

Leandra Formentão

**IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES EM OVOS DE AVES
APREENDIDOS EM SITUAÇÃO DE COMÉRCIO ILEGAL:
APORTE PARA APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE DNA *BARCODE***

Dissertação de Mestrado submetida ao
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia e Biociências da
Universidade Federal de Santa
Catarina para obtenção do Título de
Mestre em Biotecnologia e
Biociências.
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Andrea Rita
Marrero

Florianópolis
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Formentão, Leandra

Identificação de espécies em ovos de aves
apreendidos em situação de comércio ilegal : Aporte
para aplicação da técnica de DNA barcode / Leandra
Formentão ; orientadora, Andrea Rita Marrero, 2019.
110 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas,
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e
Biociências, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

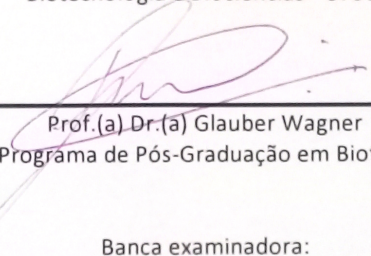
1. Biotecnologia e Biociências. 2. Análise
molecular. 3. Citocromo oxidase I. 4. Crimes contra
a fauna. 5. Simulações forenses. I. Marrero, Andrea
Rita. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e
Biociências. III. Título.

"Identificação de espécies em ovos de aves apreendidos em situação de comércio ilegal: aporte para aplicação da técnica de DNA *barcode*"

Por

Leandra Formentão

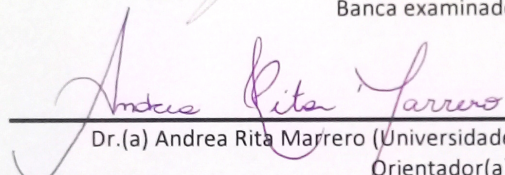
Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (003/2019/PPGBTC) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências - UFSC.



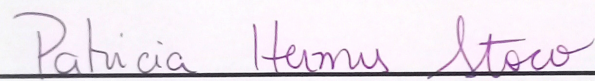
Prof.(a) Dr.(ã) Glauber Wagner

Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências

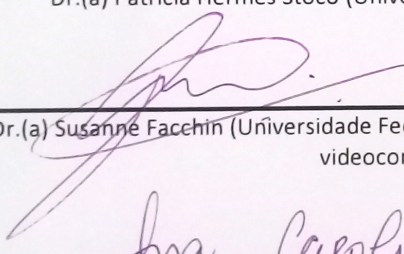
Banca examinadora:



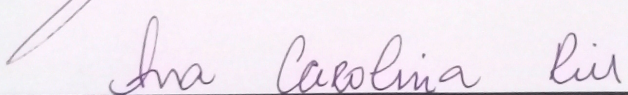
Dr.(a) Andrea Rita Marrero (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)



Dr.(a) Patricia Hermes Stoco (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr.(a) Susanne Facchin (Universidade Federal de Minas Gerais) – participação por videoconferência



Dr.(a) Ana Carolina Reimann Ries (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 20 de fevereiro de 2019.

Ao Manoel. Aos animais silvestres e a quem acredita que a vida de cada um deles é importante.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao CNPq pela disponibilização da bolsa para desenvolvimento deste trabalho. À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências pela oportunidade de desenvolver essa pesquisa e pelo apoio na participação em eventos para apresentação de trabalhos. A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências e professores de outros programas nos quais cursei disciplinas pelos conhecimentos compartilhados e paciência em ensinar.

Ao Manoel Kolling Dutra, meu grande incentivador. Pelo apoio, paciência e pelas massagens quando minhas costas não suportavam mais o tempo dedicado à escrita ou aos experimentos. Por acreditar em mim. Por me dar comidas gostosas, colo e abraços apertados quando o estresse era demais.

Aos meus pais, Ivaneide Maestri e Anilon Formentão, por me permitirem chegar até aqui. Por se apaixonarem pelos animais por causa das nossas conversas.

À minha orientadora e amiga, Andrea Rita Marrero, por me orientar e me guiar nesse caminho de descobertas. Por acreditar em mim e aceitar me orientar mesmo após o tempo em que estive afastada da universidade. Pelas conversas, quase sessões de terapia e por literalmente me mandar para casa quando o cansaço era evidente.

À Priscila Cassol, minha amiga e primeira orientada oficial de TCC, que abraçou comigo essa ideia e por acreditar tanto nela. Pela ajuda nos experimentos. Por providenciar almoços e lanches quando o tempo não me permitia sair do laboratório. Por me dar (muitos) motivos para risadas.

A todos os meus amigos que me lembraram tantas vezes o quanto eu sou capaz e o quanto minha vocação precisa ser seguida, em especial à Thaynara Pereira e ao Yuri Verzola.

Aos amigos que fiz e reencontrei no mestrado. Ao Guilherme Maia por acolher minhas lágrimas e sempre ter um abraço e uma cadeira no Laboratório de Bioinformática para eu me sentar e desabafar. Ao Guilherme, de novo, e ao Caíbe Alves pela parceria nos estudos. À Tatiany Soratto por ser tão acolhedora. À Hegger Fritsch pelos abraços apertados, bolinhos de chocolate e chimarrão nas aulas.

À Melissa Lins. À Carol Carvalho e ao Rodrigo Riefel, minha equipe médico-psicológica que manteve minha saúde mental (quase) intacta durante todo esse processo.

À Júlia Zanette Penso e Rafael Godoy Martinez, por estarem sempre tão disponíveis. Pelos abraços e por me fazerem rir em momentos de desespero. Pelas tardes e noites no laboratório. Com certeza esse trabalho não aconteceria a tempo sem a ajuda de vocês.

Aos alunos do Laboratório de Polimorfismos Genéticos pelas conversas e apoio durante os experimentos. À Iara Pinheiro, Sophia Cassol, Kathleen Yasmin de Almeida e Bernardo Cima pela disponibilidade e auxílios em momentos de urgência e pela amizade. Ao José que ajudou muito no pouco tempo que estive no LAPOGE.

À Clisten e Mari Staffen por compartilharem comigo muitos anseios, dúvidas, frustrações e também por estarem presente quando tudo saia maravilhosamente bem. Pelas geleias deliciosas e todo o apoio que me manteve firme nessa caminhada.

Aos professores do LAPOGE pelos conselhos, em especial à Yara Muniz, que sempre tirou um tempinho para esclarecer as dúvidas mais básicas; pelas conversas e por ser tão fofa. Ao Professor Guilherme Toledo, sempre tão disponível e atencioso.

Ao Laboratório de Protozoologia e todos seus integrantes. Pelo empréstimo de equipamentos, reagentes, reagentes e reagentes. Em especial aos professores Edmundo Grisard, Mário Steindel, meu primeiro e querido orientador nessa caminhada científica e Patrícia Hermes Stoco, minha cientista inspiradora desde muitos anos.

Ao Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura e seus integrantes pelos reagentes e conhecimento compartilhados e empréstimo de equipamentos. Em especial ao Gabriel Matos, Cairé Barreto e Mariana Pilotto.

Ao professor Rafael Diego da Rosa que me encantou com sua personalidade linda e suas maravilhosas aulas de biologia celular e molecular. Por ter participado do desenvolvimento desse trabalho como avaliador do projeto e da qualificação da dissertação.

Ao Laboratório de Bioinformática, professor Glauber Wagner, Guilherme Maia e Tatiany Soratto pela ajuda bioinformática.

A todos os integrantes do Laboratório de Estudos e Interações entre Macro e Micromoléculas pelo uso de equipamento e por me receberem durante tantas horas dentro do laboratório. Em especial à Professora Tânia Pasa e sua aluna Júlia Cisilotto.

Ao Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia e todos os seus técnicos. À Vanessa Silva pelos eficientes ensaios de sequenciamento e por sempre agilizar tudo para que as coisas acontecessem dentro do prazo.

Ao professor Paulo Fernando Dias pelas longas conversas sobre ovos e desenvolvimento embrionário e por me ajudar a entender como as coisas funcionam nesse incrível mundo chamado ovo. Ao professor Ricardo Garcez por despertar em mim a vontade de saber mais sobre ovos e perceber o quão importante esse conhecimento é para meu trabalho.

A todos os profissionais de animais silvestres, cujos nomes não cabem em um único agradecimento, que me auxiliaram a entender a dinâmica do tráfico de animais silvestres.

Ao Centro de Recuperação de Animais Silvestres, do Departamento de Águas e Energia Elétrica, da Secretaria de Energia, Recursos Hídricos e Saneamento do Estado de São Paulo pela disponibilização de informações sobre o tráfico de ovos, em especial à Liliane Milanelo.

Ao IBAMA pela disponibilização de dados sobre o tráfico de animais silvestres.

Ao Superintendente da Polícia Federal no Amazonas, Alexandre Saraiva, por atender tão prontamente meu contato sobre ovos apreendidos. Por ceder amostras para minha pesquisa e me permitir auxiliar na perícia de um caso real de tráfico de ovos. À Ana Carolina Vieira por orientar sobre o recebimento das amostras.

Ao INPA, em especial ao Mário Cohn-Haft e à Gisiane Rodrigues Lima por agilizarem o recebimento das amostras e não medir esforços em ajudar, mesmo quando o tempo é curto e as atividades são muitas. Por compartilharem informações importantes para o entendimento da situação dos ovos.

À Ariane Ferreira que prontamente aceitou meu pedido de trazer consigo as amostras dos ovos de João Pessoa à Florianópolis.

Ao Victor Hugo Keunecke, Marcelo Oliveira Dutra e Ley pela doação de ovos de aves de canário-belga e calopsita.

À Jéssica Imperico Maciel pela grande ajuda para que esse trabalho possa ser lido e entendido por qualquer pessoa que esteja iniciando seus estudos.

Às membras da banca que aceitaram participar da construção desse trabalho: Prof^a Dr^a Patricia Hermes Stoco, D^a Ana Carolina Ries e Dr^a Susanne Facchin e suplentes Prof^a Dr^a Fabienne Ferreira e Dr^a Camile Lugarini.

Aos animais silvestres, por resistirem.

Muito prazer, ao seu dispor
se for por amor às causas perdidas.
(Humberto Gessinger e Paulo Gauvão, 2003)

RESUMO

O comércio ilegal de animais silvestres é uma das grandes ameaças à biodiversidade sendo que, no Brasil, as aves são os animais mais visados. O *modus operandi* do tráfico de aves foi sendo alterado ao longo do tempo e, atualmente, a retirada de ovos diretamente dos ninhos é bastante praticada. Após apreensão, os ovos podem apresentar-se em condições diversas: fecundado ou não, em decomposição, dessecado ou, muitas vezes, não estar inteiramente disponível, dispondo-se apenas de alguns vestígios, como cascas quebradas. Tais situações podem limitar a disponibilidade de DNA ou torná-lo altamente degradado. Este estudo objetivou a proposição de um protocolo padrão a ser utilizado na identificação de espécies de aves em ovos apreendidos em quaisquer situações. Foram realizadas análises *in silico* para determinar os tamanhos de fragmentos do gene citocromo oxidase I (COI) que podem ser bons marcadores buscando verificar a utilidade de um marcador de DNA para identificação de espécies de psitacídeos, um dos grupos cujos ovos são alvos frequentes do tráfico no Brasil. A partir desses resultados, foram definidos *primers* para os fragmentos de COI de 164, 405 e 747 pares de base (pb) para utilização na padronização de protocolos de análise de DNA em ovos. Foi padronizado um protocolo de extração e amplificação de DNA a partir de ovos de codorna. Em seguida, o protocolo foi testado em ovos submetidos a diferentes condições adversas que podem ocorrer a partir do tráfico: ovos dessecados, em decomposição, cascas de ovos quebradas e fluido de ovo depositado em diferentes substratos. Em todas as situações simuladas foi possível amplificar *mini-barcodes* (164 pb), sendo necessário o uso de DMSO 3% como adjuvante na PCR em algumas amostras, principalmente de cascas quebradas. A amplificação de fragmentos *barcode* (947 – tamanho maior para codorna em relação à maioria das aves – e 405 pb) obteve menor sucesso em amostras de ovos em decomposição, cascas quebradas e fluido de ovo em quatro dos oito substratos testados, podendo ser um indicativo de degradação do DNA. Por fim, o protocolo foi aplicado em amostras de ovos apreendidos pela Polícia Federal resultando na identificação de 30 dos 31 ovos analisados como *Graydidascalus brachyurus* (curica-verde). Assim, o protocolo desenvolvido neste estudo se mostrou uma ferramenta amplamente aplicável e funcional que pode auxiliar no combate a crimes contra a fauna.

Palavras-chave: Análise molecular. Citocromo oxidase I. Crimes contra a fauna. Forense. Simulações forenses.

ABSTRACT

The wildlife illegal trade is one of the current major threats to biodiversity and in Brazil birds are the animals more aim for this activity. The birds illegal trade's *modus operandi* was altered over time. Currently, the withdrawal of eggs directly from the nests is fairly frequent. After seizure, eggs may be presented under different conditions: fertilized or not, rotten, dry or, often, not entirely available, with only a few trace, such as broken shells. Such situations may limit the DNA availability or make it highly degraded. This study aimed proposing a standard protocol to be used in the bird species identification in seized eggs in any situations. *In silico* analyzes were performed to determine the cytochrome oxidase I (COI) fragments sizes which can be good markers in order to check the usefulness of a DNA marker for psittacines species identification, one of the groups whose eggs are highly targeted by trafficking in Brazil. From these results, primers were defined for the COI fragments of 164, 405 and 747 base pairs (bp) for use in the eggs DNA analysis standardization. A DNA extraction and amplification protocol was standardized from poultry eggs previously approved as the biological model of the study. The protocol was then tested on eggs subjected to different adverse conditions that may occur as: dried and decomposing eggs, broken egg shells and egg fluid deposited on different substrates. In all simulated situations it was possible to amplify mini-barcodes (164 bp), requiring the use of 3% DMSO as an PCR adjuvant in some samples, mainly broken shells. Barcode fragments amplification (947 – larger size for quail compared to most birds – and 405 bp) was more compromised in samples of rotten eggs, broken shells and egg fluid on four of the eight substrates tested, possibly because the DNA degradation. The protocol was applied in samples of seized eggs by the Federal Police resulting in identification success of 30 of the 31 eggs analyzed as *Graydidascalus brachyurus* (short-tailed parrot). Thus, the protocol developed in this study proved to be a widely applicable and functional tool wich can assist to combat wildlife crimes.

Keywords: Case-type samples. Cytochrome oxidase I. Forensic. Molecular analysis. Wildlife crime.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ovos apreendidos pela Polícia Federal no Aeroporto Internacional de Manaus/AM.....	25
Figura 2. Organização do genoma mitocondrial em animais. A: organização geral do DNA mitocondrial de metazoários, demonstrando o posicionamento dos genes nas fitas interna e externa. B: representação esquemática do genoma mitocondrial linearizado demonstrando variações de tamanho do genoma, comprimento e posição dos genes entre diferentes grupos animais. As porções coloridas indicam modificações em relação ao mtDNA de Eutheria. RNAs transportadores estão indicados pelo aminoácido que cada um transporta.	30
Figura 3. Partes do ovo.....	33
Figura 4. Representação de parte do gene citocromo oxidase I (COI) mostrando o tamanho e posição dos fragmentos gerados pelos pareamentos possíveis entre os quatro <i>primers</i> de Kerr (2009a).....	44
Figura 5. Esquema da primeira etapa da metodologia adotada na padronização do protocolo de análise de DNA em ovos de aves.	48
Figura 6. Esquema da segunda etapa da metodologia adotada na padronização do protocolo de análise de DNA em ovos de aves.	49
Figura 7. Esquema das simulações forenses realizadas. MDF: placa de fibra de média densidade, poliéster: sintético; algodão: natural, <i>jeans</i> : misto de poliéster, algodão e elastano, meia fina: fio 15, 86% poliamida e 14% elastano.....	52
Figura 8. Ovos apreendidos em 2018 pela Polícia Federal em Manaus/AM em processo de curadoria para coleção zoológica do INPA. A): diferenças na coloração e morfometria dos ovos, B): diferenças no desenvolvimento embrionário.	53
Figura 9. Alinhamento dos <i>primers</i> em estudo com sequências de COI de psitacídeos. A: BirdF1, B: COIbirdR2, C: AvMiF1, D: AvMiR1. Os <i>primers</i> COIbirdR2 e AvMiR1 foram transformados em seus reversos complementos antes do alinhamento utilizando a ferramenta disponível em < http://www.cellbiol.com/ >.	61
Figura 10. Resultado das análises no SPIDER para determinação da menor e mais informativa região <i>barcode</i> de COI em espécies de psitacídeos. A: 506 pb; B: 405 pb; C: 382 pb; D: 277 pb; E: 164 pb. Em vermelho estão demarcadas as intersecções entre a proporção de zero não-coespecíficos e as proporções de clados com congruência entre as árvores <i>neighbor-joining</i> das janelas e das sequências inteiras com valores acima de 0,84.	65

Figura 11. Eletroforese de fragmentos de 164 pb de COI amplificados a partir de amostras de ovos de quatro espécies de aves domésticas, duas partes do ovos e três protocolos de extração utilizando os *primers* AvMiF1 + AvMiR1. G: gema, M: membrana da casca, Nh: *Nymphicus hollandicus*, Gg: *Gallus gallus*, Sc: *Serinus canaria*, Cj: *Coturnix japonica*, 1: cloreto de sódio, 2: acetato de potássio, 3: acetato de amônio, C-: controle negativo..... 69

Figura 12. Eletroforese de fragmentos de 164 pb de COI amplificados a partir de amostras de membrana de cascas secas sem (A) e com (B) DMSO 3%. A primeira banda de cada gel corresponde ao controle positivo de 164 pb..... 78

Figura 13. Espécime de *Graydidascalus brachyurus* (curica-verde). 83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Pareamento dos <i>primers</i> utilizados para testes <i>in silico</i> e tamanhos de fragmentos gerados por cada par.....	43
Tabela 2. Lista de espécies cujas sequências obtidas no BOLD foram utilizadas para análises no SPIDER.....	46
Tabela 3. Identificação dos ovos conforme coleção zoológica do INPA e respectivos tipos de amostra recebidos pelo LAPOGE/UFSC para análise.....	54
Tabela 4. Gêneros cujas sequências obtidas no BOLD foram utilizadas para cálculo de limiar de identificação de espécies.....	55
Tabela 5. Qualidade dos <i>primers</i> BirdF1, COIbirdR1, AvMiF1 e AvMiR1. Resultados referentes a grampos indicam a maior temperatura na qual ocorre formação de grampos. Resultados de auto-dímeros e hetero-dímeros (H-d) indicam o intervalo de número de pares de bases pareados.....	60
Tabela 6. Resultados do teste de especificidade <i>in silico</i> a partir do alinhamento BLAST de cada <i>primer</i> com cada conjunto de sequências do GenBank analisado.....	63
Tabela 7. Número de amostras de ovos de codorna <i>in natura</i> com sucesso na amplificação, por tamanho de fragmento, técnica de PCR, parte do ovo e total. Números entre parênteses correspondem ao total de amostras testadas. Do total de 15 amostras, 05 correspondem a cada um dos protocolos de extração de DNA (cloreto de sódio, acetato de potássio e acetato de amônio). PCR com DMSO 3% e <i>nested</i> foram realizadas apenas com amostras que não amplificaram com a PCR convencional.....	72
Tabela 8. Número de amostras de simulações forenses em ovos de codorna com sucesso na amplificação de fragmento de 164 pb por técnica de PCR. Números entre parênteses correspondem ao total de amostras testadas. Do total de 15 amostras, 05 correspondem a cada um dos protocolos de extração de DNA (cloreto de sódio, acetato de potássio e acetato de amônio). PCR com DMSO 3% foi realizada apenas com amostras que não amplificaram com a PCR convencional.....	76
Tabela 9. Número de amostras de simulações forenses em ovos de codorna com sucesso na amplificação por tamanho de fragmento. Números entre parênteses correspondem ao total de amostras testadas. Do total de 15 amostras, 05 correspondem a cada um dos protocolos de extração de DNA (cloreto de sódio, acetato de potássio e acetato de amônio). <i>Nested</i> PCR foi realizada apenas com amostras que não amplificaram fragmento de 947 pb.	80

Tabela 10. Identificação de espécies no BOLD, percentual de similaridade realizada a partir de amostras de ovos apreendidos e tamanho do fragmento analisado. 84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

12S rRNA – Gene da subunidade 12S do RNA ribossomal
16S rRNA – Gene da subunidade 16S do RNA ribossomal
BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*
BOLD – *Barcode of Life Data System*
CCB – Centro de Ciências Biológicas
CETAS – Centro de Triagem de Animais Silvestres
CITES – Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies da Fauna e da Flora Silvestres Ameaçadas de Extinção
COI – Gene citocromo oxidase subunidade I
COII – Gene citocromo oxidase subunidade II
CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente
CPI – Comissão Parlamentar de Inquérito
CRAS/PET – Centro de Recuperação de Animais Silvestres do Parque Ecológico do Tietê
Cyt b – Gene citocromo b
DMSO – Dimetilsulfóxido
EXO – Exonuclease
FISPQ – Ficha de Segurança de Produtos Químicos
FWG – Grupo de Trabalho Forense
IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
INPA – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
INTERPOL – Organização Internacional de Polícia Criminal
ITS – Espaçadores Transcritos Internos
Kb – Quilobase
LAMEB – Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia
LAPOGE – Laboratório de Polimorfismos Genéticos
MDF – Placa de fibra de média densidade
MEGA – *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*
mtDNA – DNA mitocondrial
ND2 – Gene NADH desidrogenase subunidade 2
PAN – Plano de Ação Nacional
pb – Pares de base
PCR – Reação em cadeia da polimerase
RFLP – Polimorfismos de Comprimento de Fragmentos de Restrição
SAP – Fosfatase alcalina de camarão
SPIDER – *Species Identity and Evolution in R*
SR/PF/AM – Superintendência Regional da Polícia Federal no Amazonas
USP – Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
1.1	MARCADORES PARA IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES: PRIMEIRO PASSO PARA A PADRONIZAÇÃO	28
1.2	COMPLEXIDADE DE ANÁLISES MOLECULARES EM OVOS DE AVES	32
1.3	A IMPORTÂNCIA DAS SIMULAÇÕES DE CASOS REAIS DE COMÉRCIO ILEGAL DE OVOS DE AVES	35
1.4	CONHECIMENTOS SOBRE O COMÉRCIO ILEGAL DE AVES E SEUS OVOS	38
1.5	OBJETIVOS	42
1.5.1	Objetivo geral	42
1.5.2	Objetivos específicos	42
2	MATERIAL E MÉTODOS	43
2.1	CARACTERIZAÇÃO DO MARCADOR DE IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES.....	43
2.2	PADRONIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE ANÁLISE DE DNA EM OVOS	47
2.3	SIMULAÇÃO DE SITUAÇÕES FORENSES	51
2.4	IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES EM OVOS APREENDIDOS	53
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
3.1	CARACTERIZAÇÃO DO MARCADOR DE IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES.....	57
3.2	PADRONIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE ANÁLISE DE DNA EM OVOS	67
3.3	SIMULAÇÃO DE SITUAÇÕES FORENSES	75
3.4	IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES EM OVOS APREENDIDOS	82
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	90
	REFERÊNCIAS	93

1 INTRODUÇÃO

Na madrugada do dia 15 de maio de 2018 a Polícia Federal da Superintendência Regional do Amazonas (SR/PF/AM) apreendeu, no Aeroporto Internacional de Manaus, 32 ovos que eram transportados por um homem envoltos em papel toalha e meia fina e amarrados à sua cintura (Figura 1). Os ovos foram encaminhados ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e, posteriormente, ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) a fim de compor a coleção zoológica da Instituição. Os ovos estavam inviáveis provavelmente devido às condições do tráfico e tempo decorrido entre a apreensão e destinação e sua manutenção em ar condicionado durante esse período¹. Um destes ovos encontrava-se quebrado e acabou sendo descartado.

Figura 1. Ovos apreendidos pela Polícia Federal no Aeroporto Internacional de Manaus/AM.



Fonte: SR/PF/AM (2018).

¹ Contato com Dr. Mario Cohn-Haft (INPA) via aplicativo de mensagens.

Não é a primeira vez que esse tipo de apreensão ocorre no Brasil. No entanto, há poucos trabalhos científicos que relatam e estudam o tráfico de ovos no País (CARVALHO, 2012; D'AMATO; NETO; MARIA, 2009; GONÇALVES et al., 2015; JACQUES, 2005) e rotas do Brasil para o exterior (BÁRTOLO, 2013)..

Atualmente a legislação brasileira é baseada nos seguintes parâmetros legais utilizados no combate a crimes contra a fauna: a Lei 5.197 (BRASIL, 1967), a Lei 9.605 de Crimes Ambientais (BRASIL, 1998), a Convenção Internacional sobre o Comércio de Espécies da Fauna e Flora Ameaçadas de Extinção (*Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora* - CITES), instaurada no Brasil pelo Decreto Nº 3.607 (BRASIL, 2000), o Decreto Nº 6.514 (BRASIL, 2008a) e a Portaria Nº 444 (MMA, 2014) que apresenta a Lista Nacional Oficial de Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção.

A Lei de Crimes Ambientais define crimes contra a fauna, em seu Artigo 29, como “Matar, perseguir, caçar, apanhar, utilizar espécimes da fauna silvestre, nativos ou em rota migratória, sem a devida permissão, licença ou autorização da autoridade competente, ou em desacordo com a obtida”. Esta mesma Lei sentencia o crime com pena de detenção ou multa “aumentada de metade, se o crime é praticado contra espécie rara ou considerada ameaçada de extinção”. A determinação de espécie ameaçada é dada a partir da Portaria Nº 444, que apresenta a lista de espécies ameaçadas de extinção em âmbito nacional e listas estaduais oficiais de espécies ameaçadas de extinção. A partir dos anexos CITES é possível identificar espécies de captura e venda proibidas. Dessa forma, identificar corretamente as espécies apreendidas é crucial para a aplicabilidade da Lei e dosimetria de pena.

Entre os principais obstáculos em conter o tráfico de animais silvestres está a dificuldade na correta identificação taxonômica (CARVALHO, 2014; REHMAN et al., 2015). Não é incomum que casos de apreensão resultem em espécies não identificadas. Na Austrália (dados de 1994 a 2007), 20% dos casos de tráfico de animais silvestres não tiveram a espécie dos indivíduos identificada e a maior parte dessas situações foi relativa ao comércio ilegal de ovos de animais silvestres (ALACS; GEORGES, 2008). No Brasil, em análise de dados correspondentes a oito anos seguidos de registros, um número de quase 500 espécimes entre os 15.000 animais apreendidos não teve sua espécie identificada (PIMENTEL; SANTOS, 2009).

Através de análise dos registros de perícias de crimes contra a fauna conduzidos pela Polícia Federal brasileira entre 2013 e 2014, Reis et al. (2016) encontraram que 43,32 % foram referentes ao uso da genética

na identificação de espécies, de indivíduos, origem geográfica e paternidade, não havendo distinção entre elas. Portanto, não há dados sobre o uso específico de identificação genética de espécies no Brasil, tampouco em ovos de aves. Na literatura científica, apenas dois estudos relatam o uso da identificação genética de espécies em ovos de aves para geração de laudos periciais oficiais no Brasil (CARVALHO, 2012; JACQUES, 2005).

Técnicas moleculares e pesquisas em biotecnologia vem sendo cada vez mais aprimoradas para uso nos campos forense e de conservação da biodiversidade (CORLETT, 2017; GUNN; WALSH; ROUX, 2014). Apesar disso, a identificação morfológica de ovos apreendidos é uma recomendação do Grupo de Trabalho Forense (*Forensic Working Group* - FWG) do Reino Unido (FWG, 2014). No entanto, há grandes dificuldades desse tipo de identificação acarretadas pela diversidade, em termos de morfologia, que pode ser observada em ovos de uma mesma espécie de ave (STODDARD et al., 2017).

A validação de protocolos de análise de DNA é definida como “(...) processo pelo qual um procedimento é avaliado para determinar sua eficácia e/ou confiabilidade para uso em análises forenses ou de bancos de dados.” (SWGDM, 2016, p. 4). Assim, fornece um desempenho mínimo para garantia de qualidade de laudos forenses, critérios da análise e garantia de uso de diretrizes e melhores práticas laboratoriais (BUDOWLE et al., 2005).

As etapas de uma validação de protocolos de análises moleculares para uso forense incluem diferentes testes que devem ser aplicados conforme a análise que se deseja validar, como a caracterização de marcadores moleculares, estudos populacionais, testes de sensibilidade, especificidade, estabilidade, repetibilidade, reprodutibilidade, simulação de situações forense, análise de misturas, padronização de PCR e ensaios de sequenciamento, além de verificações no funcionamento de equipamentos e avaliação de contaminações, estes últimos necessários para validação interna de protocolos (SWGDM, 2016). Para cada uma dessas etapas, experimentos específicos devem ser realizados, tendo como padrão geral: extração, quantificação, amplificação e detecção de ácidos nucleicos, estando disponíveis, atualmente, diferentes técnicas para cada ensaio necessário (BUTLER, 2011).

Existem protocolos indicados para diferentes usos e tipos de amostra. Entretanto, não há indicação de protocolos padrão a serem utilizados em análise de DNA de ovos (MINAKSHI et al., 2013). Embora estudos tenham obtido sucesso na identificação genética de espécies na maioria dos ovos analisados (CARVALHO, 2012; COGHLAN et al.,

2012; GONÇALVES et al., 2015; JACQUES, 2005; JOHNSON, 2010), todas as análises foram realizadas a partir do embrião ou anexos embrionários e não há informação da história do tráfico destes ovos e condições em que se encontravam. Também não há correspondência entre os protocolos de extração de DNA utilizados e entre os marcadores escolhidos. Assim, não há padronização, tampouco validação dos processos, o que pode colocar em dúvida qual a melhor forma de se identificar espécies em ovos, sendo um problema para peritos, que não dispõem de tempo para testes e repetições.

1.1 MARCADORES PARA IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES: PRIMEIRO PASSO PARA A PADRONIZAÇÃO

A identificação de espécies baseada em caracteres morfológicos é padrão em diversos tipos de estudos. No entanto, principalmente na área forense, nem sempre é possível identificar corretamente uma espécie com base nestes critérios dadas as diversas partes animais utilizadas como evidências biológicas (IYENGAR, 2014; UNODC, 2016). A necessidade de taxonomistas especialistas em cada táxon envolvido pode elevar os custos de manutenção de profissionais e o tempo necessário para reconhecimento da amostra (GARRIDO; RODRIGUES, 2016; UNODC, 2016). Ademais, Gaur et al (2012) citam um caso em que a identificação morfológica de um caso de tráfico de fauna, mesmo realizada por especialista, foi equivocada. Assim, a identificação molecular de espécies surgiu como uma alternativa em amostras forenses (CARVALHO, 2017).

Apesar disso, a identificação taxonômica através de caracteres morfológicos é extremamente importante para garantir a confiabilidade dos resultados obtidos na identificação molecular. Isso porque a identificação molecular de espécies necessita da prévia padronização dos dados moleculares usados na comparação, que deve ser realizada a partir de amostras de espécimes referência identificados por taxonomista especialista no táxon (NÚÑEZ-RODRÍGUEZ et al., dados em publicação).

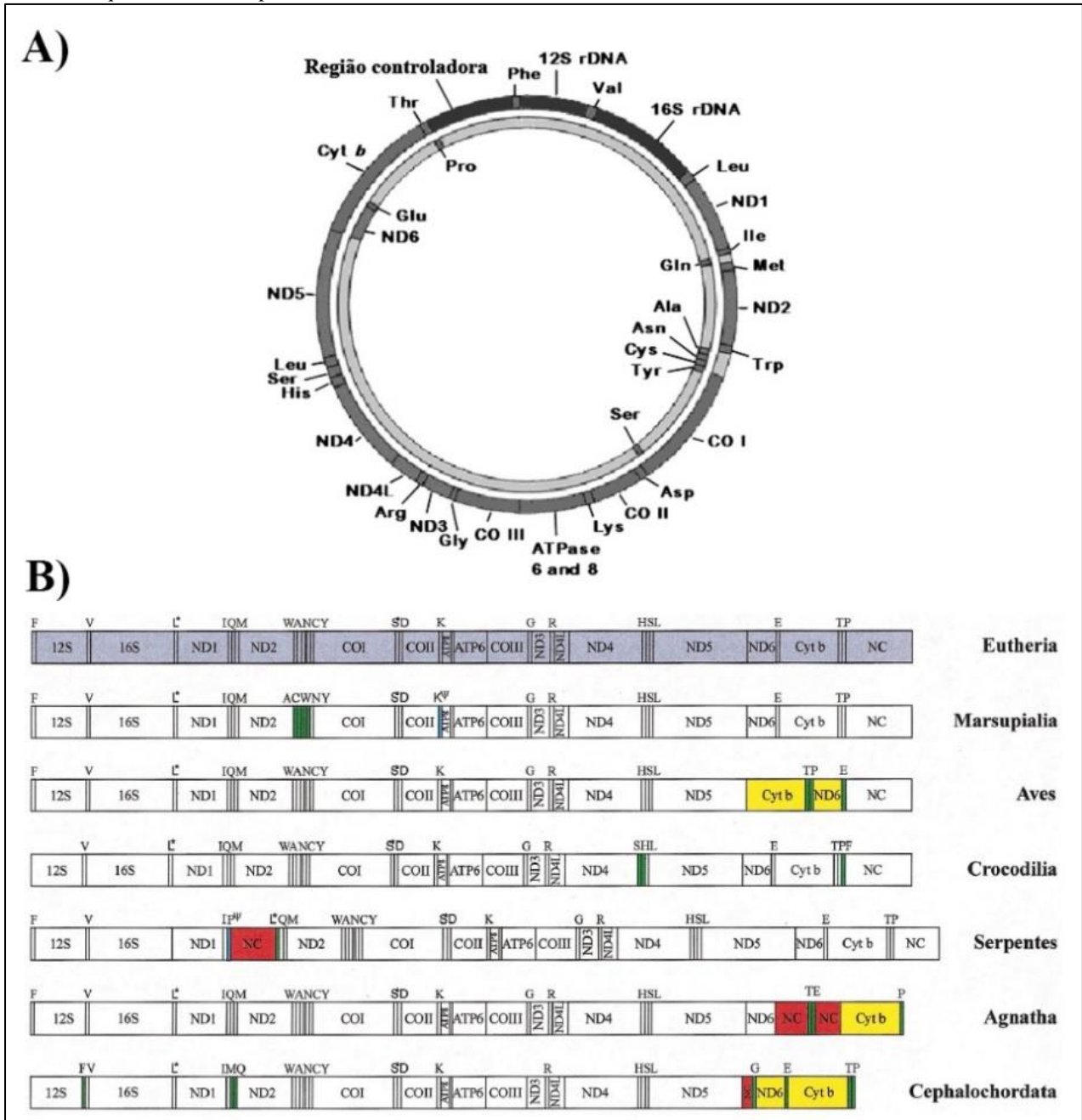
Ao longo dos anos, diferentes técnicas moleculares foram sendo padronizadas para uso em identificação de espécies, como a detecção imunoistoquímica de proteínas (CUTRUFELLI et al., 1988), utilização de sondas de oligonucleotídeos e *slot blot* (HUNT; PARKES; LUMLEY, 1997), Polimorfismos de Comprimento de Fragmentos de Restrição (do inglês, *Restriction Fragment Length Polymorphism* – RFLP) (MEYER et al., 1995) e sequenciamento de fragmentos de genes, em especial os mitocondriais (BATAILLE et al., 1999).

O genoma mitocondrial (mtDNA) é composto por um total de 37 genes: 13 codificadores de proteínas, 02 relacionados a subunidades ribossomais e 22, à RNAs transportadores. O tamanho varia entre algumas espécies, visto que os genes podem ter comprimentos diferentes, assim como a ordem dos genes também difere entre alguns táxons (PEREIRA, 2000). Dessa forma, o tamanho do mtDNA em animais varia entre 13 e 19 kb (SACCONI et al., 1999). Um esquema geral do genoma mitocondrial de metazoários pode ser visto na Figura 2, bem como variações possíveis entre diferentes linhagens.

Genes mitocondriais são alvos na identificação de espécies animais por serem de origem uniparental² e estarem presentes em grande quantidade nas células, facilitando a recuperação do DNA molde (ARIF; KHAN, 2009; TAHIR; AKHTAR, 2015). Além disso, ausência de íntrons, evolução rápida e menor acúmulo de mutações deletérias são características evolutivas dos genomas mitocondriais de metazoários importantes para identificação de espécies (RUBINOFF, 2006; TAHIR; AKHTAR, 2015). Na área forense, o formato circular do mtDNA é uma vantagem, visto que o torna menos suscetível à degradação por endonucleases (FORAN, 2006; ISENBERG, 2002).

² A origem materna do DNA mitocondrial torna os genes ausentes de recombinação. Estudo recente mostrou que a transferência de mitocôndrias paternas ocorre em humanos (LUO et al., 2018).

Figura 2. Organização do genoma mitocondrial em animais. A: organização geral do DNA mitocondrial de metazoários, demonstrando o posicionamento dos genes nas fitas interna e externa. B: representação esquemática do genoma mitocondrial linearizado demonstrando variações de tamanho do genoma, comprimento e posição dos genes entre diferentes grupos animais. As porções coloridas indicam modificações em relação ao mtDNA de Eutheria. RNAs transportadores estão indicados pelo aminoácido que cada um transporta.



Fonte: adaptado de Pereira (2000) e Saccone et al (1999).

A evolução ocorre de formas distintas entre os diferentes genes mitocondriais, levando a uma composição de bases completamente variável entre linhagens, tornando possível a percepção das divergências intra e interespecíficas (SACCONI et al., 1999). Diferentes genes mitocondriais são conhecidos por sua utilização na identificação de espécies animais, como o RNA ribossomal subunidade 12 (12S rRNA), RNA ribossomal subunidade 16 (16S rRNA) (KITANO et al., 2007), citocromo b (Cyt b) (PARSON et al., 2000) e citocromo oxidase I (COI) (HEBERT et al., 2003). Os dois últimos são os alvos principais de identificação de espécies utilizando mtDNA (CARVALHO, 2017; IYENGAR, 2014).

A escolha do marcador para identificação de espécies gera controvérsias em alguns grupos taxonômicos quanto a qual é mais representativo, principalmente entre Cyt b e COI (ROSSI et al., 2017; TOBE; KITCHENER; LINACRE, 2009). O COI é amplamente utilizado devido ao esforço de geração de sequências de DNA de diversas espécies e depósito em bancos de dados públicos, principalmente após a proposição da porção 5' desse gene como DNA *barcode*³ (HEBERT et al., 2003; HEBERT; RATNASINGHAM; DE WAARD, 2003) e criação do *Barcode of Life Data Systems* (BOLD) (RATNASINGHAM; HEBERT, 2007). No entanto, Foran, Fischer e Stoloff (2015) demonstraram que os genes Cyt b e COI são igualmente eficientes na identificação de muitas espécies de mamíferos, peixes, aves, répteis não aviários, anfíbios, insetos, artrópodes e anelídeos. Considera-se como uma vantagem de Cyt b a possibilidade de amplificar fragmentos menores de DNA e, mesmo assim, informativos (FORAN; FISCHER; STOLOFF, 2015). Entretanto, diversos estudos demonstraram a eficiência dos *mini-barcodes* de COI (HAJIBABAEI; MCKENNA, 2012; KHAN et al., 2018; MEUSNIER et al., 2008; PATEL et al., 2010). Ademais, COI possui regiões mais conservadas que permitem o desenho de *primers* universais que abrangem uma maior gama de táxons em comparação ao Cyt b, aumentando as chances de sucesso na identificação de amostras desconhecidas (FORAN; FISCHER; STOLOFF, 2015).

O gene COI codifica um total de 219 aminoácidos. Destes, 99 são altamente variáveis entre grupos animais (PENTINSAARI et al., 2016). A conservação do mtDNA é mantida pelas substituições sinônimas, no entanto, a presença de mutações não-sinônimas é notável no genoma mitocondrial animal, contribuindo com sua característica de alta

³ Região do genoma de tamanho padronizado que permite a identificação de espécies e pode ser amplificada a partir de *primers* universais.

diversidade entre espécies (JAMES; PIGANEAU; EYRE-WALKER, 2016). A variabilidade observada em COI é dada por mutações não sinônimas presentes principalmente em regiões distantes das porções responsáveis pelo ancoramento da enzima na membrana celular, interação com as demais subunidades e sítio catalítico, pois estas são extremamente conservadas, dada a função vital que exercem (PENTINSAARI et al., 2016).

Dawnay et al. (2007) validaram o uso de COI para investigação forense de animais vertebrados a partir de amostras de sangue e músculo de mamíferos, aves e peixes submetidas a condições diversas. Embora o tamanho do fragmento de COI utilizado como *barcode* seja adequado para ensaios forenses, pode haver falha quando há pouca quantidade de DNA ou DNA muito degradado. Uma alternativa é a utilização de *primers* universais para amplificação de fragmentos menores, com aproximadamente 100 a 300 pb, renomeando a técnica, então, como DNA *mini-barcode* (HAJIBABAEI et al., 2006; HAJIBABAEI; MCKENNA, 2012).

Em análises forenses de crimes contra a fauna a eficácia da metodologia de DNA *barcoding* foi demonstrada por Dalton e Kotze (2011), em análise de carcaças de antílope e de carne; por Jeong et al. (2013) e Rehman et al. (2015) em investigação de venda de carne de répteis; por Abe, Hayano e Inoue-Murayama (2012) e Carvalho (2013) em análise de penas e por Johnson (2010) e Gonçalves et al. (2015) em análise de ovos. Porém, diversos destes trabalhos citam a necessidade de utilizar *mini-barcodes* quando há falha na amplificação de algumas amostras.

1.2 COMPLEXIDADE DE ANÁLISES MOLECULARES EM OVOS DE AVES

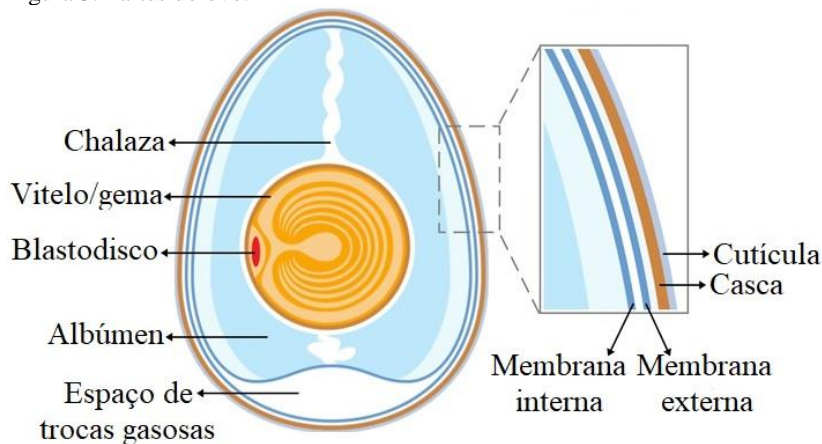
Os ovos são alvo da curiosidade humana desde muitos anos e estudos empíricos datam do século XVIII, seguidos por pesquisas científicas ainda no século XIV, resultando em grande conhecimento e muitas perguntas sobre aspectos diversos dos ovos (BIRKHEAD, 2016). Já diziam Purcell, Hall e Coardso (2008) “Biólogos podem aprender muitas coisas sobre espécies de aves a partir de seus ovos” (tradução livre de “*Biologists can learn many things about bird species from their eggs*”). Geneticistas forense também.

O vitelo (ou gema do ovo) está contido no citoplasma de uma única célula a fim de suprir as necessidades do embrião. É onde se inicia o desenvolvimento embrionário a partir da blastoderme, região da célula

chamada blastodisco antes da fecundação (Figura 3) (EGLOFF et al., 2009). A recuperação de DNA nuclear no blastodisco é bastante difícil (EGLOFF et al., 2009). Entretanto, a identificação de espécies é baseada em DNA mitocondrial e na gema há um número considerável de mitocôndrias devido à grande quantidade de lipídeos que precisam ser consumidos através da β -oxidação (GURAYA, 1989; RICKLEFS, 1977). Assim, esta parte do ovo pode resultar em bom rendimento de mtDNA.

Na membrana da casca (Figura 3) não é descrita a presença de células, sendo composta principalmente por proteínas (95%), carboidratos (2%) e gorduras (3%) (BOARD; SPARKS, 1991), sendo em torno de 10% de colágeno (HINCKE et al., 2012). Qualquer conteúdo interno do ovo é fonte potencial de DNA devido ao processo de formação do ovo, onde células do trato reprodutivo da fêmea podem ser aderidas à formação de cada camada. Contudo, a quantidade pode ser bastante reduzida (LEE; PRYS-JONES, 2008).

Figura 3. Partes do ovo.



Fonte: adaptado de Frank de Benutzer.

A composição dos ovos das aves varia de diversas formas: entre tipos de desenvolvimento (precocial, altricial e seus espectros) (BIRCHARD; DEEMING, 2015; RICKLEFS, 1977), estágio de desenvolvimento do embrião (NOBLE, 1991; ORŁOWSKI et al., 2016), entre espécies (ORŁOWSKI et al., 2016; RICKLEFS, 1977) e entre indivíduos de uma mesma espécie, seja dentro da mesma população ou de origens geográficas distintas (RUUSKANEN et al., 2011). Tal variação ocorre em nível de composição química, quantidade de

elementos de composição e características de cada parte do ovo (BUCHER, 1983; GURAYA, 1989; ORŁOWSKI et al., 2016). Ademais, tem relação direta com o investimento reprodutivo individual de cada fêmea (BIRKHEAD, 2016; D'ALBA et al., 2010; RUUSKANEN et al., 2011).

Fêmeas influenciam diretamente a composição dos ovos devido a fatores intrínsecos à sua fisiologia e fatores ambientais, onde a disponibilidade de alimentos determina o quanto a fêmea conseguirá investir nos ovos (BIRKHEAD, 2016; HARGITAI et al., 2009). Além disso, elas investem mais ou menos no desenvolvimento de um ovo de acordo com a qualidade do macho e possibilidade de sobrevivência da prole (BIRKHEAD, 2016).

Hormônios⁴ podem ser depositados em maior ou menor quantidade em um ovo dependendo da idade do macho (MICHL et al., 2005). O investimento em depósito de lisozima⁵ depende da atratividade do macho e também seu comportamento, sendo que ovos de machos poligâmicos recebem menos lisozima em relação aos ovos de machos monogâmicos (D'ALBA et al., 2010). As qualidades do macho, aparentes através de suas características físicas, são tidas como indicativo da probabilidade de sobrevivência dos filhotes e, por isso, o investimento diferenciado da fêmea. Além disso, outro fator que influencia o quanto uma fêmea investe em seus ovos é a sua possibilidade de escolha do macho, dado que elas investem mais em ovos de machos que escolheram para acasalamento (BIRKHEAD, 2016).

Tais características dos ovos os tornam amostras complexas para análises de DNA devido à presença de vários componentes inibidores de PCR, como proteínas, lipídeos, hormônios e anticorpos (SCHRADER et al., 2012; WILSON, 1997). A qualidade das amostras é fortemente influenciada pelo protocolo de extração de DNA (DEMEKE; JENKINS, 2010) e a utilização de reagentes específicos, como o cloreto de lítio, podem otimizar a extração de ácidos nucleicos em ovos (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). Assim, não há um protocolo de extração de DNA padrão que seja eficiente para todos os tipos de amostras biológicas (EL-ASHRAM; AL; SUO, 2016). Atualmente há grande

⁴ Alguns hormônios têm relação direta com a proteção do embrião contra radicais livres formados durante o metabolismo de lipídeos.

⁵ Embora não haja um sistema imune nos ovos, eles recebem diversos componentes da fêmea, como proteínas antimicrobianas (como a lisozima) e anticorpos, que auxiliam na proteção do ovo durante a incubação.

disponibilidade de opções entre *kits*, métodos alcalinos, orgânico, em colunas, entre outros (SAMBROOK; GREEN, 2012).

Diferentes técnicas podem ser utilizadas para quantificação e qualificação de ácidos nucleicos após extração, como corrida eletroforética em gel de agarose, espectrofotometria (LINACERO; RUEDA; VAZQUEZ, 1998; SAMBROOK; GREEN, 2012), PCR em tempo real (ANDRÉASSON et al., 2006; SWANGO et al., 2006) e amplificação de diferentes tamanhos de fragmentos por PCR convencional (ALAEDDINI; WALSH; ABBAS, 2010). Pode-se utilizar, ainda, equipamentos específicos como o BioAnalyzer® (DAMGAARD et al., 2015). Entretanto, resultados efetivos sobre a possibilidade de se realizar ou não ensaios moleculares com amostras complexas são dados pelo sucesso ou insucesso destes ensaios (MATLOCK, 2015).

Mesmo em amostras de baixa qualidade, a análise de DNA não se torna impossível visto a possibilidade de uso de diversas substâncias consideradas adjuvantes na PCR (FRACKMAN et al., 1998), entre elas Formamida em concentrações entre 1,25 e 10%, DMSO, entre 1 e 10%, Tween-20, entre 0,25 e 1%, cloreto de potássio (KCl), entre 35 e 100 mM, magnésio (Mg^{2+}), entre 0,5 e 5 mM, sêrum albumina bovina, entre 10 e 100 $\mu g/mL$ e betaina, entre 0,5 e 2,5 M (LORENZ, 2012). O DMSO e a Formamida atuam na PCR facilitando a hibridização dos *primers* e, conseqüentemente, reduzindo a formação de produtos inespecíficos e de dímeros de *primers*, enquanto que o Tween-20 diminui os efeitos inibitórios do SDS, mas pode levar à amplificação de produtos inespecíficos por diminuir o rigor dos *primers* (LORENZ, 2012). Dessa forma, testar diferentes reagentes para extração e amplificação de DNA e padronizar os protocolos para amostras específicas são importantes estratégias em amostras forenses (MELTON; HOLLAND; HOLLAND, 2012).

1.3 A IMPORTÂNCIA DAS SIMULAÇÕES DE CASOS REAIS DE COMÉRCIO ILEGAL DE OVOS DE AVES

Em todas as espécies de aves, quando na natureza, há falha na eclosão em cerca de 10% dos ovos (KOENIG, 1982). Essa taxa é maior em espécies ameaçadas de extinção, dado que as populações são menores, mais isoladas e a taxa de endogamia aumenta (HEMMINGS; WEST; BIRKHEAD, 2012). Quando a incubação ocorre em cativeiro, esse número é ainda maior, variando conforme a espécie e podendo chegar a 85% de falha (FRANCISCO; VALDUGA; MOREIRA, 2014; HEMMINGS; WEST; BIRKHEAD, 2012).

Entre os motivos da ausência de eclosão está a falha na fecundação (BIRKHEAD et al., 2008). Mesmo na natureza, é comum encontrar aves incubando ovos não fertilizados, visto que é possível que espermatozoides sejam inférteis (REDING, 2015). A taxa de ovos não fecundados em uma ninhada pode chegar a 50% em algumas espécies (ORŁOWSKI et al., 2016). A infertilidade pode estar relacionada a vários fatores, como incompatibilidade genética causada por endogamia (HEMMINGS; WEST; BIRKHEAD, 2012; KOENIG, 1982), taxa de fecundidade anual (MARTIN, 1987), estação do ano, nutrição das aves e tempo dedicado ao acasalamento (MIAZI et al., 2012). Isso torna possível que ovos retirados da natureza por traficantes não eclodam por ausência de embrião.

As aves possuem estratégias para aumentar a taxa de fecundidade. Entre elas está a poliandria⁶, que aumenta a quantidade de espermatozoides disponíveis, além de garantir que a fecundação aconteça mesmo que um macho tenha espermatozoides inférteis ou tenha genética incompatível com a fêmea (REDING, 2015). A monogamia, por outro lado, é um dos fatores que aumenta o sucesso na eclosão dos ovos, visto que menos machos cuidando de ovos pode aumentar o sucesso na eclosão, pois diminui o estresse por interação social e o excesso de troca de indivíduos na incubação, que pode prejudicar a manutenção da temperatura e umidade (KOENIG, 1982). Considerando que tanto a monogamia quanto a poliandria possuem vantagens, algumas espécies de aves se utilizam de ambas estratégias, como é o caso de muitos psitacíformes (FERNANDES, 2015).

Além da infertilidade, ovos podem não eclodir por falha no desenvolvimento do zigoto após fecundação ou problemas ocorridos durante a incubação que levaram à morte do embrião (BIRKHEAD et al., 2008). Enquanto que falhas na fecundação estão relacionadas diretamente à qualidade do macho, falhas no desenvolvimento do óvulo fecundado estão relacionadas à qualidade da fêmea (HEMMINGS; WEST; BIRKHEAD, 2012).

Ausência de eclosão de ovos pode ocorrer em qualquer estágio de desenvolvimento, mas são mais comuns em estágios iniciais tanto pela exposição a condições adversas (BEISSINGER; COOK; ARENDT, 2005), quanto pela possibilidade de incompatibilidade genética, que afeta tanto sucesso na fecundação quanto o desenvolvimento inicial do embrião (HEMMINGS; WEST; BIRKHEAD, 2012).

A mortalidade do embrião em ovos ocorre principalmente no início e final do desenvolvimento embrionário, sendo acentuada quando os ovos

⁶ Sistema de reprodução no qual uma fêmea acasala com mais de um macho.

são expostos a condições adversas de umidade e, principalmente, temperatura, levando ao acréscimo da taxa de mortalidade quanto maior tempo de exposição (BEISSINGER; COOK; ARENDT, 2005; TULLETT, 2009). Em caso de baixa quantidade de água no ovo, a mortalidade se dá por desidratação e, em caso de excesso de água, ocorre morte do embrião por dificuldade de trocas gasosas (BOLELI; DE QUEIROZ, 2012).

Em embriões no início e metade do período de desenvolvimento, a sensibilidade é maior à alta temperatura e baixa umidade, enquanto que em estágio tardio de desenvolvimento, alterações na umidade afetam muito mais a viabilidade (BOLELI; DE QUEIROZ, 2012). A sensibilidade do embrião às condições inadequadas é tanta que a morte pode ocorrer mesmo com pouquíssimo tempo de exposição a temperaturas inadequadas (TULLETT, 2009). Além disso, quanto mais tempo os ovos são armazenados em processo de pausa na incubação⁷, mais a viabilidade dos embriões diminui (PEDROSO et al., 2006).

Os ninhos e a atividade incubatória dos parentais têm um importante papel na manutenção de condições favoráveis de temperatura e umidade. O esfriamento e superaquecimento é impedido pelo contato direto dos parentais com o ninho, e não com os ovos, o que permite dissipação de parte do calor e manutenção da umidade sem impedir aeração e trocas gasosas (DEEMING, 2016). Ademais, o ninho também protege contra o desenvolvimento de microrganismos na casca que, quando invadem o ovo através dos poros, levam o embrião à morte (BOLLINGER et al., 2018).

O procedimento padrão adotado após apreensão de ovos no Brasil segue o disposto no artigo 107 do Decreto nº 6.514 para apreensão de indivíduos (BRASIL, 2008b). Os ovos devem ser enviados a instituições mantenedoras de fauna equipadas para incubação dos ovos. Após eclosão, a espécie é identificada pela morfologia do filhote. No entanto, muitos são os casos em que os ovos são inviáveis ou os filhotes morrem antes de chegarem à idade na qual é possível identificá-los morfologicamente de forma confiável, situações derivadas das condições adversas a que os ovos são submetidos durante o tráfico. D'Amato, Neto e Maria (2009) apresentam relato de dois casos de incubação de ovos provenientes de apreensões realizadas no Brasil nos anos de 2005 e 2008 e apontam que estes foram os primeiros casos de sucesso de incubação de ovos após

⁷ Os ovos possuem uma faixa de temperatura chamada zero fisiológico compreendida entre 24 e 27°C na qual o início do desenvolvimento é retardado (STOLESON, 1999).

apreensão por tráfico registrados no País. Ainda, de acordo com os autores, os ovos inviáveis foram descartados, não tendo sua espécie identificada.

Dada a falta de informações sobre sucesso na incubação de ovos apreendidos, acredita-se que as condições adversas de manipulação excessiva e armazenamento inadequado a que os ovos são expostos em situações de tráfico podem comprometer o sucesso de eclosão dos ovos apreendidos e também a viabilidade dos filhotes que chegam a eclodir (ALACS; GEORGES, 2008; D'AMATO; NETO; MARIA, 2009).

Outras situações observadas em ovos apreendidos são cascas com fissuras, trincadas, quebradas ou amassadas (D'AMATO; NETO; MARIA, 2009). Também é frequente o esmagamento dos ovos pelos traficantes quando são abordados pela fiscalização, a fim de evitar que as espécies sejam identificadas (ALACS; GEORGES, 2008; FILHO, 2003). Em caso de ovos embrionados, os traficantes podem se desfazer deles, restando apenas cascas e amostras de fluido de ovo nas roupas do traficante.

1.4 CONHECIMENTOS SOBRE O COMÉRCIO ILEGAL DE AVES E SEUS OVOS

O comércio ilegal de fauna é considerado o terceiro maior tráfico do mundo (UNODC, 2012). O Brasil é tido como um dos maiores fornecedores de animais silvestres (OLIVEIRA, 2000), estimando-se a captura de aproximadamente 38 milhões de indivíduos por ano com destinação para o tráfico, movimentando em torno de US\$ 2,5 bilhões (RENCTAS, 2001). Aves representam cerca de 80 a 90% dos animais comercializados ilegalmente no Brasil (COSTA, 2017). Em todo o mundo, as ordens de aves mais traficadas incluem Psittaciformes, Falconiformes e Strigiformes (JOHNSON, 2012). Há relatos de tráfico destas ordens no Brasil, mas destaca-se a preferência por Psittaciformes e Passeriformes (COSTA, 2017).

O tráfico é considerado uma das maiores ameaças à biodiversidade (FERREIRA; COSTA, 2017; ROSEN; SMITH, 2010), principalmente às espécies ameaçadas de extinção, pois possuem sua população reduzida (JOHNSON, 2012; REIS, 2014). Em 2014, mais de 8% das espécies de aves, répteis e mamíferos apreendidas no Brasil e encaminhadas aos Centros de Triagem de Animais Silvestres (CETAS) correspondiam a espécies ameaçadas de extinção (IBAMA, 2016). Entre os vertebrados, estes animais são os mais cotados no mercado e com grande demanda, o

que estimula o tráfico de animais silvestres e o torna mais difícil de combater (IYENGAR, 2014; JOHNSON, 2012; OLIVEIRA, 2000).

É difícil determinar os impactos do tráfico de animais silvestres sobre as populações selvagens, pois há falta de informações aprofundadas sobre o tema (FERREIRA; COSTA, 2017). Entretanto, sabe-se que os impactos permeiam entre temáticas de saúde pública, ecologia, economia e sociedade (DESTRO et al., 2012). Ainda que sejam citados alguns quantitativos sobre o comércio ilegal de animais silvestres, estes são apenas estimativas ou se baseiam em números de apreensões, o que pode subestimar a real quantidade de animais explorados por essa atividade visto que a retirada de espécimes da natureza nem sempre resulta em apreensões e, mesmo quando acontecem, muitos outros indivíduos morreram antes mesmo de serem comercializados (FRANCO et al., 2012; REIS, 2014; ROSEN; SMITH, 2010; UNODC, 2016).

Embora não representem os números reais do tráfico, os dados de apreensões são importantes para o desenvolvimento de ações de combate ao comércio ilegal. No entanto, Pimentel e Santos (2009) destacam que as informações dos órgãos brasileiros de fiscalização são incompletas e desorganizadas, dificultando a geração de dados estatísticos e demais informações sobre o tráfico de animais silvestres no Brasil.

Os primeiros registros de tráfico de aves relatam o transporte de animais em malas ou outros tipos de embalagem, porém a taxa de mortalidade nesse caso é bastante elevada, chegando a 90%. Além disso, os traficantes são facilmente descobertos devido aos odores e ruídos emitidos pelos animais, o que levou à mudança do *modus operandi* para comercialização ilegal dos ovos (AMADO, 2013; BÁRTOLO, 2013). Essa prática cresceu a partir dos anos 2000 devido, também, à facilidade do transporte (ALACS; GEORGES, 2008; AMADO, 2013; BÁRTOLO, 2013; JOHNSON, 2010). Outra utilidade da coleta de ovos percebida pelos traficantes é a facilidade em falsificar documentos junto a comerciantes credenciados (AMADO, 2013; COSTA, 2017). Retirar ovos da natureza é ainda mais prejudicial ao ambiente e às espécies visto que é possível capturar uma grande quantidade destes, além de que muitos animais adultos são mortos e ninhos são destruídos para que os ovos possam ser acessados (FRANCO et al., 2012), podendo prejudicar espécies com restrições de local para postura de ovos, diminuindo seu sucesso reprodutivo.

No Brasil, o tráfico de ovos de aves atende principalmente o mercado internacional (COSTA, 2017), sendo Portugal a porta de entrada na Europa de ovos traficados de toda a América do Sul. O Brasil é país de trânsito de ovos sul-americanos devido às relações amigáveis com

Portugal, fazendo com que hajam voos diretos em frequentes horários e em aeroportos que não possuem fiscalização do IBAMA (AMADO, 2013). Bártolo (2013) analisou as apreensões de ovos em aeroportos de Portugal de 2009 a 2011. Foi observado um aumento gradual na apreensão de ovos de aves nesses três anos, enquanto que a apreensão de indivíduos diminuiu; todos ovos apreendidos eram provenientes do Brasil. Operações internacionais da Organização Internacional de Polícia Criminal (*International Criminal Police Organization – INTERPOL*) realizaram apreensão de ovos provenientes da América do Sul em outros países da Europa. Entre 2007 e 2012 foram apreendidos, na Espanha, 30 ovos de psitaciformes vindos do Brasil e, somente em 2013, houve apreensão de 150 ovos brasileiros na Suíça, assim como 74 ovos jamaicanos na Áustria em 2011 (UNODC, 2016).

Na rota internacional do tráfico, além de Portugal como porta de entrada, o Reino Unido desempenha grande papel como país de trânsito dos ovos e, em menor escala, como fornecedor, enquanto que a Noruega é um grande receptor de ovos de aves, além de fazer distribuição, também em menor escala (SOLLUND; MAHER, 2015). Finlândia e Suécia também são países com registro de receptação de ovos de aves (ILLES, 2016). Além da América do Sul, Austrália e África são outros locais de origem de ovos para o tráfico internacional (ALACS; GEORGES, 2008; BÁRTOLO, 2013).

O Relatório da Operação Oxóssi realizada pela Polícia Federal (SARAIVA, 2009) indica o frequente tráfico de ovos do Brasil para o exterior, principalmente de espécies de psitaciformes, com preferência para as mais raras, como *Anodorhynchus leari* (arara-azul-de-lear), mas também são citados ovos de coruja. Eles são retirados principalmente da região norte e enviados para fora do País. Ovos traficados podem, ainda, corresponder a espécies de tucanos e emas (FILHO, 2003).

Em informe do Centro de Recuperação de Animais Silvestres do Parque Ecológico do Tietê (CRAS/PET)⁸, em São Paulo, foram recebidos ovos de duas apreensões realizadas nos anos de 2013 e 2015. Em um dos casos, no ano de 2013, a incubação resultou na eclosão de apenas 02 dos 17 ovos apreendidos. Os demais foram enviados para identificação genética em laboratório da Universidade de São Paulo (USP). Na apreensão de 2015, de 04 ovos, 02 eclodiram. Os outros ovos não foram

⁸ Informações recebidas via email no dia 28 de junho de 2017 após solicitação oficial de acordo com a Portaria DAEE 1.520, de 29/11/2001 do Governo do Estado de São Paulo.

enviados para análise molecular e a identificação se deu pelos filhotes nascidos e relato do portador dos ovos.

Outras fontes de informação incluem notícias publicadas em jornais de circulação regional, em sua maioria, ou nacional. Poucas apreensões são relatadas em jornais televisivos e, nas redes sociais, apenas páginas relacionadas à ONGs de proteção animal divulgam tais acontecimentos⁹. Em todas as notícias são relatadas apenas as apreensões, geralmente atribuindo os ovos a um grupo (aves, psitacídeos, papagaios, etc.).

Os números do tráfico de animais silvestres são alarmantes e demonstram a perda de biodiversidade da fauna brasileira ocasionada por essa atividade. No entanto, fatores como a dificuldade na identificação das espécies podem estar subestimando as estatísticas desse crime, o que o torna ainda mais grave. A identificação molecular de espécies através da técnica de DNA *barcoding* é uma metodologia de fácil aplicação sendo possível identificar a espécie correspondente a amostras coletadas como evidências biológicas de tráfico de animais silvestres de forma rápida e com baixo custo. Considerando que a legislação brasileira cita infrações cometidas contra espécies ameaçadas de extinção como uma circunstância agravante do crime, aumentando, conseqüentemente, a pena aplicada, a identificação fidedigna das espécies da fauna vítimas de crimes faz-se de extrema importância para que seja realizada correta dosimetria de pena em casos de tráfico de animais silvestres. A identificação genética de espécies através da técnica de DNA *barcoding* é uma alternativa de baixo custo e de fácil aplicação e simulações de situações reais do tráfico de ovos podem padronizar a melhor forma de aplicar esta técnica na resolução de crimes de comércio ilegal de ovos de aves.

⁹ As páginas das ONGs Renctas e Freeland Brasil no Facebook são bastante ativas na publicação de notícias sobre o tráfico de animais silvestres.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo geral

Fornecer elementos técnicos para aplicação de um protocolo de análise de DNA para identificação de espécies de aves em ovos comercializados ilegalmente.

1.5.2 Objetivos específicos

Analisar, *in silico*, a efetividade de *primers* descritos na literatura e fragmentos do gene citocromo oxidase I como marcadores moleculares de identificação de espécies de psitacídeos;

Padronizar a extração e amplificação de DNA em ovos de aves;

Examinar a extração e amplificação de DNA em amostras de ovos de aves em simulações forenses;

Identificar espécies em um caso real de tráfico de ovos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Esta secção está dividida em tópicos onde cada um corresponde a um dos objetivos específicos do estudo a fim de organizar a descrição da metodologia adotada no trabalho como um todo.

2.1 CARACTERIZAÇÃO DO MARCADOR DE IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES

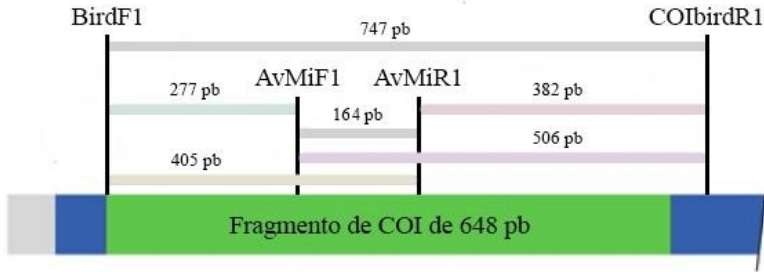
O marcador molecular escolhido para os testes de identificação de espécies está localizado na porção 5' do gene mitocondrial citocromo oxidase I (COI). Uma lista de 31 *primers* distintos já descritos na literatura é apresentada por Lijtmaer et al. (2012) para uso em análises de COI em aves, sendo 10 destes utilizados para amplificar *mini-barcodes*. Destes, escolheu-se para análise os quatro *primers* citados por Kerr et al. (2009a) e os diferentes pareamentos que podem ser formados entre os quatro (Tabela 1). O tamanho dos fragmentos foi dado conforme hibridização dos *primers* na maioria das aves (LIJTMAER et al., 2012). A hibridização dos *primers* pode resultar em fragmento de tamanho maior ou menor em algumas espécies. A Figura 4 mostra a representação dos fragmentos gerados por cada par de *primers*.

Tabela 1. Pareamento dos *primers* utilizados para testes *in silico* e tamanhos de fragmentos gerados por cada par.

<i>Primer forward (5' – 3')</i>	<i>Primer reverse (5' – 3')</i>	Fragmento (pb)
BirdF1 TTCTCCAACCACAAAGACATTGGCAC	COIbirdR2 ACGTGGGAGATAAATTCCAATCCTGG	747
AvMiF1 ACTGAAGCTCCGGCATGGGC	COIbirdR2 ACGTGGGAGATAAATTCCAATCCTGG	506
BirdF1 TTCTCCAACCACAAAGACATTGGCAC	AvMiR1 ACTGAAGCTCCGGCATGGGC	405
AvMiR1 ACTGAAGCTCCGGCATGGGC	COIbirdR2 ACGTGGGAGATAAATTCCAATCCTGG	382
BirdF1 TTCTCCAACCACAAAGACATTGGCAC	AvMiF1 ACTGAAGCTCCGGCATGGGC	277
AvMiF1 CCCCGACATAGCATTCC	AvMiR1 ACTGAAGCTCCGGCATGGGC	164

Fonte: Kerr et al. (2009a) (*primers*) e Lijtmaer et al. (2012) (tamanho dos fragmentos).

Figura 4. Representação de parte do gene citocromo oxidase I (COI) mostrando o tamanho e posição dos fragmentos gerados pelos pareamentos possíveis entre os quatro *primers* de Kerr (2009a).



Fonte: Adaptado de Lijtmaer et al. (2012).

Foram realizadas análises de bioinformática recomendadas por Núñez-Rodríguez et al. (em publicação) para análise do marcador e escolha dos *primers* universais. Incluem-se nessas recomendações a análise de qualidade e especificidade dos *primers* e análise em janelas para determinação de tamanhos de fragmentos que permitem identificação das espécies do conjunto de dados utilizado.

A análise de qualidade dos *primers* foi realizada através da ferramenta *OligoAnalyzer* (IDT INEGRATED DNA TECHNOLOGIES, 2018). A especificidade dos *primers* foi testada na ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (NCBI, 2018), onde foram realizados cinco alinhamentos distintos de cada *primers* com o banco de dados GenBank, utilizando: o banco de dados completo (coleção de nucleotídeos nr/nt), sequências apenas de aves (8.782 táxons), de humanos (genoma e transcritos), de amostras ambientais de Eubacteria (48.479 táxons) e de amostras ambientais de Eukarya (100.272 táxons).

Os *primers* foram, ainda, alinhados a 09 sequências completas de COI de psitacídeos utilizando o método ClustalW no *software* BioEdit®, versão 7.2.6 (HALL, 1999). As sequências utilizadas nesse alinhamento foram obtidas no GenBank em outubro de 2018 e correspondem às seguintes espécies: *Amazona ochrocephala* (papagaio-campeiro), *Ara ararauna* (arara-canindé), *Ara glaucogularis* (arara-de-garganta-azul), *Ara militaris* (arara-militar), *Forpus passerinus* (tuim-santo), *Primolius couloni* (maracanã-de-cabeça-azul), *Primolius maracana* (maracanã-verdadeira), *Psittacara rubritorquis* (periquito-de-garganta-vermelha) e *Pyrrhura rupicola* (tiriba-rupestre).

Nas análises *in silico* de determinação de menores fragmentos mais informativos foram utilizadas 131 sequências parciais de COI (região 5') compiladas a partir do *Barcode of Life Data System* (BOLD SYSTEMS, 2019a) em janeiro de 2018. Essas sequências corresponderam à 31 espécies pertencentes a 11 gêneros de psitacídeos (Tabela 2) constantes em listas de aves mais traficadas no Brasil. A busca das sequências no BOLD se deu a partir do termo “psittacidae” seguindo os critérios de: tamanho maior ou igual de 500 pb, pelo menos duas sequências por espécie e espécies pertencentes aos gêneros daquelas constantes em listas de espécies traficadas. Verificou-se a distribuição geográfica de cada espécie (IUCN, 2018) e foram descartadas sequências daquelas cuja distribuição não constava México, América Central e América do Sul.

Todas as sequências utilizadas foram alinhadas no MAFFT versão 7.271 (KATO; STANDLEY, 2013) e tiveram tamanho padronizado para 584 pb¹⁰, iniciando no nucleotídeo de posição 87 e terminando no nucleotídeo de posição 670 do gene COI de psitacídeos, que possui tamanho médio de 1107 pares de base. A análise em janelas realizada pelo *Species Identity and Evolution in R* (SPIDER) (BROWN et al., 2012) versão 1.5.0 em RStudio versão 1.0.143 foi utilizada para busca de regiões informativas correspondentes a cada tamanho de fragmento gerado pelos pares de *primers* escolhidos (506, 405, 382, 277 e 164 pb). O fragmento gerado pelo par BirdF1 + COIbirdR2 não foi testado por gerar um fragmento de 747 pares de base que já é descrito na literatura como um tamanho suficiente para identificação de espécies de aves (HEBERT et al., 2004). Ademais, as sequências usadas no teste são de menor tamanho que 747 pb.

Determinou-se que as janelas seriam formadas e analisadas no SPIDER a cada um (01) nucleotídeo, ou seja, para cada tamanho de fragmento são geradas várias janelas com início de cada janela a partir da posição seguinte à do nucleotídeo que iniciou a janela anterior. As funções utilizadas para análise em janelas foram *slidingWindow* e *slideAnalyses* para cada tamanho de fragmento, onde considerou-se os resultados de proporção de zero não-coespecíficos e proporção de clados com congruência entre as árvores *neighbor-joining* geradas a partir do tamanho de 584 pb e do tamanho das janelas.

A função *bestCloseMatch* do SPIDER foi utilizada antes e depois da análise em janelas para conferência do potencial de identificação de espécies de cada sequência. Antes da análise em janelas buscou-se

¹⁰ A análise em janelas só pode ser realizada a partir de sequências de mesmo tamanho.

verificar o número de sequências com espécie identificada corretamente a partir do tamanho padronizado de 584 pb (sequências inteiras). Após a análise em janelas verificou-se se o fragmento gerado por cada par de *primers* correspondia a regiões que permitem identificação de espécies segundo o SPIDER. Os cinco tamanhos de fragmento gerados pelos diferentes pareamentos dos *primers* foram testados com a função *bestCloseMatch* para verificar quantas sequências permitiriam a correta identificação das espécies.

Tabela 2. Lista de espécies cujas sequências obtidas no BOLD foram utilizadas para análises no SPIDER.

Espécie	Nome popular	Nº de sequências
<i>Amazona aestiva</i>	Papagaio verdadeiro	3
<i>Amazona amazonica</i>	Curica	2
<i>Amazona autumnalis</i>	Papagaio-diadema	4
<i>Amazona dufresniana</i>	Papagaio-de-bochecha-azul	2
<i>Amazona farinosa</i>	Papagaio-moleiro	8
<i>Amazona tucumana</i>	Papagaio-tucuman	3
<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>	Arara-azul	2
<i>Ara ararauna</i>	Arara-canindé	8
<i>Ara chloropterus</i>	Arara-vermelha	5
<i>Ara macao</i>	Arara-macao	7
<i>Brotogeris chrysoptera</i>	Periquito-de-asa-dourada	3
<i>Brotogeris jugularis</i>	Periquito-de-queixo-laranja	15
<i>Deropterus accipitrinus</i>	Anacã	2
<i>Eupsittula aurea</i>	Periquito-rei	2
<i>Eupsittula nana</i>	Periquito-jamaicano	2
<i>Eupsittula pertinax</i>	Periquito-de-bochecha-parda	8
<i>Forpus conspicillatus</i>	Tuim-da-colômbia	2
<i>Forpus modestus</i>	Tuim-de-bico-escuro-do-norte	2
<i>Forpus passerinus</i>	Tuim-santo	6
<i>Forpus xanthopterygius</i>	Tuim-de-asa-azul	2
<i>Pionites melanocephalus</i>	Marianinha-de-cabeça-preta	4
<i>Pionus fuscus</i>	Maitaca-roxa	5
<i>Pionus menstruus</i>	Maitaca-de-cabeça-roxa	8
<i>Psittacara finschi</i>	Aratinga-de-finsch	3
<i>Psittacara leucophthalmus</i>	Periquitão-maracanã	5
<i>Psittacara mitratus</i>	Aratinga-mitrada	3
<i>Pyrrhura egregia</i>	Tiriba-de-cauda-roxa	3
<i>Pyrrhura hoffmanni</i>	Periquito-de-asa-de-enxofre	3
<i>Pyrrhura molinae</i>	Tiriba-de-cara-suja	2
<i>Pyrrhura perlata</i>	Tiriba-de-barriga-vermelha	2
<i>Pyrrhura picta</i>	Tiriba-de-testa-azul	5
TOTAL		131

Fonte: elaborado pela autora (2019).

Os pares de *primers* cujo tamanho de fragmentos gerados permitem a correta identificação das espécies foram utilizados em ensaios de PCR com amostras das espécies *Gallus gallus* (galinha doméstica), *Coturnix japonica* (codorna japonesa), *Serinus canaria* (canário-doreino) e *Nymphicus hollandicus* (calopsita) em reações conforme protocolo de reagentes de Lijtmaer et al (2012), utilizando 1 µL de produto de extração de DNA (com concentrações entre 10 e 80 ng/µL) e o seguinte programa padronizado após diferentes testes de gradiente de temperatura de hibridização dos *primers* e tempo de cada etapa: 01 ciclo a 94°C por 40 s, seguido por 35 ciclos de 40 s a 94°C, 30 s a 52°C e 40 s a 72°C e, por fim, 01 ciclo de 72°C por 5 m.

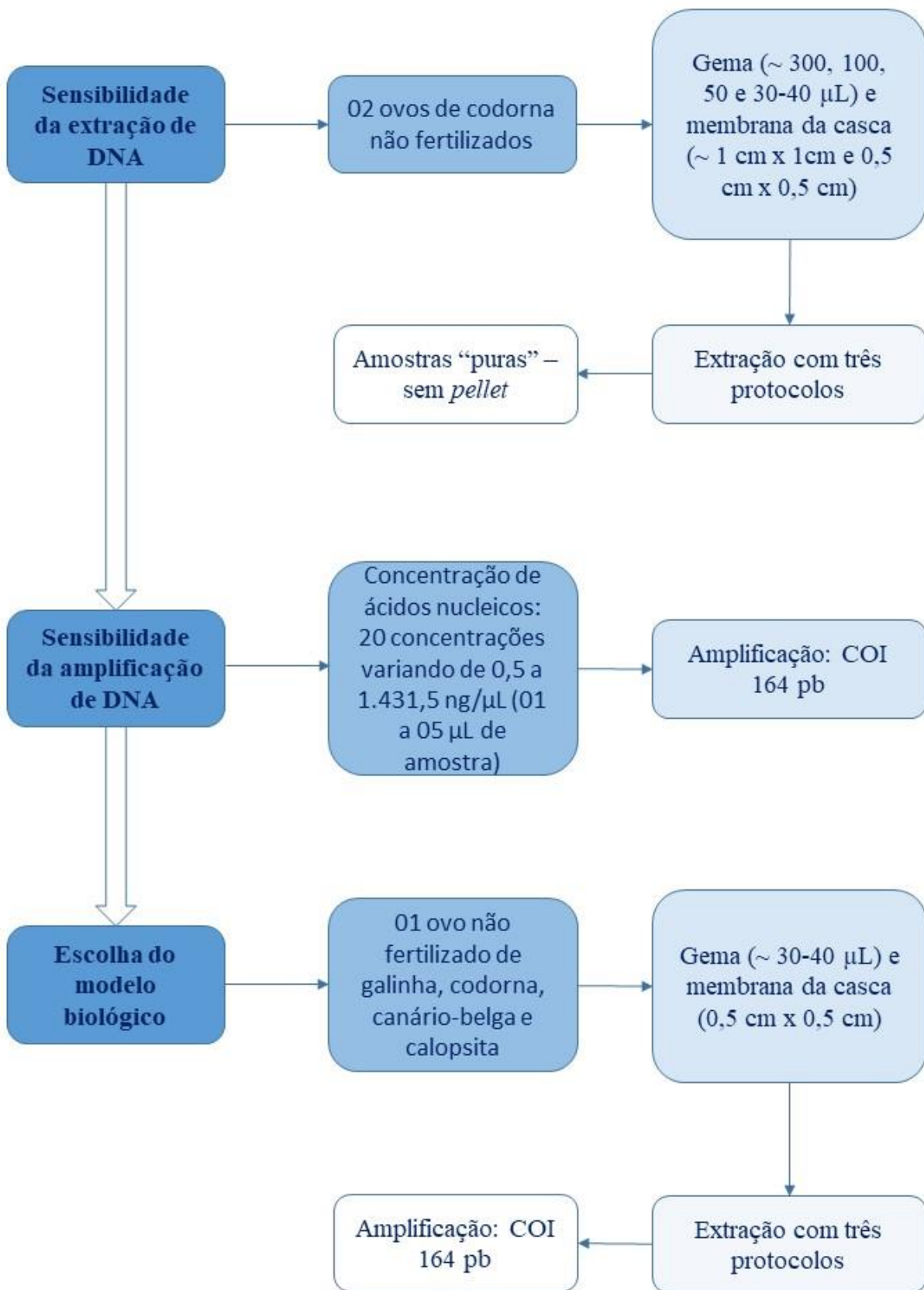
2.2 PADRONIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE ANÁLISE DE DNA EM OVOS

A padronização do protocolo de análise de DNA em ovos se deu em duas grandes etapas. A Figura 5 mostra a primeira etapa dividida em três passos sequenciais. Os ovos de *Gallus gallus* (galinha doméstica) e *Coturnix japonica* (codorna japonesa) foram adquiridos em supermercados; o ovo de *Serinus canaria* (canário-belga) foi doado pelos criadores Victor Hugo Keunecke e Marcelo Oliveira Dutra, do Canaril Floripa, registrado junto à Associação Catarinense de Ornitologia sob o número 098; o ovo de *Nymphicus hollandicus* (calopsita) foi doado pelo proprietário do Aviário Mundo Animal, Ley. Todos os estabelecimentos estão localizados em Florianópolis, SC. A Figura 6 apresenta a segunda etapa da padronização e seus diferentes testes de PCR. Nesta etapa, o ovo de codorna foi utilizado como modelo biológico do estudo.

As extrações de DNA em ambas etapas foram realizadas com os seguintes protocolos:

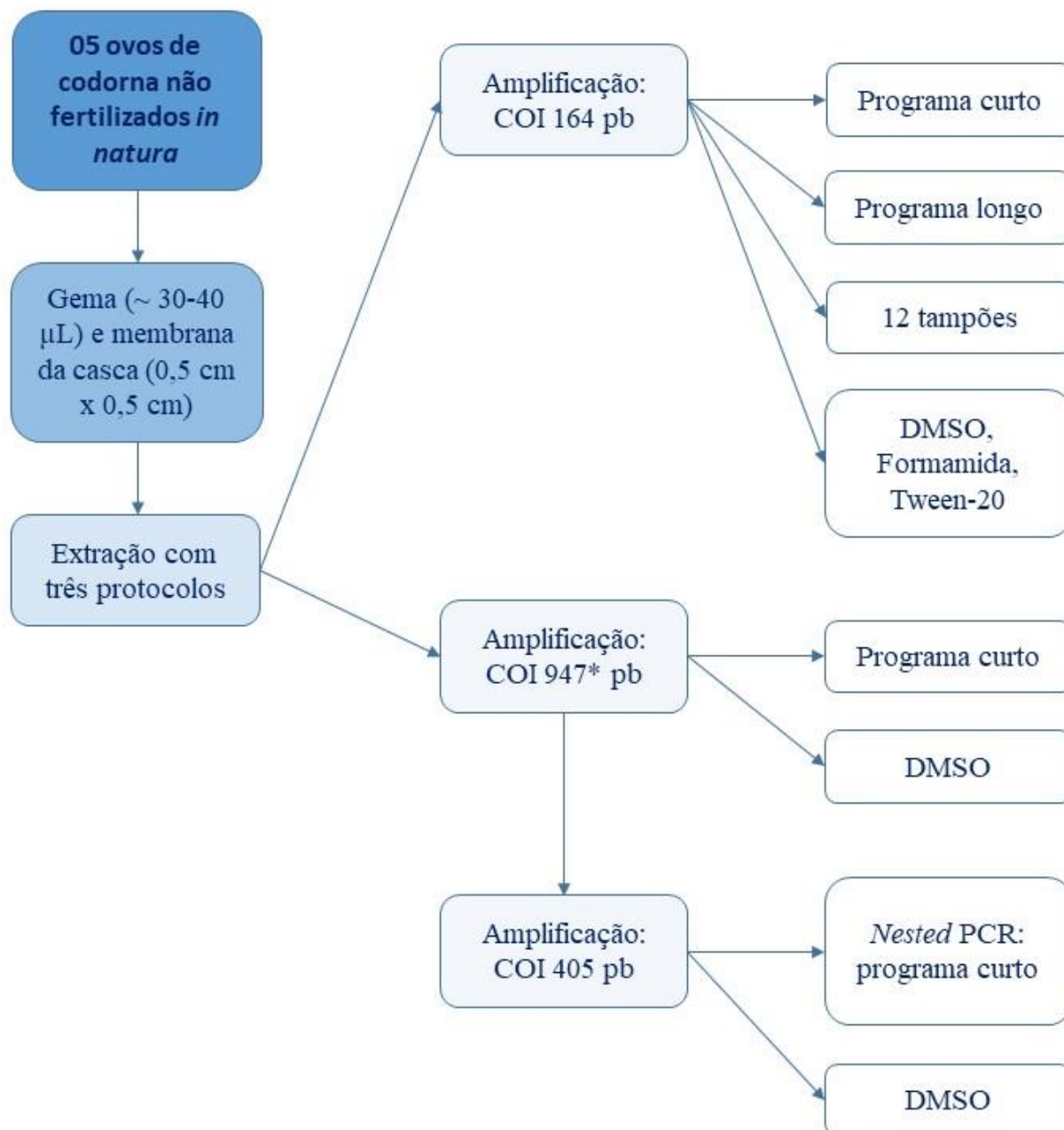
- 1) cloreto de sódio (Scaranto (2017) adaptado de Aljanabi e Martinez (1997) e modificado neste estudo: 5 µL de proteinase K a 20 mg/mL, sem uso de RNase e sem a etapa final com etanol 100%);
- 2) acetato de potássio (Pilotto et al (2018) adaptado por este estudo: quantidade de solução de lise e de acetato de potássio ajustada para 50 µL ou 50 mg de amostra, 10 µL de proteinase K a 20 mg/mL, sem uso de RNase).
- 3) acetato de amônio (Rivero et al. (2006) modificado neste estudo: quantidade de reagentes, tempo e rotações da centrifugação iguais ao protocolo com acetato de potássio).

Figura 5. Esquema da primeira etapa da metodologia adotada na padronização do protocolo de análise de DNA em ovos de aves.



Fonte: elaborado pela autora (2019).

Figura 6. Esquema da segunda etapa da metodologia adotada na padronização do protocolo de análise de DNA em ovos de aves.



Fonte: elaborado pela autora (2019).

* Em codorna, o fragmento gerado pelo par de *primers* BirdF1 + COIbirdR2 tem tamanho maior que descrito para as demais aves.

Após extração de DNA, todas as amostras foram analisadas por espectrofotometria para quantificação de DNA e presença de proteínas. Para o teste de sensibilidade, diferentes amostras da extração de DNA realizada na primeira etapa foram utilizadas a partir de suas concentrações de ácidos nucleicos. Para concentrações menores (até 100 ng/μL) utilizou-se 01 μL de produto de extração de DNA. A estratégia de utilização de maior volume de produto de extração (02 a 05 μL) foi utilizada de forma a gerar concentrações maiores de ácidos nucleicos na reação.

A amplificação de DNA na primeira etapa foi realizada utilizando os *primers* AvMiF1 + AvMiR1 (fragmento de 164 pb) com protocolo e programa de PCR descritos na seção 2.1, sendo este chamado de “programa curto” na segunda etapa da padronização. Na segunda etapa, além do programa curto, foi utilizado o programa de PCR longo, que consiste em: 01 ciclo a 94°C por 40 s, seguido por 06 ciclos de 94°C por 40 s, 45°C por 30 s e 72°C por 40 s, com posteriores 35 ciclos de 40 s a 94°C, 30 s a 52°C e 40 s a 72°C e, por fim, 01 ciclo de 72°C por 5 m. Nessa etapa, foram testados os seguintes adjuvantes de PCR: DMSO e Formamida a 1, 2, 3, 4 e 5%, Tween-20 a 0,5, 0,75 e 1% e 12 tampões de PCR com variações no pH do Tris-HCl e diferentes concentrações de KCl e MgCl₂, conforme protocolo Optiprime kit®. Na segunda etapa foram utilizados os *primers* AvMiF1 + AvMiR1, BirdF1 + COIbirdR2 e *nested* PCR desta última reação com os *primers* BirdF1 + AvMiR1. Produtos de PCR foram corados com GelRed® e visualizados em gel de agarose 1%.

Seis amostras foram selecionadas aleatoriamente para teste de sequenciamento. Estas foram purificadas com enzimas EXO e SAP e enviadas para sequenciamento com os *primers forward* e *reverse* no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). As reações de sequenciamento e precipitação do DNA foram realizadas a partir de protocolos padronizados do LAMEB¹¹. Os eletroferogramas foram analisados qualitativamente no Chromas Lite versão 2.6.4 (*Technelysium LTDA*®) de forma manual e o resultado do

¹¹ Disponíveis em: <<http://lameb.ccb.ufsc.br/files/2016/03/POP-031-Rea%C3%A7%C3%A3o-para-sequenciamento-no-Sequenciador-Automatizado-de-DNA-ABI3500.pdf>> e <<http://lameb.ccb.ufsc.br/files/2016/03/POP-032-Rea%C3%A7%C3%A3o-de-precipita%C3%A7%C3%A3o-com-etanol.EDTA-para-sequenciamento-no-Sequenciador-Automatizado-de-DNA-ABI3500.pdf>>.

sequenciamento, em formato FASTA, foi lançado no banco de dados BOLD para identificação das espécies.

2.3 SIMULAÇÃO DE SITUAÇÕES FORENSES

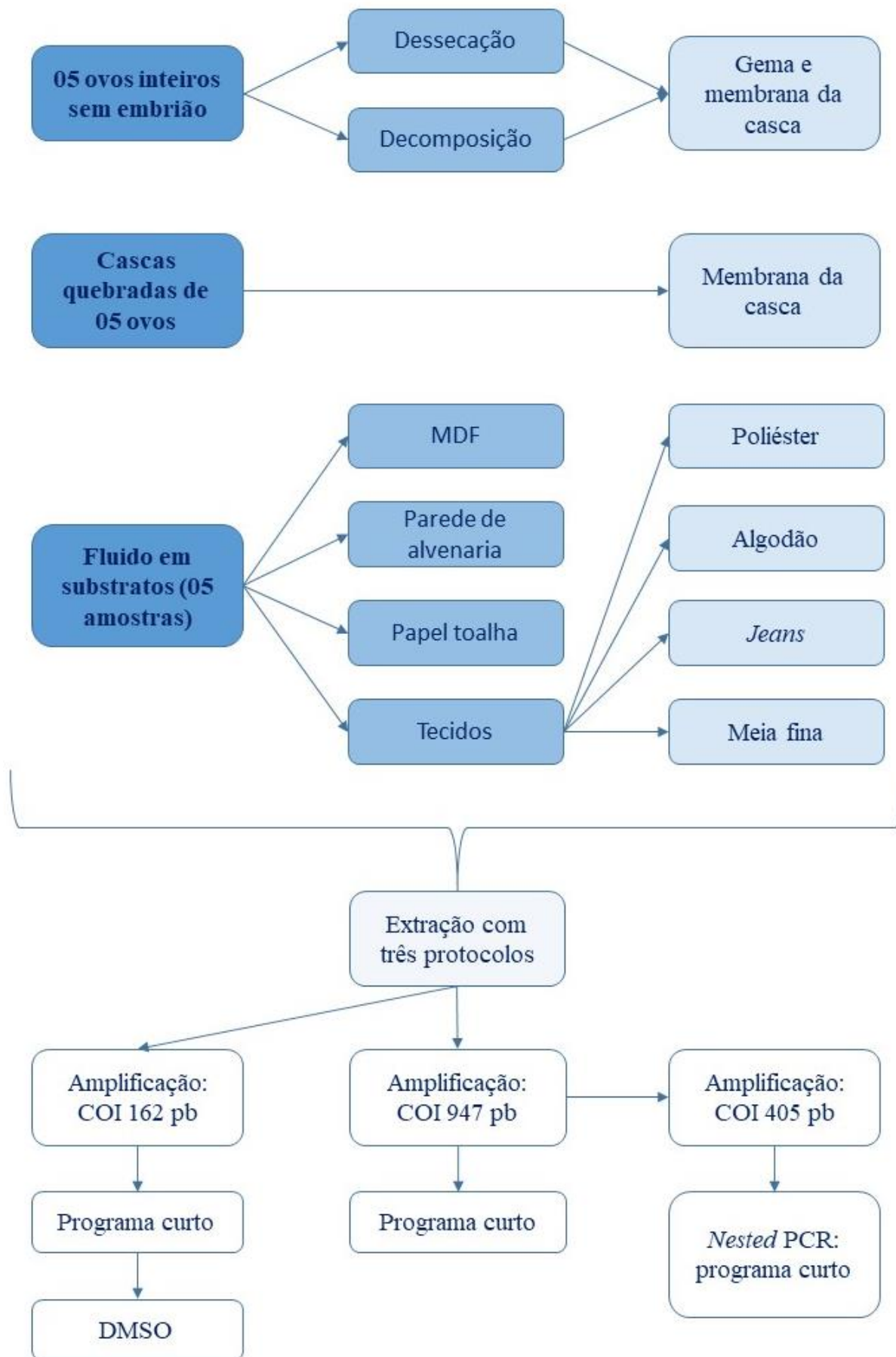
Considerando que vestígios biológicos provenientes de ovos podem apresentar as mais variadas formas e condições, foram simuladas diferentes possibilidades de amostras forense (Figura 7). Os ovos de codorna não fertilizados utilizados neste estudo foram adquiridos em supermercados de Florianópolis-SC, mantendo-se a escolha da mesma marca para todas as etapas de necessidade de compra de ovos.

O tratamento para desidratação foi realizado pela exposição dos ovos, em incubadora, a variações de temperatura e umidade. A decomposição foi resultante de ovos deixados em temperatura ambiente para decomposição natural. As cascas quebradas e os substratos com fluido de ovo ficaram expostos ao ambiente do laboratório durante um dia.

O fluido de ovos foi uma mistura de gema e albúmen depositada sobre os substratos apresentados na Figura 7 (aproximadamente 80 μ L), espalhando bem o fluido. Para análise de tecidos e papel toalha, cortou-se um quadrado de aproximadamente 0,5 x 0,5 cm em regiões onde foi possível perceber maior acúmulo de fluido. Os quadrados de tecidos foram desfiados e acondicionados em microtubos enquanto que o quadrado de papel toalha foi utilizado inteiro. Para coleta das amostras de deposição de fluido em parede e MDF foram utilizadas hastes flexíveis de algodão estéreis umedecidas com água ultrapura esterilizada. A ponta de algodão foi friccionada sobre as regiões contendo fluido, em um ângulo de aproximadamente 30° e, posteriormente, as pontas foram cortadas e acondicionadas em microtubos.

Os protocolos de extração de DNA e PCR e *primers* foram os mesmos descritos na seção 2.2, utilizando-se 1 μ L de produto de extração de DNA com diluição a 200 ng/ μ L apenas em amostras com concentração de ácidos nucleicos superior a 280 ng/ μ L, conforme teste de sensibilidade. Amostras com concentração de ácidos nucleicos inferior a 280 ng/ μ L não foram diluídas. Utilizou-se o programa curto em todos os ensaios de PCR e DMSO 3% na amplificação de fragmentos *mini-barcodes*.

Figura 7. Esquema das simulações forenses realizadas. MDF: placa de fibra de média densidade, poliéster: sintético; algodão: natural, *jeans*: misto de poliéster, algodão e elastano, meia fina: fio 15, 86% poliamida e 14% elastano.

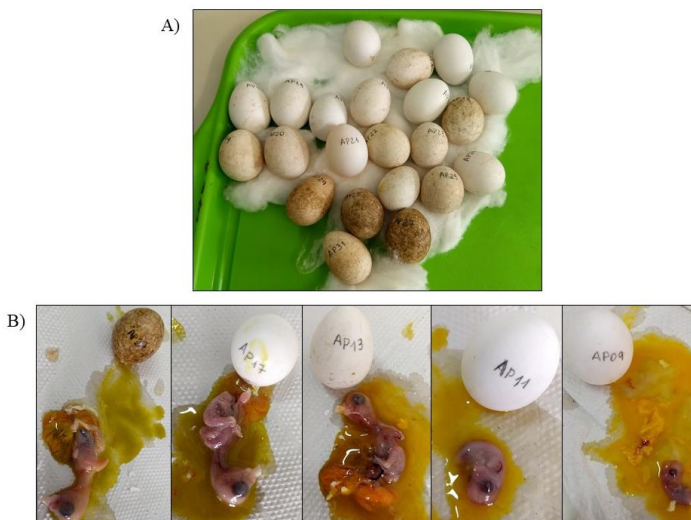


Fonte: elaborado pela autora (2019).

2.4 IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES EM OVOS APREENDIDOS

Em setembro de 2018, amostras dos 31 ovos do caso descrito na secção 1 foram recebidas pelo Laboratório de Polimorfismos Genéticos (LAPOGE) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) para identificação molecular de espécies. Para realização deste estudo e emissão de laudo técnico solicitado pela SR/PF/AM, todos os ovos do caso descrito na introdução tiveram amostras de partes de embrião, gema e casca disponibilizadas. As amostras chegaram ao LAPOGE/UFSC armazenadas em microtubos plásticos com tampa de rosca, identificados com número de 01 a 31 e indicando o tipo de amostra. Embriões e gema estavam mantidos em álcool e as cascas protegidas pelos microtubos. Os ovos apresentavam variação tanto em coloração quanto em forma, embora tinham tamanhos semelhantes (Figura 8A). Os embriões não se apresentavam em processo de decomposição ou mumificação e encontravam-se em diferentes estágios de desenvolvimento (Figura 8B). A Tabela 3 mostra a lista de ovos recebidos, com numeração e indicação do tipo de amostra recebida.

Figura 8. Ovos apreendidos em 2018 pela Polícia Federal em Manaus/AM em processo de curadoria para coleção zoológica do INPA. A): diferenças na coloração e morfometria dos ovos, B): diferenças no desenvolvimento embrionário.



Fonte: Gisiane Rodrigues Lima (2018).

Tabela 3. Identificação dos ovos conforme coleção zoológica do INPA e respectivos tipos de amostra recebidos pelo LAPOGE/UFSC para análise.

Identificação do ovo	Tipo de amostra
AP01	Embrião e casca
AP02	Gema e casca
AP03	Gema e casca
AP04	Embrião e casca
AP05	Embrião e casca
AP06	Embrião e casca
AP07	Embrião e casca
AP08	Embrião e casca
AP09	Embrião e casca
AP10	Embrião e casca
AP11	Embrião e casca
AP12	Embrião e casca
AP13	Embrião e casca
AP14	Embrião e casca
AP15	Embrião e casca
AP16	Embrião e casca
AP17	Embrião e casca
AP18	Embrião e casca
AP19	Embrião e casca
AP20	Casca
AP21	Casca
AP22	Embrião e casca
AP23	Embrião e casca
AP24	Casca
AP25	Embrião e casca
AP26	Embrião e casca
AP27	Embrião e casca
AP28	Embrião e casca
AP29	Casca
AP30	Embrião e casca
AP31	Casca

Fonte: elaborado pela autora (2019).

As análises moleculares foram realizadas conforme protocolos descritos na secção 2.2. Para extração de DNA foi utilizado apenas o protocolo com cloreto de sódio. Na PCR foi utilizado o programa curto, com uso de DMSO 3% para amplificação de *mini-barcode*s em amostras de membrana da casca. Os pares de *primers* utilizados foram, em ordem de uso: BirdF1 + COIbirdR2, *nested* PCR da reação anterior com BirdF1 + AvMiR1 e PCR convencional com AvMiF1 + AvMiR1. Para

sequenciamento, amostras de embrião e gema foram preferencialmente escolhidas devido à melhor qualidade das bandas amplificadas, sendo as membranas da casca utilizadas apenas para os cinco ovos que só possuíam este tipo de amostra. Estas foram purificadas com enzimas EXO e SAP e enviadas para sequenciamento no LAMEB/CCB/UFSC (secção 2.2) utilizando, preferencialmente, os *primers forward*, visto que teste anterior determinou não haver diferença entre os dois *primeirs* no sequenciamento. Os *primers reverse* foram utilizados apenas em caso de falha no sequenciamento com *primers forward*.

Os eletroferogramas foram analisados qualitativamente no Chromas Lite versão 2.6.4 (*Technelysium LTDA*®) de forma manual e o resultado do sequenciamento, em formato FASTA, foi lançado no banco de dados BOLD para identificação das espécies. O limiar de identificação de espécies foi determinado através da função *localMinima* do SPIDER (BROWN et al., 2012) utilizando sequências dos gêneros resultantes como mais próximos da(s) espécie(s) identificada(s) obtidas no BOLD (Tabela 4) e duas sequências obtidas entre as amostras testadas com tamanho de 682 pb e 683 pb e que tiveram correspondência no BOLD com valor de identidade acima de 99%.

Tabela 4. Gêneros cujas sequências obtidas no BOLD foram utilizadas para cálculo de limiar de identificação de espécies.

Gênero	Nº de sequências
<i>Alisterus</i>	03
<i>Amazona</i>	36
<i>Brotogeris</i>	21
<i>Eclectus</i>	03
<i>Ixobrychus</i>	32
<i>Melopsittacus</i>	08
<i>Micropsitta</i>	01
<i>Myiopsitta</i>	11
<i>Phalacrocorax</i>	97
<i>Pionus</i>	21
<i>Polytelis</i>	01
<i>Psittacus</i>	04
<i>Pterodroma</i>	269
TOTAL	507

Fonte: elaborado pela autora (2019).

Todas as sequências geradas foram editadas no BioEdit®, versão 7.2.6 (HALL, 1999) para o tamanho de 164 pb conforme região de hibridização dos *primers* AvMiF1 + AvMiR1 (posição 285 e 411, respectivamente). Estes fragmentos em formato FASTA também foram lançados no BOLD a fim de verificar se o *mini-barcode* gerado por estes *primers* permitiria identificar todos os ovos, caso seu uso fosse necessário.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esta secção está dividida em tópicos conforme a secção Material e Métodos a fim de organizar a resolução de cada objetivo específico.

3.1 CARACTERIZAÇÃO DO MARCADOR DE IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES

Entre os motivos da escolha da região 5' do gene citocromo oxidase I (COI) para identificação de espécies neste estudo tem-se que este é um marcador amplamente utilizado para aves e descrito na literatura como bastante eficiente neste grupo (ALIBADIAN et al., 2013; GONÇALVES, 2009; HEBERT et al., 2004; KERR et al., 2007, 2009c, 2009a; PARK et al., 2011; SAITOH et al., 2015; TAVARES et al., 2011; VAN DE PERRE; DE MOOR; LIBERT, 1984; VILAÇA et al., 2006), inclusive regiões *mini-barcodes* (LIJMAER et al., 2012; PATEL et al., 2010; SCHÄFFER; ZACHOS; KOBLMÜLLER, 2017). Em estudo evolutivo de neoaves¹² a partir de mitogenomas, Pacheco et al (2011) encontraram que os genes mitocondriais de neoaves são altamente variáveis entre os grupos, sendo COI aquele mais conservado, com a menor taxa de heterogeneidade¹³ entre as linhagens e um dos genes com maiores taxas de mutação, junto com citocromo oxidase II (COII), citocromo b (Cyt b) e NADH desidrogenase 2 (ND2).

Outra vantagem do uso de COI está no fato de que há um grande número e variedade de sequências depositadas no *Barcode of Life Datasystems* (BOLD) (BOLD SYSTEMS, 2019b), o que faz com que seja bastante provável identificar uma amostra proveniente de um ovo de apreensão utilizando este banco de dados. Entretanto, ainda há carência de sequências de diversas espécies em bancos de dados, mesmo no BOLD, onde, até o ano de 2018, apenas 53% das espécies de aves conhecidas possuíam seu *barcode* depositado, sendo esta uma das grandes limitações do uso da técnica (BARREIRA; LIJMAER; TUBARO, 2016).

A falta de dados não impede por completo a utilização de DNA *barcodes* visto que, mesmo não sendo possível identificar uma sequência questionada a nível de espécie, esta pode ser identificada a nível de gênero no BOLD (RATNASINGHAM; HEBERT, 2007, 2013). A partir disso

¹² Clado mais diverso entre as aves, correspondendo a 95% das espécies do grupo (JARVIS et al., 2014; ZHANG et al., 2014)

¹³ Fenótipos semelhantes produzidos por mecanismos genéticos diferentes.

pode-se buscar por espécimes referência para as espécies não contempladas no banco de dados e gerar sequências referência que possam ser comparadas à sequência questionada (CARVALHO, 2014; ROSSI et al., 2017) utilizando *softwares* como o MEGA X (KUMAR et al., 2018). Salienta-se que o uso desta metodologia exige que os espécimes referência sejam identificados corretamente por taxonomista. O uso de amostras provenientes de coleções biológicas são uma boa opção nestes casos.

O uso de *primers* universais e sequenciamento de DNA é primordial em situações de apreensão de ovos de aves, em detrimento de técnicas de menor custo, como *primers* espécie-específicos ou RFLP, que fazem detecção de espécies (GUAN et al., 2018; OGDEN; DAWNAY; MCEWING, 2009). Essas últimas podem ser aplicadas quando há caracteres morfológicos suficientes para direcionar a análise a um número limitado de espécies ou quando há interesse em reconhecer determinadas espécies prioritárias, sendo técnicas dependentes de prévia padronização (NÚÑEZ-RODRIGUEZ et al, dados em publicação; ZENG et al., 2018).

Entretanto, esse não é o caso de ovos de aves visto que a possibilidade de espécies é bastante abrangente. Somente psitaciformes brasileiros são 89 espécies diferentes (PIACENTINI et al., 2015), sem considerar as espécies de psitacídeos de ocorrência em outros países latino-americanos que sabidamente podem ser apreendidas no Brasil (BÁRTOLO, 2013) e as outras 34 ordens de aves existentes (JARVIS et al., 2014). Ademais, a análise morfológica do ovo permite identificá-los em aves ou répteis não aviários (IVERSON; EWERT, 1991), sendo bastante difícil que sejam identificados morfológicamente em algum nível taxonômico mais profundo devido à grande diversidade morfométrica observada em ovos de uma mesma espécie de ave e semelhanças entre espécies diferentes (STODDARD et al., 2017).

Embora no Genbank também seja encontrado um grande número de sequências de COI (IYENGAR, 2014), o BOLD é considerado mais confiável para uso em análises forenses (CARVALHO, 2014). Isso porque há exigência de ligação da sequência depositada no BOLD a um espécime referência devidamente identificado por taxonomista especialista no grupo e registrado em coleção biológica reconhecida (RATNASINGHAM; HEBERT, 2007). Ademais, demonstrou-se depósito de sequências errôneas de COI no Genbank (MIOUCHOWSKA et al., 2018). Portanto, todas as sequências utilizadas neste estudo para análises *in silico* foram obtidas no BOLD, assim como a identificação de espécies descrita no tópico 5 foi realizada a partir deste banco de dados.

As análises de bioinformática foram realizadas a partir de sequências de psitacídeos. A família foi escolhida por pertencer aos psitacíformes, que é considerada a segunda ordem de aves mais traficada no mundo (PEREIRA et al., 2018). No Brasil, o tráfico de psitacíformes é superado apenas pelos passeríformes (COSTA, 2017) devido à cultura passaríneira presente no País (RENCTAS, 2001). No entanto, não foram encontrados registros na literatura de tráfico de ovos de passeríformes, enquanto que os psitacíformes são as aves que mais sofrem com a captura de ovos para comércio ilegal (NETO, 2012). Assim, mesmo que seja necessário identificar espécies em ovos de outros táxons, optou-se por focar as análises inicialmente na família Psittacidae como uma forma de abranger maior nível de aprofundamento e possibilitar o uso imediato em situações reais, visto que a probabilidade de que ovos apreendidos sejam de psitacídeos é muito alta. Além disso, essas podem servir como modelo para análises referentes a outros táxons.

A universalidade de um *primer* pode ser mais ampla ou mais restrita. Há na literatura a descrição de *primers* universais de COI para vertebrados (IVANOVA et al., 2007; SORENSON et al., 1999) e invertebrados (FOLMER et al., 1994), para peixes (IVANOVA et al., 2007), morcegos (IVANOVA; CLARE; BORISENKO, 2012), aves europeias (SCHÄFFER; ZACHOS; KOBLMÜLLER, 2017), aves da Nova Zelândia e Antártica (PATEL et al., 2010), entre outros. Quanto mais abrangente em relação ao nível taxonômico for um *primer*, mais chances ele tem de não ser eficiente para todas as espécies do grupo a que se propõe atuar (SHARMA; KOBAYASHI, 2014). Os *primers* de Kerr et al (2009a) e suas diferentes combinações foram escolhidos por terem sido testados *in vitro* em um grande número de espécies de aves neotropicais do sul (mais de 500 apenas no estudo citado).

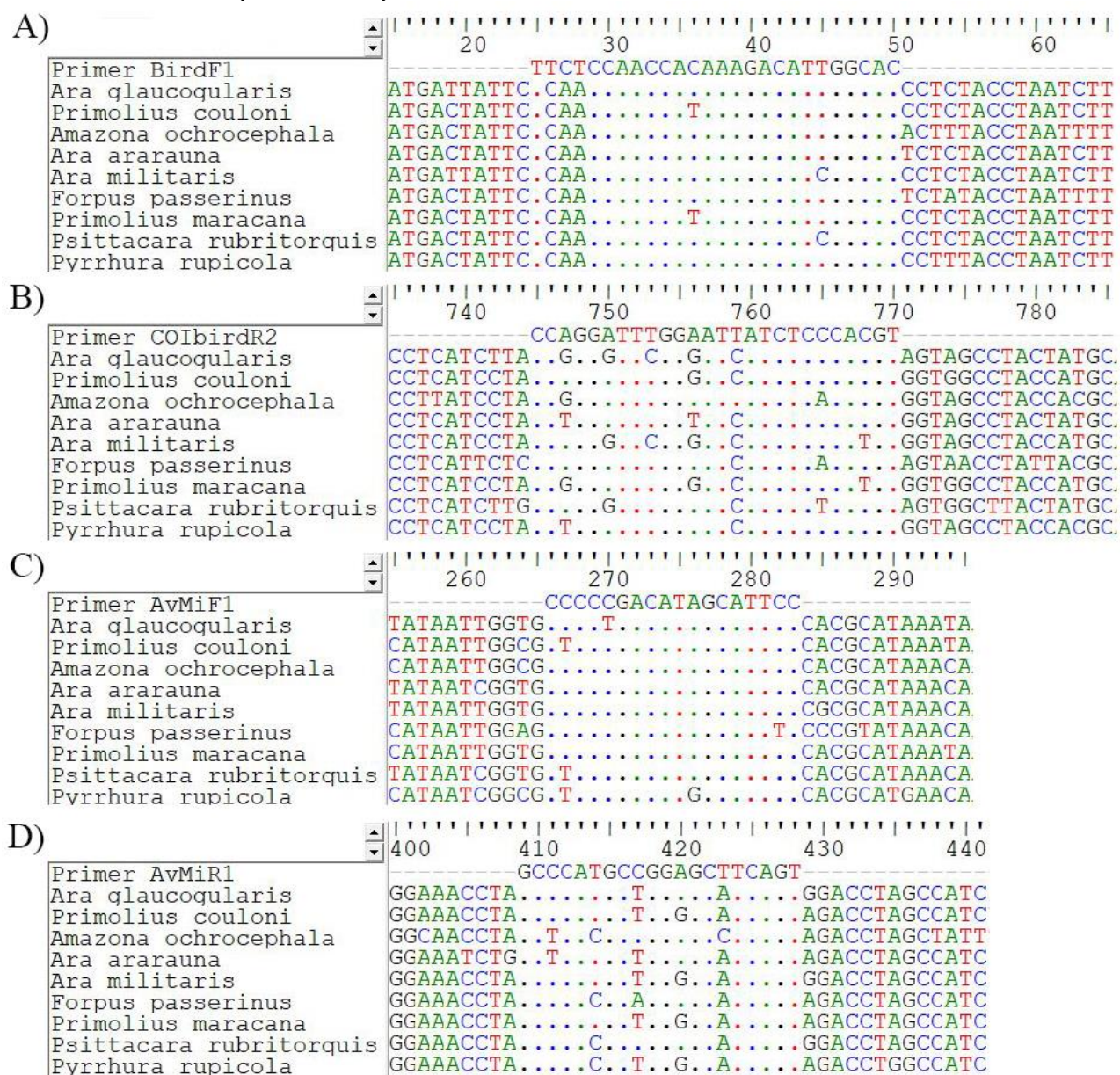
Vários parâmetros moleculares devem ser atendidos para garantir a qualidade dos *primers* e diminuir falhas na amplificação (LORENZ, 2012; SAMBROOK; GREEN, 2012). Embora as análises deste estudo demonstraram que os *primers* de Kerr et al (2009a) podem formar pareamento de até cinco bases em auto e hetero-dímeros, os demais parâmetros se encontraram dentro dos valores indicativos de boa qualidade (Tabela 5). Ademais, o alinhamento realizado com sequências de COI de psitacídeos demonstrou poucas bases não alinhadas, principalmente na região 3' (Figura 9). No caso de *primers* universais, nem sempre é possível atingir de forma exata todos os critérios, mas é importante que sejam otimizados o máximo possível a fim de garantir a eficiência da PCR (CAMPOS; QUESADA, 2017).

Tabela 5. Qualidade dos *primers* BirdF1, COIbirdR1, AvMiF1 e AvMiR1. Resultados referentes a grampos indicam a maior temperatura na qual ocorre formação de grampos. Resultados de auto-dímeros e hetero-dímeros (H-d) indicam o intervalo de número de pares de bases pareados.

<i>Primer</i>	G (%)	Tm (° C)	Grampos (° C)	Auto-dímeros (pb)	Hetero-dímeros (pb)	
					<i>Primer</i>	H-d
BirdF1	46,2	59,8	39,4	2 a 4	COIbirdR1	2 a 5
					AvMiF1	2
					AvMiR1	2 a 3
COIbirdR1	46,2	58,7	37,2	2 a 4	AvMiF1	2 a 3
					AvMiR1	2 a 4
AvMiF1	61,1	55,5	-	2	AvMiR1	2 a 3
AvMiR1	65,0	63,0	41,4	2 a 4	-	-

Fonte: elaborado pela autora (2019).

Figura 9. Alinhamento dos *primers* em estudo com seqüências de COI de psitacídeos. A: BirdF1, B: COIbirdR2, C: AvMiF1, D: AvMiR1. Os *primers* COIbirdR2 e AvMiR1 foram transformados em seus reversos complementos antes do alinhamento utilizando a ferramenta disponível em <<http://www.cellbiol.com/>>.



Fonte: elaborado pela autora (2019).

É comum que *primers* universais de um determinado grupo taxonômico sejam capazes de amplificar outros táxons. Através da análise realizada no BLAST, encontrou-se que os resultados de similaridade, *score* total e *e-value* entre as sequências dos *primers* e sequências de aves apresentaram valores mais robustos que em sequências de humanos e amostras ambientais de Eubacteria e Eukarya (Tabela 6). Isso evidenciou uma maior especificidade dos *primers* ao grupo alvo do estudo em relação a possíveis contaminantes da amostra (DNA humano e DNA de microorganismos).

Vestígios biológicos forense frequentemente encontram-se em pouca quantidade e com DNA altamente degradado (ALAEDDINI; WALSH; ABBAS, 2010). Isso pode ser bastante comum em amostras de ovos apreendidos, visto a exposição ambiental variada a que são submetidos durante os procedimentos do tráfico. Embora fragmentos menores sejam mais fáceis de amplificar, o desafio dos *mini-barcodes* é que estas pequenas regiões podem ser mais difíceis de identificar corretamente as espécies (FORAN; FISCHER; STOLOFF, 2015). Através de ferramentas de bioinformática é possível determinar as menores e mais informativas regiões *mini-barcodes* para um dado grupo de espécies (BOYER et al., 2012; BROWN et al., 2012; DOÑA et al., 2015), como foi realizado neste estudo.

Tabela 6. Resultados do teste de especificidade *in silico* a partir do alinhamento BLAST de cada *primer* com cada conjunto de sequências do GenBank analisado.

Sequências	Parâmetros	<i>Primers</i>			
		BirdF1	COIbirdR2	AvMiF1	AvMiR1
Geral	% de identidade	100	100	100	100
	% de cobertura	84 a 100	100	100	100
	<i>Score</i> total	44,1 a 52	52	40,1	40,1
	<i>e-value</i>	2e-04 a 0,058	2e-04	0,30	0,30
Aves	% de identidade	100	100	100	90 a 100
	% de cobertura	84 a 100	100	100	100
	<i>Score</i> total	52 a 44,1	52	40,1	32,2 a 40,1
	<i>e-value</i>	1e-05 a 0,003	1e-05	0,018	0,018 a 4,3
Humano	% de identidade	94 a 100	95 a 100	94 a 100	94 a 100
	% de cobertura	53 a 100	53 a 100	65 a 100	65 a 100
	<i>Score</i> total	28,2 a 34,2	28,2 a 34,2	24,3 a 28,2	24,3 a 30,2
	<i>e-value</i>	1,6 a 96	1,6 a 96	36 a 562	36 a 562
Eubacteria	% de identidade	91 a 100	100	100	94 a 100
	% de cobertura	50 a 76	50 a 73	65 a 85	65 a 85
	<i>Score</i> total	26,3 a 32,2	26,3 a 32,2	26,3 a 30,2	26,3 a 30,2
	<i>e-value</i>	4,7 a 292	4,7 a 291	6,9 a 108	10 a 159
Eukarya	% de identidade	100	94 a 100	100	93 a 100
	% de cobertura	42 a 53	46 a 76	50 a 70	50 a 70
	<i>Score</i> total	22,3 a 28,2	24,3 a 32,2	20,3 a 24,3	20,3 a 24,3

Sequências	Parâmetros	Primers			
		BirdF1	COIbirdR2	AvMiF1	AvMiR1
	<i>e-value</i>	3,4 a 212	0,28 a 69	32 a 503	26 a 410

Fonte: elaborado pela autora (2019).

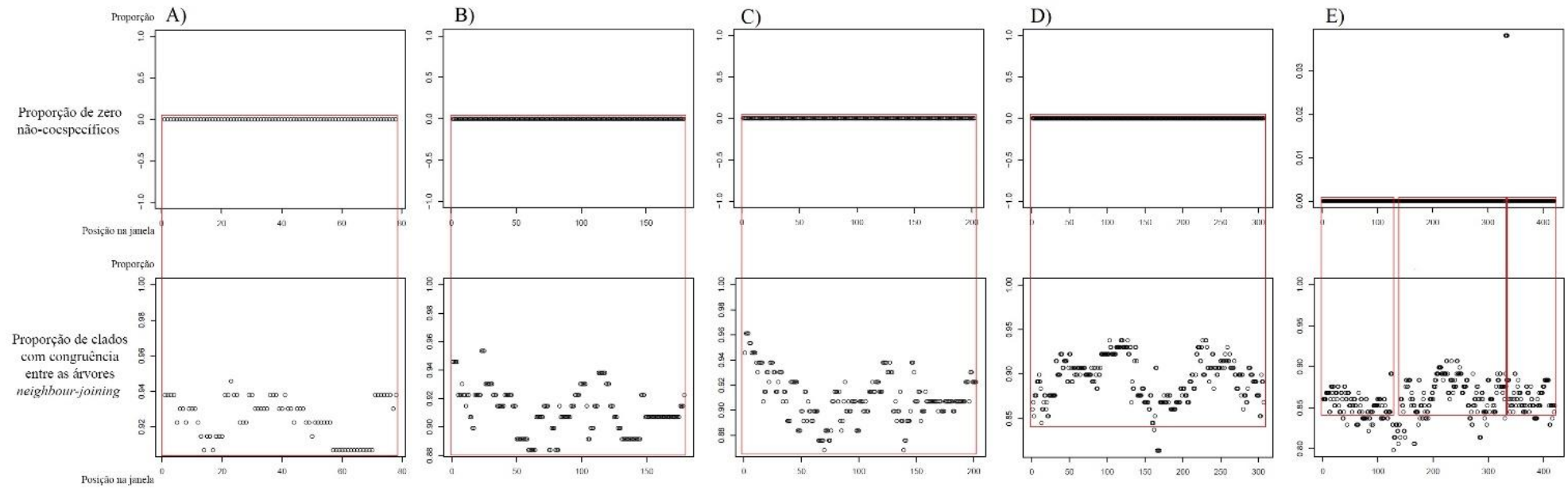
Na análise em janelas realizada no SPIDER, a proporção de zero não-coespecíficos¹⁴ deve ser igual a zero e a proporção de cladogramas com congruência entre as árvores *neighbor-joining* da janela e das sequências inteiras¹⁵ deve ser superior a 0,84 (BOYER et al., 2012). As análises em janelas realizadas neste estudo demonstraram que é possível identificar as espécies testadas mesmo com fragmento de tamanho bastante reduzido (164 pb) (Figura 10), o que amplia a possibilidade de identificação de espécies de psitacídeos em ovos em situações bastante extremas. Além disso, observou-se que as regiões de hibridização dos *primers* de Kerr et al (2009a) formam fragmentos que ficaram dentro das regiões de identificação das espécies de psitacídeos dadas pelo SPIDER. Encontrou-se, também, que estas regiões possuem menor número de nucleotídeos diagnósticos¹⁶, sendo, portanto, consideradas boas regiões para *primers* universais (BOYER et al., 2012). Nenhum dos fragmentos das sequências do conjunto de dados utilizado neste estudo atingiu 100% de sequências identificadas, como ocorreu com o tamanho padronizado de 584 pb (405 pb e 277 pb = 96,77% e 164 pb = 90%), o que pode ter relação com a baixa representatividade de sequências no conjunto de dados.

¹⁴ Proporção de quantas distâncias intra e interespecíficas não permitem identificar todas as espécies do conjunto de dados.

¹⁵ O SPIDER cria árvores filogenéticas com o tamanho completo das sequências e com os fragmentos determinados pelo tamanho das janelas. Uma a uma, todas as árvores dos fragmentos testados são comparadas com a árvore das sequências completas a fim de verificar se o agrupamento das espécies é igual entre as duas árvores.

¹⁶ São assim chamados os nucleotídeos que são específicos em determinada posição para cada espécie. Em casos de *primers* universais, espera-se que as regiões de flaqueamento sejam mais conservadas, ou seja, com menor número de nucleotídeos diagnósticos, enquanto que se espera maior número destes em fragmentos de identificação de espécies.

Figura 10. Resultado das análises no SPIDER para determinação da menor e mais informativa região *barcode* de COI em espécies de psitacídeos. A: 506 pb; B: 405 pb; C: 382 pb; D: 277 pb; E: 164 pb. Em vermelho estão demarcadas as intersecções entre a proporção de zero não-coespecíficos e as proporções de clados com congruência entre as árvores *neighbour-joining* das janelas e das seqüências inteiras com valores acima de 0,84.



Fonte: elaborado pela autora (2019).

Através da PCR não foi possível amplificar os fragmentos de 277, 382 e 506 pb nas espécies testadas (*C. japonica*, *G. gallus*, *S. canaria* e *N. hollandicus*). O par de *primers* que gera o fragmento de 405 pb teve hibridização inespecífica, gerando duas ou mais bandas em algumas espécies. No entanto, foi utilizado em *nested* PCR e amplificou uma banda única. No caso do fragmento de 164 pb, a amplificação foi possível, porém, por ser um fragmento de tamanho pequeno, podem ser perdidos alguns nucleotídeos diagnósticos devido a artefatos da técnica de sequenciamento de Sanger (SULTANA et al., 2018). Apesar disso, fragmentos de tamanho superior a 100 pb frequentemente resultam em um bom sequenciamento (YANG et al., 2018). Assim, escolheu-se para as demais análises, os pares de *primers* BirdF1 + COIbirdR2, BirdF1 + AvMiR1 e AvMiF1 + AvMiR.

A despeito das vantagens do uso de COI e sua eficiência na identificação de espécies de psitacídeos demonstrada pelas análises *in silico* deste estudo e na literatura, inclusive na identificação de espécies de aves crípticas e proximamente relacionadas (BAKER; TAVARES; ELBOURNE, 2009; KERR et al., 2009a; TAVARES; BAKER, 2008; VILAÇA et al., 2006), embora bastante raros (BARREIRA; LIJMAER; TUBARO, 2016), há casos onde não é possível identificar espécies a partir do uso de COI¹⁷. Isso ocorre com os Tiranídeos, gênero *Lorus* (KERR et al., 2009a) e oito espécies do gênero *Sporophila* (BARREIRA; LIJMAER; TUBARO, 2016)¹⁸. Entretanto, COI é o gene mitocondrial de aves que, até o momento, estudos determinaram como aquele com características evolutivas consideradas mais eficientes para o grupo. Isso porque as taxas de divergência não variam significativamente entre os genes mitocondriais em aves e os demais genes têm funcionalidade igual ou inferior ao COI (BARREIRA; LIJMAER; TUBARO, 2016; KERR et al., 2009a; PACHECO et al., 2011), o que representa um problema para a identificação destas espécies citadas na literatura por DNA *barcode* utilizando mtDNA.

Nesses casos, uma alternativa possível é a utilização de *primers* espécie-específicos para identificação a nível de espécie (NÚÑEZ-RODRIGUEZ et al, dados em publicação). A amplificação de fragmentos de genes mitocondriais seguida do uso de RFLP do fragmento amplificado também pode ser uma alternativa (FERRITO; BERTOLINO;

¹⁷ Espécies resultantes de radiações recentes e hibridização entre espécies (HEBERT et al., 2004).

¹⁸ Tiranídeos e gênero *Sporophila* são passeriformes e gênero *Lorus* são psitacíformes.

PAPPALARDO, 2016; SUNTRARACHUN; CHANHOMÉ; SUMONTHA, 2018), assim como o uso conjunto de mais de um gene.

3.2 PADRONIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE ANÁLISE DE DNA EM OVOS

Tendo em vista a escassez de amostra em termos de quantidade muitas vezes presente em situações forenses (ALAEEDINI; WALSH; ABBAS, 2010) e a necessidade de manter parte das amostras armazenadas como prova (RODRIGUES; FRANCEZ; GARRIDO, 2018), testes de sensibilidade da análise de DNA são importantes para determinar o mínimo de material biológico necessário em um diagnóstico eficiente. Ademais, a presença de componentes inibidores de reação pode interferir tanto nos experimentos de extração quanto de amplificação de DNA (WILSON, 1997) e a utilização de quantidade menor de amostra pode ser uma forma de reduzir ou eliminar a ação destes inibidores (DEMEKE; JENKINS, 2010; SCHRADER et al., 2012; WILSON, 1997). Testes de sensibilidade também são importantes como meio de padronizar os limites da análise de DNA e garantir a qualidade destas (SWGDM, 2016).

Neste estudo, foi possível padronizar a utilização de uma quantidade mínima de aproximadamente 30 a 40 μL (ou mg) de gema e 0,5 cm x 0,5 cm de membrana da casca na extração de DNA, obtendo amostras sem *pellet*¹⁹ visível. Optou-se por não padronizar a concentração de ácidos nucleicos em todas as amostras devido à grande variabilidade no rendimento de ácidos nucleicos obtido na extração, com concentração mínima de 0,5 ng/ μL . Nos ensaios de amplificação de fragmento de COI foram obtidos resultados positivos em amostras com concentrações de ácidos nucleicos entre 0,5 e 280 ng/ μL . Amostras com concentração maior que 280 ng/ μL precisaram ser diluídas dado o insucesso na PCR. No entanto, casos de concentração de ácidos nucleicos acima de 200 ng/ μL foram bastante raros em extração de DNA em partes de ovos que não incluem o embrião.

Tal resultado possivelmente está relacionado com o fato de que uma quantidade mínima de amostra (01 μL , por exemplo) aumenta a diluição de DNA no volume final da PCR, fazendo com que os inibidores também sejam diluídos a concentrações não inibitórias (DEMEKE; JENKINS, 2010; SCHRADER et al., 2012; WILSON, 1997), assim como a diluição prévia das amostras de extração de DNA a concentrações

¹⁹ *Pellets* formados, possivelmente, por complexos proteínas + SDS + lipídeos.

baixar, como 20 a 50 ng/ μ L. A diluição também pode diminuir a sensibilidade da PCR por também reduzir a concentração de DNA, mas, nesse caso, não foi o que ocorreu.

Durante a manipulação dos ovos das quatro espécies selecionadas para teste notou-se diferenças físicas relacionadas à resistência da casca e da membrana da casca, coloração da gema e quantidade de albúmen dentro de cada ovo, mesmo considerando o fato de que nenhum ovo estava fertilizado. A coloração amarelada da gema e seus diferentes tons é dada pela presença de carotenoides diversos (BIRKHEAD, 2016; BLOUNT; HOUSTON; MOLLER, 2000), compostos que são adquiridos durante a alimentação, sendo provável que a composição da gema em cada ovo fosse diferente. A composição da casca varia tanto entre espécies, quanto de acordo com a alimentação (BIRKHEAD, 2016). Além disso, a rigidez da membrana da casca é determinada pela sua composição proteica e varia entre espécies (BIRKHEAD, 2016; STODDARD et al., 2017). A partir de tais características visíveis foi possível inferir que também haviam variações químicas entre os ovos utilizados.

Os resultados mostraram não haver diferença nos ensaios de amplificação de DNA (Figura 11), sendo possível extrair e amplificar a região de interesse em todas as espécies e partes de ovo testadas no presente estudo. Também não foi observada diferença entre taxa de sucesso e insucesso da PCR em amostras de extração de DNA a partir dos três protocolos utilizados. Variações na intensidade das bandas foram mais provavelmente relacionadas à concentração de DNA e pureza das amostras, que pode variar em cada uma delas (HUGGETT et al., 2008), mesmo que o processo de extração tenha sido realizado no mesmo dia e pela mesma pessoa, em vez de diferenças entre espécies. Assim, optou-se pelo uso de ovos de *Coturnix japonica* nos demais ensaios.

Figura 11. Eletroforese de fragmentos de 164 pb de COI amplificados a partir de amostras de ovos de quatro espécies de aves domésticas, duas partes do ovos e três protocolos de extração utilizando os *primers* AvMiF1 + AvMiR1. G: gema, M: membrana da casca, Nh: *Nymphicus hollandicus*, Gg: *Gallus gallus*, Sc: *Serinus canaria*, Cj: *Coturnix japonica*, 1: cloreto de sódio, 2: acetato de potássio, 3: acetato de amônio, C-: controle negativo.



Fonte: elaborado pela autora (2019).

Embora todas as amostras deste teste tiveram sucesso na amplificação de fragmentos de COI, sabendo-se que a diferença entre concentração inibitória e não inibitória de um determinado componente é bastante sensível (ROSSEN et al., 1992), não se pode excluir a possibilidade de falhas em análises de ovos em uma aplicação futura em caso real de tráfico, visto que não foram realizadas análises de composição química de cada ovo utilizado nos testes a fim de verificar as diferenças de concentração dos possíveis inibidores de PCR. Ademais, o ambiente criado durante as reações moleculares é variável entre amostras (HUGGETT et al., 2008). No entanto, ao longo dos passos de um protocolo de extração de DNA frequentemente é possível alterar a concentração dos componentes inibitórios (ROSSEN et al., 1992), além de existirem adjuvantes que podem ser adicionados ao *mix* de PCR a fim de contornar a presença de inibidores (SCHRADER et al., 2012).

É possível extrair DNA de casca de ovos, tanto por maceração, quanto por *swab* da casca (EGLOFF et al., 2009; MARTÍN-GÁLVEZ et al., 2011). Estudo anterior realizou *swab* em casca de ovos de galinha e não retornou resultados positivos (KLIPPEL; BONFIM; PANETO, 2012), provavelmente devido à intensa manipulação que faz com que as células remanescentes da cloaca da fêmea sejam perdidas. Portanto, pode ser improvável reproduzir a técnica em ovos apreendidos, visto que Martín-Gálvez et al., (2011) realizaram coleta de *swab* em ovos diretamente nos ninhos, após postura.

O processo de extração de DNA em cascas maceradas inclui passos a mais na análise devido à necessidade de se retirar o cálcio (RIKIMARU; TAKAHASHI, 2009), que é um inibidor de PCR (WILSON, 1997). Além

disso, o protocolo de Rikimaru e Takahashi (2009) utiliza EDTA em grande quantidade na descalcificação, sendo necessário outro passo para purificação das amostras, pois o EDTA em grandes quantidades também inibe PCR (DEMEKE; JENKINS, 2010).

Este estudo realizou testes iniciais em que foram utilizadas amostras de albúmen. Não houve sucesso na amplificação de fragmentos de COI em nenhuma amostra de albúmen, embora Herman (2004) relate extração e amplificação de DNA a partir desta parte do ovo. A falha observada neste estudo pode ter ocorrido pela grande presença de albumina nessa parte do ovo (RICKLEFS, 1977), que pode ter inibido a PCR (ROSSEN et al., 1992). Muito provavelmente esse problema não foi encontrado por Herman (2004) devido à utilização de *kit* de extração de DNA em seu estudo.

Optou-se, então, por utilizar nos ensaios desta pesquisa amostras de gema e membrana da casca, que já foram utilizadas em outros estudos como fonte de material genético, porém, a extração do DNA foi sempre realizada com *kits* (ARNOLD et al., 2017; HERMAN, 2004). Demais estudos que realizaram análise de DNA em embrião e anexos embrionários utilizaram, para extração de DNA, protocolos com fenol-clorofórmio ou *kits* (COGHLAN et al., 2012; EGLOFF et al., 2009; GONÇALVES et al., 2015; JACQUES, 2005; JOHNSON, 2010).

Os custos de *kits* de extração de DNA são bastante altos, principalmente para regiões onde os recursos são limitados e a identificação de espécies depende de procedimentos de menor custo. Protocolos com fenol-clorofórmio oferecem um grande risco à saúde devido à exposição a estes agentes extremamente tóxicos. Considerando o exposto, para este estudo foram escolhidos três protocolos de extração de DNA com o princípio *salting out*, ou seja, diminuição da solubilidade das proteínas pela alta concentração de sal. Escolheu-se utilizar protocolos com sais devido às características das amostras: gema e membrana da casca são extremamente ricas em proteínas (BIRKHEAD, 2016). Existem sais que são eficientes na precipitação de proteínas, enquanto outros são menos ou não são eficientes (Franz Hofmeister (1887) traduzido por Kunz, Henle e Ninham (2004)), por isso o teste de três sais distintos.

Estudo de Franz Hofmeister (1887, traduzido por Kunz, Henle e Ninham (2004)) demonstrou a atividade de vários sais e seus componentes ácidos e básicos na precipitação de proteínas. Componentes alcalinos como lítio, sódio, potássio e amônio são bastante eficientes na precipitação de proteínas, mas o componente básico também influencia: sulfatos e acetatos são precipitantes mais fortes que cloretos e nitratos.

Em relação à composição dos sais utilizados nos protocolos de extração desta pesquisa, segundo o autor, aquele com maior poder de precipitação de proteínas é o cloreto de sódio, seguido pelo acetato de potássio e, por fim, acetato de amônio, que é um sal considerado sem poder de precipitar proteínas, o que é contrário ao descrito por Rivero et al (2006).

Protocolo com precipitação de proteínas utilizando cloreto de lítio é considerado o mais eficiente na extração de RNA em gema de ovos (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989), assim como em extração de DNA em plantas (HONG et al., 1995), provavelmente pela capacidade do sal em formar precipitados de proteína insolúveis. Entretanto, Franz Hofmeister (1887, traduzido por Kunz, Henle e Ninham (2004)) não encontrou variações na precipitação de proteínas utilizando cloreto de lítio e cloreto de sódio. Portanto, o protocolo com cloreto de lítio não foi testado neste estudo, além de o cloreto de lítio ser tóxico e de difícil acesso.

Fatores como concentração de proteínas e de sal presentes na solução, além da composição do sal em si, determinam o quão eficiente é a precipitação de proteínas. A forma de atuação de um sal também depende da sua capacidade de absorção do solvente no qual a proteína está solubilizada, que é dada pela sua força iônica. Acetatos e cloretos diferem na interação com o solvente dependendo da substância que será precipitada. Sódio e potássio têm igual comportamento de absorção de solvente, podendo ser substituídos sem qualquer alteração. O amônio, entretanto, é instável em relação à sua interação com o solvente (Franz Hofmeister (1888) traduzido por Kunz, Henle e Ninham (2004)). No presente estudo não foi observada diferença na extração de DNA com os três sais testados. O acetato de amônio, quando bem solubilizado, pode ser capaz de precipitar proteínas, o que explicaria o sucesso na extração de DNA descrito por Rivero et al (2006) e encontrado nesse estudo.

Outros componentes abundantes na gema são as gorduras (BIRKHEAD, 2016). Lipídeos são melhor extraídos a partir do uso de solventes orgânicos que impedem agregação das moléculas por interações hidrofóbicas (NELSON; COX, 2014). Assim, fenol-clorofórmio seria a melhor opção na remoção destes compostos que também são inibidores de PCR (SCHRADER et al., 2012). Entretanto, álcoois também podem remover lipídeos (NELSON; COX, 2014), então os protocolos escolhidos foram mantidos a fim de observar se as etapas de precipitação de DNA com isopropanol e lavagem do *pellet* com etanol 70% são suficientes para garantir a qualidade das análises. A remoção de lipídeos não foi verificada diretamente nesta pesquisa, mas pode ser inferida a partir do sucesso na amplificação do DNA nas amostras.

Etapas finais de precipitação de DNA com álcoois também removem reagentes utilizados na extração de DNA. Embora o isopropanol dificulte a aderência do *pellet* de DNA ao microtubo e permita a coprecipitação de sais, sendo, portanto, menos eficiente que o etanol, a quantidade de isopropanol utilizada para sua eficiência máxima na precipitação de DNA é a metade da quantidade necessária de etanol (SAMBROOK; GREEN, 2012). Além disso, a escolha em manter a precipitação de DNA com isopropanol se deu devido ao fato de que este já foi descrito como capaz de remover inibidores de PCR em amostras que passaram por processo de *post mortem* (HÄNNI et al., 1995), que é o caso de amostras forenses.

Na amplificação de *mini-barcodes* (164 pb) realizada nesta pesquisa, apenas duas amostras não amplificaram os fragmentos utilizando o programa curto (Tabela 7). Estão não eram amostras com concentração de DNA abaixo do limite dado pelo teste de sensibilidade (0,5 ng/ μ L). O programa longo, semelhante ao descrito por Kerr et al (2007, 2009a), não amplificou *mini-barcodes* nessas duas amostras, que posteriormente foram amplificadas com o uso de DMSO, fazendo com que todas as amostras de ovos *in natura* (n = 30) apresentassem sucesso na PCR.

Tabela 7. Número de amostras de ovos de codorna *in natura* com sucesso na amplificação, por tamanho de fragmento, técnica de PCR, parte do ovo e total. Números entre parênteses correspondem ao total de amostras testadas. Do total de 15 amostras, 05 correspondem a cada um dos protocolos de extração de DNA (cloreto de sódio, acetato de potássio e acetato de amônio). PCR com DMSO 3% e *nested* foram realizadas apenas com amostras que não amplificaram com a PCR convencional.

Tamanho do fragmento	PCR	Sucesso na amplificação		
		Membrana	Gema	Total
164 pb	Convencional	14 (15)	14 (15)	28 (30)
	DMSO 3%	01 (01)	01 (01)	02 (02)
947 pb	Convencional	02 (15)	14 (15)	16 (30)
405 pb	<i>Nested</i>	03 (13)	01 (01)	04 (14)

Fonte: elaborado pela autora (2019).

Os 12 tampões de PCR utilizados como tentativa de melhorar a reação não foram eficientes em amplificar fragmentos de COI em amostras que falharam na primeira tentativa, assim como os outros adjuvantes, sendo que apenas DMSO a concentração de 3% permitiu amplificação do fragmento de interesse. Apesar de ter mecanismos de ação semelhantes ao DMSO, a Formamida é considerada com menor

poder de melhoramento de PCR (FRACKMAN et al., 1998). O Tween-20, apesar de ser um agente importante no melhoramento de PCR na presença de albumina²⁰ (WILSON, 1997), não foi suficiente no melhoramento da amplificação de fragmentos em amostras de ovos de codorna, possivelmente pelo seu efeito de diminuir a especificidade dos *primers*.

O uso de DMSO é descrito como facilitador de PCR em casos nos quais os alvos são ricos em GC (FRACKMAN et al., 1998). O conteúdo de GC no COI de aves é alto e bastante variável entre espécies (FORSDYKE, 2013). Em codornas, o modelo utilizado para os testes descritos, o conteúdo de GC na região 5' de COI encontrado foi de pouco mais de 46%, enquanto que nos psitacídeos utilizados nas análises *in silico*, o conteúdo de GC esteve em torno de 48 e 53%²¹. O DMSO também age como isoestabilizador das moléculas de DNA, tornando-as mais acessíveis à taq DNA polimerase por facilitar o rompimento das ligações de hidrogênio entre as bases nitrogenadas (JENSEN; FUKUSHIMA; DAVIS, 2010).

Nos resultados aqui descritos, o problema parece não ter sido o conteúdo de GC, dado que houveram amostras que não tiveram problemas na amplificação e a mesma espécie (*Coturnix japonica*) foi utilizada em todos os testes. Portanto, é provável que o problema foi causado por excesso de albumina na reação. O DMSO é capaz de precipitar e desnaturar proteínas (ARAKAWA; KITA; TIMASHEFF, 2007), então sua atividade de melhoramento de PCR nas amostras estudadas provavelmente foi relacionada à desnaturação de proteínas, impedindo-as de interagir com as moléculas de DNA, facilitando, assim, o acesso da taq DNA polimerase. Entre as vantagens do uso de DMSO como adjuvante está o fato de que é um reagente barato e de fácil acesso.

Dada a alta taxa de falha na amplificação de fragmentos de 947 e 405 pb em membranas da casca observada neste estudo (Tabela 7), tal resultado pode ser um indicativo de degradação do DNA (ALAEEDINI; WALSH; ABBAS, 2010). Isso porque o uso de DMSO não melhorou a PCR, como aconteceu com a amplificação do *mini-barcode*. No entanto, testes de qualificação do DNA genômico extraído poderiam confirmar essa hipótese. Os demais adjuvantes e o programa longo não foram testados para amplificação de fragmentos de maior tamanho por já terem falhado na amplificação de fragmentos de 164 pb.

²⁰ Proteína bastante abundante em ovos.

²¹ Cálculo realizado no SPIDER através da função *GC.content*.

Por serem ovos *in natura*, esperava-se ausência ou pouca degradação no DNA, visto que não passaram por nenhum processo que facilitasse tal condição. Entretanto, deve-se lembrar que foram adquiridos ovos não fertilizados em supermercados e que estes poderiam ter estado algum tempo em estoque e suscetíveis a ação de enzimas digestivas presentes na gema, assim como pode ocorrer com amostras de saliva estocadas por muito tempo antes de realizar a extração de DNA (YAO et al., 2016), visto que, embora o embrião seja capaz de metabolizar nutrientes em seu sistema digestivo²² (UNI; FERKET, 2004), parte dos nutrientes sofrem algum grau de metabolização ainda no citoplasma da célula para, então, serem absorvidos pelo embrião (YOSHIZAKI et al., 2004).

Nucleases que degradam DNA também estão presentes nas células após a morte celular (BAR et al., 1988) podendo ser, também, um dos motivos da possível degradação do DNA nas amostras analisadas. Além disso, a degradação do DNA pode ter ocorrido durante o processo de extração devido à presença destes componentes digestivos ou em decorrência do próprio processo. Adicionar 0,1 M de sulfito de sódio ao tampão de lise pode evitar degradação de DNA durante a extração (BYRNE; MACDONALD; FRANCKI, 2001).

Entretanto, o maior insucesso na amplificação de fragmentos maiores se deu em amostras de membrana da casca. O fato destas serem mantidas em incubação a 55°C com proteinase K durante aproximadamente 24 h²³ pode ter aumentado a degradação de DNA devido a exposição a alta temperatura durante tempo prolongado (ROHLAND; HOFREITER, 2007). Mesmo que fragmentos de 164 pb puderam ser amplificados com sucesso e que as análises no SPIDER demonstraram ser possível identificar psitacídeos a partir de fragmentos *mini-barcode*, estudos *in silico* e *in vitro* com outros táxons de aves são necessários para determinar a eficiência destes tamanhos de fragmento como identificadores de espécies, sendo, por enquanto, preferível a utilização de fragmentos maiores por conterem maior número de regiões diagnósticas para grande parte das espécies (NÚÑEZ-RODRIGUEZ et al, dados em publicação). Dos seis sequenciamentos realizados neste estudo, dois resultaram em fragmento de tamanho inferior a 80pb, não podendo ser analisados pelo BOLD. Dos quatro tamanhos de fragmento aceitáveis

²² O sistema digestivo de aves é um dos primeiros a serem definidos durante o desenvolvimento embrionário.

²³ A fim de aumentar o rendimento de DNA, visto que membranas são ricas em proteínas e não alteram seu aspecto visual durante a extração de DNA.

para análise no BOLD, um não retornou resultados (*no match*) e três tiveram a espécie corretamente identificada (*Coturnix japonica*).

Outra possibilidade que não deve ser descartada é que houve presença de DNA amplificado, porém em rendimento bastante baixo para ser detectado em gel de agarose. Entretanto, em ensaios de PCR em tempo real é possível detectar a presença de produtos de PCR mesmo em rendimento baixo (ANDRÉASSON et al., 2006; JAKUBOWSKA; MACIEJEWSKA; PAWŁOWSKI, 2012; SWANGO et al., 2006) e a realização destes testes poderia confirmar se realmente houve falha na amplificação dos fragmentos nestas amostras.

3.3 SIMULAÇÃO DE SITUAÇÕES FORENSES

Estudos que simulam situações forenses são frequentes na literatura em diversas áreas da biologia, como a entomologia forense (MAZZANTI et al., 2010; RIES et al., 2016). Em genética, esse tipo de estudo é realizado com diferentes tecidos humanos e partes de animais, como órgãos e músculo (ASLAN et al., 2009; BAR et al., 1988; FORAN, 2006; HOFF-OLSEN et al., 1999; POONIYA et al., 2014), em simulações de extração a partir de DNA em local de crime (RAYMOND et al., 2009; VAN OORSCHOT et al., 2003), amostras de material biológico em roupas (ALLARD et al., 2007; VERDON; MITCHELL; VAN OORSCHOT, 2013), entre outros (TOBE et al., 2013; TOBE; GOVAN; WELCH, 2011), sendo um tema que perpetua em pesquisas atuais (MCLEISH et al., 2018).

No entanto, um único estudo foi encontrado tratando de simulações de situações forenses envolvendo ovos de animais silvestres, onde testou-se apenas a análise de DNA a partir de *swab* da casca em ovos de galinha (KLIPPEL; BONFIM; PANETO, 2012). O presente trabalho apresenta o primeiro ensaio mais aprofundado tratando do assunto, em que diversas simulações de amostras de ovos de aves traficados foram realizadas.

As simulações de vestígios forenses aqui realizadas são condições que podem alterar a composição das amostras em relação aos ovos *in natura* utilizados na etapa de padronização. O apodrecimento altera a composição química dos ovos (ORŁOWSKI et al., 2016), assim como a presença de microrganismos nestas situações também pode ser um fator de inibição de PCR (WILSON, 1997). Além disso, a presença de componentes em tecidos de roupas também altera o ambiente da reação, como é o caso do índigo, um corante azul utilizado em calças *jeans* reconhecido como um inibidor de PCR (SHUTLER et al., 1999). Dessa forma, foram mantidos nesta etapa da pesquisa os três protocolos de

extração e as distintas partes do ovo nos ensaios de simulação, assim como a utilização de DMSO 3% para amplificação de *mini-barcode*s.

A dessecação de tecidos biológicos é considerada uma forma de preservação do DNA, visto que limita os danos hidrolíticos ao DNA e impede o crescimento de microrganismos que aceleram o processo de degradação *post mortem* (ALAEDDINI; WALSH; ABBAS, 2010). Sucesso na recuperação de DNA em amostras de coleções biológicas e museus, que são muito antigas e, frequentemente, preservadas por dessecação, confirmam essa proteção (HOFREITER et al., 2001; LEE; PRYS-JONES, 2008; OSKAM et al., 2010), assim como a alta taxa de sucesso na amplificação de fragmentos de 164 pb em ovos secos observada no presente estudo (Tabela 8).

Tabela 8. Número de amostras de simulações forenses em ovos de codorna com sucesso na amplificação de fragmento de 164 pb por técnica de PCR. Números entre parênteses correspondem ao total de amostras testadas. Do total de 15 amostras, 05 correspondem a cada um dos protocolos de extração de DNA (cloreto de sódio, acetato de potássio e acetato de amônio). PCR com DMSO 3% foi realizada apenas com amostras que não amplificaram com a PCR convencional.

Simulação		Sucesso na amplificação		
		PCR convencional	DMSO 3%	Total
Ovo seco	Membrana	12 (15)	01 (03)	13 (15)
	Gema	13 (15)	00 (02)	13 (15)
Ovo podre	Membrana	00 (15)	07 (15)	07 (15)
	Gema	07 (15)	05 (08)	12 (15)
Casca quebrada	Membrana	02 (15)	13 (13)	15 (15)
	MDF	09 (15)	06 (06)	15 (15)
Fluido em substrato	Parede	12 (15)	02 (03)	14 (15)
	Papel toalha	05 (15)	01 (10)	06 (15)
	Poliéster	15 (15)	-	15 (15)
Fluido em tecidos	Algodão	13 (15)	02 (02)	15 (15)
	Jeans	12 (15)	03 (03)	15 (15)
	Meia fina	13 (15)	02 (02)	15 (15)

Fonte: elaborado pela autora (2019).

É fato que o DNA encontra-se em melhor qualidade e é mais facilmente recuperado a partir de amostras de material biológico *in natura* que naquelas em que houve algum tipo de manipulação (ASLAN et al., 2009). Na simulação de ovos podres, a amplificação de *mini-barcode*s foi eficiente e melhorada pelo uso de DMSO 3%, porém com bastante falha

em amostras de membrana (Tabela 8). O fato de a amplificação ter ocorrido apenas com uso de DMSO em membrana e de ter sido melhorada em gema pode ter relação com a geração de inibidores de PCR durante o processo de putrefação (HÄNNI et al., 1995) ou devido à presença de microrganismos (WILSON, 1997). Em relação a ovos *in natura* e secos, a amplificação de COI a partir de membrana da casca de ovos podres foi a mais ineficiente. Ao coletar as membranas, mesmo com lavagem e raspagem destas, ainda restava conteúdo de putrefação e talvez a presença de inibidores, aliada à baixa quantidade de DNA em membrana e sua degradação, seja a explicação para o insucesso na PCR observada nesses casos.

Extração de DNA a partir de tecidos é comum na área forense, sendo utilizadas amostras de sêmen, sangue e células da pele presentes nas roupas. Os resultados encontrados neste estudo (Tabela 8) condizem com a eficiência deste tipo de análise com os tipos de amostra citados (ALLARD et al., 2007; SHUTLER et al., 1999; VERDON; MITCHELL; VAN OORSCHOT, 2013), embora no caso dos ovos foi necessário o uso de adjuvante na PCR para melhoramento da intensidade das bandas. Tal fato pode estar relacionado tanto com a composição do fluido quanto com o substrato em si, visto que a composição dos tecidos é diferente entre este estudo e os estudos citados.

A recuperação de DNA a partir de impressões digitais deixadas em substratos é uma realidade (CAVANAUGH; BATHRICK, 2018), embora algumas vezes necessite do emprego de técnicas que melhorem a quantidade de DNA recuperada, como *swab* duplo²⁴ (PANG; CHEUNG, 2007) ou utilização de adesivos para coleta do material (FORSBERG et al., 2016). A quantidade de DNA presente em uma impressão digital é bastante baixa (VAN OORSCHOT et al., 2003; VAN OORSCHOT; JONES, 1997), possivelmente menor que a quantidade encontrada em fluido de ovos, principalmente se contém grande quantidade de gema. Logo, a amplificação dos fragmentos de interesse em simulações de amostras de fluido de ovo em substratos apresentou como maior desafio a presença de inibidores de PCR e não a quantidade de DNA recuperada. Apesar disso, o sucesso na ampliação foi evidente (Tabela 8) e o uso de DMSO 3%, além de amplificar o fragmento em amostras antes com insucesso, também aumentou a intensidade das bandas.

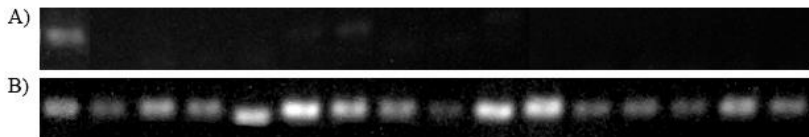
A maior falha na PCR ocorreu em amostras de fluido depositado em papel toalha. A extração de ácidos nucleicos a partir de amostras

²⁴ A técnica de *swab* duplo consiste na utilização, inicialmente, de um *swab* úmido seguido por um *swab* seco.

depositadas em papel é possível e, inclusive, em diversas áreas como saúde e forense, são utilizadas amostras coletadas e armazenadas em papel filtro (MIGUEL et al., 2013; ROSSI et al., 2017). O papel utilizado nesses casos possui componentes que protegem o DNA, mas o fato de que outros substratos, como os tecidos, permitiram a recuperação de DNA mesmo não havendo componentes de proteção, faz com que este provavelmente não tenha sido o motivo pelo qual as amostras de fluido em papel toalha foram tão ineficientes. Uma possível explicação seria que, em papel, há maior acúmulo de albúmen visto que, durante a deposição do fluido, a absorção era bastante rápida e foi possível visualizar que o conteúdo de gema ficava depositado sobre o substrato de apoio do papel. Consequentemente, há maior concentração de albumina nesse caso, que pode ter inibido a PCR, mesmo com uso de adjuvantes, pois o funcionamento destes depende também da concentração de inibidores presente nas amostras (HUGGETT et al., 2008; SCHRADER et al., 2012). Outra possibilidade é que esta perda de material para o substrato de apoio tenha reduzido a quantidade de DNA molde disponível para amplificação.

Em membrana de cascas secas só foi possível amplificar os fragmentos após uso de DMSO 3% (Tabela 8), além de que este adjuvante aumentou em muito a intensidade das bandas das duas únicas amostras que amplificaram em PCR sem adjuvantes. Quando as cascas foram quebradas e deixadas para secar no ambiente, foi deixado nelas o albúmen a fim de não interferir no experimento. Possivelmente o que impediu a análise foi o excesso de albumina nas amostras, visto que não apenas houve amplificação do fragmento após adição de DMSO 3%, mas a qualidade das bandas foi incrivelmente aumentada (Figura 12).

Figura 12. Eletroforese de fragmentos de 164 pb de COI amplificados a partir de amostras de membrana de cascas secas sem (A) e com (B) DMSO 3%. A primeira banda de cada gel corresponde ao controle positivo de 164 pb.



Fonte: elaborado pela autora (2019).

Apesar de serem notadas algumas diferenças na quantificação de DNA e intensidade das bandas de DNA amplificado, não foi observado um padrão destes resultados em relação aos protocolos de extração

utilizados. Assim, todos os protocolos testados foram eficientes na extração de DNA para identificação de espécies em todas as situações propostas, recuperando quantidade de DNA suficiente para as análises. A escolha do melhor protocolo de extração de DNA pode ser baseada em outros critérios como a disponibilidade do sal.

As reações acontecem de forma diferente em amostras diferentes, de acordo com o ambiente criado e qualquer amostra está sujeita a facilitadores e inibidores diferentes (HUGGETT et al., 2008), o que explica o porquê de algumas poucas amostras terem falhado na PCR, mesmo com tentativas de melhoramento. As análises em amostras de ovo seco podem ser realizadas em PCR sem nenhuma alteração nos reagentes e programa descritos nesse estudo. Nas demais situações o uso de DMSO 3% é indicado, enquanto que, para membrana de cascas secas, o DMSO 3% é indispensável. A fim de evitar necessidades de repetições, embora o sucesso da PCR em muitas amostras independeu do uso de DMSO, indica-se que ele seja utilizado como padrão em análises de DNA de ovos.

A amplificação de fragmentos maiores, assim como ocorreu com membrana da casca de ovos *in natura* (Seção 3.2), também foi menos eficiente nos ensaios de simulação forense (Tabela 9). Embora os ovos deste estudo não estavam fecundados, a putrefação por ação de microrganismos ocorre da mesma forma que em situações *post mortem* e contribuem com a degradação do DNA (BAR et al., 1988). Isso pode explicar a falha na amplificação de amostras de ovos podres com fragmentos *barcode* de dois tamanhos (Tabela 9), tendo sido eficiente apenas utilizando-se *mini-barcode*s (Tabela 8). No caso das amostras de fluido depositado em papel toalha, o insucesso na amplificação de fragmentos maiores pode confirmar a hipótese lançada para insucesso observado com fragmento menor, pois a possibilidade de degradação de DNA, nesse caso, decorre apenas do processo de extração (BYRNE; MACDONALD; FRANCKI, 2001), mas a falha foi muito alta para que este seja considerado como o principal motivo.

Tabela 9. Número de amostras de simulações forenses em ovos de codorna com sucesso na amplificação por tamanho de fragmento. Números entre parênteses correspondem ao total de amostras testadas. Do total de 15 amostras, 05 correspondem a cada um dos protocolos de extração de DNA (cloreto de sódio, acetato de potássio e acetato de amônio). *Nested PCR* foi realizada apenas com amostras que não amplificaram fragmento de 947 pb.

Simulação		Sucesso na amplificação		
		947 pb	405 pb	Total
Ovo seco	Membrana	03 (15)	08 (12)	11 (15)
	Gema	08 (15)	07 (07)	15 (15)
Ovo podre	Membrana	00 (15)	00 (15)	00 (15)
	Gema	00 (15)	01 (15)	01 (15)
Casca quebrada	Membrana	08 (15)	00 (07)	08 (15)
	MDF	06 (15)	03 (09)	09 (15)
Fluido em substrato	Parede	05 (15)	04 (10)	09 (15)
	Papel toalha	00 (15)	01 (15)	01 (15)
	Poliéster	08 (15)	01 (07)	09 (15)
Fluido em tecidos	Algodão	14 (15)	01 (01)	15 (15)
	<i>Jeans</i>	11 (15)	02 (04)	13 (15)
	Meia fina	12 (15)	01 (03)	13 (15)

Fonte: elaborado pela autora (2019).

Nas demais simulações pode-se considerar que, de maneira geral, foi possível amplificar *barcodes* de um ou outro tamanho (947 e 405 pb), tendo um rendimento total bastante eficiente (Tabela 9). Em amostras de fluido em substratos (MDF e parede) e em poliéster, a menor eficiência pode ter relação com a degradação do DNA devido aos processos de preparo do material (fricção de *swab* e desfiar o tecido). No caso das cascas secas, a degradação pode ser decorrente da exposição ao ambiente. Ademais, há a possibilidade de que houve amplificação, mas em rendimento bastante baixo (ver Secção 3.2).

Em todas as amostras foi possível amplificar pelo menos um tamanho de fragmento. Para aquelas em que foi possível amplificar apenas o fragmento *mini-barcode*, a identificação de espécies é um desafio, visto que são necessárias análises para determinar se esse fragmento de 164 pb permite identificação de maior número de espécies (ver Secção 3.1).

O mtDNA é citado muitas vezes como uma alternativa em situações forenses tanto para análise de DNA animal quanto humano, visto que há maior quantidade disponível nas células (ARIF; KHAN,

2009; FORAN, 2006; ISENBERG, 2002; TAHIR; AKHTAR, 2015), sendo relatado, inclusive, sua menor possibilidade de degradação em relação ao DNA nuclear devido à sua compartimentalização em mitocôndrias e formato circular que dificulta ação de nucleases (FORAN, 2006; ISENBERG, 2002). Entretanto, Foran (2006) cita que a degradação de mtDNA é mais acelerada quando este se encontra em mesmo meio que o DNA nuclear (após rompimento das mitocôndrias e membrana nuclear), visto que o DNA nuclear está protegido pela cromatina. Qualquer processo de morte celular depende de alguma atividade mitocondrial e a permeabilização da membrana das mitocôndrias é um dos primeiros eventos resultantes da morte celular, liberando o mtDNA rapidamente no citoplasma (KROEMER; GALLUZZI; BRENNER, 2007). Em amostras forenses, o rendimento de mtDNA e DNA nuclear obtido é variável conforme o tipo de amostra e as condições em que se encontram, com algumas delas apresentando recuperação bastante alta de DNA nuclear em relação ao mtDNA, enquanto que outras amostras têm um rendimento baixo de mtDNA e zero de DNA nuclear (ANDRÉASSON et al., 2006).

Embora o mtDNA apresente diversas vantagens evolutivas para identificação das espécies, pode haver situações onde a recuperação de DNA nuclear é mais eficiente, sendo o único ou melhor material disponível para análise. Regiões intergênicas do genoma nuclear são descritas como eficientes na identificação de organismos como plantas, fungos, invertebrados, peixes (WANG et al., 2015) e carnívoros (OLIVEIRA et al., 2010). Tais regiões podem ser uma alternativa na identificação forense de espécies, visto que genes nucleares com alta taxa de transcrição são mais suscetíveis a degradação que genes com baixa taxa de transcrição ou regiões intergênicas (FORAN, 2006). O uso conjunto de marcadores mitocondriais e nucleares também é descrito como forma de melhorar a identificação de espécies (SEVILLA et al., 2007; YAO et al., 2010), com potencial para identificação de espécies problemáticas de aves (ALIABADIAN et al., 2009). Pesquisa recente de Dyomin et al (2017) abre espaço para estudos dos espaçadores transcritos internos (ITs) dos genes ribossomais como candidatos em estudos de identificação de espécies animais que não podem ser identificadas a partir de COI, incluindo aves.

Embora não tenham sido realizados testes de simulação em ovos embrionados, o fato de que foi possível realizar análises em situações bastante adversas e em tipos de amostra mais complexos faz com que a análise em embriões em condições adversas, como decomposição e dessecação, seja, muito provavelmente, possível. Caso em algum

momento não o seja, os testes aqui relatados dão suporte para que outras partes do ovo sejam utilizadas.

3.4 IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES EM OVOS APREENDIDOS

Foi possível obter DNA de todos os tipos de amostras utilizados e amplificar fragmentos de COI através dos pares de *primers* BirdF1+ COIbirdR2 (n = 26), BirdF1 + AvMiR1 (n = 4) e AvMiF1 + AvMiR1 (n = 1). Ao contrário das simulações realizadas neste estudo, as amostras recebidas não se encontravam em situações adversas, o que pode ter facilitado a recuperação de fragmentos maiores, mas demonstrou a importância em se testar fragmentos *mini-barcodes* visto que, para um ovo, foi possível amplificar apenas o fragmento de 164 pb.

A escolha do protocolo de extração com cloreto de sódio resultou de comparações entre preço e disponibilidade do reagente em empresas especializadas e análise da Ficha de Segurança de Produtos Químicos (FISPQ) de cada sal. Em termos de preço, a variabilidade foi maior entre empresas diferentes que entre os sais, porém o acetato de amônio não estava sendo comercializado por algumas empresas, sendo, portanto, menos acessível. Nenhum deles é classificado como substância perigosa pela legislação brasileira e europeia, tanto a seres humanos quanto ao ambiente²⁵. A escolha pelo cloreto de sódio se deu, então, pela maior facilidade de se adquirir o produto.

Após diversas tentativas não foi possível obter sequenciamento de qualidade para realizar a identificação da espécie a partir de membrana da casca da amostra AP29. Os demais ovos apreendidos foram identificados no BOLD como a espécie *Graydidascalus brachyurus* (curica-verde) (Tabela 10), evidenciando a importância da identificação genética baseada em dados de referência obtidos a partir de identificação taxonômica do adulto, dada a evidente variação morfométrica observada nos ovos apreendidos (Figura 8A).

A curica-verde (*G. brachyurus*) (Figura 13) é um psitacídeo com distribuição bastante restrita no Brasil (Rondônia, Amazonas, Pará e Amapá), Peru, Colômbia, Equador e Guiana Francesa (BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2016). Embora não conste na lista de espécies ameaçadas de extinção do Ministério do Meio Ambiente (MMA, 2014) e nos anexos CITES (CITES, 2017), além de não ser considerada ameaçada

²⁵ Informações obtidas a partir de fichas FISPQ baseadas no “The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals”.

de extinção pelos critérios da IUCN, há pouco conhecimento sobre a população da espécie na natureza, sendo considerada em declínio populacional (BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2016).

Figura 13. Espécime de *Graydidascalus brachyurus* (curica-verde).



Fonte: Kurazo Okada (2017).

Embora a amplificação de COI tenha sido realizada, em sua maioria, a partir dos *primers* BirdF1 + COIbirdR2, os fragmentos resultantes do sequenciamento tiveram tamanho menor que o esperado, de 747 pb (Tabela 10). Isso pode ter ocorrido por artefatos do sequenciamento, visto que o sequenciamento de algumas amostras a partir do *primer reverse* completou o tamanho do fragmento obtido a partir do *primer forward*. Mesmo com fragmentos menores, a identificação das amostras não foi prejudicada.

Tabela 10. Identificação de espécies no BOLD, percentual de similaridade realizada a partir de amostras de ovos apreendidos e tamanho do fragmento analisado.

Ovo	Tipo de material	Nome científico da espécie identificada geneticamente	% de similaridade	Fragmento analisado (pb)
AP01	Tecido muscular	<i>Graydidascalus brachyurus</i>	99,46	379
AP02	Gema	<i>Graydidascalus brachyurus</i>	99,71	364
AP03	Gema	<i>Graydidascalus brachyurus</i>	99,71	342
AP04	Tecido muscular	<i>Graydidascalus brachyurus</i>	98,34	250
AP05	Tecido muscular	<i>Graydidascalus brachyurus</i>	99,65	298
AP06	Tecido muscular	<i>Graydidascalus brachyurus</i>	100	243
AP07	Tecido muscular	<i>Graydidascalus brachyurus</i>	99,61	265
AP08	Tecido muscular	<i>Graydidascalus brachyurus</i>	99,68	324
AP09	Tecido muscular	<i>Graydidascalus brachyurus</i>	99,62	535
AP10	Tecido muscular	<i>Graydidascalus brachyurus</i>	98,69	322
AP11	Tecido muscular	<i>Graydidascalus brachyurus</i>	99,35	320
AP12	Tecido muscular	<i>Graydidascalus brachyurus</i>	99,18	682
AP13	Tecido muscular	<i>Graydidascalus brachyurus</i>	99,79	483

Ovo	Tipo de material	Nome científico da espécie identificada geneticamente	% de similaridade	Fragmento analisado (pb)
AP14	Tecido muscular	<i>Graydidascalus brachyurus</i>	100	361
AP15	Tecido muscular	<i>Graydidascalus brachyurus</i>	100	113
AP16	Tecido muscular	<i>Graydidascalus brachyurus</i>	99,47	211
AP17	Tecido muscular	<i>Graydidascalus brachyurus</i>	100	308
AP18	Tecido muscular	<i>Graydidascalus brachyurus</i>	98,32	299
AP19	Tecido muscular	<i>Graydidascalus brachyurus</i>	99,6	333
AP20	Membrana da casca	<i>Graydidascalus brachyurus</i>	99,7	344
AP21	Membrana da casca	<i>Graydidascalus brachyurus</i>	99,37	329
AP22	Tecido muscular	<i>Graydidascalus brachyurus</i>	100	356
AP23	Tecido muscular	<i>Graydidascalus brachyurus</i>	99,27	292
AP24	Membrana da casca	<i>Graydidascalus brachyurus</i>	99,14	350
AP25	Tecido muscular	<i>Graydidascalus brachyurus</i>	99,36	329
AP26	Tecido muscular	<i>Graydidascalus brachyurus</i>	99,68	324
AP27	Tecido muscular	<i>Graydidascalus brachyurus</i>	99,68	325

Ovo	Tipo de material	Nome científico da espécie identificada geneticamente	% de similaridade	Fragmento analisado (pb)
AP28	Tecido muscular	<i>Graydidascalus brachyurus</i>	100	314
AP29	Membrana da casca	-	-	-
AP30	Tecido muscular	<i>Graydidascalus brachyurus</i>	99,67	683
AP31	Membrana da casca	<i>Graydidascalus brachyurus</i>	100	325

Fonte: elaborado pela autora (2019).

O banco de dados GenBank não foi utilizado para identificação de espécies pelos seguintes motivos: tem menor disponibilidade de sequências de COI que o BOLD, as sequências ali depositadas não são curadas e o método de busca de similaridade entre sequências não favorece a identificação de espécies. Embora a ferramenta MegaBLAST considere a similaridade entre sequências bastante próximas em suas análises, esta trata unicamente da similaridade de composição de bases em determinadas posições das sequências (MADDEN, 2014), enquanto que a ferramenta de identificação de espécies do BOLD considera, além da composição e posição das bases, as distâncias inter e intraespecíficas, além de gerar uma árvore pelo método de *neighbor-joining* para, então, determinar a similaridade entre as sequências (RATNASINGHAM; HEBERT, 2007, 2013).

Utilizar valores de limiar em análises de identificação de espécies através de distâncias genéticas é essencial visto que pode eliminar erros de identificação de espécime desconhecido decorrentes da falta de sequências de determinadas espécies no banco de dados (VIRGILIO et al., 2012). Quando foi proposta a técnica de DNA *barcode*, Hebert et al (2003) determinaram um valor de limiar de distância interespecífica para identificação de espécies entre 2 e 3%. Assim, quando realizada a comparação de sequências, um espécime poderia ser considerado de uma determinada espécie se atingisse valor de similaridade igual ou acima de 97%. Em aves, o limiar foi determinado em 2,7% (similaridade de até 97,3%) (HEBERT et al., 2004).

Várias críticas surgiram em relação ao valor de limiar proposto por Hebert et al (2003) tanto em relação ao método de determinação do limiar, quanto à impossibilidade de se padronizar um limiar único para todas as espécies (ČANDEK; KUNTNER, 2015; COLLINS; CRUICKSHANK, 2013; MEYER; PAULAY, 2005). Em aves, COI evolui de maneira diferente entre vários clados, o que torna impossível determinar um valor universal de distância como limiar do grupo (CAI et al., 2010); os autores estudaram três famílias de aves onde encontraram, para cada uma, valores diferentes de limiar (1,3% para Phasianidae, 3,1% para Accipitridae e 1,6% para Strigidae). Além disso, muitas vezes não é possível definir um limiar para identificação de espécies em alguns grupos (BAKER; TAVARES; ELBOURNE, 2009).

O BOLD utiliza limiar de 1% para identificar espécies (RATNASINGHAM; HEBERT, 2007, 2013). Embora esse valor possa ser suficiente em alguns casos, padronizar o limiar a este valor pode incorrer em falsos positivo ou negativo (COLLINS; CRUICKSHANK, 2013). Assim, há a recomendação de que o limiar seja calculado para o conjunto de dados correspondente às espécies que se deseja estudar (MEYER; PAULAY, 2005; VIRGILIO et al., 2012).

Meyer e Paulay (2005) e Meier et al (2006) criticam a identificação de limiar baseado apenas em dados de distância gerados por *k-nearest neighbor* (método utilizado pelo BOLD), enquanto que Austerlitz et al (2009) apoiam o uso de tal método como o mais eficiente para aplicação na técnica de identificação de espécies por DNA *barcoding*. A estatística baseada em *k-nearest neighbour* inclui no cálculo de limiar todas as espécies do conjunto de dados contra todas, enquanto que *best close match* considera apenas o espécime mais próximo contra cada uma das sequências, sendo, portanto, menos inclusiva (BROWN et al., 2018). O método *best close match* proposto por Meier et al (2006) também apresenta taxas de erro, principalmente quando há apenas uma sequência para determinada espécie no conjunto de dados. Considerando que muitas espécies raras são difíceis de disporem de um maior número de espécimes para gerar sequências de DNA, o método utilizado pelo BOLD é a melhor estratégia disponível até os dias atuais, visto que permite a identificação de espécies mesmo que haja uma única sequência depositada no banco de dados

O SPIDER disponibiliza a função *localMinima* para cálculo de limiar de identificação de espécies, que é baseada no conceito de

*barcoding gap*²⁶ e indica a transição entre as distâncias inter e intraespecíficas, sendo o ponto mais profundo desta transição considerado o limiar de identificação de espécies. A vantagem no uso desta função é que permite análise mesmo em sequências em que as espécies não estão identificadas (BROWN et al., 2018; DOÑA et al., 2015). O limiar encontrado para o conjunto de dados analisado foi de 3,65 % (similaridade de 96,35%) e, portanto, *Graydidascalus brachyurus* pode ser considerada a espécie correspondente aos ovos analisados, exceto para o ovo AP15, cuja similaridade com a espécie *Pionus tumultuosus* foi superior ao limiar estabelecido (97,27%).

Apesar da incerteza na identificação da espécie correspondente ao ovo AP15 dada pela otimização de limiar a partir de sequências de gêneros que apareceram entre os 99 *matches* encontrados para as sequências de todos os ovos apreendidos, não se deve desconsiderar que o valor de similaridade de AP15 com *G. brachyurus* foi de 100% com a primeira sequência da espécie e 99,03% com as duas outras sequências disponíveis no banco de dados, sendo estes valores bastante altos. A fim de conferir o resultado de identificação da espécie nesta amostra, o limiar foi calculado novamente, desta vez considerando apenas sequências dos gêneros constantes entre os 99 *matches* encontrados unicamente com a sequência gerada para AP15 (*Graydidascalus*, *Pionus*, *Ixobrychus* e *Amazona*). Neste caso, o limiar resultante foi de 2,42% (97,58% de similaridade), confirmando, assim, a identificação da espécie *G. brachyurus* também para o ovo AP15.

Nenhum ovo teve a espécie identificada a partir do *mini-barcode* de 164 pb, pois os *barcodes* foram suficientes na identificação. Porém a validação *in silico* demonstrou que esse fragmento poderia identificar corretamente a espécie de cada um dos 30 ovos identificados neste estudo.

Embora muitos traficantes busquem espécies raras e ameaçadas de extinção devido ao seu alto valor comercial, estudos realizados e citados por Olah et al (2016) descrevem o intenso comércio ilegal de espécies com baixo risco de extinção devido à maior disponibilidade e facilidade na captura, como é o caso de *G. brachyurus*. A intensa captura de espécimes que correspondem a espécies não ameaçadas é o maior fator de ameaça às populações destas espécies, assim como ocorre com aquelas já consideradas ameaçadas de extinção, caracterizando o tráfico como o maior responsável pelo declínio populacional e consequente estado de ameaça em espécies de psitacíformes neotropicais (BERKUNSKY et al.,

²⁶ Diferença entre as distâncias interespecífica e intraespecífica. Quando não há sobreposição entre elas, existe um *barcoding gap*.

2017), podendo levar à situações como a possível extinção da ararinha-azul (*Cyanopsitta spixii*) pela pressão do tráfico (BUTCHART et al., 2018).

No Brasil, Planos de Ação Nacionais (PAN) para conservação de espécies frequentemente incluem ações de combate ao tráfico e caça de animais silvestres (ICMBIO, 2011, 2013). Além disso, Instruções Normativas do IBAMA e CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) dispõem sobre regulamentação de criadouros comerciais e destinação de animais silvestres apreendidos. Comissões Parlamentares de Inquérito (CPIs) e operações a nível federal, estadual e/ou municipal são realizadas a fim de combater o comércio ilegal de animais silvestres, além de haver linhas de comunicação com órgãos fiscalizadores para realização de denúncias (NASSARO, 2015).

O instrumento legal de combate ao comércio ilegal de animais silvestres está disposto na Lei de Crimes Ambientais (BRASIL, 1998) e Decreto nº 6.514 (BRASIL, 2008a), que conferem a aplicação de multas e outras penalidades a crimes contra a fauna. A aplicação de pena maior em caso de tráfico de espécie ameaçada é uma estratégia de contenção do crime e a identificação molecular de espécies é uma ferramenta importante para aplicabilidade da Lei. No entanto, a penalidade aplicada ao tráfico de espécies não ameaçadas tem se mostrado insignificante aos praticantes de tal crime (G1 RIO PRETO E ARAÇATUBA, 2018), deixando espécies hoje não ameaçadas totalmente vulneráveis ao comércio ilegal e a um maior risco de extinção.

O enquadramento do crime de tráfico de animais silvestres no art. 180 do Código Penal Brasileiro (BRASIL, 1940) é frequentemente utilizado quando se confere natureza criminosa ao ato, sendo um meio de aumentar a pena aplicada ao infrator (MACHADO, 2012), dada a natureza de penalização baixa e possibilidade de brechas da Lei de Crimes Ambientais. Entretanto, a legislação brasileira ainda não é suficiente e efetiva no combate ao tráfico de animais silvestres (OKI; PANDEFF, 2016).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Este estudo trouxe suporte à eficiência do uso de fragmentos do gene COI na identificação de espécies de psitacídeos sul-americanos, inclusive fragmentos de tamanho bastante reduzido, sendo a técnica de DNA *barcode* uma importante ferramenta para auxiliar na resolução de crimes de tráfico de ovos de psitacídeos silvestres provenientes da América do Sul. As ferramentas de bioinformática descritas no presente estudo podem ser utilizadas para guiar novas análises de marcadores *barcode* e *mini-barcode* em outros grupos não apenas de aves, mas também de organismos de diferentes clados.

Neste estudo também foi possível padronizar um protocolo de extração e amplificação de DNA em amostras de ovos e este se mostrou eficiente em diversas simulações de situações que podem ocorrer durante o comércio ilegal de ovos. Padronização e validação resultam em diferentes recomendações de uso de protocolos de análise de DNA, sendo que a padronização fornece um modelo de processo funcional, porém não garante a reprodução deste protocolo em qualquer laboratório e em qualquer tipo de amostra. Alguns testes são necessários para que o protocolo deste estudo possa ser considerado validado para aplicação forense: repetibilidade, reprodutibilidade, especificidade *in vitro* e análise de misturas. Embora tenha sido um teste de sensibilidade baseado em sucesso e insucesso na amplificação, a técnica de PCR em tempo real pode fornecer mais acurácia aos resultados encontrados.

A ausência de algumas etapas de validação do protocolo aqui descrito não impede sua utilização em casos de apreensão de ovos, visto que foi realizado um importante passo para validação de procedimentos de análise de DNA forense: a simulação de situações reais. Sendo assim, a aplicabilidade do protocolo proposto em qualquer laboratório não é prejudicada, estando sujeita apenas às possíveis padronizações internas.

Além disso, a aplicação em um caso real de ovos em situação de comércio ilegal foi bastante eficiente e o laudo resultante foi anexado ao Inquérito Policial N° 0349/2018 da SR/PF/AM. O único ovo que não teve sua espécie identificada não o foi pela falta dos testes de validação do protocolo descrito, mas porque é comum que algumas amostras forenses não resultem em análises positivas.

Em relação à análise de comparação da sequência questionada com sequências de bancos de dados, este estudo é mais uma evidência de que o cálculo de um limiar de identificação de espécies exclusivo para o conjunto de dados em análise (sequência questionada + sequências das espécies que aparecem entre os 99 *matches* do BOLD) é necessário para

maior confiabilidade do resultado obtido. Assim, as análises tanto *in silico* quanto *in vitro* descritas nesta pesquisa podem ser aplicadas na elaboração de laudos periciais de identificação de espécies a partir de amostras de ovos de aves.

Perspectivas para a área de análise bioinformática incluem a necessidade de novos estudos *in silico* que podem, da mesma forma, contribuir para a aplicação da técnica de DNA *barcode* e, principalmente, DNA *mini-barcode* não apenas em psitacídeos e ovos provenientes dos neotrópicos, mas expandir a utilização de tamanhos variados de COI na identificação de espécies em ovos de quaisquer aves provenientes de qualquer região do mundo. Embora tenham sido apresentados no presente estudo resultados apenas para psitacídeos sul-americanos, análises *in silico* para demais táxons de aves e *primers* descritos na literatura já estão em andamento. Para que tais análises possam ser realizadas, esforços de geração de *barcodes* validados para espécies de aves continuam sendo necessários para que novos testes possam ser realizados com maior variedade de espécies.

Ensaio molecular de PCR em tempo real podem melhorar os resultados obtidos durante a padronização do protocolo, visto que analisam não apenas a amplificação, mas também a detecção de DNA, que é suficiente para ensaios de sequenciamento. Entretanto, pesquisas que desejam identificar espécies através de *primers* espécie-específicos possuem suporte, baseado neste estudo, para situações de amplificação e não amplificação de mtDNA.

Amplificação diferencial de genes mitocondriais e nucleares podem ser um caminho para resolução das situações de insucesso na amplificação de DNA observados nesse estudo. Porém, experimentos de amplificação de genes nucleares em todas as condições testadas nesse estudo para gene mitocondrial são necessários para determinação da melhor fonte de DNA molde em ovos em situação de tráfico.

Além das aves, os répteis-não-aviários também sofrem com o intenso comércio ilegal de seus ovos, principalmente os quelônios. Uma perspectiva interessante para o protocolo aqui descrito é o teste de sua efetividade em ovos de répteis-não-aviários. Nesse caso, os testes vão além do protocolo *in vitro*, mas as análises *in silico* descritas inicialmente podem ser utilizadas para definição do melhor marcador para identificação molecular das espécies deste grupo.

REFERÊNCIAS

- ABE, H.; HAYANO, A.; INOUE-MURAYAMA, M. Forensic species identification of large macaws using DNA barcodes and microsatellite profiles. **Molecular Biology Reports**, v. 39, n. 1, p. 693–699, 2012.
- ALACS, E.; GEORGES, A. Wildlife across our borders: a review of the illegal trade in Australia. **Australian Journal of Forensic Sciences**, v. 40, n. 2, p. 147–160, 2008.
- ALAEDDINI, R.; WALSH, S. J.; ABBAS, A. Forensic implications of genetic analyses from degraded DNA-A review. **Forensic Science International: Genetics**, v. 4, p. 148–157, 2010.
- ALIABADIAN, M. et al. Molecular identification of birds: Performance of distance-based DNA barcoding in three genes to delimit parapatric species. **PLoS ONE**, v. 4, n. 1, 2009.
- ALIABADIAN, M. et al. DNA barcoding of Dutch birds. **ZooKeys**, v. 365, p. 25–48, 2013.
- ALJANABI, S. M.; MARTINEZ, I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. **Nucleic acids research**, v. 25, n. 22, p. 4692–4693, 1997.
- ALLARD, J. E. et al. A comparison of methods used in the UK and Ireland for the extraction and detection of semen on swabs and cloth samples. **Science and Justice**, v. 47, p. 160–167, 2007.
- AMADO, J. M. H. Convenção CITES: 40 anos a proteger a fauna e flora do planeta (1973-2013). **Revista da Guarda**, n. 97, p. 18–32, 2013.
- ANDRÉASSON, H. et al. Nuclear and mitochondrial DNA quantification of various forensic materials. **Forensic Science International**, v. 164, n. 1, p. 56–64, 2006.
- ARAKAWA, T.; KITA, Y.; TIMASHEFF, S. N. Protein precipitation and denaturation by dimethyl sulfoxide. **Biophysical Chemistry**, v. 131, p. 62–70, 2007.
- ARIF, I. A.; KHAN, H. A. Molecular markers for biodiversity analysis of wildlife animals: a brief review. **Animal Biodiversity and Conservation**, v. 32, n. 1, p. 9–17, 2009.
- ARNOLD, A. E. et al. Using cytochrome b to identify nests and museum specimens of cryptic songbirds. **Conservation Genetics Resources**, v. 9, n. 3, p. 451–458, 2017.
- ASLAN, Ö. et al. Integrity of nuclear genomic deoxyribonucleic acid in cooked meat: Implications for food traceability. **Journal of Animal Science**, v. 87, n. 1, p. 57–61, 2009.
- AUSTERLITZ, F. et al. DNA barcode analysis: A comparison of phylogenetic and statistical classification methods. **BMC Bioinformatics**, v. 10, n. SUPPL.14, p. 1–13, 2009.

BAKER, A. J.; TAVARES, E. S.; ELBOURNE, R. F. Countering criticisms of single mitochondrial DNA gene barcoding in birds. **Molecular Ecology Resources**, v. 9, n. SUPPL. 1, p. 257–268, 2009.

BAR, W. et al. Postmortem stability of dna*. **Forensic Science International**, v. 39, p. 59–70, 1988.

BARREIRA, A. S.; LIJMAER, D. A.; TUBARO, P. L. The multiple applications of DNA barcodes in avian evolutionary studies. **Genome**, v. 59, n. 11, p. 899–911, 2016.

BÁRTOLO, R. M. DE O. R. DE F. **Cães Detetores de Vida Selvagem: Utilidade e eficácia no combate ao tráfico de espécies**. Lisboa: Relatório Científico Final do Trabalho de Investigação Aplicada, 2013.

BATAILLE, M. et al. Multiplex amplification of mitochondrial DNA for human and species identification in forensic evaluation. **Forensic Science International**, v. 99, p. 165–170, 1999.

BEISSINGER, S. R.; COOK, M. I.; ARENDT, W. J. The Shelf Life of Bird Eggs : Testing Egg Viability Using a Tropical Climate Gradient. **Ecology**, v. 86, n. 8, p. 2164–2175, 2005.

BERKUNSKY, I. et al. Current threats faced by Neotropical parrot populations. **Biological Conservation**, v. 214, p. 278–287, 2017.

BIRCHARD, G. F.; DEEMING, D. C. Egg allometry: influences of phylogeny and the altricial–precocial continuum. In: DEEMING, D. C.; REYNOLDS, S. J. (Eds.). **Nests, Eggs, and Incubation: New Ideas About Avian Reproduction**. Oxford: Oxford University Press, 2015. p. 97–112.

BIRDLIFE INTERNATIONAL. *Graydidascalus brachyurus*. Disponível em: <<https://www.iucnredlist.org/species/22686172/93101087#population>>. Acesso em: 20 dez. 2018.

BIRKHEAD, T. **The most perfect thing: inside (an outside) a bird's egg**. London: Bloomsbury, 2016.

BIRKHEAD, T. R. et al. Unhatched eggs: methods for discriminating between infertility and early embryo mortality. **Ibis**, v. 150, p. 508–517, 2008.

BLOUNT, J. D.; HOUSTON, D. C.; MOLLER, A. P. Why egg yolk is yellow. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 15, p. 47–49, 2000.

BOARD, R. G.; SPARKS, N. H. C. Shell structure and formation in avian eggs. In: DEEMING, D. C.; FERGUSON, M. W. J. (Eds.). **Egg incubation: its effects on embryonic development in birds and reptiles**. Cambridge: Cambridge University Press, 1991. p. 71–86.

BOLD SYSTEMS. **Public data portal**. Disponível em: <http://www.boldsystems.org/index.php/Public_BINSearch?searchtype=records>. Acesso em: 16 jan. 2018a.

BOLD SYSTEMS. **Taxonomy browser: Aves**. Disponível em: <http://boldsystems.org/index.php/TaxBrowser_Taxonpage?taxid=51>.

Acesso em: 2 out. 2018b.

BOLELI, I. C.; DE QUEIROZ, S. A. Effects of incubation temperature and relative humidity on embryonic development in eggs of red-winged tinamou (*Rhynchotus rufescens*). **International Journal of Poultry Science**, v. 11, n. 8, p. 517–523, 2012.

BOLLINGER, P. B. et al. Partial incubation during egg laying reduces eggshell microbial loads in a temperate-breeding passerine. **Journal of Avian Biology**, v. 49, n. 6, p. 1–9, 2018.

BOYER, S. et al. Sliding window analyses for optimal selection of mini-barcodes, and application to 454-pyrosequencing for specimen identification from degraded DNA. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 2012.

BRASIL. **Decreto-Lei Nº 2.848 de 07 de dezembro de 1940**. Brasília, 1940.

BRASIL. **Lei nº 5.197, de 3 de janeiro de 1967**. Dispõe sobre a proteção à fauna e dá outras providências. Brasília, 1967.

BRASIL. **Lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998**. Dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente, e dá outras providências. Brasília, 1998.

BRASIL. **Decreto nº 3.607, de 21 de setembro de 2000**. Dispõe sobre a implementação da Convenção sobre Comércio Internacional das Espécies da Flora e Fauna Selvagens em Perigo de Extinção CITES, e dá outras providências. Brasília, 2000.

BRASIL. **Decreto nº 6.514, de 22 de julho de 2008**. Dispõe sobre as infrações e sanções administrativas ao meio ambiente, estabelece o processo administrativo federal para apuração destas infrações, e dá outras providências. Brasília, 2008a.

BRASIL. Instrução Normativa Ibama Anexo nº 169 de 20 de Fevereiro de 2008. **Diário Oficial da União**, p. 1–30, 2008b.

BROWN, A. S. et al. **Manual Species Identity and Evolution in R**, 2018.

BROWN, S. D. J. et al. Spider: An R package for the analysis of species identity and evolution, with particular reference to DNA barcoding. **Molecular Ecology Resources**, v. 12, p. 562–565, 2012.

BUCHER, T. L. Parrot Egg, Embryos and Nestlings: Patterns and Energetics of Growth and Development. **Physiol. Zool.**, v. 56, n. 3, p. 465–483, 1983.

BUDOWLE, B. et al. Recommendations for animal DNA forensic and identity testing. p. 295–302, 2005.

BUTCHART, S. H. M. et al. Which bird species have gone extinct? A novel quantitative classification approach. **Biological Conservation**, v. 227, n. August, p. 9–18, 2018.

BUTLER, J. M. **Advanced topics in forensic DNA typing: methodology**. Waltham: Elsevier, 2011.

BYRNE, M.; MACDONALD, B.; FRANCKI, M. Incorporation of Sodium Sulfite into Extraction Protocol Minimizes Degradation of Acacia DNA. **BioTechniques**, v. 30, n. 4, p. 742–748, 2001.

CAI, Y. et al. DNA barcoding on subsets of three families in Aves. **Mitochondrial DNA**, v. 21, n. 3–4, p. 132–137, 2010.

CAMPOS, M. J.; QUESADA, A. Strategies to Improve Efficiency and Specificity of Degenerate Primers in PCR. In: DOMÍNGUES, L. (Ed.). **PCR: Methods and Protocols**. Braga: Humana Press, 2017. p. 75–86.

ČANDEK, K.; KUNTNER, M. DNA barcoding gap: Reliable species identification over morphological and geographical scales. **Molecular Ecology Resources**, v. 15, n. 2, p. 268–277, 2015.

CARVALHO, C. B. V. Identificação genética de aves vítimas do tráfico de animais silvestres. **Atualidades Ornitológicas On-Line**, v. 165, p. 40–44, 2012.

CARVALHO, C. B. V. DE. The Use of DNA Barcoding to Identify Feathers from Illegally Traded Birds. **Brazilian Journal of Forensic Sciences , Medical Law and Bioethics**, v. 2, n. 4, p. 326–332, 2013.

CARVALHO, C. B. V. DE. DNA Barcoding in Forensic Vertebrate Species Identification. **Brazilian Journal of Forensic Sciences , Medical Law and Bioethics**, v. 4, n. 1, p. 12–23, 2014.

CARVALHO, C. B. V. DE. Identificação Genética de Espécies Animais. In: COSTA, F. J. V. et al. (Eds.). **Ciência contra o tráfico: avanços no combate ao comércio ilegal de animais silvestres**. João Pessoa: Imprell, 2017. p. 249.

CAVANAUGH, S. E.; BATHRICK, A. S. Direct PCR amplification of forensic touch and other challenging DNA samples: A review. **Forensic Science International: Genetics**, v. 32, p. 40–49, 2018.

CITES. **Appendices I, II and III**. Disponível em: <<https://cites.org/eng/app/appendices.php>>. Acesso em: 5 set. 2018.

COGHLAN, M. L. et al. Egg forensics: An appraisal of DNA sequencing to assist in species identification of illegally smuggled eggs. **Forensic Science International: Genetics**, v. 6, n. 2, p. 268–273, 2012.

COLLINS, R. A.; CRUICKSHANK, R. H. The seven deadly sins of DNA barcoding. **Molecular Ecology Resources**, v. 13, p. 969–975, 2013.

CORLETT, R. T. Review A Bigger Toolbox : Biotechnology in Biodiversity Conservation. **Trends in Biotechnology**, v. 35, n. 1, p. 55–65, 2017.

COSTA, F. J. V. Atualizações sobre o Tráfico de Animais no Brasil. In: COSTA, F. J. V. et al. (Eds.). **Ciência contra o tráfico: avanços no combate ao comércio ilegal de animais silvestres**. João Pessoa: Imprell, 2017. p. 249.

CUTRUFELLI, M. E. et al. Development of porcine rapid identification method (PRIME) by modified agar-gel immunodiffusion. **J**

Assoc Off Anal Chem, v. 76, p. 1022–1026, 1988.

D'ALBA, L. et al. Differential deposition of antimicrobial proteins in blue tit (*Cyanistes caeruleus*) clutches by laying order and male attractiveness. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 64, n. 6, p. 1037–1045, 2010.

D'AMATO, A. F.; NETO, M. A. DE M.; MARIA, J. L. Apreensão de ovos de Psittacidae com sucesso de eclosão – Relato de casos ocorridos na Bahia , entre 2005 e 2008. **Atualidades Ornitológicas**, v. 150, p. 37–40, 2009.

DALTON, D. L.; KOTZE, A. DNA barcoding as a tool for species identification in three forensic wildlife cases in South Africa. **Forensic Science International**, v. 207, n. 1–3, p. e51–e54, 2011.

DAMGAARD, P. B. et al. Improving access to endogenous DNA in ancient bones and teeth. **Scientific Reports**, v. 5, n. 11184, p. 1–12, 2015.

DAWNAY, N. et al. Validation of the barcoding gene COI for use in forensic genetic species identification. **Forensic Science International**, v. 173, n. 1, p. 1–6, 2007.

DEEMING, D. C. How does the bird-nest incubation unit work? **Avian Biology Research**, v. 9, n. 2, p. 103–113, 2016.

DEMEKE, T.; JENKINS, G. R. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, p. 1977–1990, 2010.

DESTRO, G. F. G. et al. Efforts to Combat Wild Animals Trafficking in Brazil. **Biodiversity Enrichment in a Diverse World**, p. 33–36, 2012.

DOÑA, J. et al. DNA barcoding and minibarcoding as a powerful tool for feather mite studies. **Molecular Ecology Resources**, v. 15, p. 1216–1225, 2015.

DYOMIN, A. et al. Evolution of ribosomal internal transcribed spacers in Deuterostomia. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 116, n. August 2016, p. 87–96, 2017.

EGLOFF, C. et al. A nondestructive method for obtaining maternal DNA from avian eggshells and its application to embryonic viability determination in herring gulls (*Larus argentatus*). **Molecular Ecology Resources**, v. 9, n. 1, p. 19–27, 2009.

EL-ASHRAM, S.; AL, I.; SUO, X. Nucleic acid protocols : Extraction and optimization. **Biotechnology Reports**, v. 12, p. 33–39, 2016.

FERNANDES, G. A. **Comportamento reprodutivo do papagaio-de-cara-roxa (*Amazona brasiliensis*: Psittacidae, Aves): uma abordagem molecular**. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biologia Animal. Brasília, 2015.

FERREIRA, J. M.; COSTA, F. J. V. Apresentação. In: COSTA, F. J.

V. et al. (Eds.). **Ciência contra o tráfico: avanços no combate ao comércio ilegal de animais silvestres**. João Pessoa: Imprell, 2017. p. 249.

FERRITO, V.; BERTOLINO, V.; PAPPALARDO, A. M. White fish authentication by COIBar-RFLP: Toward a common strategy for the rapid identification of species in convenience seafood. **Food Control**, v. 70, p. 130–137, 2016.

FILHO, S. **Relatório da Comissão Parlamentar de Inquérito destinada a “Investigar o tráfico ilegal de animais e plantas silvestres da fauna e da flora brasileira”**. Brasília, 2003.

FOLMER, O. et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, v. 3, n. 5, p. 294–299, 1994.

FORAN, D.; FISCHER, A.; STOLOFF, M. A Comparison of Mitochondrial DNA Amplification Strategies for Species Identification. **Journal of Forensic Investigation**, v. 3, n. 2, p. 1–7, 2015.

FORAN, D. R. Relative Degradation of Nuclear and Mitochondrial DNA: An Experimental Approach. **Journal of Forensic Investigation**, v. 51, n. 4, p. 766–770, 2006.

FORSBERG, C. et al. High-throughput DNA extraction of forensic adhesive tapes. **Forensic Science International: Genetics**, v. 24, p. 158–163, 2016.

FORSDYKE, D. R. Base composition, speciation, and barcoding. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 28, n. 2, p. 73–74, 2013.

FRACKMAN, S. et al. Betaine and DMSO: Enhancing agents for PCR. **Promega Notes**, v. 65, n. 65, p. 27–30, 1998.

FRANCISCO, L. R.; VALDUGA, M. O.; MOREIRA, N. Resposta reprodutiva de psitacídeos neotropicais em cativeiro à retirada de ovos e filhotes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 38(1), p. 25–31, 2014.

FRANCO, M. R. et al. Animais Silvestres Apreendidos no Período de 2002 a 2007 na Macrorregião de Montes Claros, Minas Gerais. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, v. 8, n. 14, p. 1007–1018, 2012.

FWG, F. W. G. **Wildlife Crime: a guide to the use of forensic and specialist techniques in the investigation of wildlife crime**, 2014.

G1 RIO PRETO E ARAÇATUBA. **Mulher detida sete vezes por tráfico de animais recebeu R\$ 100 mil em multas, mas nunca pagou**. Disponível em: <<https://g1.globo.com/sp/sao-jose-do-rio-preto-aracatuba/noticia/2018/11/09/mulher-flagrada-sete-vezes-por-trafico-de-animais-recebeu-r-100-mil-em-multas-mas-nunca-pagou.ghtml>>. Acesso em: 1 dez. 2018.

GARRIDO, R. G.; RODRIGUES, E. L. **Molecular Tools Application on Animal Protection and Characterization of Crimes against Fauna**. 22nd International Sustainable Development Research Society Conference. Lisboa: School of Science and Technology,

Universidade Nova de Lisboa, 2016

GAUR, A. et al. DNA-based identification of a snake in a wine bottle using universal primers: A case of mistaken identity. **Forensic Science International**, v. 214, p. 51–53, 2012.

GONÇALVES, P. F. M. **O potencial do DNA barcode na identificação de espécies de aves neotropicais**. Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Mestre em Ciências na área de Biologia/Genética. São Paulo, 2009.

GONÇALVES, P. F. M. et al. DNA Barcoding Identifies Illegal Parrot Trade. **Journal of Heredity**, v. 106, n. S1, p. 560–564, 2015.

GUAN, F. et al. A PCR Method That Can Be Further Developed into PCR-RFLP Assay for Eight Animal Species Identification. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2018, 2018.

GUNN, P.; WALSH, S.; ROUX, C. The nucleic acid revolution continues - Will forensic biology become forensic molecular biology? **Frontiers in Genetics**, v. 5, n. MAR, p. 1–4, 2014.

GURAYA, S. S. Ovarian Follicles in Reptiles and Birds. In: **Zoophysiology**. 24. ed. Berlin: Springer, 1989. p. 296.

HAJIBABAEI, M. et al. A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, n. 4, p. 959–964, 2006.

HAJIBABAEI, M.; MCKENNA, C. DNA Mini-barcodes. In: KRESS, W. J.; ERICKSON, D. L. (Eds.). **DNA Barcodes: Methods and Protocols**. Washington: Springer, 2012. p. 339–354.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symp Ser**, v. 41, p. 95–98, 1999.

HÄNNI, C. et al. Isopropanol precipitation removes PCR inhibitors from ancient bone extracts. **Nucleic Acids Research**, v. 23, n. 5, p. 881–882, 1995.

HARGITAI, R. et al. Egg composition in relation to social environment and maternal physiological condition in the collared flycatcher. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 63, p. 869–882, 2009.

HEBERT, P. D. N. et al. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings. Biological sciences / The Royal Society**, v. 270, n. 1512, p. 313–21, 2003.

HEBERT, P. D. N. et al. Identification of birds through DNA barcodes. **PLoS Biology**, v. 2, n. 10, 2004.

HEBERT, P. D. N.; RATNASINGHAM, S.; DE WAARD, J. R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 270, n. Suppl_1, p. S96–S99, 2003.

HEMMINGS, N.; WEST, M.; BIRKHEAD, T. R. Causes of hatching

failure in endangered birds. **Biology letters**, 2012.

HERMAN, L. Species identification of poultry egg products. **Poult Sci**, v. 83, n. 12, p. 2083–2085, 2004.

HINCKE, M. T. et al. The eggshell: structure, composition and mineralization Maxwell. **Frontiers in Bioscience**, v. 17, n. 1, p. 1266–1280, 2012.

HOFF-OLSEN, P. et al. Extraction of DNA from decomposed human tissue: An evaluation of five extraction methods for short tandem repeat typing. **Forensic Science International**, v. 105, n. 3, p. 171–183, 1999.

HOFREITER, M. et al. Ancient DNA. **Nature Reviews**, v. 2, p. 3–9, 2001.

HONG, Y. K. et al. DNA extraction conditions from *Porphyra perforata* using LiCl. **Journal of Applied Phycology**, v. 7, p. 101–107, 1995.

HUGGETT, J. F. et al. Differential susceptibility of PCR reactions to inhibitors: An important and unrecognised phenomenon. **BMC Research Notes**, v. 1, n. 70, p. 1–9, 2008.

HUNT, D. J.; PARKES, H. C.; LUMLEY, I. D. Identification of the species of origin of raw and cooked meat products using oligonucleotide probes. **Food Chemistry**, v. 60, n. 3, p. 437–442, 1997.

IBAMA, I. B. DO M. A. E DOS R. R.-. Relatório técnico CETAS 2002 - 2014. **IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis**, p. 29, 2016.

ICMBIO, I. C. M. DE C. DA B. **Plano de Ação Nacional para Conservação de Papagaios da Mata Atlântica**, 2011.

ICMBIO, I. C. M. DE C. DA B. **Plano de Ação Nacional para Conservação da Onça-pintada**, 2013.

IDT INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES. **OligoAnalyzer**. Disponível em: <<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>>. Acesso em: 1 mar. 2018.

ILLES, A. **Wildlife Crime in the United Kingdom**Institute for European Environmental Policy, 2016.

ISENBERG, A. R. Forensic Mitochondrial DNA Analysis: A Different Crime-Solving Tool. **FBI Law Enforcement Bulletin**, p. 16–22, 2002.

IUCN, I. U. FOR C. OF N. **The IUCN Red List of Threatened Species**. Disponível em: <<https://www.iucnredlist.org/>>. Acesso em: 20 jan. 2018.

IVANOVA, N. V. et al. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. **Molecular Ecology Notes**, v. 7, n. 4, p. 544–548, 2007.

IVANOVA, N. V.; CLARE, E. L.; BORISENKO, A. V. DNA Barcoding in Mammals. In: KRESS, W. J.; ERICKSON, D. L. (Eds.). **DNA Barcodes: Methods and Protocols**. Washington: Humana Press, 2012. p. 153–182.

IVERSON, J. B.; EWERT, M. A. Physical characteristics of reptilian

eggs and a comparison with avian eggs. In: DEEMING, D. C.; FERGUSON, M. W. J. (Eds.). **Egg incubation: its effects on embryonic development in birds and reptiles**. Cambridge: Cambridge University Press, 1991. p. 87–100.

IYENGAR, A. Forensic DNA analysis for animal protection and biodiversity conservation: A review. **Journal for Nature Conservation**, v. 22, n. 3, p. 195–205, 2014.

JACQUES, G. S. **Identificação De Espécies Animais Usando Sequências De Genes Mitocondriais No Combate Aos Crimes Contra a Fauna**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação “Stricto Sensu” em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Genômicas e Biotecnologia. Brasília, 2005.

JAKUBOWSKA, J.; MACIEJEWSKA, A.; PAWŁOWSKI, R. Comparison of three methods of DNA extraction from human bones with different degrees of degradation. **International Journal of Legal Medicine**, v. 126, p. 173–178, 2012.

JAMES, J. E.; PIGANEAU, G.; EYRE-WALKER, A. The rate of adaptive evolution in animal mitochondria. **Molecular Ecology**, v. 25, n. 1, p. 67–78, 2016.

JARVIS, E. D. et al. Whole-genome analyses resolve early branches in the tree of life of modern birds. **Science**, v. 346, n. 6215, p. 1321–1331, 2014.

JENSEN, M. A.; FUKUSHIMA, M.; DAVIS, R. W. DMSO and betaine greatly improve amplification of GC-rich constructs in de novo synthesis. **PLoS ONE**, v. 5, n. 6, p. 1–5, 2010.

JEONG, T. J. et al. DNA barcode reference data for the Korean herpetofauna and their applications. **Molecular Ecology Resources**, v. 13, n. 6, p. 1019–1032, 2013.

JOHNSON, R. N. The use of DNA identification in prosecuting wildlife-traffickers in Australia: Do the penalties fit the crimes? **Forensic Science, Medicine, and Pathology**, v. 6, n. 3, p. 211–216, 2010.

JOHNSON, R. N. Conservation Genetics and Wildlife Forensics of Birds. In: HUFFMAN, J. E.; WALLACE, J. R. (Eds.). **Wildlife Forensics: Methods and Applications**. Chichester: John Wiley & Sons, 2012. p. 293–326.

KATOH, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 4, p. 772–780, 2013.

KERR, K. C. R. et al. Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds. **Molecular Ecology Notes**, v. 7, n. 4, p. 535–543, 2007.

KERR, K. C. R. et al. Probing evolutionary patterns in neotropical birds through DNA barcodes. **PLoS ONE**, v. 4, n. 2, 2009a.

KERR, K. C. R. et al. Probing evolutionary patterns in neotropical birds through DNA barcodes. **PLoS ONE**, v. 4, n. 2, p. e4379–e4379, 2009b.

KERR, K. C. R. et al. Filling the gap - COI barcode resolution in eastern Palearctic birds. **Frontiers in Zoology**, v. 6, n. 1, p. 535–543, 2009c.

KHAN, F. M. et al. Illegal product manufacturing and exportation from Pakistan: Revealing the factuality of highly processed wildlife skin samples via DNA mini-barcoding. **Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids**, v. 0, n. 0, p. 1–7, 2018.

KITANO, T. et al. Two universal primer sets for species identification among vertebrates. **International Journal of Legal Medicine**, v. 121, n. 5, p. 423–427, 2007.

KLIPPEL, A. H.; BONFIM, J. C.; PANETO, G. G. **Padronização de metodologia para identificação de espécies de aves pela casca do ovo utilizando técnica não invasiva e barcode**. XVI Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e XII Encontro Latino Americano de Pós-Graduação. **Anais...**Urbanova: 2012

KOENIG, W. D. Ecological and social factors affecting hatchability of eggs. **The Auk**, v. 99, p. 526–536, 1982.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; BRENNER, C. Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. **Physiological Reviews**, v. 87, p. 99–163, 2007.

KUMAR, S. et al. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547–1549, 2018.

KUNZ, W.; HENLE, J.; NINHAM, B. W. “Zur Lehre von der Wirkung der Salze” (about the science of the effect of salts): Franz Hofmeister’s historical papers. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 9, p. 19–37, 2004.

LEE, P. L. M.; PRYS-JONES, R. P. Extracting DNA from museum bird eggs, and whole genome amplification of archive DNA. **Molecular Ecology Resources**, v. 8, n. 3, p. 551–560, 2008.

LIJTMAER, D. A. et al. DNA Barcoding Birds: From Field Collection to Data Analysis. In: KRESS, W. J.; ERICKSON, D. L. (Eds.). **DNA Barcodes: Methods and Protocols**. Washington: Humana Press, 2012. p. 127–152.

LINACERO, R.; RUEDA, J.; VAZQUEZ, A. M. Quantification of DNA. In: KAR, A.; ISAAC, P. G.; INGRAM, D. S. (Eds.). **Molecular tools for screening biodiversity: plants and animals**. London: Chapman & Hall, 1998. p. 18–21.

LORENZ, T. C. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. **Journal of Visualized Experiments**, v. 63, n. e3998, p. 1 of 15, 2012.

LUO, S. et al. Biparental Inheritance of Mitochondrial DNA in

- Humans. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, p. 1–6, 2018.
- MACHADO, R. D. F. S. Considerações sobre o enquadramento típico do tráfico de animais silvestres. **Custos Legis**, v. 4, p. 1–32, 2012.
- MADDEN, T. The BLAST Sequence Analysis Tool. In: **The NCBI Handbook**. 2. ed. National Center for Biotechnology Information, 2014. p. 427–438.
- MARTÍN-GÁLVEZ, D. et al. DNA sampling from eggshell swabbing is widely applicable in wild bird populations as demonstrated in 23 species. **Molecular Ecology Resources**, v. 11, n. 3, p. 481–493, 2011.
- MARTIN, T. E. Food as a limit on breeding birds: a lie-history perspective. **Ann. Rev. Ecol. Syst.**, v. 18, p. 453–487, 1987.
- MATLOCK, B. **Technical Note 52646: Assessment of Nucleic Acid Purity Thermo Scientific**. Disponível em: <<http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/TN52646-E-0215M-NucleicAcid.pdf>>.
- MAZZANTI, M. et al. DNA degradation and genetic analysis of empty puparia: Genetic identification limits in forensic entomology. **Forensic Science International**, v. 195, n. 1–3, p. 99–102, 2010.
- MCLEISH, K. et al. Profiling in wildlife crime: Recovery of human DNA deposited outside. **Forensic Science International: Genetics**, v. 35, p. 65–69, 2018.
- MEIER, R. et al. DNA Barcoding and Taxonomy in Diptera : A Tale of High Intraspecific Variability and Low Identification Success. **Systematic Biology**, v. 55, n. 5, p. 715–728, 2006.
- MELTON, T.; HOLLAND, C. A.; HOLLAND, M. Forensic Mitochondrial DNA: Current Practice and Future Potential. **Forensic Science Review**, v. 24, n. 2, p. 101–122, 2012.
- MEUSNIER, I. et al. A universal DNA mini-barcode for biodiversity analysis. **BMC Genomics**, v. 9, p. 4–7, 2008.
- MEYER, C. P.; PAULAY, G. DNA barcoding: Error rates based on comprehensive sampling. **PLoS Biology**, v. 3, n. 12, p. 2229–2238, 2005.
- MEYER, R. et al. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis: a simple method for species identification in food. **Journal of AOAC International**, v. 78, n. 6, p. 1542–1551, 1995.
- MIAZI, O. F. et al. Fertility and Hatchability of Fayoumi and Sonali Chicks. **Scholarly Journal of Agricultural Science**, v. 2, n. 5, p. 83–86, 2012.
- MICHL, G. et al. Female collared flycatchers adjust yolk testosterone to male age, but not to attractiveness. **Behavioral Ecology**, v. 16, n. 2, p. 383–388, 2005.
- MIGUEL, R. B. et al. Evaluation of three different DNA extraction methods from blood samples collected in dried filter paper in Plasmodium subpatent infections from the Amazon region in Brazil. **Revista do Instituto**

de Medicina Tropical de São Paulo, v. 55, n. 3, p. 205–208, 2013.

MINAKSHI, P. et al. Animal Forensics and Applications. In: SALAR, R. K. et al. (Eds.). **Biotechnology: Prospects and Applications**. New Delhi: Springer, 2013. p. 265–286.

MIODUCHOWSKA, M. et al. Instances of erroneous DNA barcoding of metazoan invertebrates: Are universal cox1 gene primers too “universal”? **PLoS ONE**, v. 13, n. 6, p. 1–16, 2018.

MMA. **Portaria nº 444, de 17 de dezembro de 2014**. Reconhece como espécies da fauna brasileira ameaçadas de extinção aquelas constantes da Lista Nacional Oficial de Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção. Brasília, 2014.

NASSARO, A. L. F. **Tráfico de Animais e Policiamento Ambiental: Oeste do Estado de São Paulo (1998 a 2012)**. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2015.

NCBI. **Basic Local Alignment Search Tool**. Disponível em: <<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>. Acesso em: 3 dez. 2018.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. São Paulo: Artmed, 2014.

NETO, A. A. M. DE C. O tráfico de animais. **Revista da Faculdade de Direito da Universidade de São Paulo**, v. 106, n. 107, p. 307–347, 2012.

NOBLE, R. C. Comparative composition and utilisation of yolk lipid by embryonic birds and reptiles. In: DEEMING, D. C.; FERGUSON, M. W. J. (Eds.). **Egg incubation: its effects on embryonic development in birds and reptiles**. Cambridge: Cambridge University Press, 1991. p. 17–28.

OGDEN, R.; DAWNAY, N.; MCEWING, R. Wildlife DNA forensics - Bridging the gap between conservation genetics and law enforcement. **Endangered Species Research**, v. 9, n. 3, p. 179–195, 2009.

OKI, V. G.; PANDEFF, P. A. Análise da efetividade da Lei de Crimes Ambientais e o tráfico de animais no Brasil. **Ampliando**, v. 3, n. 1, p. 1–21, 2016.

OLAH, G. et al. Ecological and socio-economic factors affecting extinction risk in parrots. **Biodiversity and Conservation**, v. 25, n. 2, p. 205–223, 2016.

OLIVEIRA, M. A. Tráfico de Animais Silvestres. **Perícia Federal**, p. 14–17, 2000.

OLIVEIRA, R. et al. Species identification using a small nuclear gene fragment: Application to sympatric wild carnivores from South-western Europe. **Conservation Genetics**, v. 11, n. 3, p. 1023–1032, 2010.

ORŁOWSKI, G. et al. Variation in egg size, shell thickness, and metal and calcium content in eggshells and egg contents in relation to laying order and embryonic development in a small passerine bird. **The Auk**, v. 133, n. 3, p. 470–483, 2016.

OSKAM, C. L. et al. Fossil avian eggshell preserves ancient DNA.

Proceedings. Biological sciences / The Royal Society, v. 277, n. 1690, p. 1991–2000, 2010.

PACHECO, M. A. et al. Evolution of modern birds revealed by mitogenomics: Timing the radiation and origin of major orders. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 6, p. 1927–1942, 2011.

PANG, B. C. M.; CHEUNG, B. K. K. Double swab technique for collecting touched evidence. **Legal Medicine**, v. 9, p. 181–184, 2007.

PARK, H.-Y. et al. New DNA barcodes for identification of Korean birds. **Genes & Genomics**, v. 33, n. 2, p. 91–95, 30 abr. 2011.

PARSON, W. et al. Species identification by means of the cytochrome b gene. **International Journal of Legal Medicine**, v. 114, n. 1–2, p. 23–28, 2000.

PATEL, S. et al. Conserved primers for DNA barcoding historical and modern samples from New Zealand and Antarctic birds. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, n. 3, p. 431–438, 2010.

PEDROSO, A. A. et al. Desenvolvimento embrionário e eclodibilidade de ovos de codornas armazenados por diferentes períodos e incubados em umidades e temperaturas distintas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 6, p. 2344–2349, 2006.

PENTINSAARI, M. et al. Molecular evolution of a widely-adopted taxonomic marker (COI) across the animal tree of life. **Scientific Reports**, v. 6, n. October, p. 1–12, 2016.

PEREIRA, R. J. G. et al. General and Comparative Endocrinology Urofecal steroid profiles of captive Blue-fronted parrots (*Amazona aestiva*) with different reproductive outcomes. **General and Comparative Endocrinology**, v. 260, p. 1–8, 2018.

PEREIRA, S. L. Mitochondrial genome organization and vertebrate phylogenetics. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 4, p. 745–752, 2000.

PIACENTINI, V. Q. et al. Annotated checklist of the birds of Brazil by the Brazilian Ornithological Records Committee. **Revista Brasileira de Ornitologia**, v. 23, n. 2, p. 91–298, 2015.

PILOTTO, M. et al. Exploring the Impact of the Biofloc Rearing System and an Oral WSSV Challenge on the Intestinal Bacteriome of *Litopenaeus vannamei*. **Microorganisms**, v. 6, n. 3, p. 83, 2018.

PIMENTEL, P. C. B.; SANTOS, J. DE M. Diagnóstico do tráfico de animais silvestres na Bahia: identificação, quantificação e caracterização das espécies-alvo. **Diálogos & Ciência - Revista da Rede de Ensino FTC**, v. III, n. 8, p. 35–44, 2009.

POONIYA, S. et al. Quality and quantity of extracted deoxyribonucleic acid (DNA) from preserved soft tissues of putrefied unidentifiable human corpse. **Journal of Laboratory Physicians**, v. 6, n. 1, p. 31–35, 2014.

PURCELL, R.; HALL, L. S.; COARDSO, R. **Egg & Nest**. Cambridge: Belknap Press, 2008.

RATNASINGHAM, S.; HEBERT, P. D. N. BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). **Molecular Ecology Notes**, v. 7, p. 355–364, 2007.

RATNASINGHAM, S.; HEBERT, P. D. N. A DNA-Based Registry for All Animal Species: The Barcode Index Number (BIN) System. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. 1–16, 2013.

RAYMOND, J. J. et al. Trace evidence characteristics of DNA: A preliminary investigation of the persistence of DNA at crime scenes. **Forensic Science International: Genetics**, v. 4, n. 1, p. 26–33, 2009.

REDING, L. Increased hatching success as a direct benefit of polyandry in birds. **Evolution**, v. 69, n. 1, p. 264–270, 2015.

REHMAN, A. et al. Use of DNA Barcoding to Control the Illegal Wildlife Trade: A CITES Case Report from Pakistan. **Journal of Bioresource Management**, v. 2, n. 2, p. 19–22, 2015.

REIS, S. T. J. **Aspectos legais, sócio-ambientais e éticos da criação comercial de animais silvestres no Brasil**. Florianópolis: Dissertação apresentada para conclusão do Mestrado Profissional em Perícias Criminais Ambientais, da Universidade Federal de Santa Catarina, 2014.

REIS, S. T. J. et al. Retrospective Study of Expert Examination Performed by the Brazilian Federal Police in Investigations of Wildlife Crimes, 2013–2014. **Brazilian Journal of Forensic Sciences, Medical Law and Bioethics**, v. 5, n. 2, p. 198–214, 2016.

RENTAS. **1º Relatório nacional sobre o tráfico de fauna silvestre Rede Nacional de controle ao Tráfico de Animais Silvestres Rede Nacional de Controle ao Tráfico de Animais Silvestres**, , 2001.

RICKLEFS, R. E. Composition of Eggs of Several Bird Species. **The Auk**, v. 94, n. 2, p. 350–356, 1977.

RIES, A. C. R. et al. Record of *Ataenius picinus* Harold, 1868 (Coleoptera: Scarabaeidae: Aphodiinae) associated with exposed carcasses in Southern Brazil. **Entomotropica**, v. 31, n. 2016, p. 48–53, 2016.

RIKIMARU, K.; TAKAHASHI, H. A simple and efficient method for extraction of PCR-amplifiable DNA from chicken eggshells. **Animal Science Journal**, v. 80, n. 2, p. 220–223, 2009.

RIVERO, E. R. C. et al. Simple salting-out method for DNA extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. **Pathology Research and Practice**, v. 202, n. 7, p. 523–529, 2006.

RODRIGUES, E. L.; FRANCEZ, P. A. DA C.; GARRIDO, R. G. Genética forense. In: FILHO, C. R. D.; FRANCEZ, P. A. DA C. (Eds.). **Introdução à biologia forense**. Segunda ed ed. Campinas: Millennium, 2018. p. 261–348.

ROHLAND, N.; HOFREITER, M. Ancient dna extraction from bones

and teeth. **Nature Protocols**, v. 2, n. 7, p. 1756–1762, 2007.

ROSEN, G. E.; SMITH, K. F. Summarizing the evidence on the international trade in illegal wildlife. **EcoHealth**, v. 7, n. 1, p. 24–32, 2010.

ROSSEN, L. et al. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 17, p. 37–45, 1992.

ROSSI, R. et al. Identificação de Espécies de Animais Silvestres por Meio de Sequências Mitocondriais Utilizados no Combate aos Crimes Contra a Fauna – Mato Grosso – Brasil. **Brazilian Journal of Forensic Sciences, Medical Law and Bioethics**, v. 6, n. 3, p. 378–403, 2017.

RUBINOFF, D. Utility of mitochondrial DNA barcodes in species conservation. **Conservation biology: the journal of the Society for Conservation Biology**, v. 20, p. 1026–1033, 2006.

RUUSKANEN, S. et al. Geographical variation in egg mass and egg content in a passerine bird. **PLoS ONE**, v. 6, n. 11, 2011.

SACCONI, C. et al. Evolutionary genomics in Metazoa: The mitochondrial DNA as a model system. **Gene**, v. 238, n. 1, p. 195–209, 1999.

SAITOH, T. et al. DNA barcoding reveals 24 distinct lineages as cryptic bird species candidates in and around the Japanese Archipelago. **Molecular Ecology Resources**, v. 15, n. 1, p. 177–186, 2015.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SAMBROOK, J.; GREEN, M. R. **Molecular cloning: a laboratory manual - Volume 1** Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.

SARAIVA, A. S. **Relatório da Operação Oxóssi**. Rio de Janeiro, 2009.

SCARANTO, B. M. S. **Bianca Maria Soares Scaranto Caracterização genética do jundiá (*Rhamdia quelen*) por meio do DNA barcode e marcadores microssatélites Florianópolis**. Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Aquicultura. Florianópolis, 2017.

SCHÄFFER, S.; ZACHOS, F. E.; KOBLMÜLLER, S. Opening the treasure chest: A DNA-barcoding primer set for most higher taxa of Central European birds and mammals from museum collections. **PLoS ONE**, v. 12, n. 3, p. 1–14, 2017.

SCHRADER, C. et al. PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, p. 1014–1026, 2012.

SEVILLA, R. G. et al. Primers and polymerase chain reaction conditions for DNA barcoding teleost fish based on the mitochondrial cytochrome b and nuclear rhodopsin genes. **Molecular Ecology Notes**, v. 7,

n. 5, p. 730–734, 2007.

SHARMA, P.; KOBAYASHI, T. Are “universal” dna primers really universal? **Journal of Applied Genetics**, v. 55, p. 485–496, 2014.

SHUTLER, G. G. et al. Removal of a PCR inhibitor and resolution of DNA STR types in mixed human-canine stains from a five year old case. **Journal of forensic sciences**, v. 44, n. 3, p. 623–626, 1999.

SOLLUND, R.; MAHER, J. **The Illegal Wildlife Trade: A Case Study report on the Illegal Wildlife Trade in the United Kingdom, Norway, Colombia and Brazil**. 2015.

SORENSEN, M. D. et al. Primers for a PCR-based approach to mitochondrial genome sequencing in birds and other vertebrates. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 12, n. 2, p. 105–114, 1999.

STODDARD, M. C. et al. Avian egg shape: Form, function, and evolution. **Science**, v. 356, p. 1249–1254, 2017.

STOLESON, S. H. The importance of the early onset of incubation for the maintenance of egg viability. In: ADAMS, N. J.; SLOTOW, R. H. (Eds.). **Int. Ornithol. Congr.** Joannesburg, 1999. p. 600–616.

SULTANA, S. et al. Universal mini COI barcode for the identification of fish species in processed products. **Food Research International**, v. 105, p. 19–28, 2018.

SUNTRARACHUN, S.; CHANHOM, L.; SUMONTHA, M. Identification of sea snake meat adulteration in meat products using PCR-RFLP of mitochondrial DNA. **Food Science and Human Wellness**, v. 7, n. 2, p. 170–174, 2018.

SWANGO, K. L. et al. A quantitative PCR assay for the assessment of DNA degradation in forensic samples. **Forensic Science International**, v. 158, n. 1, p. 14–26, 2006.

SWGDM. Validation Guidelines for DNA Analysis Methods. **Scientific Working Group on DNA Analysis Methods**, p. 1–15, 2016.

TAHIR, H. M.; AKHTAR, S. Services of DNA barcoding in different fields. **Mitochondrial DNA**, v. 1736, n. October, p. 1–12, 2015.

TAVARES, E. S. et al. DNA barcode detects high genetic structure within neotropical bird species. **PLoS ONE**, v. 6, n. 12, 2011.

TAVARES, E. S.; BAKER, A. J. Single mitochondrial gene barcodes reliably identify sister-species in diverse clades of birds. **BMC Evolutionary Biology**, v. 8, n. 1, p. 81, 2008.

TOBE, S. S. et al. Recovery of human DNA profiles from poached deer remains part 2: Improved recovery protocol without the need for LCN analysis. **Science and Justice**, v. 53, n. 1, p. 23–27, 2013.

TOBE, S. S.; GOVAN, J.; WELCH, L. A. Recovery of human DNA profiles from poached deer remains: A feasibility study. **Science and Justice**, v. 51, n. 4, p. 190–195, 2011.

TOBE, S. S.; KITCHENER, A.; LINACRE, A. Cytochrome b or

cytochrome c oxidase subunit I for mammalian species identification-An answer to the debate. **Forensic Science International: Genetics Supplement Series**, v. 2, n. 1, p. 306–307, 2009.

TULLETT, S. **Investigating Hatchery Practice**. [s.l.] Ross Tech, 2009.

UNI, Z.; FERKET, R. P. Methods for early nutrition and their potential. **World's Poultry Science Journal**, v. 60, n. 01, p. 101–111, 2004.

UNODC. **Wildlife and Forest Crime Analytic Toolkit**. New York: United Nations Office on Drugs and Crime, 2012.

UNODC. **World Wildlife Crime Report: Trafficking in protected species**. New York: United Nations, 2016.

VAN DE PERRE, R.; DE MOOR, J. P.; LIBERT, M. **Energy-savings due to the integration of a thermogenous element in prefabricated facades**. Commission of the European Communities, (Report) EUR, 1984

VAN OORSCHOT, R. et al. Are you collecting all the available DNA from touched objects? **International Congress Series**, v. 1239, p. 803 – 807, 2003.

VAN OORSCHOT, R. A. H.; JONES, M. K. DNA fingerprints from fingerprints. **Nature**, v. 387, p. 767, 1997.

VERDON, T. J.; MITCHELL, R. J.; VAN OORSCHOT, R. A. H. The influence of substrate on DNA transfer and extraction efficiency. **Forensic Science International: Genetics**, v. 7, p. 167–175, 2013.

VILAÇA, S. T. et al. DNA-based identification applied to Thamnophilidae (Passeriformes) species: The first barcodes of Neotropical birds. **Revista Brasileira de Ornitologia**, v. 14, n. 1, p. 7–13, 2006.

VIRGILIO, M. et al. Identifying insects with incomplete DNA barcode libraries, African fruit flies (Diptera: Tephritidae) as a test case. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, p. e31581–e31581, 2012.

WANG, X. C. et al. ITS1: A DNA barcode better than ITS2 in eukaryotes? **Molecular Ecology Resources**, v. 15, n. 3, p. 573–586, 2015.

WILSON, I. A. N. G. Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification. v. 63, n. 10, 1997.

YANG, F. et al. DNA Barcoding for the Identification and Authentication of Animal Species in Traditional Medicine. **Hindawi**, p. 1–18, 2018.

YAO, H. et al. Use of ITS2 region as the universal DNA barcode for plants and animals. **PLoS ONE**, v. 5, n. 10, 2010.

YAO, W. et al. Evaluation and comparison of in vitro degradation kinetics of DNA in serum, urine and saliva: A qualitative study. **Gene**, v. 590, p. 142–148, 2016.

YOSHIZAKI, N. et al. Two-step consumption of yolk granules during the development of quail embryos. **Development Growth and Differentiation**, v. 46, n. 3, p. 229–238, 2004.

ZENG, L. et al. Identification of sea cucumber species in processed food products by PCR-RFLP method. **Food Control**, v. 90, n. 9, p. 166–171, 2018.

ZHANG, G. et al. Comparative genomic data of the Avian Phylogenomics Project. **GigaScience**, v. 3, n. 1, p. 1–8, 2014.