APLICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES NA IDENTIFICAÇÃO DE INDIVÍDUOS DE FELINOS SILVESTRES APREENDIDOS

Vitorya D'Agostini da Silva[1], Mylena Kaizer Xavier Fonseca[2], Andrea Siqueira Carvalho[3], Aureo Banhos[4]

[1]Universidade Federal do Espírito Santo, Departamento de Ciências Biológicas, Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde, Alto Universitário, s/n, Guararema, 29500-000, Alegre - ES, Brasil, vitoryadagostini@gmail.com
[2]Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e Naturais, Avenida Fernando Ferrari, 514, Goiabeiras, 29075-910, Vitória - ES, Brasil, mylenakaizer07@gmail.com.
[3]Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Geografia, Avenida Presidente Antônio Carlos, 6627, Pampulha, 31270-901, Belo Horizonte - MG, Brasil, andreasicarvalho@hotmail.com
[4]Universidade Federal do Espírito Santo, Departamento de Ciências Biológicas, Centro de Ciências Humanas e Naturais, Avenida Fernando Ferrari, 514, Goiabeiras-29075-910, Vitória - ES, Brasil, aureobs@gmail.com.

Resumo
O tráfico de animais silvestres constitui uma das maiores ameaças à biodiversidade global, sendo o Brasil um dos países mais afetados devido à sua rica fauna e às falhas nos sistemas de fiscalização. Entre as espécies mais visadas estão os felinos neotropicais, como a onça-pintada (*Panthera onca*), a jaguatirica (*Leopardus pardalis*) e a onça-parda (*Puma concolor*), explorados historicamente por suas peles e também por dentes, ossos e garras. A identificação morfológica de fragmentos apreendidos é frequentemente inconclusiva, o que torna a genética forense uma ferramenta para a comprovação de crimes ambientais. Neste estudo, foram analisadas 38 amostras de tecidos de felinos apreendidos em Curionópolis (PA) em 2016, utilizando marcadores moleculares, especialmente o mini *barcode* ATP6. Os resultados confirmaram a identificação de 34 partes de onças-pintadas, duas jaguatiricas e uma onça-parda, com apenas uma amostra inconclusiva.
Palavras-chave: Felinos. Identificação. Tráfico ilegal. ATP6. COI.

Área do Conhecimento: Genética

Introdução

O tráfico ilegal de animais silvestres constitui uma importante ameaça à conservação da biodiversidade, contribuindo para a redução de populações naturais e afetando espécies de diferentes grupos taxonômicos. A captura e comercialização da fauna silvestre estão associadas a diversas finalidades, como o uso na medicina tradicional, a produção de adornos e a manutenção de animais como troféus (Morcatti *et al.*, 2020). O Brasil se destaca nesse cenário devido à elevada diversidade de sua fauna e flora, às desigualdades socioeconômicas e às limitações dos mecanismos de fiscalização e controle (Rocha, 1995). Estima-se que o tráfico de animais silvestres movimenta bilhões de dólares anualmente e resulte na retirada de milhões de indivíduos de seus ambientes naturais (Rocha, 1995; Osaua, 2001; Brasil, 2006).

Além dos impactos ecológicos, o tráfico ilegal representa um desafio para a identificação dos animais apreendidos e para a investigação de crimes contra a fauna. Frequentemente, os materiais recuperados correspondem a partes ou fragmentos corporais previamente manipulados ou preparados para comercialização, o que pode dificultar a identificação por características morfológicas (Sanches *et al.,* 2012; Gouda *et al.,* 2020). Nesse contexto, ferramentas de genética molecular permitem a identificação taxonômica, a individualização e a determinação sexual dos animais, contribuindo para investigações e para a aplicação da legislação ambiental (Iyengar, 2014).

Entre as abordagens moleculares, se destacam os marcadores mitocondriais, como os genes Citocromo Oxidase da sub unidade 1 (COI) e ATPase-6 (ATP6), utilizados na caracterização genética e diferenciação de espécies. O emprego de fragmentos menores, como os *mini-barcodes*, é particularmente útil em amostras forenses, nas quais o DNA pode apresentar degradação (Chaves *et al.,* 2011). Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo identificar molecularmente 38

amostras de tecidos de felinos silvestres, incluindo patas, pele, cauda e cabeça, apreendidas durante uma ação de combate ao tráfico ilegal no município de Curionópolis, Pará, em 2016.

Metodologia

As amostras de DNA utilizadas neste estudo foram originalmente obtidas em 2017 por Silva Júnior (2017) na pesquisa "Determinação do sexo em amostras forenses de felinos silvestres caçados e esquartejados" com o uso do kit DNeasyTM Tissue Kit (QIAGEN), seguindo o protocolo do fabricante, sendo posteriormente armazenadas sob refrigeração. Como algumas amostras apresentaram baixa qualidade inicial, o procedimento de extração precisou ser repetido, resultando em um total de 50 extrações de DNA a partir das 38 amostras coletadas, as extrações de DNA provenientes de pata, pele, cauda e cabeça de felinos foram novamente quantificadas por espectrofotometria no equipamento Nanodrop 2000. Foram inicialmente selecionados dois marcadores moleculares: o Citocromo Oxidase I (COI), de abrangência mais ampla, e o ATP6 mini barcode desenvolvido por Chaves *et al.* (2011).

Essa escolha se deu porque as amostras utilizadas no estudo são provenientes de crimes ambientais e, portanto, podem apresentar DNA degradado. Assim, foram testados ambos os marcadores para definir o mais adequado, sendo o COI um marcador mais genérico e o ATP6 mais específico para felinos. Dessa forma, foi realizada a amplificação de dois marcadores ATP6 e COI, por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR). A amplificação do mini *barcode* do gene ATP6, que gera um fragmento de aproximadamente 126 pb, utilizou os iniciadores ATP6-DF3 e ATP6-DR1 (Chaves *et al.,* 2011). A reação foi preparada em um volume final de 25 µL, contendo 12,5 µL de PCR Master Mix 2X (Promega), 2 µL de cada *primer* (*forward e reverse*, 10 µM), 7,5 µL de água livre de DNAse e 1 µL de DNA, sendo que para amostras de baixa qualidade, o volume de DNA foi ajustado para 2 µL e o de água para 6,5 µL. O programa de amplificação em termociclador Veriti™ (Applied Biosystems) consistiu em uma desnaturação inicial a 94°C por 1 minuto, seguida por 10 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e mais 25 ciclos 94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos, finalizando com uma extensão de 5 minutos a 72°C. Já para o marcador COI em uma reação similar de 25 µL, mas com 1,5 µL de cada *primer* e 8,5 µL de água. O protocolo de ciclagem para o COI foi diferente, com uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida por 40 ciclos, 94°C por 30 segundos, 48°C por 45 segundos, 72°C por 45 segundos e uma extensão final de 10 minutos a 72°C. O resultado da PCR foi visualizado através do gel de agarose a 1%. As amostras que não apresentaram sucesso na amplificação, mesmo após ajustes na concentração de DNA e nos componentes do Master Mix, foram submetidas a um novo processo de extração de DNA.

Os produtos de PCR bem sucedidos seguiram para a etapa de pré-sequenciamento, que consistiu na purificação por precipitação com polietilenoglicol (PEG). Para isso, foi adicionado um volume igual de solução PEG 20%/NaCl 2,5 M a cada volume de PCR. A mistura foi homogeneizada em vórtex e incubada a 37 °C por no mínimo 15 minutos. Após a incubação, os tubos foram centrifugados a 13.000 RPM por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de DNA foi lavado duas vezes com 125 µL de etanol 80% gelado, com centrifugações de 5 minutos a 13.000 RPM entre as lavagens. Após a remoção completa do etanol e a secagem do *pellet,* o DNA foi ressuspendido em água ultrapura no volume original da reação e armazenado a -20 °C. As amostras purificadas foram sequenciadas no equipamento Applied Biosystems 3730xl. As sequências obtidas foram editadas e alinhadas com os softwares BioEdit, AliView e MEGA (Hall, 1999; Larsson, 2014; Tamura; Stecher; Kumar, 2021). A identificação em nível de espécie foi realizada com a ferramenta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul *et al.,* 1990)

Resultados

A análise molecular das 38 amostras biológicas permitiu a identificação de 37 delas, confirmando a presença de três espécies de felinos neotropicais: 34 amostras de *Panthera onca* (onça-pintada), duas de *Leopardus pardalis* (jaguatirica) e uma de *Puma concolor* (onça-parda). Apenas a amostra P18 não apresentou resultado no BLAST. Em um teste preliminar, foram comparados os marcadores COI e ATP6 mini *barcode*. Foram utilizadas três amostras (3, 11 e P12), cada uma sequenciada nas direções forward e reverse, sendo a amostra 3 analisada para ambos os genes. Para o ATP6, apenas

uma das quatro direções testadas apresentou identificação divergente, atribuindo uma amostra de *Panthera onca* a outra espécie do gênero, *Panthera tigris.* Para o COI, duas das quatro direções resultaram em identificações incorretas: uma delas identificou uma amostra como *Otocolobus manul.*

Com base nesse teste preliminar, o marcador ATP6 mini *barcode* foi selecionado para as análises posteriores. Além disso, foi verificado que o sequenciamento unidirecional da fita de DNA (*forward*) foi suficiente para obter identificações no BLAST, permitindo a otimização do processo.

Tabela 01: Identificação das amostras de felinos silvestres utilizando BLAST

Amostras	**Parte do corpo**	**Espécie identificada**	**Nome científico**	***Query cover***	**Percentual de identificação**
1	Pele	Puma	*Puma concolor*	98%	99.05%
2	Cauda	Onça-pintada	*Panthera onca*	100%	100%
3	Pata	Jaguatirica	*Leopardus pardalis*	95%	96.15%
4	Pele	Jaguatirica	*Leopardus pardalis*	95%	96.15%
5	Pele	Onça-pintada	*Panthera onca*	100%	92.96%
6	Pata	Onça-pintada	*Panthera onca*	99%	100%
7	Pata	Onça-pintada	*Panthera onca*	97%	100%
8	Pata	Onça-pintada	*Panthera onca*	97%	100%
9	Pata	Onça-pintada	*Panthera onca*	97%	99.05%
10	Pata	Onça-pintada	*Panthera onca*	97%	99.11%
11	Pele	Onça-pintada	*Panthera onca*	100%	100%
12	Pele	Onça-pintada	*Panthera onca*	96%	91.40%
13	Pele	Onça-pintada	*Panthera onca*	100%	100%
14	Pele	Onça-pintada	*Panthera onca*	99%	100%
15	Pele	Onça-pintada	*Panthera onca*	100%	95.59%
16	Cabeça	Onça-pintada	*Panthera onca*	94%	100%
17	Cabeça	Onça-pintada	*Panthera onca*	96%	98.84%
18	Cabeça	Onça-pintada	*Panthera onca*	100%	100%
19	Cabeça	Onça-pintada	*Panthera onca*	96%	94.12%
20	Cabeça	Onça-pintada	*Panthera onca*	96%	92.21%
P1	Pata	Onça-pintada	*Panthera onca*	100%	100%
P2	Pata	Onça-pintada	*Panthera onca*	97%	98.10%
P3	Pata	Onça-pintada	*Panthera onca*	100%	92.96%
P4	Pata	Onça-pintada	*Panthera onca*	96%	98.70%
P5	Pata	Onça-pintada	*Panthera onca*	100%	100%
P6	Pata	Onça-pintada	*Panthera onca*	97%	100%
P7	Pata	Onça-pintada	*Panthera onca*	96%	98.70%
P8	Pata	Onça-pintada	*Panthera onca*	97%	100%

P9	Pata	Onça-pintada	*Panthera onca*	86%	94.26%
P10	Pata	Onça-pintada	*Panthera onca*	100%	95%
P11	Pata	Onça-pintada	*Panthera onca*	97%	97.67%
P12	Pata	Onça-pintada	*Panthera onca*	100%	90.22%
P13	Pata	Onça-pintada	*Panthera onca*	97%	100%
P14	Pata	Onça-pintada	*Panthera onca*	96%	100%
P15	Pata	Onça-pintada	*Panthera onca*	100%	97.18%
P16	Pata	Onça-pintada	*Panthera onca*	100%	90%
P17	Pata	Onça-pintada	*Panthera onca*	81%	95.40%
P18	Pata	Não identificada	Não identificada	Não identificada	

Fonte: Autora (2025)

Discussão

A identificação molecular das amostras demonstra a aplicabilidade dos marcadores mitocondriais na identificação de felinos silvestres, especialmente em amostras de interesse forense, nas quais pode haver degradação do DNA. O COI foi inicialmente considerado por ser o código de barras padrão para identificação de espécies animais e por possuir uma extensa base de referências (Hebert *et al.,* 2003). Entretanto, seu fragmento de aproximadamente 650 pb pode apresentar limitações quando aplicado a amostras com DNA degradado (Hajibabaei *et al.,* 2006; Meusnier *et al.*, 2008).

Nesse contexto, o ATP6 mini *barcode* apresenta vantagens por utilizar um fragmento menor, sendo mais adequado para amostras de baixa qualidade, além de apresentar maior poder de resolução entre espécies próximas (Chaves *et al.*, 2011). Os resultados do teste preliminar reforçam essa aplicabilidade, uma vez que o ATP6 apresentou maior taxa de identificação correta em comparação ao COI. A única identificação divergente obtida com o ATP6 ocorreu entre espécies do mesmo gênero (*Panthera*), enquanto uma das falhas observadas para o COI resultou na identificação de uma amostra como *Otocolobus manul*, espécie endêmica da Ásia e pertencente a outra linhagem evolutiva.

A identificação equivocada pelo COI pode estar relacionada à menor especificidade do marcador para esse grupo ou à presença de registros incorretos nos bancos de dados de referência, problema já documentado na literatura (Pentinsaari *et al.*, 2020). A maior eficiência do ATP6 na identificação de carnívoros também é corroborada por estudos que relatam maior variação interespecífica e menor risco de coamplificação de DNA de presas, características particularmente relevantes para amostras forenses ou não invasivas (Chaves *et al.*, 2011). Adicionalmente, foi verificado que o sequenciamento unidirecional da fita de DNA (*forward*) era suficiente para obter identificações no BLAST, otimizando o processo e barateando o custo.

Conclusão

A análise molecular das amostras permitiu a identificação da maioria dos materiais biológicos provenientes de felinos silvestres apreendidos do tráfico ilegal, evidenciando a presença de *Panthera onca*, *Leopardus pardalis* e *Puma concolor*. Os resultados demonstram a aplicabilidade de ferramentas moleculares na identificação de fragmentos biológicos, especialmente em situações nas quais a análise morfológica é limitada. O marcador ATP6 mini *barcode* apresentou melhor desempenho no teste preliminar em comparação ao COI, mostrando-se uma alternativa eficiente para a identificação de amostras forenses de felinos silvestres. Dessa forma, a utilização de marcadores moleculares pode contribuir para a identificação de espécies envolvidas em crimes contra a fauna, fornecendo informações relevantes para investigações e auxiliando em ações de fiscalização e conservação. Além disso, a possibilidade de utilizar o sequenciamento unidirecional *forward* pode otimizar o protocolo e reduzir os custos das análises genéticas.

Referências

ALTSCHUL, S. F. *et al*. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Brasil lidera campanha internacional contra tráfico de animais silvestres.** Brasília, DF: MMA, 2006. Disponível em: https://www.gov.br/mma/pt-br/noticias/brasil-lidera-campanha-internacional-contra-trafico-de-animais-silvestre. Acesso em: 21 ago. 2026.

CHAVES, P. B.; GRAEFF, V. G.; LION, M. B.; OLIVEIRA, L. R.; EIZIRIK, E. DNA barcoding meets molecular scatology: short mtDNA sequences for standardized species assignment of carnivore noninvasive samples. **Molecular Ecology Resources,** v. 12, n. 1, p. 18-35, 2012.

GOUDA, Sushanto *et al.* Wildlife forensics: A boon for species identification and conservation implications. **Forensic Science International,** v. 317, p. 110530, dez. 2020.

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.

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

HEBERT, P. D. N. *et al*. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences,** v. 270, n. 1512, p. 313-321, 2003.

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.

LARSSON, A. AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. **Bioinformatics**, v. 30, n. 22, p. 3276-3278, 2014.

MEUSNIER, I. et al. A universal DNA mini-barcode for biodiversity analysis. **BMC Genomics,** v. 9, n. 1, p. 214, 2008.

MORCATTY, T. Q. *et al*. Illegal trade in wild cats and its link to Chinese-led development in Central and South America. **Conservation Biology,** v. 34, n. 6, p. 1525-1535, 2020.

OSAUA, M. **Tráfico de animais, um negócio milionário.** Rio de Janeiro: Tierramérica, Medio Ambiente y Desarrollo, 2001.

PENTINSAARI, M.; RATNASINGHAM, S.; MILLER, S. E.; HEBERT, P. D. N. BOLD and GenBank revisited: do identification errors arise in the lab or in the sequence libraries? **PLoS ONE**, v. 15, n. 4, e0231814, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231814. Acesso em: 21 ago. 2026.

ROCHA, F. M. **Tráfico de animais silvestres.** Brasília, DF: WWF, 1995.

SANCHES, A. *et al.* Illegal hunting cases detected with molecular forensics in Brazil. I**nvestigative Genetics,** v. 3, n. 1, p. 17, 2012.

SILVA JUNIOR, G. T. **Determinação do sexo em amostras forenses de felinos silvestres caçados e esquartejados. 2017.** Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências

Biológicas) – Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2017.

TAMURA, Koichiro; STECHER, Glen; KUMAR, Sudhir. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. **Molecular Biology And Evolution**, v. 38, n. 7, p. 3022–3027, 2021.