alumínio, até o momento do sequenciamento.

### 3.2.6 Sequenciamento do DNA

As amostras foram analisadas em sequenciador de DNA automático, modelo ABI 3130-Genetic Analyzer (*Applied Biosystems*), presente no Laboratório de Biologia e Genética de peixes, de Botucatu- SP. Para cada amostra foi adicionado 15 µL de formamida Hi-Di (*Applied Biosystems*), seguindo de uma etapa de desnaturação das amostras a 96°C por dois minutos e resfriamento rápido em gelo por mais dois minutos. Logo em seguida as amostras foram colocadas no aparelho para a realização da corrida de leitura da sequência.

### 3.2.7 DNA Barcode na identificação das espécies

Posteriormente as sequências *forward* e *reverse* foram alinhadas no programa *Geneious 4.8.5*, resultando nas sequências *consensus*, conferindo mais confiabilidade ao sequenciamento. As sequências foram inseridas na base de dados do site *BOLD Species Level Barcode* ([www.boldsystems.org](http://www.boldsystems.org)) e comparadas com as 100 sequências mais similares já depositadas na plataforma, obtendo a identificação em nível de espécie. Na tentativa de padronizar a identificação das espécies e torná-la universal, foi criado um banco gênico do DNA Barcode (Hebert *et al.* 2003), o sistema online *BOLD System*, que estima a distância e a similaridade genética entre pares de sequências para realizar a identificação das espécies. Utilizando para isso o modelo de distância genética Kimura-2-parâmetros (K2P, KIMURA 1980) e em seguida uma árvore de *Neighbor Joining*

(Saitou e Nei 1987), a qual é construída a partir desse conjunto de 100 sequências, finalmente a espécie é atribuída àquela da sequência mais similar a ela (Frézal e Leblois 2008).

*RESULTADOS E*

*DISCUSSÃO*

## **4 RESULTADOS**

Os resultados e a discussão dos dados obtidos no presente estudo serão apresentados na forma de artigo científico. Consistindo na apresentação dos resultados obtidos com a identificação genética das populações de tubarões, através do método de DNA Barcode.

**4.1 Capítulo – Identificação de tubarões explorados pela pesca artesanal e industrial do Litoral de São Paulo – Brasil: uma contribuição para gestão pesqueira.**

## **Capítulo**

### **Identificação de tubarões explorados pela pesca artesanal e industrial do Litoral de São Paulo – Brasil: uma contribuição para gestão pesqueira.**

#### **RESUMO**

Recentes evidências demonstram a fragilidade das populações de tubarões, que estão cada vez mais sendo dizimadas pela pesca predatória. O presente projeto teve como objetivo a identificação de exemplares da pesca de tubarões nos principais pontos de desembarque pesqueiro do litoral do estado de São Paulo, verificando a fidedignidade dos dados de estatística pesqueira. Foram realizadas análises moleculares através da técnica de DNA Barcode por sequenciamento do gene mitocondrial Citocromo Oxidase subunidade I (COI). Nesse trabalho foi realizada uma análise de nadadeiras coletadas em mercados de peixes e pontos de desembarque nos municípios de Santos, Cananéia e Ubatuba, litoral de São Paulo entre os anos de 2008/2009 e 2014/2015, verificando a ocorrência de 13 espécies distintas, algumas delas no Anexo II da CITES, na lista vermelha da IUCN e principalmente na lista oficial de espécies ameaçadas de extinção do Ministério do Meio Ambiente. O que comprova a grande necessidade da utilização de técnicas moleculares para fiscalização da captura dessas espécies. Também foi feita uma comparação para saber quais espécies eram mais abundantes e que agora não são mais coletadas, inferindo assim que pode ter havido a sobrepesca de algumas dessas espécies. Demonstrando que a dificuldade na identificação morfológica, tem resultado em uma escassez global de informações sobre captura e comercialização, tornando quase impossível a avaliação de seus efeitos nessas populações. Portanto é indispensável o monitoramento e controle da pesca, possibilitando estatísticas mais abrangentes para determinar os níveis de exploração e conservação dessas espécies de extrema importância para o ecossistema marinho.

## INTRODUÇÃO

Atualmente, a pesca predatória tem demonstrado ser um fator preocupante para o equilíbrio das comunidades de organismos marinhos ocasionando um enorme declínio de estoques e populações de inúmeras espécies que vem sendo incluídas constantemente e, de forma crescente, nas Listas Vermelhas de Espécies Ameaçadas - IUCN, podendo levar essas espécies a extinção. Em 2011 o Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) fez uma avaliação preliminar dos riscos de extinção de todas as 169 espécies de elasmobrânquios (tubarões e arraias) registradas no Brasil.

Os tubarões ou “cações”, como são também chamados popularmente, distribuem-se em todos os mares e oceanos, em águas tropicais, subtropicais, temperadas e frias, podendo habitar regiões costeiras e oceânicas, associadas a ambientes pelágicos, demersais, recifais, estuarinos e, eventualmente, em água doce (Compagno 1990, Gruber 1990). Apesar do seu sucesso adaptativo, com uma história evolutiva de mais de 400 milhões de anos, os tubarões são altamente vulneráveis à sobre-exploração infligida pela pesca, o que decorre de sua condição de vida K-estrategista, caracterizada por crescimento lento, maturação sexual tardia, baixa fecundidade e alta longevidade (Castro *et al.* 1999).

O pequeno número de espécies conhecido também reflete a baixa prioridade que têm os elasmobrânquios para os órgãos financiadores de pesquisa no Brasil, em razão de não se constituírem, de modo geral, alvo das pescarias. O número de espécies de elasmobrânquios conhecido, evidencia que ainda estão sendo coletadas informações

sobre o grupo e que a diversidade total de espécies no país ainda pode estar longe de ser conhecida, se mantidas as condições atuais das pesquisas (SBEEEL 2005).

Sendo assim, o crescente aumento da pesca de tubarões em todo o mundo e seu baixo potencial de recuperação tem preocupações acrescidas com a vulnerabilidade das populações de tubarões à sobrepesca (Mendonça *et al.* 2012). A interpretação e a possível mitigação da redução dessas populações requerem tanto conhecimento demográfico como conhecimento genético (Mendonça *et al.* 2011).

Em 2013, no 16º encontro da Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies da Fauna e da Flora Silvestres Ameaçadas de Extinção (CITES), foi aprovada o maior controle do comércio do tubarão galha-branca, tubarão-sardo, três espécies de tubarão-martelo (*Sphyrna mokarran*, *Sphyrna lewini*, *Sphyrna zygaena*), além de duas espécies de raias manta. Nesta convenção as sete espécies foram incluídas no Anexo II das CITES, podendo elas serem comercializadas internacionalmente mediante concessão de licença ou emissão de certificado.

No entanto, alguns estoques ainda poderão ser ameaçados em futuro muito próximo devido à elevada captura da espécie como fauna acompanhante associada a pescarias oceânicas (Camhi *et al.* 1998). Como é o caso do tubarão-azul que ocorre em toda a área de exploração brasileira e é capturado principalmente por embarcações que operam com espinhel de superfície para a pesca de atuns e espadarte e acaba constituindo grande parte da fauna acompanhante capturada por essa frota.

Ainda com todos esses problemas apresentados, em escala mundial, o manejo dos estoques de elasmobrânquios é insuficiente pela falta de informações básicas sobre a dinâmica de suas populações. Esses fatores têm contribuído para o desenvolvimento de vários estudos, a fim de fornecer uma gestão mais adequada da pesca do tubarão em

muitas partes do mundo, onde já atingiu níveis insustentáveis, causando a extinção de várias espécies (Camhi 1999).

Por conseguinte, levando em consideração as características biológicas, evolutivas e taxonômicas dos tubarões, a crescente exploração pesqueira e os problemas relacionados às estatísticas de captura e de controle da pesca, o presente trabalho objetivou a identificação genética das espécies de tubarões e principalmente a constatação de que o método de DNA Barcode se mostrou eficaz na identificação genética para diversas espécies de tubarões, fornecendo uma forma de avaliação e de quantificação da captura e comercialização de elasmobrânquios na costa do Estado de São Paulo.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### *AMOSTRAGEM*

As análises foram realizadas comparando as amostras coletadas em 2014 e 2015, em Santos e Ubatuba, com um N amostral de 647, junto as que já integravam a coleção do laboratório, coletadas nos anos de 2008 e 2009, em Cananéia, Santos e Ubatuba, com o N amostral de 652, totalizando 1299 amostras no banco de tecido do laboratório.

### *METODOLOGIA*

A extração de DNA foi feita a partir de fragmentos de nadadeira coletados dos indivíduos amostrados, através do kit comercial “*Wizard Genomic DNA Purification kit-Promega*”. A integridade e a quantidade das amostras de DNA foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose 1% e visualizadas em transiluminador, sob luz

ultravioleta. Para quantificação do DNA foram utilizadas comparações diretas com um marcador padrão de peso molecular e concentrações conhecidas (*Low DNA Mass Ladder* - Invitrogen). As amostras de DNA obtidas encontram-se mantidas no Laboratório de Genética de Peixes do Departamento de Ciências Biológicas de Bauru – UNESP.

Após a extração de DNA, foi realizada a amplificação do gene mitocondrial COI utilizando os seguintes *primers*, descritos na tabela 1.

**Tabela 1.** *Primers* utilizados para amplificação e sequenciamento.

Gene	Sequência dos <i>primers</i>	Descritos por	Condições do PCR
COI Fish1 F	ACGCCTGTTTATCAAAAACAT	Ward <i>et al.</i> 2005	95°C/5min; 95°C/30s; 57°C/45s;
COI Fish2 R	ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA	Ward <i>et al.</i> 2005	72°C/45s (35x); 72°C/5min
COI L6252-Asr	AAGGCGGGGAAAGCCCCGGCAG	Melo <i>et al.</i> 2011	95°C/5min; 95°C/30s; 55°C/45s;
H7271-COXI	TCCTATGTAGCCGAATGGTTCTTTT	Melo <i>et al.</i> 2011	72°C/45s (35x); 72°C/5min

Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 1,5% corado com Nancy-520 DNA (2,5µL/ ml), e visualizadas em transluminador, sob luz ultravioleta e fotografadas com a câmera OLYMPUS, C-5060. Os produtos de PCR foram purificados através da enzima *Exo-SAP IT®* (*USB Corporation*). A reação de sequenciamento foi realizada com o Kit “*Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction*” (*Applied Biosystems*). Os *primers* utilizados na reação de sequenciamento foram os mesmos utilizados na reação de PCR para amplificação dos produtos. As amostras foram analisadas em sequenciador de DNA automático, modelo *ABI 3130-Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*), presente no Laboratório de Biologia e Genética de peixes, da UNESP de Botucatu, SP.

Posteriormente as sequências *forward* e *reverse* foram alinhadas no programa *Geneious 4.8.5*, posteriormente inseridas na base de dados do site *BOLD Species Level Barcode* ([www.boldsystems.org](http://www.boldsystems.org)) e comparadas com as 100 sequências mais similares já depositadas na plataforma, obtendo a identificação em nível de espécie.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi verificado nas coletas realizadas que a maioria das espécies de tubarões têm somente suas carcaças desembarcadas (sem cabeça, vísceras e com as nadadeiras parcialmente grudadas ao corpo), o que dificulta ou impossibilita, em algumas espécies, a identificação taxonômica por meio da morfologia do animal, como já foi visto por Heist e Gold (1999) e Shivji *et al.* (2002). Embora os tubarões não sejam o alvo das pescas industriais e artesanais, são os mais pescados anualmente, como fauna acompanhante das espécies alvo, conforme os artigos de Mazzoleni e Schwingel (1999); Costa e Chaves (2006) e Tomás *et al.* (2010), que relatam que as frotas têm como alvo de pesca as espécies como atum e espadarte.

A partir de 2012 o Ministério do Meio Ambiente (MMA) regulamentou a lei da prática do *finning*, em uma tentativa para coibir esse crime. Portanto, todos os espécimes de tubarões e raias capturados no litoral brasileiro devem ser desembarcados, seja onde for, com todas as suas nadadeiras naturalmente aderidas ao corpo do animal. Isso foi verificado na coleta realizada no Terminal Pesqueiro Público de Santos (TPPS), onde os espécimes estavam com as nadadeiras aderidas ao corpo, sendo retiradas imediatamente após o desembarque e separadas para a exportação, como é possível visualizar, logo abaixo, na figura 1.



**Figura 1.** Nadadeiras separadas para exportação

Portanto a mais de dez anos atrás Pequenõ e Lamilla (1997) e Chan *et al.* (2003), já haviam verificado que apenas com a carcaça, da forma como é desembarcado, não é possível fazer a identificação pelo método taxonômico convencional, impossibilitando a determinação do número exato de indivíduos e o número de cada espécie desembarcada pelas frotas pesqueiras. Gerando dados insuficientes para um manejo adequado da pesca para essas espécies, o que torna fundamental o uso de marcadores genéticos para uma precisa identificação dos espécimes.

As análises foram separadas em duas etapas, na primeira foi realizado o sequenciamento das amostras dos anos de 2008/2009 e posteriormente analisadas as amostras das coletas atuais. Um total de 316 amostras foram sequenciadas dos anos de 2008 e 2009, dentre essas, 230 foram consideradas para a fidedignidade dos dados (Apêndice) de acordo com a similaridade aceitas para animais, que corresponde a uma porcentagem igual ou acima de 98% de similaridade com as sequências já depositadas no *BOLD System*.

Dessas amostras foi possível verificar a ocorrência de 12 espécies diferentes, dentre elas as mais frequentes foram *Rhizoprionodon lalandii* (n=92), *Sphyrna lewini* e *Sphyrna zygaena* (n=60), *Prionace glauca* (n=33) e *Squalus cubensis* (n=28). Também foram detectadas outras em menor frequência, *Rhizoprionodon terraenovae* (6), *Rhizoprionodon porosus* (1), *Carcharhinus falciformes* (3), *Carcharhinus brevipinna* (3), *Alopias superciliosus* (2), *Mustelus schimitti* (1) e *Squatina guggenheim* (1).

Entretanto algumas dessas, como *Mustelus schimitti* e *Squatina guggenheim*, estavam proibidas de serem coletadas na época, conforme a Instrução Normativa Nº 5, de 21 de maio de 2004, normatizando que as espécies que constam no Anexo I dessa normativa, estão proibidas de serem capturadas, nos termos da legislação em vigor, exceto para fins científicos, mediante autorização especial do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis-IBAMA.

Já a espécie *Alopias superciliosus*, desde de 2008, ficou determinado que exemplares capturados no Oceano Atlântico, em áreas que a ICCAT administra a pesca, deveriam ser soltos, conforme determinado pela resolução 08-07 da ICCAT (Comissão para a Conservação do Atum no Atlântico). Além disso, se os animais estiverem vivos no momento de verificação das armadilhas, estes devem ser devolvidos ao mar sem ferimentos e todas as capturas incidentais e solturas de tubarões vivos devem ser reportadas à ICCAT. Recentemente, pela Instrução Normativa Interministerial número 5 do Ministério do Meio Ambiente (IBAMA) de 15 de abril de 2011, passou a ser protegida por lei em todo o território brasileiro, sendo proibida sua captura, desembarque, armazenamento e comercialização (MMA 2011).

As espécies de tubarão martelo (*Sphyrna* sp.) e tubarão azul (*Prionace glauca*), que tiveram maior número na amostragem, constavam no Anexo II da Instrução

Normativa Nº 5, de 21 de maio de 2004, o qual diz que são espécies sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração, deverão ser desenvolvidos planos de gestão, sob a coordenação do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis-IBAMA, com a participação dos órgãos estaduais, da comunidade científica e da sociedade civil organizada, em prazo máximo de cinco anos, a contar da publicação desta Instrução Normativa.

Na amostragem dos anos de 2014 e 2015, foram sequenciadas um total de 317 amostras e 199 tiveram similaridades acima de 98%. Sendo possível a identificação de nove espécies distintas, dentre elas as mais coletadas foram *Rhizoprionodon lalandii* (n=41), *Sphyrna lewini* e *Sphyrna zygaena* (n=26), *Prionace glauca* (n=113). As outras espécies em menor frequência foram, *Carcharhinus brevipinna* (12), *Carcharhinus limbatus* (3), *Rhizoprionodon terraenovae* (2), *Carcharhinus falciformis* (1), *Rhizoprionodon porosus* (1).

Nesse período de coleta foram capturadas espécies de tubarão martelo, que representaram 7,5 % das espécies coletadas e conforme a Portaria nº 445, de 17 de dezembro de 2014, vigente na época das coletas das amostras, diz que as espécies classificadas nas categorias extintas na natureza, criticamente em perigo, em perigo e vulnerável ficam protegidas de modo integral, incluindo, entre outras medidas, a proibição de captura, transporte, armazenamento, guarda, manejo, beneficiamento e comercialização. Esses dados mostram que mesmo existindo uma portaria vigente que proibia a pesca na época, observamos um número considerável de espécies proibidas nas amostras.

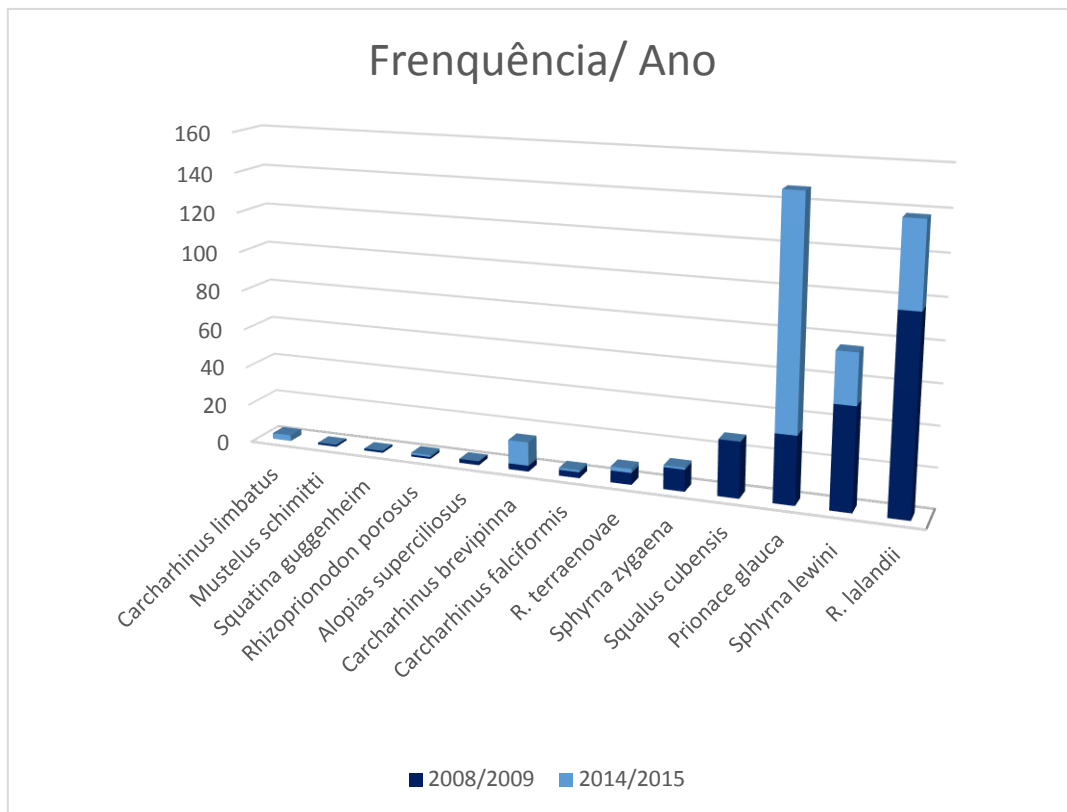
Caso semelhante ocorreu com o tubarão lombo-preto (*Carcharhinus falciformis*) que teve sua pesca proibida no Brasil em 2014, conforme Instrução Normativa

Interministerial nº 8, sendo um exemplar identificado nas coletas do mercado de peixe de Santos em 2015, com 99,8% de similaridade no banco de dados do DNA Barcode.

Tanto os tubarões martelo quanto o tubarão lombo-preto, estavam sendo vendidos no mercado de peixes com nomes populares como “cação” para indivíduos grandes e “caçonete” para indivíduos de porte pequeno, provavelmente indivíduos juvenis, o que aumenta o risco de extinção dessas espécies, enfatizando a grande necessidade de fiscalizações com a utilização de marcadores moleculares para que a legislação seja eficaz em relação ao comércio de espécies de pesca proibidas.

Os dados observados, também demonstram por exemplo, que espécies que estavam sendo exploradas nos anos 2008 a 2009, já não apareceram mais nas coletas recentes de 2014/2015, como é o caso da espécie *Squalus cubensis*, podendo assim inferir que talvez tenha havido uma sobrepesca dessa espécie em anos anteriores, não sendo mais tão abundantes na costa do país.

Buscando uma análise global das amostras em ambos períodos coletados, foram identificadas 13 espécies distintas no total (anexo), dentre elas as 5 mais exploradas foram *Prionace glauca* (n=146), *Rhizoprionodon lalandii* (n=134), *Sphyrna lewini* e *Sphyrna zygaena* (n=94), *Squalus cubensis* (n=28) e *Carcharhinus brevipinna* (n=15), sendo as outras espécies *Rhizoprionodon terraenovae* (8), *Carcharhinus falciformis* (4), *Carcharhinus limbatus* (3), *Alopias superciliosus* (2), *Rhizoprionodon porosus* (2), *Mustelus schmitti* (1), como é demonstrado no gráfico 1.

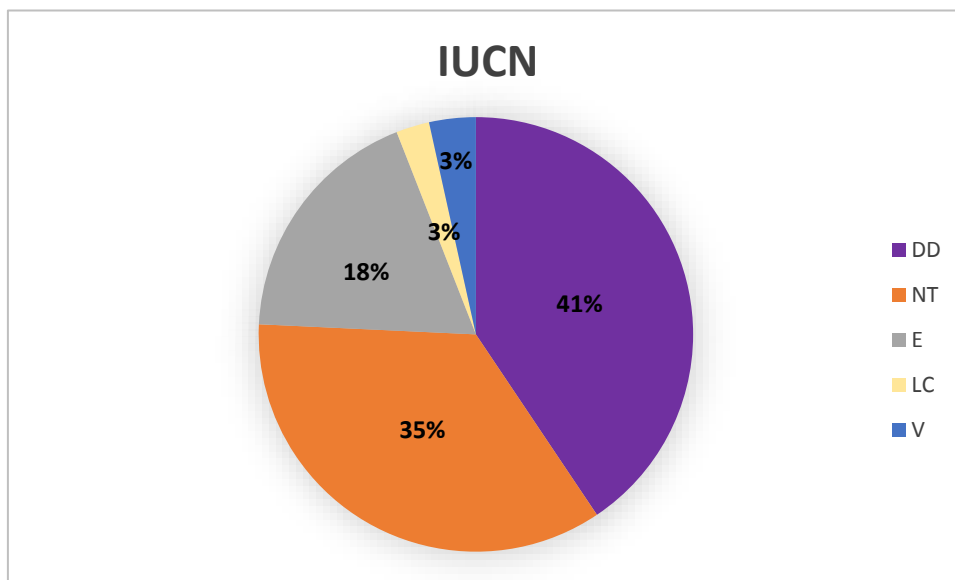


**Gráfico 1.** Freqüência das espécies encontradas por ano de coleta.

Como pode ser verificado no gráfico acima, as três espécies mais coletadas, foram: *Prionace glauca* (34%), *Rhizoprionodon lalandii* (31%), *Sphyrna* sp. (incluindo *Sphyrna lewini* e *Sphyrna zygaena*) (22%), o que totaliza quase 90% da amostragem. Portanto nos resultados obtidos, o tubarão azul (*Prionace glauca*) foi o mais coletado, o que corrobora com Quaggio *et al.* (2008), onde verificaram que ele é o Chondrichthyes mais amplamente distribuído nos oceanos do mundo, sendo o mais abundante nas capturas do espinhel pelágico.

Outras espécies como, *Carcharhinus brevipinna* consta na lista vermelha da IUCN como uma espécie vulnerável, já *Rhizoprionodon lalandii* que foi a segunda espécie com a maior freqüência nos resultados, com 31% da amostragem total, consta como “dados insuficientes”, o que pode caracterizar uma sobreexploração dessas populações, sem

informações suficientes para que haja uma pesca a nível sustentável. Foi verificado também que quase a metade das espécies identificadas, não tem dados suficientes sobre sua pesca e exploração, 35% estão quase ameaçadas e 18% em perigo de extinção (gráfico 2).



**Gráfico 2.** Red List IUCN (“DD” – data deficient, “NT” – near threatened, “E” – endangered, “LC” – least concern, “V” – vulnerable).

Os dados do gráfico 2 demonstram que muitas espécies de tubarões são muito exploradas em todo mundo, a maioria das vezes sem identificação e sem uma quantificação a respeito das espécies, o que dificulta o estabelecimento de um equilíbrio entre a pesca e a recuperação dos estoques.

No Brasil, o pescado de maneira geral, é exportado, junto a uma nota fiscal, onde cada produto possui uma nomenclatura, a Nomenclatura Comum do Mercosul (NCM), adotada pelo Brasil, junto com a Argentina, Paraguai e Uruguai, desde 1995, que trata de um código de oito dígitos para identificar a natureza das mercadorias e promover o desenvolvimento do comércio internacional, facilitando a coleta e análises das

estatísticas do comércio exterior. Qualquer mercadoria, importada ou exportada no Brasil, deve ter esse código NCM na sua documentação legal (nota fiscal, licenças para exportação, dentre outros documentos legais). Dados obtidos a partir do site da Receita Federal tornou possível verificar que existem apenas alguns códigos NCM para os tubarões atualmente exportados, tendo apenas uma espécie em evidência, com o NCM específico, o tubarão azul (*Prionace glauca*), o resto é comercializado com NCM de barbatanas em geral. Portanto o fato de ter um NCM generalista, não mostra as estatísticas reais de pesca, dificultando o planejamento de políticas públicas para conservação dessas espécies tão vulneráveis a pesca predatória.

Em vista disso, é possível perceber que não há uma fiscalização eficaz em cima do comércio interno e externo dessas espécies, provavelmente por falta de uso de técnicas moleculares de identificação de pescado descaracterizado. Verificando o grande déficit em relação aos dados do que é comercializado a nível de espécies, levantando hipóteses e questionamentos acerca de possíveis fraudes e mascaramento de fontes de exploração ilegal não declarada e não regulamentada e a comercialização de espécies protegidas, como já foi visto por Baker *et al.* 2002 e Marko *et al.* 2004, podendo levar essas a uma sobre-exploração ou até mesmo a extinção.

O mais recente e alarmante relato de amplo declínio na captura de tubarões costeiros e oceânicos refere-se ao “grupo” dos tubarões-martelo, e trata das três principais espécies alvo da pesca: *Sphyrna lewini*, *S. zygaena* e *S. mokarran*, para as quais estima-se uma redução em cerca de 89% de suas populações selvagens do Atlântico Norte desde 1986 (Baum *et al.* 2003, Baum e Myers 2004, Myers *et al.* 2007), e ainda assim, espécies com uma porcentagem 22% na amostragem total do trabalho.

Contudo, infelizmente ainda há poucos trabalhos desse tipo para uma eficaz regulamentação da pesca de tubarões. Em 2014, por exemplo, Carvalho *et al.*, fizeram uma análise forense, utilizando o DNA Barcode para espécies comercialmente importantes como o bacalhau, o linguado, a garoupa e o atum, comercializados nos mercados do Sul do Brasil, demonstrando uma grande substituição de produtos, o que é verificado em tubarões também, onde há venda de espadarte (*Xiphias gladius*) (apêndice) como tubarão e vice-versa, verificado no presente estudo, onde foram encontradas duas dessa espécie de meca.

Para correta avaliação dos estoques naturais e futuras ações de manejo e conservação das espécies de tubarões, é necessário urgentemente a implementação das técnicas de biologia molecular na ciência forense marinha, recomendada para a identificação de tubarões e raias, corroborado por Holmes *et al.* (2009). Os métodos são viáveis e seu desenvolvimento poderá proteger as espécies em questão da superexploração (Teletchea *et al.* 2005).

*CONSIDERAÇÕES*

*FINAIS*

## **5 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A atual Constituição Brasileira, promulgada em 1988, Art. 225, inclui um importante instrumento legal para a proteção das espécies que compõem a nossa biodiversidade. Determina como responsabilidade do Poder Público "proteger a fauna e a flora, vedadas, na forma da lei, as práticas que coloquem em risco sua função ecológica, provoquem a extinção das espécies ou submetam os animais à crueldade".

Para o cumprimento desses compromissos, tanto no âmbito externo quanto interno, o Brasil dispõe de uma série de mecanismos voltados à conservação e proteção da biodiversidade, com destaque para a elaboração de listas das espécies ameaçadas, monitoramento, planos de gestão e programas para recuperação de espécies ameaçadas.

Listas que, por exemplo, hoje incluem muitas espécies de tubarões. A pesca desenfreada dessas populações está levando essas espécies a uma queda drástica nos seus estoques pesqueiros, correndo um grande risco de extinção. Como a genética molecular nessas últimas décadas avançou bastante, hoje as amostras que antes seriam descartadas por não ser possível uma identificação morfológica tradicional, hoje pode ser possível fazer essa identificação a nível de espécies, sendo imprescindível para a correta avaliação dos estoques e para que haja um manejo adequado das mesmas.

Mesmo com a ampla gama de estudos que vem sendo feito para a conservação e identificação dessas populações, ainda não é o suficiente, pois, em escala mundial, o manejo dos estoques de elasmobrânquios é complicado pela falta de informações básicas sobre a dinâmica de suas populações. Nesse sentido torna-se fundamental conhecer para poder preservar, isto é, a ampliação do conhecimento sobre a

composição de recursos vivos e seus estoques genéticos nos vários ecossistemas existentes. A partir desse conhecimento é que serão gerados os subsídios para a preservação ou a utilização planejada e sustentável dos recursos naturais.

Com um crescente interesse na sustentabilidade da pesca no âmbito internacional começaram a ser desenvolvidos planos de manejo e conservação de elasmobrânquios, como por exemplo, o plano de ação para conservação de tubarões (*IPOA-Sharks - Plan of Action for the Conservation and Management of Sharks*), adotado pela “*United Nations Food and Agricultural Organization*” (FAO) com o intuito de incentivar os países a desenvolver seus próprios planos de manejo, conservação e sustentabilidade de tubarões e seus ecossistemas, dando especial atenção às espécies vulneráveis ou ameaçadas de extinção (FAO 1999).

Neste contexto, o presente trabalho foi desenvolvido para que complementasse dados sobre a pesca de elasmobrânquios no litoral do estado de São Paulo, que ainda hoje são muito defasados. O método de identificação empregado no presente trabalho, o DNA Barcode, se mostrou eficiente na identificação de espécies protegidas, pela legislação vigente no período da coleta, irregularmente comercializadas.

Podendo portanto verificar que os dados estatísticos de pesca atuais não corroboram com os dados obtidos, subestimando a importância das espécies que estão sendo sobre-exploradas de populações de tubarões.

Outro ponto importante é que os dados obtidos no presente trabalho, mostrou que há 13 espécies sendo desembarcadas no litoral de São Paulo, entretanto apenas uma está sendo exportada/importada com o Nomenclatura Comum do Mercosul (NCM), específica, sendo o restante comercializada com o NCM geral. Consequentemente, a partir dessas constatações, surgem questionamentos, como: "Se

*apenas uma espécie tem um código específico de importação e exportação, o que acontece com as outras 12 espécies encontradas no presente trabalho, estão sendo vendidas de forma geral como cação?*", *"Está havendo uma fraude, venda trocada no comércio dessas espécies?"*, *"Quais serão os dados reais de espécies comercializadas internamente e externamente de tubarões?"*. Questões essas que podem ser respondidas utilizando métodos moleculares, que demonstraram em vários trabalhos serem ferramentas extremamente eficazes no desenvolvimento de hipóteses abrangentes na área.

Desse modo, para que ações de conservação sejam efetivas no âmbito nacional e internacional do ambiente marinho, torna-se fundamental e de grande urgência que haja uma precisa identificação de seus estoques e a elaboração de estatísticas rigorosas que quantifiquem a exploração possibilitando o manejo biológico adequado das populações em conjunto com fiscalizações rigorosas em pontos de desembarque. Estas medidas de monitoramento ambiental poderão ao longo do tempo estabilizar a taxa de mortalidade a um nível sustentável, para que as populações de tubarões possam um dia estar em equilíbrio.

# *REFERÊNCIAS*

## 6 REFERÊNCIAS

- ABDO Z e GOLDING B (2007) A step toward barcoding life: a model-based, decision-theoretic method to assign genes to preexisting groups. *Syst. Biol.*, 56, 44-56.
- ALVES-GOMES JA, ORTÍ G, HAYGOOD M, MEYER M *et al.* (1995) Phylogenetic analysis of the South American electric fishes (Order Gymnotiformes) and the evolution of their electrogenic system: A synthesis based on morphology, electrophysiology, and mitochondrial sequence data. *Molecular Biology Evolution* 12(2): 298-318.
- AMORIM AF e ARFELLI CA (1992) The shark fishery in South and Southeastern Brazil. *Chondros*, 3(3): 1-4.
- AMORIM AF, ARFELLI CA, BACILIERI S (2002) Shark data from Santos longliners fishery off southern Brazil (1971-2000). *Collective Volume of Scientific Papers ICCAT*, 54(4): 1341-1348.
- ARFELLI CA (1996) Estudo da Pesca e Aspectos da Dinâmica Populacional de Espadarte *Xiphias gladius* L. 1758, no Atlântico Sul. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, São Paulo, Brasil. 175p.
- AVISE TC, GIBLIN-DAVIDSON C, LAERM J *et al.* (1979) Mitochondrial DNA clones and matriarchal phylogeny within and among geographic population of the pocket gopher, *Geomys pinelis*. *Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A.* 76: 6694-6698.
- AVISE JC e WOLLENBERG K (1997) Phylogenetics and the origin of species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94: 7748-7755.
- BARBUTO M, GALIMBERTI A, FERRI E, LABRA M, MALANDRA R, GALLI P, CASIRAGHI M (2010). DNA barcoding reveals fraudulent substitutions in shark seafood products:

The Italian case of “palombo” (*Mustelus* spp.). *Food Research International* 43: 376–381.

BAKER CS, DALEBOUT ML, LENTO GM, *et al.* (2002) Gray whale products sold in commercial markets along the Pacific Coast of Japan. *Marine Mammal Science*, 18: 295–300.

BAUM JK, MYERS RA, KEHLER DG, WORM B, HARLEY SJ, DOHERTY PA (2003) Collapse and Conservation of Sharks Populations in the Northwest Atlantic. *Science*, 299: 389–391.

BAUM JK e MYERS RA (2004) Shifting baselines and the decline of pelagic sharks in the Gulf of Mexico. *Ecol Lett* 7: 135-145.

BEZERRA P, FERNANDES A (1984) *Fundamentos de taxonomia vegetal*. Fortaleza, Ed. Universidade Federal do Ceará.

BISBY FA, ROSKOV YR, ORRELL TM, NICOLSON D, PAGLINAWAN LE, BAILLY N, KIRK PM, BOURGOIN T, BAILLARGEON G, eds (2010) *Species 2000 e ITIS Catalogue of Life: 2010 Annual Checklist*. Digital resource at <http://www.catalogueoflife.org/annualchecklist/2010>. Species 2000: Reading, UK.

BOCK WJ (1973) Philosophical foundations of classical evolutionary classification. *Systematic Zoology*, 22: 375-392.

BORNATOWSKIA H, BRAGA RR, VITULEB JRS (2014) Threats to sharks in a developing country: The need for effective and simple conservation measures. *NAT CONSERVACAO*, 12(1): 11-18.

BROTHERS EB, WILLIAMS DMcB e SALE PF (1983) Length of larval in twelve families of fishes at “One Tree Lagoon”, Great Barrier Reef, Australia. *Marine Biology* 76: 319-324.

- BROWN WM, GEORGE MJR, WILSON AC (1979) Rapid evolution of animals mitochondrial DNA. Proc Natl Acade Sci USA 76: 1967-1971.
- CALIXTO JB (2003) Biodiversidade como fonte de medicamentos. Cienc. Cult. [online], 55, 3: 37-39. ISSN 2317-6660.
- CAMHI MS, FOWLER J, MUSICK A, BRAUTIGAM AND FORDHAM S (1998) Sharks and their relatives: ecology and conservation. Occasional paper 20. IUCN Species Survival Commission, Gland, Switzerland.
- CAMHI M (1999) Sharks on the Line II: An Analysis of Pacific State Shark Fisheries. Living Oceans Program, National Audubon Society, Islip, New York. 116p.
- CARVALHO CBV, FREITAS JM (2013) The use of DNA barcoding to identify illegally traded shark fins in Brazil. Saúde, Ética & Justiça, 18(Ed. Especial): 50-4.
- CARVALHO DC, PALHARES RM, DRUMMOND MG, FRIGO TB (2014) DNA Barcoding identification of commercialized seafood in South Brazil: A governmental regulatory forensic program. Elsevier. Food Control 50: 784-788.
- CASTRO JI (1987) The Position of Sharks in Marine Biological Communities an Overview. In: Cook, S. (edit). Sharks. An Inquiry into Biology, Behavior, Fisheries and Use. Proc. Of a Conf. Portland. Oregon, State University Extension Service: 11-17.
- CASTRO J, PARDO BG, SÁNCHEZ L AND MARTÍNEZ P (1999) rDNA RFLPs as genetic markers for resource management in brown trout. J Fish Biol 55: 221-225.
- CHAN RWK, DIXON PI, PEPPERELL JG, REID DD (2003) Application of DNA-based for the identification of whaler sharks (*Carcharhinus* spp.) caught in protective beach meshing and by recreational fisheries off the coast of New South Wales. Fishery Bulletin, 101: 910-914.

- COMPAGNO LJV (1973) Interrelationships of living elasmobranchs. In P.H. Greenwood, R.S. Miles and C. Patterson, eds. Interrelationships of fishes. Zoological Journal of the Linnean Society Supplement 1, 53: 15–61.
- COMPAGNO LJV (1990) Alternative life history styles of cartilaginous fishes in time and space. Environmental Biology of Fishes 28: 33–75.
- COMPAGNO LJV, EBERT DA e COWLEY PD (1991) Distribution of offshore demersal cartilaginous fish (Class Chondrichthyes) off the west coast of southern Africa, with notes on their systematics, South African Journal of Marine Science, 11, 1: 43-139.
- COMPAGNO LJV (2000) An overview of chondrichthyan systematics and biodiversity in southern Africa. Transactions of the Royal Society of South Africa. 54(1): 75–120.
- COMPAGNO LJV (2001) FAO Species Catalogue for Fishery Purposes. No. 1. Sharks of the World: An Annotated and Illustrated Catalogue of the Shark Species Known to Date. Vol. 2. Bullhead, Mackerel and Carpet Sharks (Heterodontiformes, Lamniformes and Orectolobiformes). FAO, Rome, Italy, 269 p.
- COMPAGNO LJV (2005) Checklist of living chondrichthyes. In Hamlett W.C. (ed.) Reproductive biology and phylogeny of chondrichthyes: sharks, batoids, and chimaeras. Enfield, New Hampshire: Science Publishers, Inc, 501–548.
- COSTA L e CHAVES PTC (2006) Elasmobrânquios capturados pela pesca artesanal na costa sul do Paraná e norte de Santa Catarina, Brasil. Biota Neotropica, 6 (3): 1-10.
- CORTEZ E (2000) Life History Patterns and Correlations in Sharks. Rev. Fish. Sci., 8, 4: 299-344.
- COX AJ E HEBERT PDN (2001) Colonization, extinction and phylogeographic patterning in a freshwater crustacean. Mol. Ecol. 10: 371–386.

- DENTINGER BM, MARGARITescu S, MONCALVO JM (2010) Rapid and reliable high-throughput methods of DNA extraction for use in barcoding and molecular systematic of mushrooms. *Mol Ecol Resour* 10: 628–633.
- DIAMOND JM (1966) A rapid method for determining voltage-concentration relations across membranes. *J. Physiol*, 183: 83-100.
- DULVY NK, ROGERS SI, JENNINGS S, STETZENMILLER V, DYE SR, SKJOLDAL HR (2008) Climate change and deepening of the North Sea fish assemblage: a biotic indicator of warming seas. *J Appl Ecol* 45:1029–1039.
- EBERT DA e COMPAGNO LJV (2007) Biodiversity and systematics of skates (Chondrichthyes: Rajiformes: Rajoidei). *Environ Biol Fish* (2007) 80: 111–124.
- ELIAS M, HILL RI, WILLMOTT KR, DASMAHAPATRA KK, BROWER AVZ, MALLETT J, JIGGINS CD (2007) Limited performance of DNA barcoding in a diverse community of tropical butterflies. *P. Roy. Soc. BBiol. Sci.*, 274: 2881–2889.
- FERRETTE BLS, MENDONÇA FF, COELHO R, OLIVEIRA PGV, HAZIN FHV, ROMANOV EV, OLIVEIRA C, SANTOS MN, FORESTI F (2015) High Connectivity of the Crocodile Shark between the Atlantic and Southwest Indian Oceans: Highlights for Conservation. *PLoS ONE* 10(2): e0117549.
- FIELDS AT, ABERCROMBIE DL, ENG R, FELDHEIM K, CHAPMAN DD (2015) A Novel Mini-DNA Barcoding Assay to Identify Processed Fins from Internationally Protected Shark Species. *PLoS ONE* 10(2): e0114844.
- FRANCIS CM, BORISENK AV, IVANOVA NV, EGER JL, LIM BK, GUILLEN-SERVENT A, KRUSKOP SV, MACKIE I, HEBERT PDN (2010) The role of DNA barcode in understanding and conservation of mammal diversity in southeast Asia. *PLoS ONE* 5(9):e12575.

- FRANK DN, AMAND ALS, FELDMAN RA, BOEDEKER EC, HARPAZ N, PACE NR (2007) Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *PNAS*, 104, 34: 13780–13785.
- FRANKHAM R (2010) Challenges and opportunities of genetic approaches to biological conservation. *Biological Conservation*, 143: 1919–1927.
- FRÉZAL L e LEBLOIS R (2008) Four years of DNA barcoding: current advances and prospects. *Inf. Gen. Evo.*, 8: 727-736.
- GADIG OBF (2001) Tubarões da Costa Brasileira. Tese de Doutorado, Unesp, Campus de Rio Claro, São Paulo, 343.
- GALIMBERTI A, MATTIA FD, LOSA A, BRUNI I, FEDERICI S, CASIRAGHI M, MARTELLOS S, LABRA M (2013) DNA barcoding as a new tool for food traceability. *Food Research International* 50 (2013) 55–63.
- GIL LA (2007) PCR-based methods for fish and fishery products authentication. *Trends in Food Science and Technology*, 18: 558–566.
- GRAVES JE (1998) Molecular insights into the population structure of cosmopolitan marine fishes. *Journal of Heredity*, 89: 427-437.
- GROGAN ED e LUND R (2004) Origin and relationships of early Chondrichthyes. PP. 3-31. IN J. C. CARRIER, J. A. Musick, and M. R. Heithaus (eds), *Biology of Sharks and Their Relatives*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- GRUBER SH (1990) Life style of sharks In: Gruber SH (ed.) *Discovering sharks*. American Litoral Society, Special Publication Nº 14.
- HALL BG (2001) *Phylogenetics trees made easy. How to manual for molecular biologists*. Sunderland, Sinauer Associates.

- HAJIBABAEI M, SINGER GAC, HEBERT PND, HICKEY DA (2007) DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetic and population genetics. *V* 23, 4: 167-172.
- HOENIG IP, GRUBER SH (1990) Life History Patterns in the Elasmobranchs: Implications for Fisheries Management. NOAA Technical Report 90.
- HOLMGREN S e NILSSON S (1999) Digestive system. In: *Sharks, Skates and Rays: the biology of elasmobranch fishes*. Hamlett, W. C. (ed.). Baltimore, The John Hopkin University Press. 144 - 173.
- HEBERT PDN, RATNASINGHAM S, DEWAARD JR (2003a) Barcoding animal life: cytochrome oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270: 96-99.
- HEBERT PDN, CYWINSKA A, BALL SL, WARD JR (2003b) Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. B*, 270: 313-322.
- HEBERT PDN, STOECKLE MY, ZEMLAK TS e FRANCIS CM (2004b) Identification of birds through DNA barcodes. *Plos Biol.*, 2: 01-06.
- HEBERT PDN, GREGORY TR (2005) The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Syst Biol* 54(5): 852-859.
- HENNIG W (1966) *Phylogenetic systematics*. Urbana, Univ. Illinois Press. In: *Tese- O uso de um fragmento do marcador matK como sequência DNA Barcode em Araceae (Luciano Coêlho Milhomens Cemin)*.
- HEIST EJ e GOLD JR (1999b) Genetic Identification of Sharks in the U.S. Atlantic large coastal Shark Fishery. *Fishery Bulletin*, 97: 53-61.
- HEITHAUS MR, FRID A, WIRSING AJ, WORM B (2008) Predicting ecological consequences of marine top predator declines. doi:10.1016/j.tree.2008.01.003.

- HOLMES EB (1980) Reconsideration of some systematic concepts and terms. *Evolutionary Theory*, 5: 35-87.
- HOLMES BH, STEINKE D, WARD RD (2009) Identification of shark and ray fins using DNA barcoding. *Fisheries Research* 95: 280–288.
- HOGG ID, HEBERT PDN (2004) Biological identification of springtails (Collembola: Hexapoda) from the Canadian Arctic, using mitochondrial DNA barcodes. *Can J Zool.*, 82: 749-754.
- HUNN E (1982) The utilitarian factor in folk biological classification. *American Anthropological Association*, 84: 830-847.
- KERR KCR, STOECKLE MY, DOVE CJ, WEIGT LA, FRANCIS CF e HEBERT PDN (2007) Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds. *Mol.Ecol. Notes*, 7: 535-543.
- KRISHNAMURTHY PK, FRANCIS RA (2012) A critical review on the utility of DNA barcoding in biodiversity conservation. *Biodivers Conserv.*, 21:1901–1919 DOI 10.1007/s10531-012-0306-2.
- JUDD WS, CAMPBELL CS, KELLOGG EA, STEVENS PF e DONOGHUE MJ (2009) *Sistemática Vegetal – Um enfoque filogenético*. São Paulo, Artmed.
- LAMENDIN R, MILLER K, WARD RD (2015) Labelling accuracy in Tasmanian seafood: An investigation using DNA barcoding. *Elsevier. Food Control* 47: 436- 443.
- LESSA R, SANTANA FM, RINCÓN G, GADIG OBF, EL-DEIR ACA (1999) Biodiversidade de elasmobrânquios do Brasil. In: *Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da zona costeira e marinha*, Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal, Recife.

- LESSA RPT, VOOREN CM, ARAÚJO MLG, KOTAS JE, ALMEIDA PC, RINCÓN G, SANTANA FM, GADIG OBF, SAMPAIO C (2005) Plano Nacional de ação para a conservação de o manejo dos estoques de peixes elasmobrânquios no Brasil. Recife, 100.
- LI R, DAO Z (2011) Identification of *Meconopsis* species by a DNA barcode sequence: the nuclear internal transcribed spacer (ITS) region of ribosomal deoxyribonucleic acid (DNA). *Afr J Biotechnol* 10(70): 15805–15807.
- LOCKLEY AK, BARDSLEY RG (2000) DNA-based methods for food authentication. *Trends in Food Science and Technology*, 11: 67–77.
- MARKO PB, LEE SC, RICE AM *et al.* (2004) Fisheries: mislabelling of a depleted reef fish. *Nature*, 430: 309–310.
- MAYR EE (1998) O desenvolvimento do pensamento biológico – Diversidade, evolução e herança. Brasília – Ed. Universidade de Brasília.
- MAZZOLENI RC e SCHWINGEL PR (1999) Elasmobranch species landed in Itajaí Harbor Southern Brazil. *Notas Téc. FACIMAR*, 3: 111-118.
- MELO BF, BENINE RC, MARIGUELA TC E OLIVEIRA C (2011) A new species of *Tetragonopterus Cuvier*, 181 (Characiformes: Characidae: Tetragonopterinae) from the rio Jari, Amapá, northern Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 9 (1): 49-56.
- MENDONÇA FF, OLIVEIRA C, GADIG OBF, FORESTI F (2011) Phylogeography and genetic population structure of Caribbean sharpnose shark *Rhizoprionodon porosus*. *Rev Fish Biol Fisheries*. 21:799–814. DOI 10.1007/s11160-011-9210-1.
- MENDONÇA FF, USSAMI LHF, HASHIMOTO DT, PEREIRA LHG, PORTO-FORESTI F, OLIVEIRA C, GADIG OBF, FORESTI F (2012) Identification and characterization of polymorphic microsatellite loci in the blue shark *Prionace glauca*, and cross-amplification in other shark species. *Journal of Fish Biology*, 80: 2643–2646.

- MENESES de LIMA JH, KOTAS JE, LIN CF (2000) A historical review of the Brazilian long-line fishery and catch of swordfish. Collective Volume of Scientific Papers, ICCAT, 51 (36): 1329 – 1358.
- MENEZES TS, SANTOD FN e CHAVES LCT (2003) Ocorrência da raia-viola, *Rhinobatus percellens* Walbaum, 1792 (Chondrichthyes; Rhinobatidae) no litoral de Sergipe. Anais da Semana da Pesquisa da Universidade Tiradentes, Aracajú.
- MENEZES NA (2011) Checklist dos peixes marinhos do Estado de São Paulo, Brasil. Biota Neotropica, 11: 1-14.
- MORA C, TITTENSOR DP, ADL S, SIMPSON AGB, WORM B (2011) How Many Species Are There on Earth and in the Ocean?. Plos One, 9, 8.
- MORITZ C, CICERO C (2004) DNA barcoding: promise and pitfalls. PLoS Biol, 2: 1529-1531.
- MYERS RA, BAUM JK, SHEPERD TD, POWERS SP, PETERSON CH (2007) Cascading effects of the loss of apex predatory sharks from a coastal ocean. Science 315: 1846-1850.
- ORTIZ MF (2010). Validação do DNA Barcoding como identificador de espécies: um estudo de ampla amostragem com o gênero *pseudoplatystoma* (siluriformes; pimelodidae) na Amazônia. Instituto Nacional de pesquisas da Amazônia programa de pós-graduação em genética, conservação e biologia evolutiva. Dissertação, 73p.
- PEQUEÑO G e LAMILLA J (1997) Las pesquerías de condriictios en Chile: primer análisis. Revista Biología Pesquera, 26: 13-24.
- PESTANO J, BROWN RP (1999) Geographical structuring of mtDNA in *Chalcides sexlineatus* within the island of Gran Canaria. Proceedings of the Royal Society of London, Series B, 266: 815–823.

- PILGRIM EM, JACKSON SA, SWENSON S, TURCSANYI I, FRIEDMAN E, WEIGT L, BAGLEY MJ (2011) Incorporation of DNA barcoding into a large-scale biomonitoring program: opportunities and pitfalls. *J N Am Benthol Soc* 30(1): 217–231.
- QUAGGIO ALC, KOTAS JE e HOSTIM M (2008) As capturas do tubarão-azul, *Prionace glauca* Linnaeus (Elasmobranchii, Carcharhinidae), na pescaria de espinhel de superfície (monofilamento), sediada em Itajaí (SC), Brasil. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 3(1): 61-74.
- RACH J, DESALLE R, SARKAR IN, SCHIERWATER B e HADRYH H (2008) Character- based DNA barcoding allows discrimination of genera, species and populations in Odonata. *Proc. R. Soc. B.*, 275: 237-247.
- ROSA RS e LIMA FCT (2008) Peixe. In. MACHADO ABM, DRUMMOND GM, PAGLIA AP. Livro vermelho da fauna ameaçada de extinção. Brasil, DF: MMA. v.2.
- RUBINOFF D (2006) Utility of mitochondrial DNA barcodes in species conservation. *Conserv. Biol.*, 4: 1026-1033.
- SAITOU N e NEI M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4: 406-425.
- SAITOH K, MIYA M, INOUE JG, ISHIGURO NB, NISHIDA M (2003) Mitochondrial genomes of ostariophysan fishes: Perspectives on phylogeny and biogeography. *J Mol Evol.* 56: 464-472.
- SBEEL (2005) Plano Nacional para Conservação e Manejo dos Estoques de Peixes Elasmobrânquios no Brasil. Recife: Sociedade Brasileira para o Estudo de Elasmobrânquios - SBEEL. 100p.
- SCHNEIDER H (2003) Métodos de análises filogenética: um guia prático – Ribeirão Preto. Ed. Holos.

- SEMBIRING A, PERTIW NPD, MAHARDINI A, WULANDARI R, KURNIASIH EM, KUNCORO AW, CAHYANI NKD, ANGGORO AW, ULFA M, MADDUPPA H, CARPENTER KE, BARBER PH, MAHARDIKA GN (2015) DNA barcoding reveals targeted fisheries for endangered sharks in Indonesia. *Fisheries Research*, 164: 130–134.
- SMITH MA, FISHER BL e HEBERT PDN (2005) DNA barcoding for effective biodiversity assessment of a hyperdiverse arthropod group: the ants of Madagascar. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 360: 1825–1834.
- SMITH PJ, MCVEAGH SM, STEINKE D (2008) DNA barcoding for the identification of smoked fish products. *J Fish Biol.*, 72: 464-471.
- SNELSON FF, ROMAN BL e BURGESS GH (2008) The reproductive biology of pelagic elasmobranchs. In: *Sharks of the Open Ocean: Biology, Fisheries and Conservation* (eds. Camhi MD, Pikitch EK & Babcock EA). Blackwell Publishing, Oxford, UK.
- SHIVJI MS, CLARKE S, PANK M, NATANSON L, KOHLER N, STANHOPE M (2002) Genetic Identification of Pelagic Shark Body Parts for Conservation and Trade Monitoring. *Conservation Biology*, 16: 1036-1047.
- TAUTZ D, ARCTANDER P, MINELLI A, THOMAS RH, VOGLER AP (2003) A plea for DNA taxonomy. *Trends Ecol Evol*, 18:70–74.
- TELETSCHEA F, MAUDET C, HANNI C (2005) Food and forensic molecular identification: update and challenges. *Trends in Biotechnology*, 23 (7): 359-366.
- THACKER CE (2003) Molecular phylogeny of the gobioid fishes (Teleostei: Perciformes: Gobioidae). *Mol Phylogenet Evol*, 26: 354-368.
- TOMÁS ARG, GOMES UL, FERREIRA BP (2010) Distribuição temporal dos elasmobrânquios na pesca de pequena escala da Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brasil. *Bol. Inst. Pesca*, 36(4): 317-324.

- WARD RD, ZEMLAK TS, INNES BH, LAST PR, HEBERT PDN (2005) DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B*, 360: 1847–1857.
- WARES JP E CUNNINGHAM CW (2001) Phylogeography and historical ecology of the North Atlantic intertidal. *Evolution* 12: 2455–2469.
- WETHERBEE BM e CORTÉS E (2004) Food consumption and feeding habits. In: *Biology of Sharks and Their Relatives*. Carrier, J. C.; Musick, J. A. & Heithaus, M. R. (eds.). Boca Raton, CRC Press. 225 - 246.
- WILEY EO (1975) KARL RP, Systematics, and classification: a reply to Walter bock and other evolutionary taxonomists. *Systemtic Zoology*, 24: 233-243.
- WILSON EO (2000) A global map of biodiversity. *Science* 289:2279.
- YAO H, SONG JY, MA XY, LIU C, LI Y, XU HX, HAN JP, DUAN LS, CHEN SL (2009) Identification of *Dendrobium* species by a candidate DNA barcode sequence: the chloroplast psbA-trnH intergenic region. *Planta Med* 75: 667–669.

## ANEXO

### Exemplares das espécies coletadas



Blue shark – Tubarão azul - *Prionace glauca*



Silky shark – Lombo preto-  
*Carcharhinus falciformis*



Spinner shark- Galha- preta –  
*Carcharhinus brevipinna*



Blacktip shark – Serra-garoupa –  
*Carcharhinus limbatus*



Scalloped hammerhead – Martelo-de-  
ponta-preta – *Sphyrna lewini*



Smooth hammerhead shark –  
Tubarão martelo – *Sphyrna zyagena*



Bigeye thresher shark – Cação-raposa-  
olho-grande- *Alopias superciliosus*



Angular angel shark- Cação-anjo –  
*Squatina guggenheim*



Caribbean sharpnose shark- Cação-  
frango - *Rhizoprionodon porosus*



Atlantic sharpnose shark – Cação-frango –  
*Rhizoprionodon terraenovae*

Brasilian sharpnose shark – Cação-frango –  
*Rhizoprionodon lalandii*



Cuban dogfish – Cação-bagre – *Squalus cubensis*

Narrownose smooth hound – Bico-doce-  
do-norte – *Mustelus schmitti*



Gadig, O.

## APÊNCICE

Nº de ordem	Procedência	Data	Espécie	Similaridade
5738	Cais de Ubatuba	31/03/2014	<i>Carcharhinus brevipinna</i>	99,60%
5739	Cais de Ubatuba	31/03/2014	<i>Carcharhinus brevipinna</i>	100%
5740	Cais de Ubatuba	31/03/2014	<i>Sphyrna lewini</i>	100%
5742	Cais de Ubatuba	31/03/2014	<i>Carcharhinus brevipinna</i>	99,50%
5743	Cais de Ubatuba	31/03/2014	<i>Sphyrna lewini</i>	100%
5746	Cais de Ubatuba	31/03/2014	<i>Carcharhinus limbatus</i>	100%
5747	Cais de Ubatuba	31/03/2014	<i>Carcharhinus brevipinna</i>	99,80%
5748	Cais de Ubatuba	31/03/2014	<i>Carcharhinus brevipinna</i>	99,80%
5749	Cais de Ubatuba	31/03/2014	<i>Sphyrna lewini</i>	100%
5750	Cais de Ubatuba	31/03/2014	<i>Sphyrna lewini</i>	100%
5751	Cais de Ubatuba	31/03/2014	<i>Carcharhinus brevipinna</i>	99,80%
5752	Cais de Ubatuba	31/03/2014	<i>Prionace glauca</i>	100%
5753	Cais de Ubatuba	31/03/2014	<i>Prionace glauca</i>	100%
5754	Cais de Ubatuba	31/03/2014	<i>Prionace glauca</i>	99,80%
5755	Cais de Ubatuba	31/03/2014	<i>Prionace glauca</i>	100%
5756	Cais de Ubatuba	31/03/2014	<i>Prionace glauca</i>	100%
5757	Cais de Ubatuba	31/03/2014	<i>Carcharhinus brevipinna</i>	100%
5761	Cais de Ubatuba	31/03/2014	<i>Carcharhinus limbatus</i>	100%
5762	Cais de Ubatuba	31/03/2014	<i>Sphyrna lewini</i>	100%
5765	Cais de Ubatuba	31/03/2014	<i>Prionace glauca</i>	100%
5766	Cais de Ubatuba	31/03/2014	<i>Carcharhinus limbatus</i>	100%
5767	Cais de Ubatuba	31/03/2014	<i>Prionace glauca</i>	100%
5769	Cais de Ubatuba	31/03/2014	<i>Prionace glauca</i>	99,80%
5770	Cais de Ubatuba	31/03/2014	<i>Carcharhinus brevipinna</i>	100%
5771	Cais de Ubatuba	31/03/2014	<i>Prionace glauca</i>	98,20%
5772	Cais de Ubatuba	31/03/2014	<i>Prionace glauca</i>	100%
5773	Cais de Ubatuba	31/03/2014	<i>Sphyrna lewini</i>	100%
5774	Cais de Ubatuba	31/03/2014	<i>Carcharhinus brevipinna</i>	100%
5775	Cais de Ubatuba	31/03/2014	<i>Carcharhinus brevipinna</i>	99,30%
5776	Cais de Ubatuba	31/03/2014	<i>Carcharhinus brevipinna</i>	99,80%

5777	Cais de Ubatuba	31/03/2014	<i>Carcharhinus brevipinna</i>	99,60%
5778	Ubatuba	dez/08	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	99,80%
5780	Ubatuba	dez/08	<i>Prionace glauca</i>	100%
5782	Ubatuba	dez/08	<i>Sphyrna zygaena</i>	100%
5783	Ubatuba	dez/08	<i>Squalus cubensis</i>	99,80%
5784	Ubatuba	dez/08	<i>Carcharhinus falciformis</i>	100%
5785	Ubatuba	dez/08	<i>Squalus cubensis</i>	99,60%
5786	Ubatuba	dez/08	<i>Squalus cubensis</i>	100%
5787	Ubatuba	dez/08	<i>Squalus cubensis</i>	99,80%
5789	Ubatuba	dez/08	<i>Squalus cubensis</i>	99,40%
5790	Ubatuba	dez/08	<i>Squalus cubensis</i>	99,85%
5792	Ubatuba	dez/08	<i>Squalus cubensis</i>	99,80%
5793	Ubatuba	dez/08	<i>Squalus cubensis</i>	99,50%
5794	Ubatuba	dez/08	<i>Squalus cubensis</i>	99,80%
5795	Ubatuba	dez/08	<i>Squalus cubensis</i>	99,60%
5796	Ubatuba	dez/08	<i>Squalus cubensis</i>	99,30%
5797	Ubatuba	dez/08	<i>Squalus cubensis</i>	99,30%
5798	Ubatuba	dez/08	<i>Squalus cubensis</i>	99,60%
5799	Ubatuba	dez/08	<i>Squalus cubensis</i>	99,80%
5800	Ubatuba	dez/08	<i>Squalus cubensis</i>	99,80%
5801	Ubatuba	dez/08	<i>Squalus cubensis</i>	99,85%
5803	Ubatuba	dez/08	<i>Mustelus schimitti</i>	98,80%
5806	Ubatuba	dez/08	<i>Squalus cubensis</i>	99,80%
5807	Ubatuba	dez/08	<i>Squalus cubensis</i>	99,90%
5808	Ubatuba	dez/08	<i>Squalus cubensis</i>	99,80%
5810	Ubatuba	dez/08	<i>Squalus cubensis</i>	99,80%
5811	Ubatuba	dez/08	<i>Prionace glauca</i>	100%
5812	Ubatuba	dez/08	<i>Squalus cubensis</i>	99,80%
5813	Ubatuba	dez/08	<i>Prionace glauca</i>	98,20%
5814	Ubatuba	dez/08	<i>Prionace glauca</i>	100%
5815	Ubatuba	dez/08	<i>Squalus cubensis</i>	99,80%
5816	Ubatuba	dez/08	<i>Prionace glauca</i>	99,60%
5817	Ubatuba	dez/08	<i>Squalus cubensis</i>	99,80%

5819	Ubatuba	dez/08	<i>Squalus cubensis</i>	99,80%
5820	Ubatuba	dez/08	<i>Prionace glauca</i>	99,80%
5821	Ubatuba	dez/08	<i>Prionace glauca</i>	100%
5822	Ubatuba	dez/08	<i>Squalus cubensis</i>	99,80%
5823	Ubatuba	dez/08	<i>Squalus cubensis</i>	98,90%
5824	Ubatuba	dez/08	<i>Squalus cubensis</i>	99,80%
5825	Ubatuba	dez/08	<i>Squalus cubensis</i>	99,80%
5826	Ubatuba	dez/08	<i>Sphyrna zygaena</i>	100%
5828	Ubatuba	dez/08	<i>Rhizoprionodon terraenovae</i>	100%
5829	Ubatuba	dez/08	<i>Prionace glauca</i>	100%
5830	Ubatuba	dez/08	<i>Sphyrna lewini</i>	100%
5831	Ubatuba	dez/08	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%
5835	Ubatuba	dez/08	<i>Sphyrna zygaena</i>	100%
5836	Ubatuba	dez/08	<i>Sphyrna zygaena</i>	100%
5837	Ubatuba	dez/08	<i>Sphyrna zygaena</i>	100%
5838	Ubatuba	dez/08	<i>Sphyrna zygaena</i>	100%
5839	Ubatuba	dez/08	<i>Sphyrna lewini</i>	98,30%
5840	Ubatuba	dez/08	<i>Sphyrna zygaena</i>	100%
5841	Ubatuba	dez/08	<i>Sphyrna lewini</i>	100%
5842	Ubatuba	dez/08	<i>Rhizoprionodon terraenovae</i>	100%
5843	Ubatuba	dez/08	<i>Sphyrna zygaena</i>	100%
5846	Ubatuba	dez/08	<i>Sphyrna zygaena</i>	99,80%
5847	Ubatuba	dez/08	<i>Prionace glauca</i>	99,80%
5848	Ubatuba	dez/08	<i>Prionace glauca</i>	99,80%
5849	Ubatuba	dez/08	<i>Prionace glauca</i>	100%
5852	Ubatuba	dez/08	<i>Prionace glauca</i>	99,60%
5853	Ubatuba	dez/08	<i>Alopias superciliosus</i>	100%
5854	Ubatuba	dez/08	<i>Prionace glauca</i>	100%
5855	Ubatuba	dez/08	<i>Prionace glauca</i>	100%
5856	Ubatuba	dez/08	<i>Prionace glauca</i>	100%
5857	Ubatuba	dez/08	<i>Prionace glauca</i>	100%
5858	Ubatuba	dez/08	<i>Prionace glauca</i>	100%
5859	Ubatuba	dez/08	<i>Prionace glauca</i>	100%

5860	Ubatuba	dez/08	<i>Prionace glauca</i>	100%
5861	Ubatuba	dez/08	<i>Prionace glauca</i>	100%
5862	Ubatuba	dez/08	<i>Prionace glauca</i>	99,80%
5863	Ubatuba	dez/08	<i>Prionace glauca</i>	100%
5866	Ubatuba	dez/08	<i>Prionace glauca</i>	100%
5868	Ubatuba	dez/08	<i>Prionace glauca</i>	100%
5869	Ubatuba	dez/08	<i>Prionace glauca</i>	98,60%
5870	Ubatuba	dez/08	<i>Prionace glauca</i>	98,40%
5871	Ubatuba	dez/08	<i>Squatina guggenheim</i>	99,80%
5872	Ubatuba	dez/08	<i>Prionace glauca</i>	100%
5873	Ubatuba	dez/08	<i>Prionace glauca</i>	100%
5875	Ubatuba	dez/08	<i>Prionace glauca</i>	99,60%
5876	Ubatuba	dez/08	<i>Prionace glauca</i>	99,80%
5879	Ubatuba	dez/08	<i>Alopias superciliosus</i>	99,60%
5882	Ubatuba	dez/08	<i>Prionace glauca</i>	99,30%
5883	Ubatuba	dez/08	<i>Prionace glauca</i>	100%
5884	Ubatuba	dez/08	<i>Prionace glauca</i>	100%
5887	Ubatuba	dez/08	<i>Prionace glauca</i>	99,80%
5890	Cananéia	mar/09	<i>Sphyrna lewini</i>	99,70%
5900	Cananéia	mar/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	98,50%
5908	Cananéia	mar/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	99,80%
5909	Cananéia	mar/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	99,80%
5910	Cananéia	mar/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	98,90%
5914	Cananéia	mar/09	<i>Rhizoprionodon terraenovae</i>	99,50%
5915	Cananéia	mar/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	98,80%
5917	Cananéia	mar/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	99,30%
5918	Cananéia	mar/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%
5939	Cananéia	mar/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%
5941	Cananéia	mar/09	<i>Sphyrna lewini</i>	100%
5944	Cananéia	mar/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%
5945	Cananéia	mar/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%
5946	Cananéia	mar/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	99,40%
5948	Cananéia	mar/09	<i>Sphyrna lewini</i>	99,70%

5949	Cananéia	mar/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%
5950	Cananéia	mar/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	99,80%
5954	Cananéia	mar/09	<i>Sphyrna lewini</i>	99%
5956	Cananéia	mar/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%
5958	Cananéia	mar/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%
5960	Cananéia	mar/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%
5962	Cananéia	mar/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	98%
5964	Cananéia	mar/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	98,20%
5965	Cananéia	mar/09	<i>Sphyrna lewini</i>	100%
5966	Cananéia	mar/09	<i>Sphyrna lewini</i>	99,80%
5970	Cananéia	mar/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	98,40%
5973	Cananéia	mar/09	<i>Sphyrna lewini</i>	99%
5979	Cananéia	mar/09	<i>Sphyrna lewini</i>	100%
5984	Cananéia	mar/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	99,80%
5986	Cananéia	mar/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	99,80%
5990	Cananéia	mar/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%
5991	Cananéia	mar/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%
5992	Cananéia	mar/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%
5993	Cananéia	mar/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%
5995	Cananéia	mar/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%
5996	Cananéia	mar/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%
5997	Cananéia	mar/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	99,60%
5998	Cananéia	mar/09	<i>Rhizoprionodon terraenovae</i>	99,60%
5999	Cananéia	mar/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	99,70%
6003	Cananéia	mar/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	98%
6004	Cananéia	mar/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	99,40%
6005	Cananéia	mar/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	99,80%
6007	Cananéia	mar/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	98,50%
6009	Cananéia	mar/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%
6010	Cananéia	mar/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	99,70%
6013	Cananéia	mar/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	99,40%
6014	Cananéia	mar/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	99,80%
6016	Cananéia	mar/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%

6018	Cananéia	mar/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%
6019	Cananéia	mar/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	99,60%
6021	Cananéia	mar/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	99%
6025	Cananéia	mar/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	99,80%
6026	Cananéia	mar/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	99,20%
6027	Cananéia	mar/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	99,20%
6029	Cananéia	mar/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	99,80%
6032	Cananéia	mar/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	98,60%
6033	Santos Lote 2	mai/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	99,60%
6034	Santos Lote 2	mai/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	99,60%
6035	Santos Lote 2	mai/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%
6036	Santos Lote 2	mai/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	99,80%
6037	Santos Lote 2	mai/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%
6038	Santos Lote 2	mai/09	<i>Sphyrna lewini</i>	99,80%
6039	Santos Lote 2	mai/09	<i>Carcharhinus brevipinna</i>	100%
6040	Santos Lote 2	mai/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	99,50%
6041	Santos Lote 2	mai/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	99,80%
6042	Santos Lote 2	mai/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%
6044	Santos Lote 2	mai/09	<i>Sphyrna zygaena</i>	99,40%
6046	Santos Lote 2	mai/09	<i>Carcharhinus brevipinna</i>	100%
6047	Santos Lote 2	mai/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%
6048	Santos Lote 2	mai/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	99,80%
6050	Santos Lote 2	mai/09	<i>Rhizoprionodon terraenovae</i>	99,20%
6052	Santos Lote 2	mai/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	99,50%
6053	Santos Lote 2	mai/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	99,30%
6054	Santos Lote 2	mai/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%
6057	Santos Lote 2	mai/09	<i>Sphyrna lewini</i>	99,10%
6058	Santos Lote 2	mai/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	99%
6059	Santos Lote 2	mai/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	99%
6060	Santos Lote 2	mai/09	<i>Carcharhinus falciformis</i>	98,40%
6061	Santos Lote 2	mai/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	98,90%
6064	Santos Lote 2	mai/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	99,50%
6065	Santos Lote 2	mai/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%

6067	Santos Lote 2	mai/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%
6071	Santos Lote 2	mai/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%
6073	Santos Lote 2	mai/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	99,20%
6074	Santos Lote 2	mai/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%
6075	Santos Lote 2	mai/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%
6076	Santos Lote 2	mai/09	<i>Rhizoprionodon terraenovae</i>	99,80%
6078	Santos Lote 2	mai/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	99,80%
6101	Santos Lote 2	mai/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	99,60%
6103	Santos Lote 2	mai/09	<i>Sphyrna lewini</i>	100%
6147	Santos Lote 2	mai/09	<i>Sphyrna lewini</i>	98,60%
6149	Santos Lote 2	mai/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	99,60%
6150	Santos Lote 2	mai/09	<i>Sphyrna lewini</i>	100%
6151	Santos Lote 2	mai/09	<i>Sphyrna lewini</i>	98,50%
6156	Santos Lote 2	mai/09	<i>Sphyrna lewini</i>	99,60%
6162	Santos Lote 2	mai/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%
6163	Santos Lote 2	mai/09	<i>Sphyrna lewini</i>	100%
6232	Santos Lote 2	mai/09	<i>Sphyrna lewini</i>	98,40%
6235	Santos Lote 2	mai/09	<i>Sphyrna lewini</i>	98,90%
6237	Santos Lote 2	mai/09	<i>Sphyrna lewini</i>	99,50%
6244	Santos Lote 2	mai/09	<i>Sphyrna lewini</i>	99,80%
6245	Santos Lote 2	mai/09	<i>Sphyrna lewini</i>	100%
6246	Santos Lote 2	mai/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	99,50%
6247	Santos Lote 2	mai/09	<i>Sphyrna lewini</i>	98,90%
6248	Santos Lote 2	mai/09	<i>Sphyrna lewini</i>	99,80%
6249	Santos Lote 2	mai/09	<i>Sphyrna lewini</i>	100%
6250	Santos Lote 2	mai/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%
6270	Santos Lote 2	mai/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	98,80%
6271	Santos Lote 2	mai/09	<i>Sphyrna lewini</i>	100%
6273	Santos Lote 2	mai/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%
6275	Santos Lote 2	mai/09	<i>Sphyrna lewini</i>	100%
6276	Santos Lote 2	mai/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	99,10%
6278	Santos Lote 2	mai/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%
6288	Santos Lote 2	mai/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%

6289	Santos Lote 2	mai/09	<i>Sphyrna lewini</i>	99,40%
6293	Santos Lote 2	mai/09	<i>Sphyrna lewini</i>	99,60%
6294	Santos Lote 2	mai/09	<i>Sphyrna lewini</i>	98,90%
6297	Santos Lote 2	mai/09	<i>Sphyrna lewini</i>	99,60%
6298	Santos Lote 2	mai/09	<i>Sphyrna lewini</i>	99,80%
6299	Santos Lote 2	mai/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	99,40%
6301	Santos Lote 2	mai/09	<i>Sphyrna lewini</i>	100%
6302	Santos Lote 2	mai/09	<i>Sphyrna lewini</i>	99,60%
6303	Santos Lote 2	mai/09	<i>Sphyrna zygaena</i>	99,30%
6304	Santos Lote 2	mai/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%
6319	Santos Lote 2	mai/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%
6320	Santos Lote 2	mai/09	<i>Sphyrna lewini</i>	99,60%
6321	Santos Lote 2	mai/09	<i>Sphyrna lewini</i>	100%
6322	Santos Lote 2	mai/09	<i>Sphyrna lewini</i>	100%
6326	Santos Lote 2	mai/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	98,50%
6340	Santos Lote 2	mai/09	<i>Sphyrna lewini</i>	100%
6342	Santos Lote 2	mai/09	<i>Sphyrna lewini</i>	99,20%
6344	Santos Lote 2	mai/09	<i>Sphyrna lewini</i>	99,60%
6345	Santos Lote 2	mai/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	99,60%
6346	Santos Lote 2	mai/09	<i>Sphyrna lewini</i>	100%
6348	Santos Lote 2	mai/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	99,80%
6349	Santos Lote 2	mai/09	<i>Sphyrna lewini</i>	99,20%
6357	Santos Lote 2	mai/09	<i>Sphyrna lewini</i>	99,80%
6358	Santos Lote 2	mai/09	<i>Sphyrna lewini</i>	98,90%
6359	Santos Lote 2	mai/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	99,10%
6360	Santos Lote 2	mai/09	<i>Sphyrna lewini</i>	98,50%
6363	Santos Lote 2	mai/09	<i>Sphyrna lewini</i>	99,20%
6364	Santos Lote 2	mai/09	<i>Carcharhinus falciformis</i>	99,30%
6365	Santos Lote 2	mai/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%
6381	Santos Lote 2	mai/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%
6382	Santos Lote 2	mai/09	<i>Sphyrna lewini</i>	99%
6383	Santos Lote 2	mai/09	<i>Sphyrna lewini</i>	98%
6384	Santos Lote 2	mai/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%

6386	Santos Lote 2	mai/09	<i>Rhizoprionodon porosus</i>	99,80%
6387	Santos Lote 2	mai/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	98,90%
6388	Santos Lote 2	mai/09	<i>Sphyrna lewini</i>	99,80%
6389	Santos Lote 2	mai/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%
6390	Santos Lote 2	mai/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%
6403	Santos Lote 2	mai/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%
6406	Santos Lote 2	mai/09	<i>Carcharhinus brevipinna</i>	100%
6409	Santos Lote 2	mai/09	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%
6653	Mercado de peixe Santos	21 nov/2014	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	99,80%
6654	Mercado de peixe Santos	21 nov/2014	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%
6655	Mercado de peixe Santos	21 nov/2014	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%
6656	Mercado de peixe Santos	21 nov/2014	<i>Sphyrna lewini</i>	100%
6657	Mercado de peixe Santos	21 nov/2014	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%
6658	Mercado de peixe Santos	21 nov/2014	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%
6659	Mercado de peixe Santos	21 nov/2014	<i>Sphyrna lewini</i>	100%
6664	Mercado de peixe Santos	21 nov/2014	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	98,40%
6666	Mercado de peixe Santos	21 nov/2014	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	97,80%
6668	Mercado de peixe Santos	21 nov/2014	<i>Sphyrna lewini</i>	100%
6669	Mercado de peixe Santos	21 nov/2014	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%
6672	Mercado de peixe Santos	21 nov/2014	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%
6673	Mercado de peixe Santos	21 nov/2014	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%
6674	Mercado de peixe Santos	21 nov/2014	<i>Sphyrna lewini</i>	100,00%
6675	Mercado de peixe Santos	21 nov/2014	<i>Sphyrna lewini</i>	99,60%
6676	Mercado de peixe Santos	21 nov/2014	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%
6678	Mercado de peixe Santos	21 nov/2014	<i>Sphyrna lewini</i>	99,80%
6679	Mercado de peixe Santos	21 nov/2014	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	99,80%
6682	Mercado de peixe Santos	21 nov/2014	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%
6683	Mercado de peixe Santos	21 nov/2014	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%
6684	Mercado de peixe Santos	21 nov/2014	<i>Rhizoprionodon terraenovae</i>	99,60%
6685	Mercado de peixe Santos	21 nov/2014	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%
6686	Mercado de peixe Santos	21 nov/2014	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%
6687	Mercado de peixe Santos	21 nov/2014	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%
6688	Mercado de peixe Santos	21 nov/2014	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%

6689	Mercado de peixe Santos	21 nov/2014	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%
6690	Mercado de peixe Santos	21 nov/2014	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%
6691	Mercado de peixe Santos	21 nov/2014	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%
6692	Mercado de peixe Santos	21 nov/2014	<i>Sphyrna lewini</i>	100%
6693	Mercado de peixe Santos	21 nov/2014	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%
6694	Mercado de peixe Santos	21 nov/2014	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%
6695	Mercado de peixe Santos	21 nov/2014	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%
6696	Mercado de peixe Santos	21 nov/2014	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%
6697	Mercado de peixe Santos	21 nov/2014	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%
6698	Mercado de peixe Santos	21 nov/2014	<i>Sphyrna lewini</i>	100%
6699	Mercado de peixe Santos	21 nov/2014	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	99,80%
6700	Mercado de peixe Santos	21 nov/2014	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%
6701	Mercado de peixe Santos	21 nov/2014	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%
6702	Mercado de peixe Santos	21 nov/2014	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%
6703	Mercado de peixe Santos	21 nov/2014	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	98,80%
6704	Mercado de peixe Santos	21 nov/2014	<i>Rhizoprionodon terraenovae</i>	100%
6705	Mercado de peixe Santos	21 nov/2014	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%
6706	Mercado de peixe Santos	21 nov/2014	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%
6707	Mercado de peixe Santos	21 nov/2014	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%
6708	Mercado de peixe Santos	21 nov/2014	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%
6711	Mercado de peixe Santos	21 nov/2014	<i>Sphyrna lewini</i>	100%
6713	Mercado de peixe Santos	21 nov/2014	<i>Sphyrna lewini</i>	99,80%
6714	Mercado de peixe Santos	21 nov/2014	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%
6716	Mercado de peixe Santos	21 nov/2014	<i>Xiphias gladius</i>	100%
6717	Mercado de peixe Santos	21 nov/2014	<i>Xiphias gladius</i>	100%
6718	Mercado de peixe Santos	21 nov/2014	<i>Sphyrna lewini</i>	100%
6897	Mercado de peixe Santos	fev/15	<i>Sphyrna lewini</i>	100%
6913	Mercado de peixe Santos	fev/15	<i>Sphyrna lewini</i>	100%
6914	Mercado de peixe Santos	fev/15	<i>Sphyrna lewini</i>	100%
6923	Mercado de peixe Santos	fev/15	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%
6927	Mercado de peixe Santos	fev/15	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	99,80%
6928	Mercado de peixe Santos	fev/15	<i>Sphyrna zygaena</i>	100%
6937	Mercado de peixe Santos	fev/15	<i>Sphyrna lewini</i>	99,80%

6938	Mercado de peixe Santos	fev/15	<i>Sphyrna lewini</i>	99,40%
6940	Mercado de peixe Santos	fev/15	<i>Rhizoprionodon porosus</i>	100%
6943	Mercado de peixe Santos	fev/15	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	100%
6988	Mercado de peixe Santos	fev/15	<i>Prionace glauca</i>	99,60%
6992	Mercado de peixe Santos	fev/15	<i>Carcharhinus falciformis</i>	99,80%
7419	Entrepasto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	100%
7420	Entrepasto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	100%
7421	Entrepasto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	100%
7422	Entrepasto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	99,85%
7423	Entrepasto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	100%
7424	Entrepasto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	100%
7425	Entrepasto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	100%
7427	Entrepasto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	100%
7428	Entrepasto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	100%
7430	Entrepasto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	98,21%
7431	Entrepasto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	100%
7432	Entrepasto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	100%
7433	Entrepasto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	99,60%
7517	Entrepasto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	100%
7518	Entrepasto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	100%
7519	Entrepasto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	100%
7520	Entrepasto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	100%
7521	Entrepasto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	100%
7522	Entrepasto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	100%
7523	Entrepasto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	100%
7524	Entrepasto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	100%
7526	Entrepasto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	99,88%
7527	Entrepasto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	100%
7528	Entrepasto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	99,74%
7529	Entrepasto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	99,36%
7530	Entrepasto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	100%
7531	Entrepasto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	100%
7532	Entrepasto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	100%

7533	Entrepuesto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	99,88%
7534	Entrepuesto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	100%
7535	Entrepuesto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	99,78%
7536	Entrepuesto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	100%
7537	Entrepuesto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	100%
7538	Entrepuesto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	100%
7539	Entrepuesto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	100%
7540	Entrepuesto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	100%
7541	Entrepuesto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	100%
7542	Entrepuesto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	100%
7543	Entrepuesto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	100%
7544	Entrepuesto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	100%
7545	Entrepuesto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	99,81%
7546	Entrepuesto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	100%
7547	Entrepuesto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	100%
7548	Entrepuesto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	100%
7549	Entrepuesto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	100%
7550	Entrepuesto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	100%
7551	Entrepuesto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	99,85%
7552	Entrepuesto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	100%
7553	Entrepuesto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	99,54%
7555	Entrepuesto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	100%
7584	Entrepuesto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	98,90%
7586	Entrepuesto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	100%
7589	Entrepuesto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	99,05%
7592	Entrepuesto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	99,50%
7593	Entrepuesto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	100%
7599	Entrepuesto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	98,80%
7600	Entrepuesto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	99,74%
7602	Entrepuesto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	98,34%
7604	Entrepuesto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	100%
7606	Entrepuesto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	100%
7607	Entrepuesto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	100%

7611	Entrepuesto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	99,66%
7613	Entrepuesto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	100%
7617	Entrepuesto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	100%
7618	Entrepuesto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	100%
7619	Entrepuesto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	99,68%
7620	Entrepuesto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	98,67%
7622	Entrepuesto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	98,74%
7625	Entrepuesto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	99,82%
7628	Entrepuesto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	100%
7629	Entrepuesto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	98,38%
7631	Entrepuesto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	100%
7632	Entrepuesto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	99,82%
7633	Entrepuesto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	100%
7634	Entrepuesto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	100%
7636	Entrepuesto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	100%
7637	Entrepuesto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	100%
7638	Entrepuesto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	100%
7639	Entrepuesto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	100%
7641	Entrepuesto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	99,80%
7642	Entrepuesto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	100%
7643	Entrepuesto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	100%
7644	Entrepuesto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	99,70%
7645	Entrepuesto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	100%
7646	Entrepuesto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	99,40%
7647	Entrepuesto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	100%
7650	Entrepuesto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	99,20%
7652	Entrepuesto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	100%
7653	Entrepuesto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	100%
7654	Entrepuesto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	100%
7655	Entrepuesto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	100%
7657	Entrepuesto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	100%
7659	Entrepuesto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	99,80%
7660	Entrepuesto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	100%

7661	Entrepuesto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	100%
7666	Entrepuesto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	99,80%
7667	Entrepuesto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	100%
7670	Entrepuesto Santos	jun/15	<i>Prionace glauca</i>	100%