

**Brazilian Journal of Forensic Sciences,
Medical Law and Bioethics**

Journal homepage: www.ipebj.com.br/forensicjournal



**Identificação de Espécies de Animais Silvestres por Meio de
Sequências Mitocondriais Utilizados no Combate aos Crimes Contra a
Fauna – Mato Grosso – Brasil**

**Identification of Species of Wildlife by Mitochondrial Sequences Used in
Combating Crimes against Fauna – Mato Grosso – Brazil**

Reginaldo Rossi do Carmo^{1,2}, Ângela Regina Serafine Garcez³, Klaucia Rodrigues
Vasconcelos³, Diniz Pereira Leite Júnior^{3,4,*}, Elisangela Santana de Oliveira Dantas^{1,3},
Flávia Galindo Silvestre Silva⁵, Rogério Pincela Mateus²

¹ *Perícia Oficial de Identificação Técnica (POLITEC), Carumbé, Cuiabá, MT, Brasil*

² *Laboratório de Genética e Evolução, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Centro Oeste (UNICENTRO), 85040080, Guarapuava, PR, Brasil*

³ *Centro Universitário de Várzea Grande (UNIVAG), 78118-900, Várzea Grande, MT, Brasil*

⁴ *Laboratório de Investigação, Faculdade de Medicina, Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), 78060-900, Cuiabá, MT, Brasil*

⁵ *Universidade de Cuiabá (UNIC), 78065-900, Cuiabá, MT, Brasil*

* Corresponding author: *Laboratório de Investigação, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Mato Grosso, Av. Fernando Correa da Costa, 2367, Boa Esperança, 78060-900, Cuiabá, MT. Fone: +55(65)3615-8809. Email: djbiologico@gmail.com*

Received 02 March 2017

Resumo. O Brasil possui uma importância inquestionável no cenário da biodiversidade global o que o torna um dos países mais visados para este que é o terceiro maior comércio ilícito do mundo, o tráfico de animais silvestres. Mesmo com o reconhecimento da técnica molecular como importante ferramenta na identificação, ainda paira uma discussão sobre qual o melhor segmento de DNA a ser utilizado Cytb ou COI e se estes são efetivos para amostras degradadas, como é o caso das amostras forenses. Objetivo foi contribuir para dissolução dos questionamentos e depositar no banco de dados GenBank® as sequências de DNA mitocondrial geradas. As

amostras foram divididas em dois grupos, chamadas de amostras referências (R) (coletadas de animais do Zoológico da UFMT) e amostras questionadas (Q) (apreendidas e encaminhadas ao laboratório da POLITEC para identificação da espécie). Após extração, amplificação e sequenciamento, as amostras sequenciais foram confrontadas com amostras já depositadas no GenBank®. Os melhores resultados foram obtidos para as sequências mais curtas do Cytb. Em apenas 10% das espécies conseguiu-se sucesso no sequenciamento do segmento COI. As amostras obtidas, quando confrontadas com as sequências no GenBank® apresentou similaridade entre 93,9% a 100%, com exceção da amostra de *Leopardus pardalis* que resultou em 91,9% de similaridade com a espécie *Prionailurus bengalensis*. O confronto direto entre a amostra referência e a amostra questionada da espécie *Leopardus pardalis* apresentou índice de similaridade superior a 99%. Para as demais sequências foram obtidos índices de similaridade de 98,3% para espécie *Tupinambis merianae*, seguidos de 97% para *Hydrochoerus hydrochaeris*, *Tapirus terrestris* e *Euphractus sexcinctus*, respectivamente; 96,5% para *Ramphasto toco*, 96,1% para *Amazona guildingii*, 94,3% para as espécies *Pecari tajacu*, *Rhynchotus rufescens*, *Leptotila verreauxi* e *Tupinambis teguixin*, respectivamente. Desta forma este trabalho contribuiu para padronizar e mostrar a eficiência da técnica e a necessidade de se realizar sequenciamento da fauna silvestre brasileira para disponibilizá-los nos bancos de dados públicos e facilitar o combate ao tráfico de animais silvestres.

Palavras-chave: Ciências forenses; DNA mitocondrial; Animais silvestre; Fauna brasileira; GenBank.

Abstract. The Brazil has an unquestionable importance in the setting of global biodiversity which makes it one of the countries most targeted to this which is the third largest illicit trade of the world, the trafficking of wild animals. Even with the recognition of technique as important tool in identifying, still hangs a discussion about what the best segment of DNA to be used (Cytb or IOC) and if these are effective for degraded samples, as is the case of forensic samples. Objective was to contribute to the dissolution of the questioning and deposit in the GenBank database of mitochondrial DNA sequences generated. The samples were divided into two groups, calls to reference samples (collected animals of the Zoo of UFMT) and challenged samples (sent to Technical Scientific Police laboratory for species identification). After extraction, amplification and sequencing, the sequences were confronted with samples already deposited in GenBank. The best results were obtained for the shorter sequences of Cytb. In only 10% of species achieved success in sequencing the IOC segment. The resulting sequences of samples references, when faced with the sequences deposited in GenBank showed similarity between 100% 93.9%, with the

exception of the sample *Leopardus pardalis* which resulted in 91.9% of similarity with the species *Prionailurus bengalensis*. For the resulting sequences of samples questioned obtained similarity index greater than 97% of species of *Hydrochoerus hydrochaeris*, *Tapirus terrestris* and *Euphractus sexcinctus*. For the obtained sequences of species, *Pecari tajacu*, *Rhynchotus rufescens*, *Leptotila verreauxi* and *Tupinambis teguixin*, the index of similarity was of 94.3% with *Pecari tajacu*, 96.5% with *Ramphasto toco*, 96.1% with *Amazona guildingii* and 98.3% with the species *Tupinambis merianae*, respectively. Thus this work contributed to standardize and show the efficiency of the technique and the need to carry out a major project of sequencing of the entire fauna Silvestre Brazilian to make them available in public databases.

Keywords: Forensic Sciences; Mitochondrial DNA; Wildlife; Brazilian Fauna; GenBank.

1. Introdução

O Brasil possui uma importância inquestionável no cenário da biodiversidade global, pois apresenta uma das maiores diversidades de mamíferos e aves do mundo, incluindo exemplares não encontrados em nenhum outro lugar, tais como peixe boi, boto-rosa e a arara-azul-de-lear¹. Segundo dados apresentados pelo Ministério do Meio Ambiente (MMA) estimam-se que existam no país mais de 11 mil espécies de vertebrados, mais de 30 mil espécies de insetos e aproximadamente 30 mil espécies de outros invertebrados¹.

A legislação ambiental brasileira é uma das mais abrangentes e detalhadas, as 17 leis ambientais mais importantes já proveriam mecanismos que garantiriam a proteção e preservação de todo patrimônio ambiental brasileiro, isto se fossem devidamente cumpridas². De acordo com este mesmo autor² no contexto de crime contra a fauna, a Lei da Fauna Silvestre de nº 5.197 de 03/01/1967 merece destaque pois esta foi um marco no combate ao crime contra a fauna por ser a primeira a tipificar como crime a utilização, perseguição, destruição ou caça de animais silvestre.

Dois documentos são particularmente importantes para complementar as informações quanto ao nível de ameaça de extinção a que está submetida a espécie: a Livro vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção³ e a Convenção sobre o comércio Internacional de Espécies da Flora e Fauna selvagens em Perigo de Extinção⁴.

Com o intuito de coibir o tráfico e ações delituosas contra o meio ambiente, o estado de Mato Grosso implantou, em agosto de 1996, o primeiro juizado volante

ambiental (JUVAM) do país⁵. O juizado ambiental funciona como uma equipe volante que recebe as denúncias e se desloca até o local, com a finalidade de fazer a constatação *in loco*, quantificar o dano ambiental e apresentar sugestões para reparação quando este se fizer necessário.

Na ciência forense, o método de identificação por pêlos e penas em soluções de crimes contra a fauna tem suas vantagens por ser econômico e rápido. Porém a identificação por este método é inviabilizada se o material apreendido não contiver material necessário com características morfológicas suficientemente diferenciadas para permitir a identificação, dessa forma gerando a hipótese de que material encontrado na amostra não seja do referido animal tornando a identificação questionável⁶.

A identificação genética das espécies desempenha um papel fundamental na investigação do comércio ilegal de espécies selvagens protegidas ou ameaçadas de extinção, principalmente nos biomas mato-grossenses Amazônia, Cerrado e Pantanal. Nos últimos anos, foram registrados progressos e desenvolvimento de estratégias de codificação de DNA, que envolvem sequenciamento de códigos de barras para a detecção simultânea de espécies, em especial de materiais biológicos processados contendo DNA degradado, com intuito na identificação de espécies, principalmente aquelas ameaçadas de extinção. Este trabalho tem como objetivo fornecer subsídios e informações dos bancos de dados que congregam informações de sequências de nucleotídeos, com ênfase no auxílio das identificações para as práticas forenses, com intuito gerara informações e coibir o comercio ilegal e o tráfico de animais silvestre em Mato Grosso, região central do Brasil.

2. Materiais e métodos

O critério para seleção das amostras, foram obtidas de acordo com o encaminhamento de material de apreendido (caça-ilegal) na rotina de fiscalização ambiental dentro do Estado de Mato Grosso no período de Janeiro a Junho de 2014 e posteriormente encaminhados para a Perícia Oficial de Identificação Técnica do Estado de Mato Grosso – POLITEC e também de animais aprendidos e encaminhados ao Zoológico da Universidade Federal de Mato Grosso, para a identificação taxonômica.

Deliberadamente foram classificados como animais de interesse criminal aqueles

que, segundo informações não oficiais dos órgãos de fiscalização do Estado de Mato Grosso, foram os mais visados em crimes ambientais. As amostras estudadas foram divididas em dois grupos, os quais foram denominados de amostras referências (R) e amostras questionada (Q) ou amostra desconhecida.

As amostras referências (R)⁷, consistiram de materiais biológicos; onde foram coletadas amostras de sangue de três indivíduos de cada espécie amostral, utilizando procedimentos adequados, colocados em tubos anticoagulantes com EDTA e enviados ao laboratório da POLITEC. As amostras foram mantidas congeladas a -20 °C até serem processadas posteriormente para amplificação de DNA, as amostras foram também impregnadas em papel “FTA” (MGM[®]).

As coletas foram realizadas pelos pesquisadores/biólogos e equipe técnica veterinária do Zoológico da Universidade Federal de Mato Grosso/UFMT, para o confronto com as amostras consideradas questionadas. As amostras de sangue foram coletados de espécies da fauna mato-grossense: *Brotogeris versicolurus* (periquito verde), *Pionus menstruus* (maritaca da cabeça azul), *Amazona aestiva* (papagaio verdadeiro), *Ara chloropterus* (arara vermelha), *Ara ararauna* (arara canindé), *Anodorhynchus hyacinthinus* (arara Azul grande), *Ara macao* (araracanga), *Mazama gouazoubira* (veado catingueiro), *Nasua nasua* (quati), *Myrmecophaga tridactyla* (tamanduá bandeira) e *Leopardus pardalis* (jaguatirica).

O Zoológico da UFMT está localizado na cidade de Cuiabá no Estado de Mato Grosso, dentro do *Campus* da Universidade (15°36'26"S, 56°03'51"O) e abriga aproximadamente 600 animais de 100 espécies diferentes, incluindo répteis, aves e mamíferos dos três ecossistemas regionais: Amazônia, Cerrado e Pantanal. Atualmente o Zoológico da UFMT é a única referência no estado para a guarda de animais apreendidos pelos órgãos fiscalizadores, como a Secretaria Estadual do Meio Ambiente (SEMA), Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA), Polícia Florestal e Juizado Volante Ambiental (JUVAM). Para o tratamento e identificação dos animais, o Zoológico conta com uma equipe exclusiva de biólogos e veterinários, além de poder contar com professores especialistas do Instituto de Biociências da UFMT, órgão ao qual está subordinado.

As amostras questionadas (Q)⁷ consistiram de partes anatômicas de animais

silvestres apreendidos pelos órgãos de fiscalização ambiental e encaminhados ao Laboratório Forense da POLITEC. Inicialmente, os ofícios encaminhados por órgãos e autoridades de apreensão, foram enviados a POLITEC, contendo o provável nome da espécie correspondente contendo nome popular do espécimen apreendido e o respectivo nome científico da espécie de maior ocorrência na região de apreensão. As amostras apreendidas pelas Agências de Inspeção Ambientais foram: *Pecari tajacu* (Cateto) tecido muscular; *Euphractus sexcinctus* (Tatupeba) tecido muscular; *Dasyprocta aguti* (Cutia) tecido muscular; *Leopardus pardalis* (Jaguatirica) fragmento de pele; *Hydrochoerus hydrochaeris* (Capivara) tecido muscular; *Rhynchotus rufescens* (Perdiz) tecido muscular e *Tupinambis teguixin* (Teiu) tecido muscular.

2.1 Isolamento do DNA genômico

O DNA gênomico foi extraído a partir de amostras de sangue impregnado em papel FTA (MGM[®]) (amostras referências) e de fragmentos de tecidos musculares ou pele (amostras questionadas), utilizando-se as técnicas de extração de DNA com Kit Axyprep[™] Multisource Genomic DNA miniprep (Axygen Biosciences[®]) e Extração de DNA com fenol clorofórmio.

2.2 Reação de amplificação e sequenciamento

Para amplificação dos genes mitocondriais utilizou-se a tecnologia da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando-se quatro conjuntos de primers universais COI (*Citocrome Oxidase I*)⁸⁻¹¹: LCO1490 (F'5-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') e HCO2198 (F'5'-TAAA-CTTCAGGTGACCAAAAAATCA-3')⁸; Cytb (*Mitochondrial Citocrome b*): L14724 (F'5'-CGAAGCTTGATATGAAAAACCATCGTTG-3') e H15149 (F'5'-AAACTGCAGCCCCTCA-GAATGAATATTTGTCCTCA-3')⁹; Cytb: CytbF (F'5'-CCATCCAACATCTCCGCATGATGA-AA-3') e CytbR (F'5'-CCCCTCAGAATGATATTTGGCCTCA-3')¹⁰; Cytb: Mcb398 (F'5'-TACCATGAGGACAAATATCATTCTG-3') e Mcb869 (F'5'-CCTCCTAGTTTGTAGGGA-TTGATCG-3')¹¹.

Para garantir a acurácia das sequências obtidas foram sequenciados os dois sentidos da fita de DNA (Forward e Reverse). Na reação de sequenciamento utilizou-se

o Kit BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems®) seguindo as seguintes concentrações para cada 20 µL de reação: 8 µL de BigDye Mix (Applied Biosystems®), 2µL de tampão de sequenciamento 5X (Applied Biosystems®), 3.2 pmoles de primer, 5 ng amostra template, H₂O q.s.p. 20 µL.

Para cada amostra foram utilizados os primers Forward e Reverse de cada par de primer estudado. Para o processo de amplificação foi utilizado o termociclador BioRad MyCycler™ Plus (BioRad®), seguindo os seguintes parâmetros descritos no Manual de Treinamento Applied Biosystems: uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 1 minuto, seguido por 30 ciclos a 95°C por 30 segundos, 55°C por 15 segundos e 60°C por 4 minutos.

2.3 Alinhamento e edição das sequências obtidas

As visualizações, edições e alinhamentos das sequências nucleotídicas obtidas foram realizadas através da interface virtual do programa Clustal W ¹² integradas ao programa Geneious v5.3¹³.

As sequências nucleotídicas obtidas dessas análises foram comparadas com as sequências nucleotídicas dos genes citocromo oxidase b e subunidade I do citocromo oxidase c disponíveis no *GenBank*® ¹⁴, utilizando a interface virtual do programa *Blast – Basic Local Alignment Search Tool*¹⁵ integrada ao programa Geneious v5.3¹³ e as análises genéticas pelo método de Tamura-Nei¹⁶.

4. Resultados e discussão

Dentro do cenário nacional, a capital Cuiabá (15°35'55.36" -56°05'47.25") se destaca no cenário do Estado de Mato Grosso tendo especial importância ambiental, pois reúne três dos principais biomas brasileiros: a floresta amazônica 480.215 Km² (53,6%), o cerrado 354,823 km² (39,6%) e o pantanal 60,885 km² (6,8%) (Figura 1)¹⁷, sua fauna e flora se destaca pela diversidade e pela abundância de espécies presentes nestes ecossistemas.

Woese e Fox¹⁸, trabalhando com sequências conservadas de RNA ribossômico, foram os primeiros a utilizar diferenças de sequências de nucleotídeo para investigar as relações evolutivas¹⁹. No entanto^{20,21} foram os primeiros a reconhecer que as divergências na sequência de mtDNA fornecem um registro da história evolutiva dentro

da espécie, ligando assim genética de populações e sistemática.

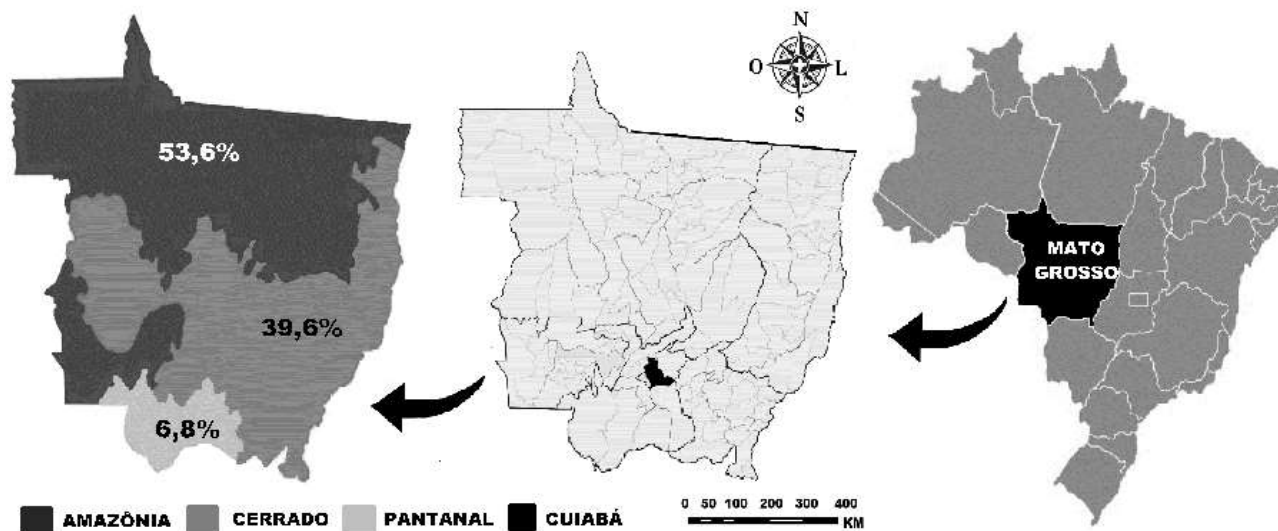


Figura 1. Mapa do Brasil e localização dos respectivos biomas mato-grossenses. A esquerda, destaque dos três biomas da região central do país e seus respectivos percentuais de ocupação territorial. No centro, mapa de Mato Grosso, em destaque a capital de Mato Grosso - Cuiabá e a direita, mapa do Brasil em destaque o estado de Mato Grosso (MATO GROSSO, 2017).

Diversas regiões do DNA mitocondrial podem ser utilizadas na identificação de espécies animais, entre elas, o gene Cytocromo b (cytb), que tem sido uma escolha tradicional para este fim desde sua descoberta^{22,23}. Na literatura, podem ser encontrados inúmeros exemplos do uso desta região na identificação de vertebrados para fins forenses, incluindo mamíferos²⁴, peixes²⁵; répteis²⁶, e aves^{27,28}, inclusive seus ovos²⁹⁻³¹.

Hoje, a análise genética, principalmente em evidência de animais tem sido utilizada com vários objetivos, como em estudos do processo de especiação, análise de parentesco, identificação de registro de raça e identificação específica³². O sucesso na identificação de uma espécie, baseando-se em um banco de dados, é que sua sequência esteja depositada nesse banco para ser comparada. O GenBank®, apesar de deter muitas sequências, estas decorrem de várias regiões do gene³³, o que pode ocasionar a uma comparação entre regiões não homólogas (Tabela 1).

Tabela 1. Análise de abundancia localizados nos bancos dados de DNA e ocorrência de sequências dos segmentos dos genes mitocondriais Cytb e COI de amostras referências e de espécies apreendidas pelas agências de Inspeção ambiental em Mato Grosso-Brasil, no ano de 2014. * Segmentos de Cytb + tRNA. ** Gene mitocondrial completo.

AMOSTRA	Nome científico	Nome popular	Cytb			IOC		
			Menor sequência	Maior sequência	N°. de sequências	Menor sequência	Maior sequência	N°. de sequências
R E F E R E N C I A	<i>Amazona aestiva</i> (Rafinesque, 1815)	Papagaio verdadeiro	595	1138	7	506	694	98
	<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i> (Rafinesque, 1815)	Arara azul grande	820	2636 *	8	460	460	2
	<i>Ara ararauna</i> (Linnaeus, 1758)	Arara canindé	888	2647 *	4	460	570	4
	<i>Ara chloropterus</i> (Gray, 1859)	Arara vermelha	307	928	2	505	505	1
	<i>Ara macao</i> (Linnaeus, 1758)	Araracanga	255	993	5	570	570	1
	<i>Brotogeris versicolurus</i> (Statius Muller, 1776)	Periquito verde	1023	1140	7	460	460	1
	<i>Leopardus pardalis</i> (Linnaeus, 1758)	Jaguatirica	63	165	5	0	0	0
	<i>Mazama gouazoubira</i> (Fischer, 1814)	Veado catingueiro	277	1131	16	587	587	1
	<i>Myrmecophaga tridactyla</i> (Linnaeus, 1758)	Tamanduá bandeira	307	307	4	0	0	0
	<i>Nasua nasua</i> (Linnaeus, 1766)	Quati	397	1140	3	0	0	0
Q U E S T I O N A D A	<i>Pionus menstruus</i> (Linnaeus, 1766)	Maritaca da cabeça azul	1002	1140	19	561	622	3
	<i>Dasyprocta aguti</i> (Linnaeus, 1758)	Cutia	395	1140	31	0	0	0
	<i>Euphractus sexcinctus</i> (Linnaeus, 1758)	Tatupeba	476	476	6	0	0	0
	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i> (Linnaeus, 1766)	Capivara	336	1140	2	0	0	0
	<i>Leopardus pardalis</i> (Linnaeus, 1758)	Jaguatirica	63	165	5	0	0	0
	<i>Leptotila verreauxi</i> (Bonaparte, 1855)	Juriti	1017	1045	9	379	694	16
	<i>Pecari tajacu</i> (Linnaeus, 1758)	Cateto	226	16839 **	42	684	684	1
	<i>Rhynchotus rufescens</i> (Temminck, 1815)	Perdiz	0	0	0	693	694	4
	<i>Tupinambis teguixin</i> (Linnaeus, 1758)	Teiú	298	695	18	0	0	0
	TOTAL			-	-	196	-	-

Diferentemente dos valores encontrados por Jacques²⁹ para ocorrências de genes mitocondriais Cytb e COI nas classes Mammalia e Sauropsida (aproximadamente quatro vezes mais sequências do Cytb), neste estudo foi verificado uma proporção inferior a 2:1 na comparação para estes grupos de espécies. Há de se observar uma análise qualitativa destes dados revelou que esta distorção está relacionada, principalmente, aos valores de COI encontrados para a espécie *Amazona aestiva* (98 sequências), oriundas de um grande número de sequências, com aproximadamente 80% das sequências encontradas (78 sequências). Muitas das sequências depositadas a princípio parecem se tratar de repetidas inserções da mesma sequência, publicadas em trabalhos diferentes.

O tamanho da sequência depositada variou muito no segmento do gene Cytb, variando, nas maiores sequências, de 165 pb na espécie *Leopardus pardalis* à 1140 pb em *Pionus menstruus*. Para o segmento COI, essa variação foi menor, ocorrendo de 460 pb (*Brotogeris versicolurus*) à 694 pb (*Amazona aestiva*). Este saldo tem uma implicância direta sobre o resultado das buscas para a identificação das espécies.

Considerando que diferentes pares de primers podem sequenciar diferentes fragmentos do gene alvo, mesmo que haja a ocorrência da espécie pesquisada; no banco poderá ocorrer um resultado negativo em decorrência da não homologia entre as sequências comparadas. Outra consequência do tamanho da sequência depositada está relacionada ao valor do *Core* recebido na busca por similaridade no banco de dados. A definição do DNA *Barcoding* em empregar uma sequência curta padronizada de 648 pares de bases^{33,34}, a princípio, resolve este problema para o segmento COI.

Com o objetivo de uniformizar o sequenciamento numa única reação para os segmentos Cytb e COI, procurou padronizar o parâmetro de PCR para ambas as sequências, o que se mostrou pouco eficiente, principalmente para a amplificação do gene COI. Para os parâmetros adotados neste estudo, os melhores resultados foram obtidos para as sequências mais curtas do Cytb e segmento de 360 pb¹⁰. Em apenas duas espécies conseguiu-se sucesso no sequenciamento do segmento COI, o que corresponde a aproximadamente 10% de eficiência.

Dentre as 11 espécies estudadas no grupo de amostra referencias (R), sete delas pertenciam à família Psittacidae. Segundo Tavares³⁷, os psitacídeos neotropicais compõem o grupo de espécies mais numeroso da ordem psittaciforme (353 das 373

espécies), sendo o Brasil o país mais rico em representantes dessa família³⁸, tendo suas famílias reclassificadas atualmente^{39,40}. Os psitacídeos apresentam uma grande variação de tamanho, preferência de habitat, distribuição geográfica e comportamento⁴¹.

A justificativa pelo interesse no estudo deste grupo ocorreu devido a fatores que tornam estas espécies particularmente importantes no tocante ao crime contra a fauna, como o fato de aproximadamente 27% das espécies serem consideradas vulneráveis ou ameaçadas de extinção⁴² e a características que as tornam valiosas comercialmente, como sua inteligência, capacidade de imitar a voz humana e sua exuberante plumagem colorida. Com o alinhamento e a correção manual das sequências obtidas do Cytb obteve-se uma matriz de 360 pb. A partir das análises de distância genética realizadas pelo método Tamura-Nei¹⁶ (Tabela 2).

A variabilidade gênica entre as espécies é, em parte, decorrente de eventos mutacionais que se acumulam ao longo do tempo. No caso das mutações pontuais, onde há troca de um único nucleotídeo por outro⁴³. Eventos moleculares como recombinação gênica, mutação, deriva genética e seleção natural alteram frequências alélicas e genotípicas entre populações isoladas de modo que, em longo prazo, estas populações acumulam mudanças que podem refletir profundamente na compreensão de sua posição sistemática, adaptação ecológica e, também, na condução do processo evolutivo da espécie⁴⁴.

Estimativas de tempo de divergência entre espécies são baseadas na taxa de substituição entre as linhagens, desta forma, é coerente esperar que haja maior similaridade entre indivíduos da mesma espécie que entre indivíduos pertencentes a apenas o mesmo gênero. Diferentes estimativas de taxas de frequência têm sido estipuladas. Miyaki⁴⁵, em trabalho realizado com espécies de papagaios, considerou uma taxa de substituição de 1,6% a 2,0% de nucleotídeos por milhão de anos. Presti⁴⁶ avaliando população de *Anodorhynchus hyacinthinus* estimou que as diferenças genéticas entre os grupos estudados ocorreram entre 16 e 42 mil anos.

Com o objetivo de testar a eficiência destas sequências na identificação da espécie, cada uma das sequências amostrais obtidas foi confrontada com o banco de dados usando a interface *Blast* integrada ao programa Geneious v5.3¹³.

Mesmo que, inicialmente, a comparação da sequência do mtDNA não seja suficiente para a identificação específica, ela pode fornecer parâmetros que permitam o

aprofundamento da pesquisa, indicando família ou gênero ao qual pertence a espécie pesquisada. Para isso, no entanto, é necessário que haja conhecimento da filogenia da espécie estudada e do significado da distância genética em cada clado. As consultas realizadas para as espécies de psitacídeos resultaram em grau intra-específico de similaridade com média de 97%, compatível com as espécies esperadas para cada sequência. A média da diferença intra-específica verificada para o segmento do Cytb para todas as espécies referenciais (R) atingiu o percentual de 2,05%.

Hebert⁴⁷ avaliando a comparação entre sequências de COI em 260 espécies de aves mostrou uma diferença média de 0,43% entre indivíduos da mesma espécie, 7,93% entre gêneros e 12,71% entre famílias. Em trabalho anterior, analisando 15 diferentes gêneros, Jacques (29) encontrou um índice médio de similaridade em torno de 93% entre as espécies do mesmo gênero e 98% na comparação entre indivíduos da mesma espécie. Análises realizadas em sequências de aproximadamente 700 pb da região controladora, revelou um índice de similaridade que variou de 93% a 96% em indivíduos da espécie *Anodorhincus hyacinthinus* e de 93% a 99% em indivíduos da espécie *Ararauna*⁴⁸.

Em estudos realizados com amostras de 29 espécies de psittaciformes, distribuídas em 25 gêneros, Tavares³⁷ encontrou valores de frequência que variaram de: A= 29,8% a 32,5% C= 31,2% a 34,6% G= 12,3% a 14,2% e T= 21,2% a 4,5%. Os resultados encontrados neste trabalho corroboram com os resultados encontrados por Tavares³⁷, já que ambos não diferiram significativamente entre si ($P < 0,05$).

O segundo grupo de espécies referência cujo segmento do Cytb foi sequenciado neste estudo é composto por organismos da classe Mammalia, estando representadas pelas espécies *Leopardus pardalis* (Jaguatirica), *Mazama gouazoubira* (veado catingueiro), *Myrmecophaga tridactyla* (Tamanduá bandeira) e *Nasua nasua* (Quati). O interesse forense pelos mamíferos neste estudo deve-se principalmente à atividade de caçadores que predam estes animais para consumo da carne e, em particular no caso dos felinos (onça, jaguatirica, etc.), o qual se destaca o interesse pela pele desses animais, que apresenta alto valor comercial⁴⁹.

Tabela 2. Análise da distância genética Tamura-Nei (1993) para a sequência de 360 pb de bases do segmento Cytb para Psittacideos.

	<i>L.</i> <i>megalura</i>	<i>A.</i> <i>aestiva</i>	<i>A.</i> <i>ararauna</i>	<i>A.</i> <i>hyacinthinus</i>	<i>P.</i> <i>menstruus</i>	<i>B.</i> <i>versicolurus</i>	<i>A.</i> <i>chloropterus</i>	<i>A.</i> <i>macao</i>
<i>Leptotila megalura</i>	-	0.2301	0.2414	0.2470	0.2411	0.2449	0.2437	0.2415
<i>Amazona aestiva</i>	0.2301	-	0.0942	0.0998	0.0939	0.0977	0.0965	0.0943
<i>Ara ararauna</i>	0.2414	0.0942	-	0.0559	0.1052	0.1090	0.0566	0.0544
<i>Anodorhincus hyacinthinus</i>	0.2470	0.0998	0.0559	-	0.1107	0.1145	0.0621	0.0600
<i>Pionus menstruus</i>	0.2411	0.0939	0.1052	0.1107	-	0.0549	0.1074	0.1053
<i>Brotogeris versicolurus</i>	0.2449	0.0977	0.1090	0.1145	0.0549	-	0.1113	0.1091
<i>Ara chloropterus</i>	0.2437	0.0965	0.0566	0.0621	0.1074	0.1113	-	0.0251
<i>Ara macao</i>	0.2415	0.0943	0.0544	0.0600	0.1053	0.1091	0.0251	-

O alinhamento e a correção manual das sequências geraram segmentos que variou de 360 pb em *Leopardus pardalis* e *Myrmecophaga tridactyla* a 470 pb em *Nasua nasua*. Assim como no procedimento adotado para a família Psittacidae, as sequências obtidas no alinhamento foram confrontadas com o banco de dados usando a interface *Blast* integrada ao programa Geneious v5.3¹³.

Leopardus pardalis (Jaguatirica) junto com *Leopardus tigrinus* (gato-do-mato pequeno) e *Leopardus wiedii* (gato-maracajá) são as três espécies do gênero *Leopardus* mais amplamente distribuídas pelo território brasileiro. A espécie encontra-se na lista de animais ameaçados de extinção e criticamente em perigo (3,50) principalmente pela ação de caçadores que comercializam sua pele. Com o alinhamento e a correção manual das sequências obtidas do Cytb obteve-se uma matriz de 360 pb, a qual foi confrontada com sequências já depositadas no *GenBank*[®] e as análises de distância genética realizadas pelo método Tamura-Nei¹⁶ descritos na (Tabela 3).

Tabela 3. Análise da distância genética Tamura-Nei (1993) para a sequência de 360 pb de bases do segmento Cytb para segmento de base para a espécie *Leopardus pardalis*.

	C.	F.	F.	L.	L.	L.	L.	P.	P.	P.	P.	P.	L.	L.	N.	P.
	<i>temminckii</i>	<i>catus</i>	<i>silvestris</i>	<i>pardalis</i>	<i>canadensis</i>	<i>pardinus</i>	<i>rufus</i>	<i>leo</i>	<i>pardus</i>	<i>tigris</i>	<i>marmorata</i>	<i>bengalensis</i>	<i>pardalis</i>	<i>Lynx</i>	<i>Nebula</i>	<i>concolor</i>
													(query)			
<i>Catopuma temminckii</i>	-	0.1337	0.1288	0.1442	0.1102	0.1064	0.1383	0.1513	0.1673	0.1486	0.1099	0.1232	0.1336	0.1160	0.1405	0.1333
<i>Felis catus</i>	0.1337	-	0.0233	0.1407	0.1265	0.1227	0.1578	0.1570	0.1730	0.1543	0.1295	0.1197	0.1301	0.1323	0.1461	0.1529
<i>Felis silvestris</i>	0.1288	0.0233	-	0.1358	0.1215	0.1177	0.1529	0.1520	0.1680	0.1493	0.1245	0.1148	0.1251	0.1274	0.1412	0.1479
<i>Leopardus pardalis</i>	0.1442	0.1407	0.1358	-	0.1369	0.1331	0.1683	0.1674	0.1834	0.1647	0.1399	0.1116	0.0578	0.1428	0.1566	0.1633
<i>Lynx canadensis</i>	0.1102	0.1265	0.1215	0.1369	-	0.0497	0.1343	0.1440	0.1600	0.1413	0.1059	0.1159	0.1263	0.0636	0.1332	0.1293
<i>Lynx pardinus</i>	0.1064	0.1227	0.1177	0.1331	0.0497	-	0.1305	0.1402	0.1562	0.1375	0.1021	0.1121	0.1225	0.0598	0.1294	0.1255
<i>Lynx rufus</i>	0.1383	0.1578	0.1529	0.1683	0.1343	0.1305	-	0.1754	0.1914	0.1727	0.1149	0.1473	0.1577	0.1401	0.1646	0.0050
<i>Panthera leo</i>	0.1513	0.1570	0.1520	0.1674	0.1440	0.1402	0.1754	-	0.0842	0.1194	0.1470	0.1464	0.1568	0.1499	0.1415	0.1704
<i>Panthera pardus</i>	0.1673	0.1730	0.1680	0.1834	0.1600	0.1562	0.1914	0.0842	-	0.1354	0.1630	0.1624	0.1728	0.1659	0.1575	0.1864
<i>Panthera tigris</i>	0.1486	0.1543	0.1493	0.1647	0.1413	0.1375	0.1727	0.1194	0.1354	-	0.1443	0.1437	0.1541	0.1472	0.1388	0.1677
<i>Pardofelis marmorata</i>	0.1099	0.1295	0.1245	0.1399	0.1059	0.1021	0.1149	0.1470	0.1630	0.1443	-	0.1189	0.1293	0.1118	0.1362	0.1099
<i>Prionailurus bengalensis</i>	0.1232	0.1197	0.1148	0.1116	0.1159	0.1121	0.1473	0.1464	0.1624	0.1437	0.1189	-	0.1009	0.1218	0.1356	0.1423
<i>Leop.pardalis (query)</i>	0.1336	0.1301	0.1251	0.0578	0.1263	0.1225	0.1577	0.1568	0.1728	0.1541	0.1293	0.1009	-	0.1321	0.1460	0.1527
<i>Lynx lynx</i>	0.1160	0.1323	0.1274	0.1428	0.0636	0.0598	0.1401	0.1499	0.1659	0.1472	0.1118	0.1218	0.1321	-	0.1391	0.1352
<i>Neofelis nebulosi</i>	0.1405	0.1461	0.1412	0.1566	0.1332	0.1294	0.1646	0.1415	0.1575	0.1388	0.1362	0.1356	0.1460	0.1391	-	0.1596
<i>Puma concolor</i>	0.1333	0.1529	0.1479	0.1633	0.1293	0.1255	0.0050	0.1704	0.1864	0.1677	0.1099	0.1423	0.1527	0.1352	0.1596	-

Ao contrário do que se esperava, o resultado indicou maior similaridade com uma sequência da espécie *Prionailurus bengalensis* (91,9%). A espécie *Prionailurus bengalensis*, também conhecido como leopardo asiático, é um pequeno gato selvagem de ocorrência no continente asiático⁵¹. Apesar de sua semelhança com a jaguatirica (*Leopardus pardalis*) elas pertencem a gêneros diferentes.

Apesar de termos encontrado cinco depósitos do gene mitocondrial Cytb para a espécie *Leopardus pardalis* no GenBank® (Tabela 3), os tamanhos dessas sequências eram curtos, variando de 63pb a 165pb. Considerando que o BitScore, um dos parâmetros para ordenação das espécies em similaridade, leva em consideração o tamanho relativo das sequências comparadas, isso contribuiu para que a sequência depositada de *Leopardus pardalis* não figurasse entre os 100 primeiros resultados de similaridade numa consulta global no banco de dados. Foi então realizada a comparação direta entre a sequência consenso obtida e as duas maiores sequências depositadas de Cytb da espécie *Leopardus pardalis* (102 pb e 165 pb) obtendo-se uma percentagem de similaridade de 99,7% e 97,5%, respectivamente.

O *Myrmecophaga tridactyla* (tamanduá bandeira) é o maior representante entre quatro espécies da família Myrmecophagidae, podendo atingir 2 metros (tamanho médio de 1,2 m) de comprimento total e massa corpórea variando de 18 Kg a 39 Kg⁵².

A espécie encontra-se classificada como “vulnerável” no livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção³, sua situação é diferente em cada estado, onde em algumas regiões, como no Santa Catarina, a espécie está provavelmente extinta⁵³, em outras, como o Rio Grande do Sul e Paraná está criticamente em perigo⁵⁴. O alinhamento e a correção manual das sequências obtidas do Cytb obtiveram-se uma matriz de 470 pb, a qual foi confrontada com sequências já depositadas no GenBank® e as análises de distância genética (Tabela 4).

É importante notar que para esta espécie foi encontrado o maior grau de similaridade na comparação com as amostras referência presente no banco de dados (100%). Uma análise dos dados da amostra depositada revelou que a sequência resultante foi submetida por Jacques²⁹ é oriunda de indivíduos procedentes do Parque Nacional das Emas (Goiás – Brasil) e Parque Nacional da Serra da Canastra (Minas Gerais – Brasil). Considerando que a amostra *query* (coletada do Zoológico da UFMT),

assim como as amostras depositadas por Jacques ²⁹, são provenientes do Brasil central, isso pode explicar a estreita relação entre as duas sequências.

Mazama gouazoubira (veado cantigueiro) é uma espécie representante da família Cervidae, distribuído do sul do México até o norte da Argentina ⁵⁵. No território brasileiro é encontrada em todas as regiões, tanto em áreas florestais como em formações abertas de campo, cerrado e caatinga⁵⁶. O cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) e o veado-bororó-do-sul (*Mazama nana*) estão listados no Livro de Espécies Ameaçadas de Extinção ³, bem como *Ozotoceros bezoarticus* (Veado-campeiro) evidenciando a importância desses animais aos ecossistemas a qual pertencem e ainda mais a necessidade de uma correta identificação destas espécies em casos de investigações forenses. Após o alinhamento e a correção manual das sequências obtidas do Cytb obteve uma matriz de 474 pb, e a distância genética realizada pelo método de Tamura-Nei ¹⁶ (Tabela 5).

O índice de similaridade alcançado pela busca foi de 99,5% para a espécie esperada *Mazama gouazoubira*. Análises moleculares de cervídeos sul-americanos mostraram divergência intra-específica de 0,36% em *M. nana*, 0,43% em *B. dichotomus*, 0,99% em *O. bezoarticus*, 2,59% em *M. nemorivaga* e 3,51% em *M. americana* ⁵⁷ comparando dados moleculares e citogenéticos obtidos de 82 indivíduos de diferentes espécies de veados sul-americanos.

Nasua nasua (Quati) é uma espécie da família Procyonidae com ampla distribuição na América do Sul, da Colômbia e Venezuela até o norte do Uruguai e Argentina. Os adultos medem entre 40cm e 70cm de comprimento (com exceção da cauda que mede em média 50cm) e média de 30 cm de altura, pesam entre 3Kg e 8Kg ⁵⁸. Apesar de não ser conhecido pelo apreço de sua carne ou pele, este animal sofre frequentes ataques por estar supostamente relacionado a ataques às criações domésticas (59). O alinhamento e a correção manual das sequências obtidas do Cytb obtiveram-se uma matriz de 470 pb, a qual foi confrontada com sequências já depositadas no *GenBank*[®] e as após análises de distância genéticas, os resultados encontram-se sumarizados (Tabela 6).

Tabela 4. Análise da distância genética Tamura-Nei (1993) para a sequência de 360 pb de bases do segmento Cytb da espécie *Myrmecophaga tridactyla*.

ESPÉCIES	C. <i>didactylus</i>	B. <i>variegatus</i>	C. <i>unicinctus</i>	T. <i>tetradactyla</i>	D. <i>novemcinctus</i>	D. <i>novemcinctus</i>	M. <i>tridactyla</i>	B. <i>tridactylus</i>	E. <i>sexcinctus</i>	M. <i>tridactyla</i> (query)
<i>Choleopus didactylus</i>	-	0.1667	0.2170	0.1965	0.1943	0.1486	0.1648	0.1381	0.2142	0.1685
<i>Bradypus variegatus</i>	0.1667	-	0.2284	0.2079	0.2057	0.1600	0.1762	0.1496	0.2256	0.1799
<i>Cabassous unicinctus</i>	0.2170	0.2284	-	0.1867	0.1651	0.1827	0.1989	0.0789	0.1850	0.2026
<i>Tamandua tetradactyla</i>	0.1965	0.2079	0.1867	-	0.1640	0.1622	0.1784	0.1078	0.1839	0.1821
<i>Dasypus novemcinctus</i>	0.1943	0.2057	0.1651	0.1640	-	0.1600	0.1762	0.0862	0.1527	0.1799
<i>Dasypus novemcinctus</i>	0.1486	0.1600	0.1827	0.1622	0.1600	-	0.0850	0.1038	0.1799	0.0887
<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	0.1648	0.1762	0.1989	0.1784	0.1762	0.0850	-	0.1201	0.1961	0.0037
<i>Bradypus tridactylus</i>	0.1381	0.1496	0.0789	0.1078	0.0862	0.1038	0.1201	-	0.1062	0.1238
<i>Euphractus sexcinctus</i>	0.2142	0.2256	0.1850	0.1839	0.1527	0.1799	0.1961	0.1062	-	0.1998
<i>Myrmecophaga tridactyla</i> (query)	0.1685	0.1799	0.2026	0.1821	0.1799	0.0887	0.0037	0.1238	0.1998	-

Tabela 5. Análise da distância genética Tamura-Nei (1993) para a sequência para a sequência de 474 pb de bases do segmento Cytb da espécie *Mazama gouazoubira*.

ESPÉCIES	M. <i>gouazoubira</i>	R. <i>tarandus</i>	H. <i>atisensi</i>	P. <i>puda</i>	O. <i>virginianus</i>	B. <i>dichotomus</i>	H. <i>bisulcus</i>	M. <i>gouazoubira</i>	M. <i>gouazoubira</i> (query)	M. <i>memorivaga</i>	M. <i>americana</i>	O. <i>bezoartricus</i>
<i>Mazama gouazoubira</i>	-	0.1276	0.0874	0.0967	0.1149	0.0741	0.0680	0.0200	0.0191	0.0990	0.0917	0.0626
<i>Rangifer tarandus</i>	0.1276	-	0.1392	0.1497	0.1428	0.1482	0.1540	0.1476	0.1467	0.1355	0.1195	0.1144
<i>Hippocamelus atisensis</i>	0.0874	0.1392	-	0.1095	0.1265	0.1080	0.1138	0.1074	0.1065	0.1106	0.1033	0.0676
<i>Puda puda</i>	0.0967	0.1497	0.1095	-	0.1370	0.1174	0.1232	0.1167	0.1159	0.1211	0.1138	0.0847

<i>Odocoileus virginianus</i>	0.1149	0.1428	0.1265	0.1370	-	0.1356	0.1413	0.1349	0.1341	0.1229	0.0839	0.1018
<i>Blastocercus dichotomus</i>	0.0741	0.1482	0.1080	0.1174	0.1356	-	0.1005	0.0941	0.0933	0.1197	0.1123	0.0832
<i>Hippocamelus bisulcus</i>	0.0680	0.1540	0.1138	0.1232	0.1413	0.1005	-	0.0880	0.0871	0.1254	0.1181	0.0890
<i>Mazama gouazoubira</i>	0.0200	0.1476	0.1074	0.1167	0.1349	0.0941	0.0880	-	0.0174	0.1190	0.1117	0.0826
<i>M. gouzoubira (query)</i>	0.0191	0.1467	0.1065	0.1159	0.1341	0.0933	0.0871	0.0174	-	0.1181	0.1108	0.0817
<i>Mazama nemorivaga</i>	0.0990	0.1355	0.1106	0.1211	0.1229	0.1197	0.1254	0.1190	0.1181	-	0.0996	0.0858
<i>Mazama americana</i>	0.0917	0.1195	0.1033	0.1138	0.0839	0.1123	0.1181	0.1117	0.1108	0.0996	-	0.0785
<i>Ozotoceros bezoaricus</i>	0.0626	0.1144	0.0676	0.0847	0.1018	0.0832	0.0890	0.0826	0.0817	0.0858	0.0785	-

Tabela 6. Análise da distância genética Tamura-Nei (1993) para a sequência de 470 pb de bases do segmento Cytb para segmento de base para a espécie *Nasua nasua*.

<i>Species</i>	<i>B. aleeni</i>	<i>B. gabbii</i>	<i>D. novemcinctus</i>	<i>L. Lutra</i>	<i>M. nivalis</i>	<i>N. binotata</i>	<i>N. narica</i>	<i>N. nasua</i>	<i>N. nasua (query)</i>	<i>N. olivacea</i>
<i>Beddard aleeni</i>	-	0.0549	0.2407	0.6028	0.2065	0.2044	0.2160	0.1980	0.1773	0.2146
<i>Beddard gabbii</i>	0.0549	-	0.2551	0.6172	0.2209	0.2188	0.2304	0.2124	0.1917	0.2290
<i>Dasypus novemcinctus</i>	0.2407	0.2551	-	0.6484	0.2583	0.2562	0.2616	0.2436	0.2229	0.2602
<i>Lutra lutra</i>	0.6028	0.6172	0.6484	-	0.6205	0.6183	0.5806	0.5139	0.4932	0.4690
<i>Mustela nivalis</i>	0.2065	0.2209	0.2583	0.6205	-	0.2021	0.2337	0.2157	0.1949	0.2323
<i>Nandinia binotata</i>	0.2044	0.2188	0.2562	0.6183	0.2021	-	0.2315	0.2135	0.1928	0.2301
<i>Nasua narica</i>	0.2160	0.2304	0.2616	0.5806	0.2337	0.2315	-	0.1758	0.1550	0.1924
<i>Nasua nasua</i>	0.1980	0.2124	0.2436	0.5139	0.2157	0.2135	0.1758	-	0.0207	0.1257
<i>Nasua nasua (query)</i>	0.1773	0.1917	0.2229	0.4932	0.1949	0.1928	0.1550	0.0207	-	0.1050
<i>Nassuela olivacea</i>	0.2146	0.2290	0.2602	0.4690	0.2323	0.2301	0.1924	0.1257	0.1050	-

Consulta para o segmento de DNA obtido da espécie *Nasua nasua* resultou em uma sequência, de igual espécie, com similaridade de 97,2%, seguida por uma sequência da espécie *Bassaricyon gabii* (mamífero da família Procyonidae) com similaridade de 85,7%. Este isolamento é um indicativo de que o grupo dos Myrmecophagidae ainda é pouco estudado.

Em relação às amostras questionadas (Q); durante o período de estudo houve quatro encaminhamentos de partes de animais que necessitaram do auxílio do Laboratório de Biologia Molecular da POLITEC para a determinação da espécie. As espécies sequenciadas neste caso foram: Amostra de couro encaminhado como sendo provavelmente de Jaguatirica (*Leopardus pardalis*) e amostra de partes de outros animais encaminhados como sendo provavelmente de cateto (*Pecaris tajacu*), Tatu peba (*Euphractus sexcinctus*), Cutia (*Dasyprocta aguti*); Capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*); Teiú (*Tupinambis teguixin*), Perdiz (*Rhynchotus rufescens*) e Juriti (*Leptotila verreauxi*).

Nas análises realizadas na amostra de couro encaminhado como sendo de jaguatirica (*Leopardus pardalis*) obteve-se uma sequência de 308 pb do Cytb. Semelhante ao que aconteceu na busca para a amostra referência, foi encontrada similaridade de 91,6% com a espécie *Prionailurus bengalensis*. Alinhamento realizado diretamente entre a sequência da amostra questionada (Q) e referência (R) resultou em 100% de similaridade.

A amostra encaminhada como sendo de cutia (*Dasyprocta aguti*) apresentou índice de similaridade superior a 99% com a espécie *Tapirus terrestris* (Anta). Este resultado não foi exatamente uma surpresa porque, uma avaliação morfológica do material recebido indicava que a proporção da massa muscular na porção encaminhada era incompatível com o tamanho de uma cutia.

As amostras encaminhadas como sendo de Cateto (*Pecaris tajacu*) e Tatu peba (*Euphractus sexcinctus*) retornaram resultados compatíveis com aquelas informadas no ofício. No entanto, o índice de similaridade entre as sequências verificadas para a amostra de cateto foi pouco superior a 94%. Para a certificação desta identificação foi sugerido o sequenciamento do segmento COI (já que ele está depositado no banco de dados) e/ou uma comparação com uma amostra referencia (R) devidamente identificada.

A comparação da sequência tida como sendo de *Rhynchotus rufescens* (Perdiz) resultou em similaridade de 96,5% com *Ramphasto toco* (Tucano), o qual pertence à família diferente da espécie pesquisada. Ao contrário do que acontece com a perdiz, o consumo de carne de tucano não é uma prática na região mato-grossense, sugerindo assim uma análise mais cautelosa dos dados. Não foi encontrado depósito do gene Cytb para a espécie *Rhynchotus rufescens*, não sendo, desta forma, possível um confronto direto entre a amostra questionada (Q) e uma amostra depositada em banco.

Situação similar a encontrada para a espécie tida como sendo perdiz (*Rhynchotus rufescens*) foi verificada para a juriti (*Leptotila verreauxi*), apresentando similaridade de 96,1% com a espécie *Amazona guildingii* (família Psittacidae).

As análises realizadas na sequência resultante da amostra encaminhada como sendo teiú (*Tupinambis teguixin*), mostrou maior similaridade (98,3%) para a espécie *Tupinambis meriana*, uma espécie de lagarto de até 1,4 metro de comprimento e 5 quilos, com ampla distribuição no Brasil e no norte da Argentina⁶⁰.

Neste sentido podemos concluir que o estudo da sequência gênica do Cytb é uma importante ferramenta de orientação sobre a relação filogenética entre as espécies. Assim como demonstrados em outros trabalhos sobre a evidência do DNA mitocondrial na evolução de psitacídeos.

A identificação de animais silvestres por meio do sequenciamento do DNA mitocondrial mostrou ser uma ferramenta efetiva em amostras forense, no entanto alguns cuidados devem ser tomados para garantir a confiabilidade dos resultados. Ainda é comum que muitos indivíduos da fauna brasileira não tenham suas sequências depositadas nos bancos de dados, o que dificulta sobre maneira todo o processo de identificação.

O tráfico de animais silvestres representa uma ameaça à sobrevivência das espécies nativas brasileiras, em que muitas vezes retira indivíduos diretamente da natureza, provocando danos ambientais com o comércio ilegal de espécies silvestres reduzindo a biodiversidade e alterando os ecossistemas, colocando em risco as populações naturais.

Assim, como já acontece nos laboratórios de identificação humana, é imperativo que os laboratórios de identificação animal participem de programas de testes de

proficiência que visem uniformizar os procedimentos e assegurar padrões de qualidade nas análises de identificação. Os resultados preliminares encontrados nesta pesquisa demonstram a importância desta técnica para a identificação e elucidação nos crimes ambientais.

É importante que os órgãos de Segurança Pública promovam cursos de capacitação visando o treinamento de profissionais na identificação molecular de animais, pois o combate da prática de crimes contra a fauna passa pela devida responsabilidade dos autores do delito, o que só é possível mediante a materialização do ato criminoso.

Conflito de Interesses

Os autores declaram que não há conflito de interesses quanto à publicação deste artigo.

Agradecimentos

A POLITEC – Perícia Oficial de Identificação Técnica, Governo do Estado de Mato Grosso, pelo uso do laboratório na identificação e análise das amostras apreendidas.

Referências

1. Brasil. Ministério do Meio Ambiente. 2012. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/meio-ambiente/2012/04/fauna-silvestre>. Acesso em: 05 Abril 2017.
2. Machado PAL. Direito Ambiental Brasileiro. Revista ampliada e atualizada. 24^a. Ed. Malheiros Editores. São Paulo. 2016; 1407 p.
3. ICMBIO/MMA. Instituto Chico Mendes da Conservação da Biodiversidade. Ministério do Meio Ambiente. 2016. Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. Disponível em: http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/comunicacao/publicacoes/publicacoes-diversas/dcom_sumario_executivo_livro_vermelho_ed_2016.pdf. Acesso em: 30 Abril 2017.
4. Brasil. Decreto 3.607. 21 de Setembro 2000. Comércio Internacional das Espécies da Flora e Fauna Selvagens em Perigo de Extinção-CITES. 2000. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/civil_03/decreto/D3607.htm. Acesso em: 30 Abril 2017.
5. Milaré E. Direito do Ambiente: doutrina, jurisprudência, glossário. 10^a Ed., revista, atualizada e

ampliada. São Paulo: Thomson Reuters Ed. Rev Trib, 2015; 1712 p.

6. Allen WL, Cuthill IC, Scott-Samuel NE, Baddeley R. Why the leopard got its spots: relating pattern development to ecology in felids. *Proceed Royal Soc*, 2010; 1-8 p. [https://doi: 10.1098/rspb.2010.1734](https://doi:10.1098/rspb.2010.1734).

7. Bell S. *A Dictionary of Forensic Science*, Oxford University Press, New York, 2013; 320 p.

8. Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotech*, 1994; 5(3): 294-9.

9. Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Pääbo S, Villablanca Fx, Wilson AC. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1989; 86(16):6196-200. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.16.6196>

10. Branick W, Kupiec T, Pawlowski R. Validation of Cytochrome b sequence analysis as a method of species identification. *J Forensic Sci*, 2003; 1(48):83-7. <https://doi:10.1520/JFS2002128>.

11. Verma SK & Singh L. Novel Universal primers establish identity of an enormous number of animal species for forensic application. *Mol Ecol*, 2003; 3:28-31. <https://doi/10.1046/j.1471-8286.2003.00340.x>.

12. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, Mcgettigan PA, Mcwilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 2007; 23(21):2947-48. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404>.

13. Kearse M, Maier R, Wilson A, Stones-Havas S, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Meintjes P, Drummond A. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 2012; 28(12):1647-49. <https://doi:10.1093/bioinformatics/bts199>.

14. Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Rapp BA, Wheeler DL. Genbank. *Nucleic Acids Res*, 2000; 30(17):17- 20. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.15>

15. Altschul SF, Gish W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 1990; 3(215):403-10. [https://doi:10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2).

16. Tamura K & Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the controls of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol*, 1993; 10(3):512-26.
17. Mato Grosso. Biomas. 2017. Disponível em <https://www.coisasdematogrosso.com.br/mato-grosso/biomas>. Acesso em 05 Maio 2017.
18. Woese CR & Fox GE. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natur Acad Sci*, 1997; 74:5088-90. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.11.5088>
19. Hebert PDN, Waard JR, Landry JF. DNA barcodes for 1/1000 of the animal kingdom. *Biol Lett* 2010; 6(3):359-62. <https://doi:10.1098/rsbl.2009.0848>.
20. Avise JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T. Intraespecific phylogeography: The mitochondrial bridge between population genetics and systematics. *Rev Ecol Syst* 1987; 18:489-522. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.18.110187.002421>
21. Avise JC. *Molecular Ecology and Evolution: The Organismal Side*. World Scientifica Publishing Ltda. British Library. 2010; 541 p. <https://doi:10.1146/annurev.es.18.110187.002421>.
22. Parson WK, Pegorato H, Niederstätter, Föger M, Steinlecker M. Species identification by means of the cytochrome b gene. *Int J Leg Med* 2000; 114:23-28. <https://doi:10.1007/s004140000134>.
23. Hsieh H, Chiang H, Tsall L, Lai S, Huang N, Linacre A, Lee JC. Cytochrome b gene for species identification of the conservation animals. *Forensic Sci Intern* 2001; 122:7-18. [http://dx.doi.org/10.1016/S0379-0738\(01\)00403-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0379-0738(01)00403-0).
24. Tsai L, Huang M, Hsiao C, Lin AC, Chen S, Lee JC, Hsieh H. Species identification of animal specimens by cytochrome b gene. *Forensic Sci J* 2007; 6(1):63-5.
25. Kyle CJ & Wilson CC. Mitochondrial DNA identification of game and harvested freshwater fish species. *Forensic Sci Intern* 2007; 166(1):68-76. <https://doi:10.1016/j.forsciint.2006.03.025>.
26. Wong K, Wang J, But PP, Shaw P. Application of cytochrome b DNA sequences for the authentication of endangered snake species. *Forensic Sci Int* 2004; 139:49-55. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2003.09.015>
27. Gupta SK, Verma SK, Singui L. Molecular insight into a wildlife crime: the case of a peafowl slaughter. *Forensic Sci Int* 2005; 154:214-17. <https://doi:10.1016/j.forsciint.2004.12.010>.
28. Parik J, Freitas AI, Jesus J, Vilems F, Brehm A, Gonçalves R. Identification of endangered petrel species from poor quality feather debris using cytochrome b sequences. *Forensic Sci Int* 2008; 174(1):86-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2006.10.024>.

29. Jacques GS. Identificação de espécies animais usando sequencias de genes mitocondriais no combate ao crime contra a fauna. Brasília: UCB. Dissertação de Mestrado Ciência Genômica e Biotecnologia, Instituto de Biociências, Universidade Católica de Brasília, 2005.
30. Coghlan ML, White NE, Prkison L, Haile J, Spence PBS. Egg forensics: An appraisal of DNA sequencing to assist in species identification of illegally smuggled eggs. *Forensic Sci Int Gen: In press*, 2011. <https://doi:10.1016/j.fsigen.2011.06.006>.
31. Carvalho CBV. Identificação genética de aves vítimas do tráfico de animais silvestres. *Atual Ornitol On-Line*, 2012; 165. http://www.ao.com.br/download/AO165_40.pdf.
32. Budowle B, Garofano P, Hellman A, Ketchum M, Kanthaswamy S, Parson W, Haeringen WV, Fain S, Broad T. Recommendations for animal DNA forensic and identity testing. *Int J Leg Med* 2005; 119: 295-302. <https://doi:10.1007/s00414-005-0545-9>.
33. Hebert PDN, Cywiska A, Ball SL, Dewaard R. Biological identifications through DNA barcodes. *Biol Sci*, 2003; 270:313-21. <https://doi:10.1098/rspb.2002.2218>.
34. Savolainen V, Cowan RS, Vogler AP, Roderick GK, Lane R. Towards Writing the encyclopedia of life: an introduction to DNA barcoding. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. PhilosTrans R Soc Lond B Biol Sci*. 2005; 360(1462):1805-11. <https://doi:10.1098/rstb.2005.1730>.
35. Ratnasingham S & Hebert PDN. A DNA-Based Registry for All Animal Species: The Barcode Index Number (BIN) System. *Plos ONE* 2013; 8(8): e66213. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066213>.
36. Prosdocimi F, Peixoto FC, Ortega JM. Evaluation of window cohabitation of DNA sequencing errors and lowest PHRED quality values. *Genet Mol Res* 2004; 30;3(4):483-92.
37. Tavares ES; Baker AJ; Pereira SL, Miyaki CY. Phylogenetic Relationships and historical Biogeography of Neotropical Parrots (Psittaciformes: psittacidae) inferred from Mitochondrial and nuclear DNA Sequences. *Syst Biol* 2006; 55(3):454-70. <https://doi:10.1080/10635150600697390>.
38. Sick H. *Ornitologia brasileira*. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 2001.
39. Dickson EC & Remsen JR. *The Howard and Moore complete checklist of the birds of the World*. Vol. 1. Non-passerines. 4th Edition. Aves Press, Eastbourne, UK, 2013; 461 p.
40. Rheindt FE., Christidis L, Kuhn S, Kloet D, Normam JA, Fidler A. The timing of Diversification within the most divergent parrot clade. *J. Avian Biol* 2014; 45:140-48. <http://doi:10.1111/j.1600->

[048X.2013.00200.x.](#)

41. Aleixo A, Poletto F, Lima MFC, Castro M, Portes E, Miranda LS. Notes on the Vertebrates of northern Pará, Brazil: a forgotten part of the Guianan Region, II. Avifauna. Bol Mus Para Emílio Goeldi, Ciênc Natur 2011; 6(1):11-65.

42. Birdlife International. Globally Threatened Birds of the World. IUCN Red List for Birds. Barcelona: Lynx Edicions and Birdlife Intern; 2017. <https://http://www.birdlife.org/worldwide/news/threatened-birds-world>.

43. Martins JM. Prospecção de locos microssatélite e análise da variabilidade genética em uma população do Mato Grosso do Sul, visando a conservação da Arara Vermelha, *Ara chloroptera* (Psittacidae, Aves). Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução. Universidade de São Carlos; 2007.

44. Ridley M. Evolução. 3. Ed. Porto Alegre: Artmed. 2006; 752 p.

45. Miyaki CY, Mاتيoli SR, Wajntal T, Burke A. Parrot Evolution and Paleogeographical Events: Mitochondrial DNA Evidence. Mol Biol Evolution 2010; 15(5):544-51. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025954>

46. Presti FT, Guedes NM, Antas PT, Miyaki CY. Population Genetic Structure in Hyacinth Macaws (*Anodorhynchus hyacinthinus*) and Identification of the Probable Origin of Confiscated Individuals. J Hered 2015; 106 Suppl 1:491-502. <https://doi:10.1093/jhered/esv038>.

47. Hebert PDN, Stoeckle MY, Zemplak TS, Francis CM. Identification of birds through DNA Barcodes. Plos Biol. 2004; 2:e312. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020312>.

48. PRESTI FT. Caracterização da variabilidade genética em espécies de psitacídeos ameaçados. São Paulo: USP, Dissertação, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 2006.

49. Ripple WJ, Abernethy K, Betts MG, Chapron G, Dirzo R, Galetti M, Levi T, Lindsey PA, Macdonald DW, Machovina B, Newsome TM, Peres CA, Wallach AD, Wolf C, Young H. Bushmeat hunting and extinction risk to the world's mammals. R Soc Open Sci. 2016; 3:160-498. <https://doi.org/10.1098/rsos.160498>

50. Oliveira TG, Almeida LB, Campos CB. Avaliação do risco de extinção da Jaguatirica *Leopardus pardalis* (Linnaeus, 1758) no Brasil. Biod Bras 2014; 3(1):66-75. <https://http://www.icmbio.gov.br/revistaeletronica/index.php/BioBR/article/view/372/320>.

51. Tamada T, Siriaroonrat B, Subramaniam V, Hamachi M, Lin L, Oshida T, Rerkamnuaychoke W, Masuda R. Molecular Diversity and Phylogeography of the Asian leopard Cat, *Felis bengalensis*, Inferred from Mitochondrial and Y-Chromosomal DNA Sequences. 2008; *Zoolog Sci* 28:154-63. <https://doi.org/10.2108/zsj.25.154>.
52. Woltanski A. *Myrmecophaga tridactyla*. 2010. Disponível em: http://animal-diversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Myrmecophaga_tridactyla.html. Acesso em: 28 dez. de 2016.
53. Tortato FR, Testoni AF, Althoff SL. Mastofauna terrestre da Reserva Biológica Estadual do Sassafrás, Doutor Pedrinho, Santa Catarina, Sul do Brasil. *Biotemas* 2014; 27(3):123-29. <http://dx.doi.org/10.5007/2175-7925.2014v27n3p123>.
54. Miretzki M & Braga FG. Distribuição histórica e recente de *Myrmecophaga tridactyla* Linnaeus, 1758 (Pilosa, Myrmecophagidae) no Estado do Paraná, Brasil. *Edentata* 2014; 15:16-26. <http://dx.doi.org/10.5537/020.015.0113>.
55. Eisenberg JF & Redford KH. Mammals of the neotropics, the central neotropics: Ecuador, Peru, Bolivia e Brasil. Vol. 3. Chicago: University of Chicago Press, 1999. 624 p. <https://press.uchicago.edu/ucp/books/book/chicago/M/bo3696756.html>.
56. Oliveira SV. Registro de albinismo parcial em veado cantingueiro *Mazama gouazoubira* (G. Fisher, 1814) (Artiodactyla, Cervidae) na Serra do Sudeste, Rio Grande do Sul, Brasil. *Biod Pampeana*, PUCRS, Uruguaiana 2009; 7(1):13-15 p.
57. Duarte JMB, González S, Maldonado JE. The surprising evolutionary history of South American deer. *Mol Phylog Evol* 2008; 49(1):17- 22. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.07.009>.
58. Beisiegel BM. Notes on the Coati, *Nasua nasua* (Carnivora: Procyonidae) in an Atlantic Forest Area Braz *J Biol* 2001; 61(4):689-92. <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-69842001000400020>.
59. Rocha-Mendes F, Mikich SB, Bianconi GV, Pedro WA. Mamíferos do município de Fênix, Paraná, Brasil: etnozootologia e conservação. *Rev Bras Zoo* 2005; 4:991-1002. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-81752005000400027>.
60. Passos DC; Lima-Araujo F; Melo ACB, Borges-Nojosa DM. New state record and distribution extension of the golden tegu *Tupinambis teguixin* (Linnaeus 1758) (Squamata: Teiidae) to the Caatinga biome, northeastern Brazil. *Check List* 2013; 9(6):1524-6. <https://doi.org/10.15560/9.6.1524>