

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA**



Marcos Vinicius de Almeida Amorim

**Desenvolvimento de marcadores moleculares mitocondriais para a
identificação forense de psitacédeos alvos do comércio ilegal**

Belo Horizonte
2021

Marcos Vinicius de Almeida Amorim

**Desenvolvimento de marcadores moleculares mitocondriais para a
identificação forense de psitacédeos alvos do comércio ilegal**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador: Dr. Evanguedes Kalapothakis

Belo Horizonte
2021

043 Amorim, Marcos Vinicius de Almeida.
Desenvolvimento de marcadores moleculares mitocondriais para a
identificação forense de psitacídeos alvos do comércio ilegal [manuscrito] /
Marcos Vinicius de Almeida Amorim. - 2021.
58 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Dr. Evanguedes Kalapothakis.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Genética Forense. 2. Psittaciformes. 3. Amazona. 4. Reação em Cadeia da
Polimerase. 5. Marcadores Genéticos. I. Kalapothakis, Evanguedes. II.
Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III.
Título

CDU: 575



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
 Instituto de Ciências Biológicas
 Programa de Pós-Graduação em Genética

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO / TESE

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO

312/2021

entrada

2º/2019

Marcos Vinicius de Almeida Amorim

CPF: 09849995661

Às nove horas e trinta minutos do dia **30 de julho de 2021**, reuniu-se remotamente, devido ao isolamento social decorrente da pandemia de COVID-19, a Comissão Examinadora de Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: " **Desenvolvimento de marcadores moleculares mitocondriais para a identificação forense de psitacideos alvos do comércio ilegal** ", requisito para obtenção do grau de Mestre em **Genética**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Evanguedes Kalapothakis**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	CPF	Indicação
Evanguedes Kalapothakis	UFMG	494.307.426-04	Aprovado
Valéria Rosalina Dias e Santos	POLÍCIA CIVIL	942.735.706-10	Aprovado
Maria Raquel Santos Carvalho	UFMG	349.651.730-15	Aprovado

Pelas indicações, a candidata foi considerada: **APROVADO**

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 30 de julho de 2021.

Evanguedes Kalapothakis (UFMG)

Valéria Rosalina Dias e Santos (POLÍCIA CIVIL)

Maria Raquel Santos Carvalho (UFMG)

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Valeria Rosalina Dias e Santos, Usuário Externo**, em 30/07/2021, às 11:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Raquel Santos Carvalho, Membro**, em 05/08/2021, às 12:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Evanguedes Kalapothakis, Presidente**, em 10/08/2021, às 13:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0862315** e o código CRC **3BA93C32**.

Referência: Processo nº 23072.238491/2021-54

SEI nº 0862315



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética

FOLHA DE APROVAÇÃO

"Desenvolvimento de marcadores moleculares mitocondriais para a identificação forense de psitacídeos alvos do comércio ilegal"

Marcos Vinicius de Almeida Amorim

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Evanguedes Kalapothakis
UFMG

Valéria Rosalina Dias e Santos
POLÍCIA CIVIL

Maria Raquel Santos Carvalho
UFMG

Belo Horizonte, 30 de julho de 2021.



Documento assinado eletronicamente por **Valeria Rosalina Dias e Santos, Usuário Externo**, em 30/07/2021, às 11:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Raquel Santos Carvalho, Membro**, em 05/08/2021, às 12:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Evanguedes Kalapothakis, Presidente**, em 10/08/2021, às 13:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0862345** e o código CRC **992BAD25**.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética, pela oportunidade.

Ao professor Evanguedes Kalapothakis, pela oportunidade, ensinamento e confiança.

A toda a equipe do Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares, pelo suporte durante esta jornada.

À agência de fomento, CAPES pelo apoio financeiro.

Aos doutores, Alessandra Matavel e Daniel Chaves pela orientação durante minha graduação e inspiração para ir ainda mais longe.

A todos os meus professores na Newton e PUC-MG, pelos ensinamentos.

À toda a equipe do Cetas de Belo Horizonte, especialmente ao Marco, pelo auxílio na coleta das amostras.

Ao professor Fabricio Santos e a Dra. Valéria pelos conselhos dados sobre o projeto no seminário

Aos todos os meus amigos, que me apoiaram durante esta jornada, em especial para os que mais me ajudaram nesses últimos dois anos: Grécia, Felipe Reis, Alison, Carol, Amanda, Yan, Kelton e Wallace.

À minha família, por me dar força e tranquilidade.

“We are like butterflies who flutter for a day and think it is forever.”

Carl Sagan, Cosmos.

Resumo

O comércio ilegal de animais movimenta bilhões de dólares por ano, retirando no Brasil cerca de 38 milhões de espécies anualmente. A perda de biodiversidade causada pelo tráfico causa sérios danos aos ecossistemas. A caça, para subsistência e o comércio, é a segunda maior ameaça para a fauna silvestre, perdendo apenas para a degradação e a fragmentação de *habitats*. No Brasil, as aves são o grupo que sofre maior a pressão do tráfico, chegando a 82% dos animais comercializados ilegalmente. As ordens mais traficadas de aves são a dos Passariformes e Psittaciformes. A demanda por psitacídeos vem do desejo de tê-lo como animal doméstico, devido a sua beleza e capacidade de imitar a fala humana. Devido a sua raridade e grande porte, o preço desses animais pode ser elevado, o que gera uma forte demanda do tráfico. A lei de crimes ambientais do Brasil (lei 9.605/98) caracterizou como crime o uso da fauna silvestre, assim como seu âmbito penal. No ato da apreensão nem sempre é possível a identificação por meio da morfologia do animal, principalmente dos psitacídeos, que muito frequentemente são coletados quando filhotes ou embriões (ovos). Por isso, o desenvolvimento de marcadores moleculares é essencial para auxiliar na identificação desses indivíduos. Neste trabalho foram desenhados e testados oito pares de *primer* para a identificação específica do Papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*). Esse é o psitacídeo mais traficado do Brasil e com crescente preocupação de conservação (classificação a lista vermelha: Quase Ameaçado). Sete pares de *primer* apresentaram especificidade dentro da família Psittacidae (gênero *Pionus* e *Amazona*), enquanto três pares de *primer* amplificaram apenas na espécie alvo. Análises *in silico* demonstraram uma possível amplificação de vários pares de *primer* em espécies do complexo *Amazona aestiva/Amazona ochrocephala*, cuja a única espécie ocorrente no Brasil é a *Amazona ochrocephala*. A tecnologia apresentada no trabalho tem potencial para uso na área forense, auxiliando na consolidação da prova pericial e na correta penalização do autor do dano ambiental.

PALAVRAS-CHAVE: *Amazona aestiva*, Genética forense, PCR, Marcadores Moleculares, Psitacídeos.

Abstract

The illegal wildlife trade moves billions of dollars per year, removing from Brazilian natural habitats about 38 million species annually. The loss of biodiversity caused by trafficking causes serious damage to ecosystems. The main threat to wildlife is habitat degradation and fragmentation, followed by hunting for subsistence and trade. In Brazil, birds are the group that suffer the greatest pressure from trafficking, reaching 82% of animals illegally traded. The most trafficked orders of birds are Passariformes and Psittaciformes. The demand for parrots comes from the desire to have it as a domestic animal, due to its beauty and ability to imitate human speech. Due to their rarity and large size, the price of these animals can be high, which generates a strong demand from the traffic. The Brazilian environmental crimes law (law 9,605/98) characterized the use of wild fauna as a crime. In the act of apprehension, it is not always possible to identify the species using animal's morphology, especially parrots, which are often collected when they are nestlings or (eggs). Therefore, the development of molecular markers is essential to help identify these individuals. In this work, eight sets of *primers* were designed and tested for the specific identification of the Blue-fronted Parrot (*Amazona aestiva*). This is the most trafficked parrot in Brazil and with growing conservation concern (red list classification: Almost Threatened). Seven sets showed specificity within the Psittacidae family (genus *Pionus* and *Amazona*), while three sets amplified only in the target species. *In silico* analyzes demonstrated a possible amplification of several pair of *primers* in species of the *Amazona aestiva/Amazona ochrocephala* complex, whose only species occurring in Brazil is *Amazona ochrocephala*. The technology presented in the work has potential for use in the forensic area, helping to consolidate the expert evidence and correctly penalize the author of the environmental damage.

KEYWORDS: *Amazona aestiva*, Forensic genetics, PCR, Molecular Markers, Parrots.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Alinhamento da sequência mitocondrial do gene ND3.....	10
Figura 2 – Papagaio-verdadeiro (<i>Amazona aestiva</i>)	13
Figura 3 – Aves recebidas do Cetas-BH.....	14
Figura 4 – Qualidade de extração de DNA de tecido muscular.....	16
Figura 5 – Qualidade da extração de DNA de sangue.....	16
Figura 6 – Géis de agarose da PCR Inicial.....	17
Figura 7 – Géis da padronização dos <i>primers</i> de <i>Amazona aestiva</i>	19
Figura 8 – Distribuição das espécies/subespécies do complexo <i>Amazona aestiva/Amazona ochrocephala</i> e da <i>Amazona barbadensis</i>	33
Figura 9 – Busca feita com o fragmento esperado do par de <i>primer</i> COI-267 de <i>Amazona aestiva</i> (KT361659.1).....	35
Figura 10 – Busca feita com o fragmento esperado do par de <i>primer</i> COI-267 de <i>Pionus maximiliani</i> (FJ028096).....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Influência do <i>mismatch</i> na inespecificidade da PCR.....	7
Tabela 2 – Caracterização das espécies de psitacídeos alvos do comércio ilegal.....	12
Tabela 3 – Sequências mitocondriais existentes de psitacídeos com alta pressão de tráfico....	13
Tabela 4 – Espécies coletadas para o banco de DNA.....	14
Tabela 5 – Protocolos de PCR.....	16
Tabela 6 – Reagentes utilizados na PCR.....	17
Tabela 7 – <i>Primers</i> padronizados e suas propriedades.....	17
Tabela 8 – Teste de especificidade dos <i>primers</i> de <i>Amazona aestiva</i>	20
Tabela 9 – Análises Moleculares de especificidade do par de <i>primer</i> ND1-185.....	23
Tabela 10 – Análises Moleculares de especificidade do par de <i>primer</i> COII-203.....	24
Tabela 11 – Análises Moleculares de especificidade do par de <i>primer</i> COIII-304.....	25
Tabela 12 – Análises Moleculares de especificidade do par de <i>primer</i> COI-267.....	26
Tabela 13 – Análises Moleculares de especificidade do par de <i>primer</i> 16S-371.....	27
Tabela 14 – Análises Moleculares de especificidade do par de <i>primer</i> ND3-288.....	28
Tabela 15 – Análises Moleculares de especificidade do par de <i>primer</i> ND6-344.....	29
Tabela 16 – Análises Moleculares de especificidade do par de <i>primer</i> CR-281.....	30
Tabela 17 – Médias de <i>mismatches</i> nos diferentes graus de especificidade.....	33
Tabela 18 – Estimativas de divergência evolutiva (%) entre a <i>Amazona aestiva</i> e outros psitacídeos.....	34

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A – Adenina

AMH – Análise molecular hipotética

Amp – Amplificação

AMV – Análise molecular *in vitro*

ARMS-PCR – *Amplification Refractory Mutation System-Polymerase Chain Reaction*

ATP6 – Sintase de trifosfato de adenosina 6

ATP8 – Sintase de trifosfato de adenosina 8

BLASTn – *Nucleotide Blast*

C – Citosina

CBRO – Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos

Cetas – Centros de triagem de Animais Silvestres

Cetas-BH – Centros de triagem de Animais Silvestres da cidade de Belo Horizonte

Cetas-Brasil – Centros de triagem de Animais Silvestres do Brasil

CITES – *Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora*

COI – Citocromo oxidase I

COII – Citocromo oxidase II

COIII – Citocromo oxidase III

CR – *Control region*/região controle

Ct – *Cycle threshold*

CYTB – Citocromo b

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

EED – Espécies exóticas domésticas

END – “Em perigo” /*Endangered* (categoria da lista vermelha IUCN)

ESTP – Espécies silvestres testadas em PCR

F – *Forward primer*

G – Guanina

GC% – Porcentagem de bases Guanina/Citosina

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais

IUCN – *International Union for Conservation of Nature*

LC – “Pouco preocupante” /*Least concern* (categoria da lista vermelha IUCN)

MG3 – Média global *mismatches* nas últimas cinco bases da extremidade 3’

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

MGT – Média global de *mismatches* em todo o *primer*

min – Minuto(s) (tempo)

MMA – Ministério do Meio Ambiente

mtDNA – DNA mitocondrial

ND1 – Subunidade 1 da desidrogenase Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

ND2 – Subunidade 2 da desidrogenase Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

ND3 – Subunidade 3 da desidrogenase Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

ND5 – Subunidade 5 da desidrogenase Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

ND6 – Subunidade 6 da desidrogenase Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

ng – Nanograma

nM – Nanomolar

nt – não testado

pb – pares de bases

PCR – *Polymerase Chain Reaction*/ Reação em cadeia da polimerase

PCR-RFLP – Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição

pd – Padrão molecular

pH – Potencial de hidrogênio

pmol – Picomol

Prev – Previsão

R – *Reverse primer*

Renctas – Rede Nacional de Combate ao Tráfico de Animais Silvestres

rRNA – Ácido ribonucleico ribossômico

sec – Segundo(s) (tempo)

T – Timina

TAE – Tris (hidroximetil) aminometano, ácido acético-Ácido etilenodiamino tetra-acético

Tris - Tris (hidroximetil) aminometano

Tris-EDTA – Tris (hidroximetil) aminometano - Ácido etilenodiamino tetra-acético

tRNA – Ácido ribonucleico ribossômico transportador

\bar{x} – Média

U – Unidades enzimáticas taq polimerase

μl – Microlitro

VU – Vulnerável (categoria do livro vermelho do MMA)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Tráfico de animais silvestres.....	1
1.2 Psitacídeos e o cenário atual de conservação.....	3
1.3 Marcadores moleculares.....	4
1.4 <i>Primers</i> espécie-específicos.....	5
2. OBJETIVOS.....	8
2.1- Objetivo geral.....	8
2.2- Objetivos específicos.....	8
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	8
3.1 Caracterização da pressão do tráfico e sequências mitocondriais.....	8
3.2 Amostras e extração de DNA.....	9
3.3 Desenho dos <i>primers</i>	9
3.4 Padronização da PCR e teste de especificidade.....	10
3.5 Análises moleculares de especificidade.....	10
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	11
4.1 Pressão do tráfico de psitacídeos e sequências mitocondriais existentes.....	11
4.2 Banco de DNA de aves.....	14
4.3 Padronização da PCR.....	15
4.4 Teste de especificidade intraespecífica e interespecífica.....	19
4.5 Análises moleculares de especificidade dos <i>primers</i>	20
4.6 Identificação usando as sequências esperadas.....	35
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	37
6. REFERÊNCIAS.....	38
7. ANEXOS.....	43

1 1. INTRODUÇÃO

2 1.1. Tráfico de animais silvestres

3

4 O Brasil é o país com maior biodiversidade do mundo, possuindo mais de 20% das
5 espécies da Terra. A conservação da biodiversidade é essencial para a manutenção das funções
6 ecológicas desempenhadas no ecossistema, a deficiência dessas funções providas pelo
7 desequilíbrio ecológico causa escassez na disponibilidade de recursos naturais, tais como a
8 água, o alimento e os medicamentos (Brasil 2020). Dentre as principais causas da perda de
9 biodiversidade estão a degradação e a fragmentação de ambientes naturais, a introdução de
10 espécies exóticas, a caça e o comércio ilegal (Tabarelli *et al.* 2005, Destro *et al.* 2012, Brasil
11 2020).

12 O comércio ilegal de animais silvestres movimentava cerca de vinte bilhões de dólares por
13 ano no mundo, perdendo nesse quesito de ilegalidade apenas para o tráfico de drogas (Brasil
14 1998). Esse valor é subestimado, visto que a metodologia de vigilância do comércio ilegal de
15 animais é bem precária em vista ao do tráfico de drogas. No Brasil computa-se que esse valor
16 seja de 1 bilhão de dólares por ano (Renctas 2002).

17 A legislação ambiental brasileira cita em seu artigo nº 225 o direito a um meio ambiente
18 ecologicamente equilibrado, prevendo penalização do gerador do dano ambiental nas esferas
19 administrativa, civil e criminal. A lei de Crimes Ambientais de 1998 (lei 9.605/98) foi outro
20 marco importante no âmbito legislativo para a conservação da biodiversidade, nela são
21 definidas as condutas prejudiciais ao meio ambiente e a penalização para as mesmas. O artigo
22 nº 29 dessa lei define como crime contra fauna: “matar, perseguir, caçar, apanhar, utilizar
23 espécimes da fauna silvestre, nativos ou em rota migratória, sem a devida permissão, licença
24 ou autorização da autoridade competente”. Doravante, a pena é detenção de seis meses a um
25 ano e multa caso a espécie possua algum grau de ameaça de extinção a pena é aumentada de
26 metade. A lei também prevê em seu artigo nº 19, a necessidade da prova pericial, sendo
27 necessário verificar por meio de exame pericial a apuração do possível dano ambiental (Brasil
28 1998). Além do mais, o Brasil é signatário da Convenção Internacional sobre o Comércio de
29 Espécies da Fauna e Flora Ameaçadas de Extinção (*Convention on International Trade in*
30 *Endangered Species of Wild Fauna and Flora* - CITES), instaurada no Brasil pelo Decreto Nº
31 3.607 (BRASIL 2000).

32 Chagas *et al.* (2015b) em um estudo sobre a caça e a pesca ilegal no Brasil, observou
33 que entre as carcaças de animais abatidos, 63,7% eram mamíferos e 30,3% eram aves. Dessas
34 carcaças de aves, 98,3% não foram identificadas. Segundo a Rede Nacional de Combate ao
35 Tráfico de Animais Silvestres (Renctas), o grupo taxonômico mais traficado no Brasil são as
36 aves (82%), seguido pelos répteis (3%) e mamíferos (1%), dentre as famílias mais apreendidas
37 estava a Thraupidae (antiga Emberezidae) (40%), Columbidae (12%) e Psittacidae (4%)
38 (Renctas 2002). Em um levantamento no Estado de Goiás entre 1997-2005 foi verificado que
39 94% das aves apreendidas era das ordens Passariformes e Psittaciformes (Bastos *et al.* 2008).
40 O estudo de Destro *et al.* (2012), revelou que 44 mil aves são recebidas por ano em Centros de
41 triagem de Animais Silvestres (Cetas) do Brasil. Outro trabalho com vários Cetas durante os
42 anos de 2008 a 2010, mostrou que 67,7% (158.820 indivíduos) dos animais recebidos foram
43 provenientes de ação fiscalizatória realizadas pela polícia militar e também da polícia do meio
44 ambiente que expuseram uma intensa pressão do tráfico de animais silvestres no Brasil. Esse
45 estudo também revelou que 86% do total da fauna recebida por essas entidades eram aves,
46 incluindo 28 ordens, 70 famílias e 574 espécies, as ordens mais recebidas foram a dos
47 Passariformes (80,4%) e Psittaciformes (10%) (Vilela 2012).

48 A América do Sul é o continente com maior biodiversidade de aves, sendo algumas
49 residentes e outras visitantes, ultrapassando a quantidade de 2.900 espécies (Sick 1997). O
50 Brasil possui aproximadamente 1.901 espécies aves, mais de 60% das espécies do continente,
51 sendo 10% dessas endêmicas (Marini & Garcia 2005, CBRO 2014). De acordo com a lista
52 vermelha do Ministério do Meio Ambiente (MMA) de 2018 (ICMBIO 2018), existem 236
53 espécies de aves ameaçadas de extinção no Brasil. Essa lista vem aumentando ao longo dos
54 anos, evidenciando que as políticas adotadas para a conservação têm sido pouco eficientes. As
55 principais causas que ameaçam as aves são o desmatamento, a fragmentação de habitat, bem
56 como as queimadas e a captura de animais da natureza.

57 Apesar dos esforços legislativos, um dos fatores que influencia o tráfico de animais
58 silvestres é a impunidade e o alto retorno financeiro é acompanhado pelas baixas chances de
59 apreensão. Quando o crime ambiental é detectado, as penalidades são geralmente leves e
60 raramente a pena é proporcional ao possível ganho financeiro do tráfico (Yi-Ming 2000).
61 Portanto, a aplicação da ação corretiva na esfera criminal necessita de uma forte evidência
62 culpável, especialmente quando a identificação da espécie não é possível mediante a
63 características morfológicas.

64 1.2. Psitacídeos e o cenário atual de conservação

65 Os psitacídeos são formados pelas espécies da família Psittacidae, sendo constituído
66 pelas araras, papagaios, periquitos, jandaias, maracanãs, tuins, agapornis, etc. As espécies desse
67 grupo têm como características morfológicas: a cabeça larga e robusta, bico forte, alto e curvo
68 (especializado em quebrar e descascar sementes) e musculatura da mandíbula e da língua muito
69 desenvolvidas (Guedes 2015).

70 Os psitacídeos desempenham um importante papel na integridade e resiliência do
71 ecossistema por meio das suas interações ecológicas com as plantas que consomem, tal
72 mutualismo entre os psitacídeos e a plantas, pode contribuir para a memória e recuperação do
73 ecossistema, inclusive em casos onde o ambiente sofreu degradação (Blanco *et al.* 2015).

74 A família Psittacidae possui 88 gêneros e cerca de 395 espécies. O Brasil é país com
75 maior diversidade desse grupo, possuindo cerca de 88 espécies distribuídas em 25 gêneros
76 (IUCN 2021, Birdlife International 2021). Dezesete espécies brasileiras estão classificadas na
77 lista vermelha de ameaça de extinção acima da categoria “*Near Threatenet/Quase Ameaçado*”
78 (NT) do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais (IBAMA) de 2014. Na
79 lista vermelha da União Internacional pela Conservação da Natureza (*International Union for*
80 *Conservation of Nature – IUCN*), 25 espécies têm grau de ameaça acima de NT e 14 possuem
81 o grau de ameaça NT.

82 Segundo a IUCN (2021), a principal ameaça a conservação dos psitacídeos é a caça
83 ilegal, tendo 147 espécies listadas como alvos intencionais do tráfico de animais no mundo. No
84 Brasil, cerca de 37,5% dos psitacídeos sofrem pressão da caça ilegal. Tal demanda está
85 relacionada ao desejo de ter um psitacídeo como animal de estimação, motivado pela vistosa
86 coloração e fácil adaptação desse grupo ao cativeiro, além disto, a habilidade de imitar a voz
87 humana tornaram essas aves populares entre os criadores (Schunck *et al.* 2011).

88 Na Austrália, um estudo de revisão sobre o comércio ilegal da fauna, relatou que em
89 20% dos casos de tráfico não foi possível a identificação da espécie, sendo grande parte de
90 casos relacionado ao comércio ilegal de ovos de aves (Alacs & Georges 2008). Pimentel &
91 Santos (2009) observaram que entre os anos 1996 e 2003 no Estado da Bahia, houve 468
92 espécimes não identificados, sendo que 83,9% dos animais desse estudo eram da classe Aves.
93 Nos dados de Vilela (2012), 290 espécimes encaminhados a diversos Cetas no Brasil foram
94 classificados apenas quanto a ordem Psitaciforme e 74 quanto ao gênero *Amazona*.

95 A maioria dos psitacídeos são retirados de seus habitats quando são embriões (ovos) ou
96 filhotes. Ademais, isto ocorre devido ao fácil manejo em cativeiro e facilidade de transporte. O
97 comércio local desses animais muitas vezes ultrapassa o salário mensal do coletor, o que torna
98 a ação do tráfico regular (Schunck *et al.* 2011). O fato de os indivíduos serem retirados antes
99 da fase adulta dificulta a identificação morfológica quanto a espécie, sendo necessário o uso de
100 técnicas moleculares para definir a espécie, e conseqüentemente, a ação corretiva ao
101 comerciante ilegal.

102 **1.3. Marcadores moleculares**

103 O uso de tecnologias moleculares possui grande relevância para a forense animal,
104 auxiliando na identificação de espécies, na definição da origem geográfica e na verificação do
105 sexo e paternidade. Os Marcadores moleculares presentes no ácido desoxirribonucleico (DNA)
106 são excelentes na identificação de espécies, uma vez que, os marcadores morfológicos estão
107 ausentes em certas amostras (ovos, filhotes, etc.). Além disto, o DNA é facilmente extraído de
108 amostras degradadas. O DNA mitocondrial (mtDNA) é mais utilizado na identificação de
109 espécies em comparação com o DNA nuclear, visto que a extração em amostras degradadas ou
110 escassas é mais acessível, isto é possível porque o mtDNA está presente em múltiplas cópias
111 por célula, diferentemente do DNA nuclear que possui uma cópia por célula (Alacs *et al.* 2010).
112 Ademais, o mtDNA não passa por recombinação genética e apresentam altas taxas de mutação,
113 tais características facilitam na diferenciação das espécies (Linacre & Tobe 2011).

114 Os grandes vertebrados possuem o genoma mitocondrial em forma circular, tendo
115 geralmente trinta genes relacionados a função de respiração celular da mitocôndria. Dentre
116 esses genes, vinte e dois produzem ácidos ribonucleicos transportadores (tRNA), dois
117 codificam ácidos ribonucleicos ribossômicos (rRNA) e treze codificam proteínas relacionadas
118 ao processo de fosforilação oxidativa. Além desses genes, a mitocôndria possui uma região
119 não-codificante conhecida como região controle ou *D-loop* (CR “*Control Region*”), região onde
120 está a origem de replicação da fita pesada (*H-strand*). A CR apresenta grande variação em sua
121 sequência de DNA em comparação a espécies próximas (Linacre & Tobe 2013).

122 Em 2003 um grupo de pesquisadores propuseram a criação de um código de barras
123 universal do DNA, denominado DNA Barcode (código de barras de DNA). O fragmento
124 selecionado possui 650 pares de bases (pb) e está presente no gene mitocondrial citocromo
125 oxidase I (COI) (Hebert *et al.* 2003). Segundo os pesquisadores, esse marcador molecular seria
126 o suficiente para identificar a maioria dos táxons. Para armazenar e analisar essas sequências,

127 foram criadas uma bancada de informática com um banco de dados e ferramentas de análise e
128 publicação. Esse sistema é denominado *DNA Barcode of Life Data System* (BOLD)
129 (Ratnasingham e Hebert *et al.* 2007).

130 Várias regiões do mtDNA já foram usados em estudos filogenéticos de aves, como os
131 genes do citocromo B (CYTB) (Lee *et al.* 2008, Boonseub *et al.* 2009), citocromo oxidase I
132 (COI) (Kerr *et al.* 2007, Chaves *et al.* 2008), 12S (Karabasanavar *et al.* 2010) e da subunidade
133 2 da desidrogenase nicotinamida adenina dinucleotídeo (ND2) (Queiroz-Filho 2008, Boonseub
134 *et al.* 2009). Outros estudos mesclam esses genes com outras regiões mitocondriais para
135 inferirem as relações filogenéticas dentre as regiões usadas estão a da CR, as sintases de
136 trifosfato de adenosina 6 (ATP6) e 8 (ATP8) e os genes ribossomais 12S e 16S. (Tavares 2005,
137 Oliveira-Marques 2006).

138 Várias abordagens em diversos genes mitocondriais (12S, 16S, COI e CYTB) foram
139 usadas na identificação de aves, utilizando amostras do corpo (Sanches *et al.* 2012) e ovos
140 apreendidos no Brasil (De carvalho 2012, Gonçalves *et al.* 2015, Formentão 2019) e na
141 Austrália (Coghlan 2012). A estratégia usada nesses trabalhos é a aplicação da reação em cadeia
142 da polimerase (PCR) por meio de *primers* (ou iniciadores) universais, seguida por
143 sequenciamento do fragmento e comparação com outras sequências em banco de dados.

144 A PCR associada com o “Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição”
145 (PCR-RFLP) também é usada como método de identificação. Essa técnica consiste na
146 amplificação de um fragmento comum seguida pela digestão por uma ou mais enzimas de
147 restrição espécie-específica (Branciani 2000).

148 Outra abordagem usada na identificação de espécie é a PCR usando *primers* espécie-
149 específicos, pois essa técnica proporciona uma série de vantagens como redução do tempo e
150 custo (devido à ausência da etapa de sequenciamento). Outrossim, várias espécies podem ser
151 identificadas ao mesmo tempo, por meio de uma PCR multiplex. Em virtude disto, amostras
152 mistas (com DNA de várias espécies) podem ser identificadas e amostras degradadas são mais
153 viáveis (Linacre 2013).

154 **1.4. *Primers* espécie-específicos**

155 A identificação de espécies por meio da PCR com *primers* espécie-específicos é um
156 excelente método para teste de “rotina”, pois é de fácil execução, rápido, evita-se o tempo e
157 custo do sequenciamento e pode discriminar várias espécies em uma reação de PCR multiplex

158 (Linacre e Tobe 2013). Além do mais, é possível discriminar o DNA da espécie alvo em uma
159 amostra com DNA de outras espécies, por exemplo, em um criadouro ilegal onde os indivíduos
160 já foram retirados, sobrando apenas vestígios.

161 Vários fatores podem influenciar na padronização da PCR, como pequenas alterações
162 físico-químicas, alteração da temperatura de anelamento ou aumento na concentração de cloreto
163 de magnésio ($MgCl_2$) pode resultar em ausência de amplificação ou em amplificação
164 inespecífica. Além desses fatores relacionados aos reagentes e termociclador, o desenho dos
165 *primers* é outro fator essencial para obter o fragmento alvo, tal desenho pode também delimitar
166 a especificidade de anelamento e da extensão da PCR no DNA molde. A estratégia usada na
167 identificação por *primers* espécie-específicos, é estabelecer uma compatibilidade do par de
168 *primer* com o DNA molde da espécie alvo, enquanto nas espécies não-alvo é necessário
169 estabelecer uma incompatibilidade. Essa incompatibilidade é alcançada com erros de
170 anelamento entre o nucleotídeo do *primer* e o nucleotídeo do DNA molde. O erro é comumente
171 chamado na literatura de *mismatch* (tradução direta “incompatibilidade”; plural *mismatches*).

172 Alguns trabalhos para detectar polimorfismos relacionados a doenças pelo método de
173 Mutação Refratária de Amplifica o-Rea o em Cadeia da Polimerase (ARMS-PCR -
174 *Amplification Refractory Mutation System-Polymerase Chain Reaction*), padronizaram *primers*
175 com apenas um *mismatch* na última base nucleotídica da extremidade 3', sendo que,
176 *mismatches* adicionais próximas a extremidade 3' aumentaram a especificidade da rea o
177 (Newton *et al.* 1989). Em um estudo semelhante foi observado que *mismatches* no penúltimo
178 nucleotídeo do *primer* também apresentava especificidade, além disso, *mismatches* na terceira
179 e quarta base nucleotídica da extremidade 3' apresentava especificidade em certas
180 concentra es de $MgCl_2$ (Sarkar *et al.* 1990). Outros estudos sobre o efeito de *mismatches* na
181 eficiência da PCR, mostraram que as bases adenina (A), citosina (C) e guanina (G) na
182 extremidade 3' do *primer* combinadas com qualquer *mismatch* adicional nas três bases seguintes
183 da extremidade 3' diminuem o produto da PCR (Kwok *et al.* 1990). Em um trabalho sobre
184 efeitos na varia o das bases do *primer* na PCR quantitativa, a média do valor de C_t (*cycle*
185 *threshold*) foi maior em *primers* com dois ou três *mismatches* nas últimas quatro bases. Por
186 conseguinte, o C_t também o aumentou com dois *mismatches* (fora das últimas cinco bases) no
187 restante do *primer*, esse aumento foi ainda maior quando adicionado mais *mismatches* no par
188 de *primer* (Whiley & Sloots 2005). Essa característica de composi o nucleotídica na
189 extremidade 3' do *primer* e a especificidade da amplifica o, foram importantes em estudos
190 posteriores de *primers* espécie-específicos. O *mismatch* mais estudado na literatura   o da

191 última base do *primer*, a Tabela 1 mostra um resumo da influência desse na inespecificidade da
 192 PCR.

193 **Tabela 1 – Influência do *mismatch* na inespecificidade da PCR**

		Última base 3' do <i>primer</i>			
		A	C	G	T
Última base 3' do DNA molde	A	Forte ¹²³⁴	Fraca ¹²³	Forte ¹²	—
	C	Forte ⁴	Forte ¹²	—	Razoável ²
	G	Forte ¹²	—	Fraca ¹	Fraca ¹²³
	T	—	Razoável ²	Forte ⁴	Razoável ²³⁴

194 ¹ Kwok *et al.* 1990; ² Stadhouders *et al.* 2010; ³ Newton *et al.* 1989; ⁴ Sarkar *et al.* 1990.
 195 T (timina)
 196

197 Esse método de identificação tem sido usado para averiguar alimentos de origem animal
 198 como queijo, carnes (ruminantes, peixes, aves e suína), leite, etc (Bottero *et al.* 2002, Dalmaso
 199 *et al.* 2004, Santos *et al.* 2012, Bottero & Dalmaso, 2011). No encaço de um trabalho forense
 200 com tigras em risco de extinção, *primers* espécie-específicos foram desenhados e obtiveram
 201 boa especificidade identificação das subespécies (Wan & Fang 2003). Palomares *et al.* (2002)
 202 ante à uma pesquisa para determinar a presença e distribuição de uma espécie de lince-ibérico
 203 em risco de extinção, desenhou *primers* espécie-específicos para as regiões mitocondriais CR
 204 e CYTB, o método foi testado em amostras escassas de DNA (fezes) que se mostraram eficazes.
 205 Uma abordagem semelhante foi feita com serpentes indianas em risco de extinção, utilizando
 206 um ensaio de PCR multiplex visando o gene 16S (Dubey 2009). Alguns trabalhos no Brasil têm
 207 desenvolvido *primers* para identificar espécies de interesse forense com foco em espécies
 208 peixes (Chagas 2015a) e tamanduás (Queiroz 2017).

209 O comércio ilegal da fauna silvestre é uma das principais causas da perda de
 210 biodiversidade nos ecossistemas brasileiros. O grupo taxonômico mais atingido no Brasil são
 211 as aves, correspondendo a mais de 80% da fauna traficada. As ordens mais atingidas são a dos
 212 Passariformes, Columbiformes e Psittaciformes. Dentre esses grupos os psitacídeos se
 213 destacam na demanda pelo tráfico, pois apresentam preço elevado no mercado em razão à sua
 214 raridade e dificuldade de transporte devido ao seu tamanho, por isso, eles frequentemente são
 215 capturados de forma precoce (ovos e filhotes). No âmbito da fiscalização, após uma apreensão
 216 os animais são identificados com base na sua morfologia, entretanto, nem sempre esse método
 217 é satisfatório, pois em muitos casos, a prova apreendida são filhotes, ovos, penas e partes do

218 corpo indistinguíveis olho nu quanto a espécie. Além do mais, há uma demanda nos laboratórios
219 forense por técnicas de baixo custo, rápidas e de fácil execução. Nesse aspecto, novas
220 estratégias de identificação usando métodos da biologia molecular podem ser de grande ajuda
221 na distinção das espécies e na conclusão do laudo pericial.

222 **2. OBJETIVOS**

223 **2.1. Objetivo Geral**

224 Este projeto tem como objetivo desenvolver marcadores moleculares genéticos para a
225 identificação de espécies de aves da família Psittacidae alvos do comércio ilegal no Brasil.

226 **2.2. Objetivos Específicos**

- 227 i. Caracterizar a pressão do comércio ilegal nas aves da família Psittacidae e definir
228 as espécies prioritárias para o desenvolvimento de marcadores moleculares.
- 229 ii. Fazer levantamento das sequências mitocondriais de psitacídeos mais traficados da
230 fauna silvestre brasileira
- 231 iii. Construir um banco de DNA de aves para uso na etapa de padronização dos
232 marcadores e em futuros projetos de biodiversidade e biotecnologia.
- 233 iv. Avaliar o método de identificação por PCR usando *primers* espécie-específicos.
- 234 v. Analisar a especificidade molecular dos *primers* desenhados

235 **3. MATERIAL E MÉTODOS**

236 **3.1. Caracterização da pressão do tráfico e sequências mitocondriais**

237 Para medir essa pressão, foram utilizados os dados da literatura sobre apreensões que
238 chegaram nos Cetas do Brasil entre 2008 a 2010 (Cetas-Brasil) (Vilela 2012), de recebimento
239 total de apreensões e entregas voluntárias pelo Cetat de Belo Horizonte entre 2008 a 2012
240 (Cetas-BH) (Freitas 2014). Foram verificadas a situação de conservação das espécies pela lista
241 do Ministério do Meio Ambiente (ICMBIO 2018) e através da lista vermelha da IUCN (2021).
242 O preço de venda dos animais no mercado legal foi pesquisado na *internet* em janeiro de 2020.
243 Com base na análise desses dados, o Papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*) foi selecionado
244 como espécie prioritária para o desenvolvimento dos marcadores.

245 O levantamento de dados genômicos mitocondriais existentes foi feito em buscas no
246 banco de dados das plataformas GenBank® e BOLD. Apenas as espécies no topo da lista de
247 pressão do tráfico foram buscadas.

248 **3.2. Amostras e extração de DNA**

249 As amostras usadas na extração de DNA, foram cedidas pelo Cetas-BH por meio da
250 carcaça do animal ou de sangue em EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético). Para a criação
251 do banco de DNA, várias espécies de aves foram coletadas apenas carcaças (dois por espécie)
252 quando disponível. Já nos psitacídeos, foram coletadas tanto carcaças quanto as amostras de
253 sangue dos indivíduos vivos mantidos em cativeiro. Ademais, foram extraídos parte do músculo
254 das carcaças, sendo este conservado em etanol 70%. O restante da carcaça e as amostras de
255 sangue em EDTA foram conservados em -20°C.

256 Para a extração de DNA do músculo foi utilizado aproximadamente 02 (dois) gramas
257 de tecido usando o método de proteinase K e fenolclorofórmio (adaptado de Sambrook *et al.*
258 1989). Na extração de DNA das amostras de sangue em EDTA foi utilizado o kit GTS
259 (Phoneutria). Após a coleta, foram realizadas extrações de DNA dos espécimes e as extrações
260 bem sucedidas, foram posteriormente fracionadas, precipitadas e armazenadas em -4°C.

261 **3.3. Desenho dos *primers***

262 Os *primers* foram desenhados manualmente por meio da análise do alinhamento das
263 sequências mitocondriais no *software* Mega X (Kumar *et al.* 2018). Foi feito um alinhamento
264 para cada sequência gênica e para a região controle, sendo que foram inseridas no alinhamento,
265 além da *Amazona aestiva*, quatro sequências completas de DNA mitocondrial de psitacídeos
266 (*Aratinga solstitialis*, *Primolius macarana*, *Psittacara leucophthalmus* e *Ara ararauna*).
267 Ainda foram adicionadas outras sequências de aves com alta similaridade com o seguimento
268 alvo, para encontra-las. Além disto, foi feito uma busca pelo programa *online Nucleotide Blast*
269 (BLASTn) (Altschul 1990).

270 Os desenhos dos *primers* seguiram os seguintes critérios, quando possível: tamanho
271 entre 15 a 26 bases nucleotídicas; alta divergência de bases com as demais sequências
272 (principalmente nas últimas cinco bases da extremidade 3'); porcentagem de bases guanina-
273 citosina (GC%) entre 40-60%; temperatura de *melting* entre 45 e 63 °C e repetições de base
274 única de abaixo de seis. Os três últimos citados foram avaliados pelo programa OligoCalc
275 (Kibbe 2007), que também avaliou o potencial de formação de *hairpin*, auto-

303 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

304 4.1. Pressão do tráfico de psitacídeos e sequências mitocondriais existentes

305 O delineamento das espécies de psitacídeos mais visadas pelo tráfico de animais,
306 segundo os dados de Vilela (2012) e Freitas (2014), listam treze espécies que variam no número
307 de apreensões anuais, entre 12 a 715 no Cetas-Brasil e de 6 e 394 no Cetas-BH (Tabela 2). O
308 Papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*), ficou em primeiro nas duas listas com apreensões
309 totais de 2145 (Cetas-Brasil) e 1969 (Cetas-BH) espécimes. Das espécies listadas, 53%
310 pertencem a três gêneros: *Amazona*, *Eupsittula* e *Pionus*. O Cetas-BH diferiu do Cetas-Brasil
311 na classificação das demais espécies pela média anual, sendo a 2^a, 3^a e 4^a espécie mais
312 apreendida no Cetas-BH, a *Psittacara leucophthalmus*, *Eupsittula aurea* e a *Pionus*
313 *maximiliani*, respectivamente. Em dados mais recentes, as apreensões de psitacídeos no período
314 de 2015 a 2017 no Cetas-BH, a *Amazona aestiva* continua no topo da lista e houve aumento da
315 média anual de apreensões. As demais espécies mais apreendidas, respectivamente, foram a
316 *Psittacara leucophthalmus*, *Brotogeris chiriri*, *Eupsittula aurea*, *Amazona vinacea* e *Pionus*
317 *maximiliani* (Comunicação pessoal). Devido à forte pressão do tráfico, confirmada por esses
318 dados, e a crescente perda de habitat na espécie *Amazona aestiva*, a IUCN, atualizou a situação
319 de conservação em agosto de 2019 para “quase ameaçado (NT)”, e infere-se que a população
320 está sofrendo um declínio contínuo em uma taxa de 20-29% a cada três gerações (IUCN 2021).

321 Apenas quatro espécies tinham sequenciamento completo da mitocôndria (Tabela 3),
322 três espécies possuíam algum grau de ameaça de extinção pela lista do MMA (ICMBIO 2018)
323 ou pela IUCN (2021), a espécie *Amazona vinacea* tem o grau mais severo de ameaça, sendo
324 classificada como “Vulnerável (VU)” pelo MMA e “Em perigo (END)” pela IUCN. A média
325 do preço dos animais legalizados via *internet* foi de R\$ 2.689, sendo a espécie de menor valor
326 o Tuim (*Forpus xanthopterygius*) vendido em média por R\$ 400, e a de maior valor, a Arara-
327 vermelha-grande vendida em média por R\$ 6.200. Apesar do preço estipulado, a maioria dos
328 animais estavam em falta para a venda, assim o valor nesse período pode ser maior do que o
329 consultado.

330 **Tabela 2 – Caracterização das espécies de psitacídeos alvos do comércio ilegal**

Espécie	IUCN (2020)	MMA (2014)	Média de Preços ¹	Faixa (R\$) ²	Mitocôndria sequenciada	Apreensões CETAS-Brasil (2008-2010) Vilela	Média Anual	Recebimento CETAS-BH (2008-2012) Freitas	Média Anual
<i>Amazona aestiva</i>	NT	LC	3600,00	3.500 - 4.500	sim	2145	715	1969	394
<i>Eupsittula cactorum</i>	LC	LC	700,00	600 - 800	não	985	328	55	11
<i>Psittacara leucophthalmus</i>	LC	LC	1683,00	1.100 - 2.750	sim	800	267	1166	233
<i>Forpus xanthopterygius</i>	LC	LC	400,00	-	não	526	175	232	46
<i>Eupsittula aurea</i>	LC	LC	762,00	450 - 1.200	não	515	172	342	68
<i>Amazona amazonica</i>	LC	LC	3300,00	2.300 - 4.500	não	474	158	154	31
<i>Brotogeris chiriri</i>	LC	LC	1200,00	800 - 1.200	não	316	105	152	30
<i>Ara ararauna</i>	LC	LC	5450,00	3.800 - 6.500	sim	297	99	185	37
<i>Pionus maximiliani</i>	LC	LC	1500,00	500 - 1.600	não	211	70	265	53
<i>Amazona vinacea</i>	END	VU	3877,00	3.300 - 4.210	não	90	30	96	19
<i>Primolius maracana</i>	NT	LC	2633,00	2.200 - 3.200	sim	61	20	75	15
<i>Ara chloropterus</i>	LC	LC	6200,00	5300 - 7500	sim	49	16	30	6
<i>Alipiopsitta xanthops</i>	NT	LC	2850,00	2.700 - 3000	não	37	12	32	6

331 Classificação do estado de conservação: LC (Pouco preocupante), END (Em perigo), NT (quase ameaçada), VU
332 (vulnerável). ¹A média foi estipulada por meio de consulta a *sites* legalizados em dezembro de 2019. ² Faixa de
333 preço consultada em dezembro de 2019, a espécie *Forpus xanthopterygius* foi encontrado apenas um valor.
334

335 As sequências encontradas no *Genbank* estão representadas na Tabela 3, foram
336 encontradas apenas cinco mitocôndrias completas na busca por sequências existentes. As
337 demais regiões mais sequenciadas foram a 12S, 16S, COI, CYTB e ND2, porém, várias dessas
338 sequências foram apenas parcialmente. Apesar das várias sequências encontradas, no geral, a
339 informação do genoma mitocondrial dos psitacídeos mais traficados do Brasil se encontra
340 escassa, com várias lacunas e sequências parcialmente sequenciadas. A ausência dessa
341 informação impõe uma limitação na especificidade dos *primers* desenhados, aonde as
342 sequências ausentes não entram no alinhamento do desenho dos *primers*, além disso, a criação
343 de novos marcadores é dificultada já que é necessário fazer o sequenciamento.

344 Com base na análise da pressão do tráfico e disponibilidade das sequências
345 mitocondriais, os *primers* espécie-específicos foram desenhados visando a espécie *Amazona*
346 *aestiva*. Durante a busca por sequências similares no BLASTn para inserção no alinhamento,
347 foram encontradas algumas espécies de psitacídeos com mtDNA bem similar a *Amazona*
348 *aestiva*. As mais similares eram as espécies *Amazona ochrocephala* e *Amazona barbadensis*
349 (ambas com o genoma mitocondrial completo), essa última não nativa da fauna brasileira. Já o
350 Papagaio-campeiro (*Amazona ochrocephala*) é uma espécie nativa presente mais ao norte do
351 Brasil, além disso, essa espécie também é protegida pela lei contra crimes ambientais, não
352 prejudicando o objetivo de identificação forense deste trabalho.

353 **Tabela 3 – Sequências mitocondriais existentes de psitacídeos com alta pressão de tráfico.**

Espécies	12S	16S	tRNA Met	ND2	COI	COII	tRNA Lys	ATP8	ATP6	COIII	tRNA Gly	ND3	tRNA Arg	CYTB	tRNA Thr	tRNA Pro	ND6	tRNA Glu	CR
<i>Amazona aestiva</i> ¹	[Barra preta contínua]																		
<i>Eupsittula cactorum</i>	[Barra cinza]	[Barra cinza]	[Barra amarela]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]
<i>Psittacara leucophthalmus</i> ¹	[Barra preta contínua]																		
<i>Forpus xanthopterygius</i>	[Barra cinza]	[Barra cinza]	[Barra amarela]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]
<i>Eupsittula aurea</i>	[Barra cinza]	[Barra cinza]	[Barra amarela]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]
<i>Amazona amazonica</i>	[Barra cinza]	[Barra cinza]	[Barra amarela]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]
<i>Brotogeris chiriri</i>	[Barra cinza]	[Barra cinza]	[Barra amarela]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]
<i>Ara ararauna</i> ¹	[Barra preta contínua]																		
<i>Plonus maximiliani</i>	[Barra cinza]	[Barra cinza]	[Barra amarela]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]
<i>Amazona vinacea</i>	[Barra cinza]	[Barra cinza]	[Barra amarela]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]
<i>Primolius maracana</i> ¹	[Barra preta contínua]																		
<i>Ara chloropterus</i> ¹	[Barra preta contínua]																		
<i>Alipiopsitta xanthops</i>	[Barra cinza]	[Barra cinza]	[Barra amarela]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]	[Barra preta]

354
 355 ¹ Espécies com todo genoma mitocondrial sequenciado. CR: região controle. As barras pretas sem intervalos
 356 representam espécies com genoma completo da mitocôndria, as barras pretas contínuas representam regiões
 357 completamente sequenciadas, as barras em cinza representam regiões parcialmente sequenciadas e as regiões
 358 realçadas com a mesma cor são adjacentes no DNA mitocondrial.
 359

360

361

362

363

364

365

366

367

368

369



370 **Figura 2 – Papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*).** Animal oriundo de soltura pelo Cetas-BH. Autor
 371 da foto: Gerson Muzzi (via vidadecampobio).

372 **4.2. Banco de DNA de aves**

373 Durante um período de dois meses amostras de aves (carcaças, tecido ou sangue) foram
 374 recebidas do Cetas-BH com no máximo dois indivíduos por espécie, excluindo as espécies
 375 presentes em projetos do laboratório. Foram coletadas amostras de trinta e oito espécies (Tabela
 376 4) pertencentes a nove ordens de aves silvestres da fauna brasileira. As ordens mais presentes
 377 eram a dos Passariformes com dezesseis espécies, e em seguida, a dos Psitaciformes com nove
 378 espécies. Quatorze famílias estavam presentes, sendo que as mais abundantes eram a Psittacidae
 379 (nove espécies) e a Thraupidae (oito espécies). Um indivíduo prematuro de psitacídeo
 380 identificado pelo Cetas-BH como *Amazona sp.* também foi coletado.



381 **Figura 3 - Aves recebidas do Cetas-BH.** Foto tirada no laboratório de Marcadores Moleculares de
 382 UFMG de algumas das carcaças de aves cedidas pelo Cetas-BH (Autoria própria). A) Algumas das
 383 espécies identificadas; B) Filhote de psitacídeo indefinido (amostra 79), identificado como *Amazona sp.*

384 **Tabela 4 – Espécies coletadas para o banco de DNA**

Nome popular	Ordem	Família	Gênero	Espécie	Identificação das amostras
Gavião-de-cauda-branca	Accipitriformes	Accipitridae	<i>Geranoaetus</i>	<i>albicaudatus</i>	123
Bacurau	Caprimulgiformes	Caprimulgidae	<i>Nyctidromus</i>	<i>albicallis</i>	175
Siriema	Cariamiformes	Cariamidae	<i>Cariama</i>	<i>cristata</i>	169
Pombo-doméstico	Columbiforme	Columbidae	<i>Columba</i>	<i>livia</i>	179
Asa-branca	Columbiforme	Columbidae	<i>Patagioenas</i>	<i>picazura</i>	83
Carcará	Falconiforme	Falconidae	<i>Carcara</i>	<i>plancus</i>	127
Gavião-quiri-quiri	Falconiformes	Falconidae	<i>Falco</i>	<i>sparverius</i>	164
Azulão	Passeriforme	Fringilidae	<i>Cyanoloxia</i>	<i>Brissonii</i>	84
Pintassilgo	Passeriforme	Fringilidae	<i>Spinus</i>	<i>magellanica</i>	85
Andorinha	Passeriforme	Hirundinidae	<i>Pygochelidon</i>	<i>cyanoleuca</i>	174
Pássaro-preto	Passeriforme	Icteridae	<i>Gnorimopsar</i>	<i>chopi</i>	86

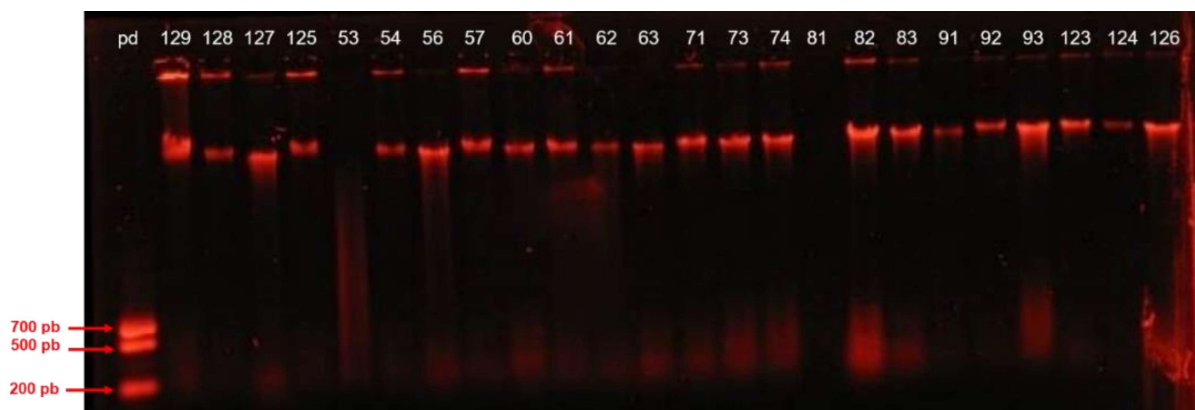
Japu	Passeriforme	Icteridae	<i>Psarocolius</i>	<i>decumanus</i>	129
Tiê-sangue	Passeriforme	Thraupidae	<i>Ramphocelus</i>	<i>bresilius</i>	168
Bico-de-pimenta	Passeriforme	Thraupidae	<i>Saltator</i>	<i>fuliginosis</i>	97
Bico-de-veludo	Passeriforme	Thraupidae	<i>Schistochlamys</i>	<i>ruficapillus</i>	68
Canário-da-terra	Passeriforme	Thraupidae	<i>Sicalis</i>	<i>flaveola</i>	134
Curió	Passeriforme	Thraupidae	<i>Sporophila</i>	<i>angolensis</i>	116,142 e 182
Patativa	Passeriforme	Thraupidae	<i>Sporophila</i>	<i>plumbea</i>	59
Bicudo	Passeriforme	Thraupidae	<i>Sporophila</i>	<i>maximiliani</i>	54-58
Coleirinho	Passeriforme	Thraupidae	<i>Sporophila</i>	<i>caerulescens</i>	265-269
Nei-nei	Passeriforme	Tyrannidae	<i>Megarynchus</i>	<i>pitangua</i>	165
Bem-te-vi	Passeriforme	Tyrannidae	<i>Pitangus</i>	<i>sulphuratus</i>	131
Suiriri	Passeriforme	Tyrannidae	<i>Tyrannus</i>	<i>melancholicus</i>	166
Tucano-toco	Piciforme	Ramphastidae	<i>Ramphastos</i>	<i>toco</i>	81 e 124
Papagaio-galego	Psittaciformes	Psittacidae	<i>Aliopsita</i>	<i>xanthops</i>	172
Papagaio-verdadeiro	Psittaciformes	Psittacidae	<i>Amazona</i>	<i>aestiva</i>	128, 200-204
Arara-canindé	Psittaciformes	Psittacidae	<i>Ara</i>	<i>ararauna</i>	170 e 199
Periquito-do-encontro-amarelo	Psittaciformes	Psittacidae	<i>Brotogeris</i>	<i>chiriri</i>	80,93,190 e 195
Periquito-rei	Psittaciformes	Psittacidae	<i>Eupsittula</i>	<i>aurea</i>	74,191 e 192
Maritaca	Psittaciformes	Psittacidae	<i>Psittacara</i>	<i>leucophthalmus</i>	75
Papagaio-de-Peito-roxo	Psittaciformes	Psittacidae	<i>Amazona</i>	<i>vinacea</i>	196 e 197
Papagaio-moleiro	Psittaciformes	Psittacidae	<i>Amazona</i>	<i>farinosa</i>	193 e 194
Maracanã	Psittaciformes	Psittacidae	<i>Primolius</i>	<i>maracana</i>	198
Maitaca-verde	Psittaciformes	Psittacidae	<i>Pionus</i>	<i>maximiliani</i>	99
Indefinido	Psittaciformes	Psittacidae	<i>Amazona</i>	<i>sp.</i>	79
Coruja-orelhuda	Strigiforme	Strigidae	<i>Asio</i>	<i>clamator</i>	64
Coruja-buraqueira	Strigiforme	Strigidae	<i>Athene</i>	<i>cunicularia</i>	125
Caburé	Strigiforme	Strigidae	<i>Glaucidium</i>	<i>brasilianum</i>	126
Curuja-do-mato	Strigiforme	Strigidae	<i>Megascops</i>	<i>choliba</i>	82
Suindara	Strigiforme	Tytonidae	<i>Tyto</i>	<i>furcata</i>	130

385 4.3. Padronização da PCR

386 A maioria das amostras de tecido muscular apresentaram boa qualidade de extração
387 (Figura 4), essas foram alicotadas e armazenadas para utilização no teste de especificidade e
388 futuros projetos do laboratório. Também foi extraído DNA de amostras de sangue, cuja
389 qualidade pode ser vista da Figura 5. Os trinta *primers* sintetizados foram testados em uma PCR
390 inicial (Tabela 5) com a amostra 204 de *Amazona aestiva*, vinte e um *primers* apresentaram o
391 fragmento esperado no gel de agarose (Figura 6). Os *primers* sem amplificação foram testados

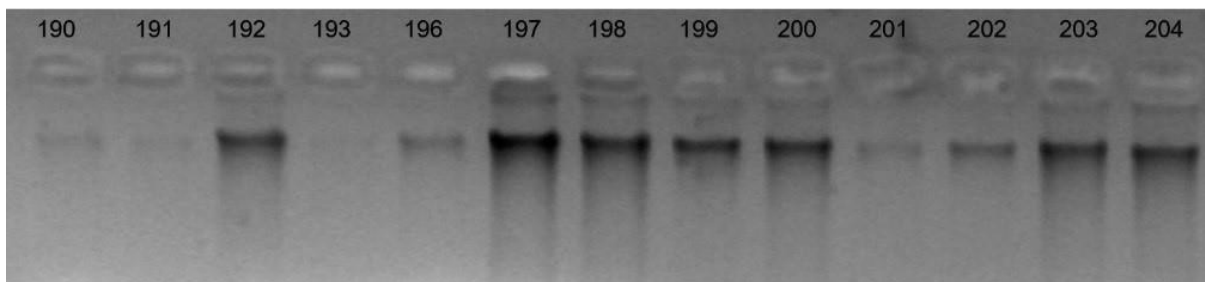
392 novamente usando gradiente de temperatura de anelamento (53, 56 e 59 °C), aumentando a
 393 quantidade de DNA (5ng para 10 ng) e aumentando o tempo de anelamento (30s para 60s).
 394 Dois pares apresentaram o fragmento desejado após as modificações, porém outros dez pares
 395 de *primers*, dos vinte e um que funcionaram inicialmente, apresentaram problemas de
 396 amplificação nos experimentos seguintes, mesmo com o mesmo protocolo inicial. Portanto,
 397 treze *primers* que estavam estáveis, após repetições e modificações da PCR (protocolo final
 398 Tabela 5), foram selecionados para o teste de especificidade. As características desses *primers*
 399 são mostradas na Tabela 7.

400



401 **Figura 4 - Qualidade extração de DNA de tecido muscular** A coluna “pd” corresponde ao padrão
 402 molecular (700, 500 e 200pb). Os números na coluna correspondem as amostras das espécies vistas na
 403 Tabela 4. A imagem mostra apenas uma parte das amostras extraídas

404



405 **Figura 5 - Qualidade da extração de DNA de sangue.** Extração feita com Kit GTS (Phoneutria). Os
 406 números na coluna correspondem as amostras das espécies vistas na Tabela 4.

407 Tabela 5 – Protocolos de PCR

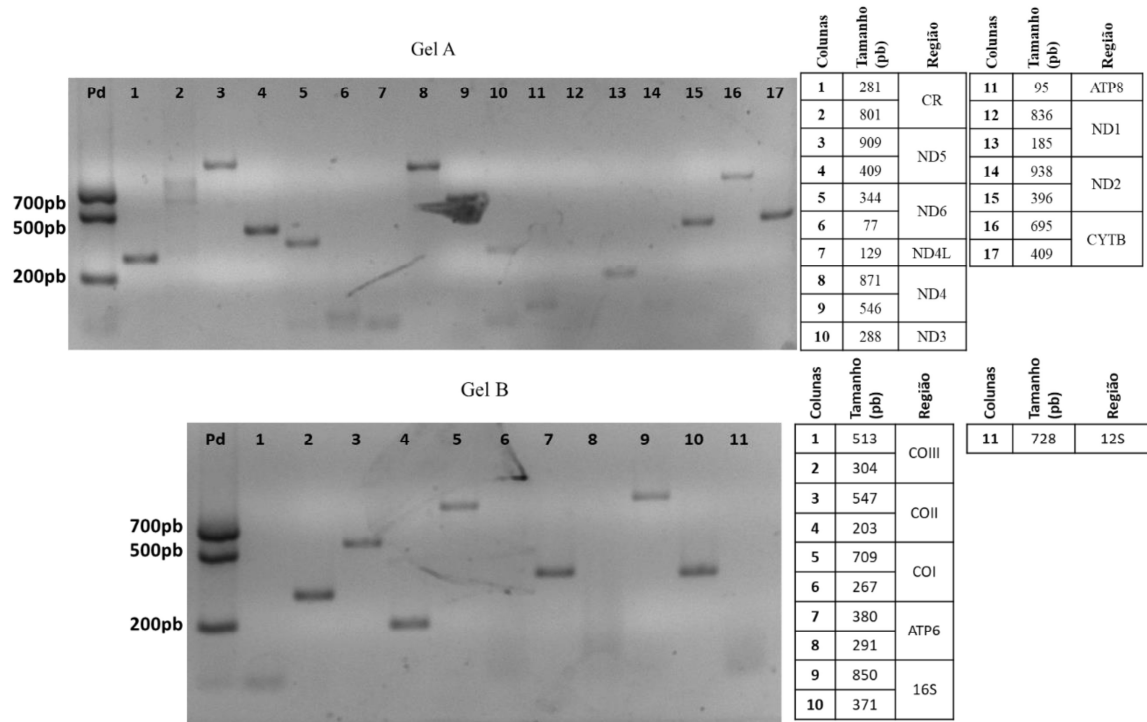
Configurações do termociclador – Protocolo inicial de PCR				Configurações do termociclador – Protocolo final de PCR			
Estágio	Temperatura (°C)	Tempo	Ciclo(s)	Estágio	Temperatura (°C)	Tempo	Ciclo(s)
Desnaturação inicial	94	3min	1	Desnaturação inicial	95	3min	1
Desnaturação	95	30s	35	Desnaturação	95	30s	35
Anelamento	50	30s		Anelamento	53	1min	
Extensão	72	1min		Extensão	72	1min	
Extensão final	72	5min	1	Extensão final	72	10min	1

408 Tabela 6 – Reagentes utilizados na PCR

Especificações da reação				
Reagentes	Volume(µl)	Quantidade	Taq pol. (U)	MgCl ₂ (nM)
Pré-Mix IVB	10	–	4,54	2-3.5
Primers	1	5pmol	–	–
água ultrapura	7	–	–	–
DNA	1	10ng	–	–

409

Taq pol. (U): quantidade da enzima taq polimerase em unidades enzimáticas.



410 **Figura 6 - Gel de agarose da PCR Inicial.** Protocolo inicial de PCR testado (Tabela 5), dois pares de
 411 primers não estão representados nos géis (fragmento CR-397 e 12S-560). A coluna “pd” corresponde
 412 ao padrão molecular (700, 500 e 200pb).

413

414

415 Tabela 7 - Primers padronizados e suas propriedades

Nome do par de primer	Tamanho do fragmento (pb)	Código	Sentido	Sequência	Tamanho (bases)	Temperatura de melting (°C)	GC %	Hairpin
ND1-185	185	41	F	GTTATTACAGCCCGTTGCC	19	51.1	53	não
		42	R	GGAGGAAGAGGAGACCCAGATTC	23	58.8	57	não
	203	57	F	GCCCGCCATCGTCCTTATTCTACTG	25	61.0	56	não

COII-203	58	R	GGAGTCGGAAGTACCCTGTTCG	21	58.3	62	não
		F	CCAATCATAATCGGAGGGTTC	21	52.4	48	não
COI-267	267	F	CCAATCATAATCGGAGGGTTC	21	52.4	48	não
		R	CCCTAGGATGGAGGATACACCAGCC	25	62.6	60	não
CR-281	281	F	GGCCTTTATGGATCATAGACTCC	23	55.3	48	não
		R	ATGGTTTCACGTGAGATGCTCGATC	25	57.7	48	não
ND3-288	288	F	CATTTACTTACCTCAACTCTAGC	25	54.4	40	não
		R	GGTTAGGAGGAGGACGATAGC	21	56.3	57	não
COIII-304	304	F	CCCTCGGACTAACATCAATTATC	23	53.2	43	não
		R	GTTACGGTAACGCCTGTGGCCAAT	24	59.1	54	sim
ND6-344	344	F	TGTCTTAGCGGCTTTATTAGTGGCG	25	57.7	48	não
		R	AACCGACCAAAAAACGCTCCCATGT	25	57.7	48	não
16S-371	371	F	ACCCACCAGGCTCACTACCCAAAA	24	59.1	54	não
		R	CTTTCGTAAGTGGGAAAGGCTAA	22	53.0	45	não
ATP6-380	380	F	TGAGCCATTATCCTGACATCCT	22	53.0	45	não
		R	GTGACGGTAAGGGCTGACACTGCA	24	60.8	58	não
ND5-409	409	F	CATTTTTCTACTTTTCGTCGGTTGG	25	54.4	40	não
		R	GGCGGTTTTGTTGCTGGCT	19	53.2	58	não
CYTB-409	409	F	GTCAAATAATCCTCTGGGCATCCCG	25	59.3	52	não
		R	GCTCCCCACTCAAGTTAAGATGAAC	25	57.7	48	não
COIII-513	513	F	CCTACTAACCACATCCGGACTG	22	56.7	55	não
		R	GAGCCATAAACGCTGTTCGGCA	21	56.3	57	não
COII-547	547	F	CCTTTACTTGCTAACACTCATGCTC	25	56.0	44	não
		R	AGTCTCGAAGTGGGTAAGGGGGACA	25	61.0	56	não

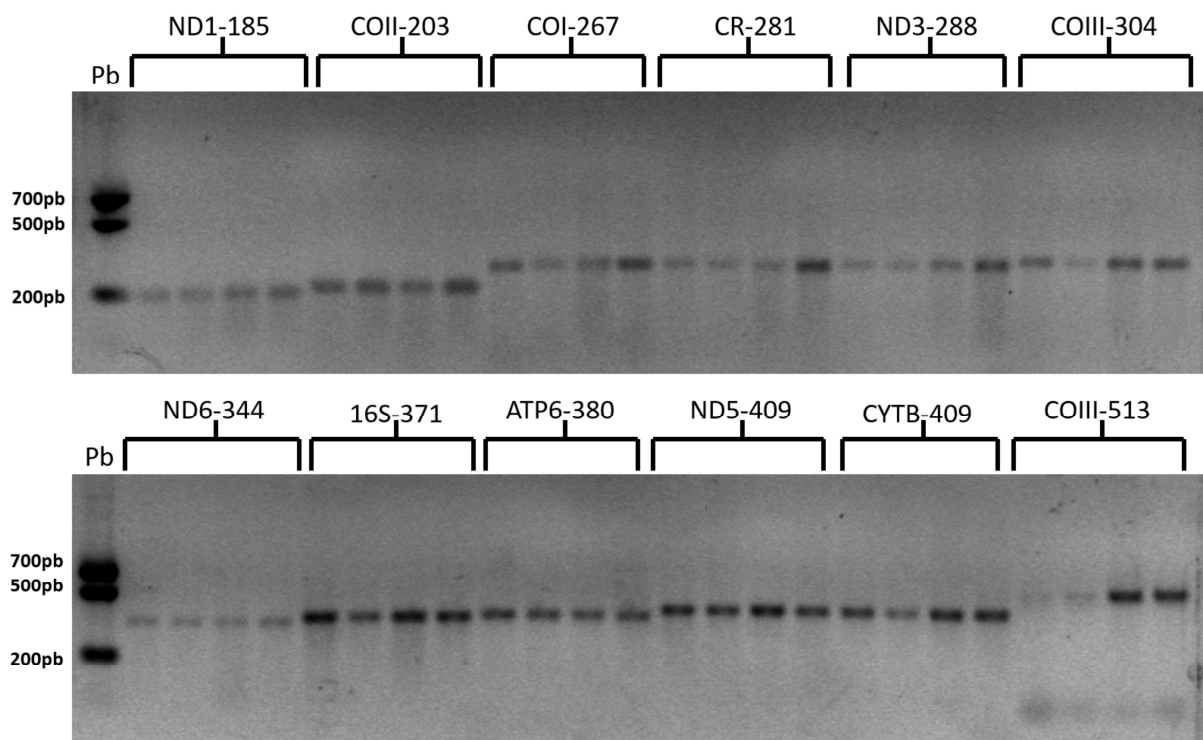
416 Legenda – GC (%): o percentual dos nucleotídeos Guanina e Citosina. *hairpin*: possível presente de formação de
417 *hairpin* no *primer*. Realçado em cinza *primers* sem teste de especificidade interespecífica. Sentido das sequências
418 são 5' para 3'. As propriedades dos *primers* foram calculadas pelo *software online* Oligocalc (Kibbe, 2007), nada
419 foi encontrado nesses *primers* na checagem de auto-complementaridade na extremidade 3' e potencial de auto-
420 anelamento por essa ferramenta.

421 4.4. Teste de Especificidade intraespecífica e interespecífica

422 Um ensaio inicial utilizando outras quatro amostras de indivíduos de *Amazona aestiva*
 423 foi feito para verificar a especificidade intraespecífica (amplificação entre os indivíduos da
 424 mesma espécie) dos *primers* na Tabela 7. Todas as amostras apresentaram o fragmento no
 425 tamanho esperado (Figura 7) assim como a amostra 204, usada na padronização da PCR de
 426 *Amazona aestiva* (Figura 6). Posteriormente, outra amostra de *Amazona aestiva* (amostra 128)
 427 foi usada como controle durante o teste de especificidade interespecífica (amplificação entre
 428 várias espécies), amplificando em todos os pares de *primer* testados.

429 O Teste de Especificidade interespecífica (Tabela 8) avaliou especificidade dos *primers*
 430 em trinta amostras: vinte e nove identificadas quanto a espécie e uma quanto ao gênero. Nove
 431 espécies entre estas amostras pertencem à família Psittacidae e estão distribuídas em sete
 432 gêneros (*Ara*, *Brotogeris*, *Eupsittula*, *Amazona*, *Pionus*, *Primolius* e *Psittacara*). Outras duas
 433 espécies pertencem ao gênero ao *Amazona* (*A. farinosa* e *A. vinacea*).

434



435 **Figura 7 - Géis da padronização dos *primers* de *Amazona aestiva*.** Pb: padrão molecular com 700,
 436 500 e 200 pares de bases. A Figura mostra o teste dos *primers* com quatro indivíduos da espécie
 437 *Amazona aestiva* (amostras 200 a 203)
 438

439 Foram testados oito pares de *primers* dos treze padronizados, o par de *primer* de cada
 440 PCR foi identificado com o código da sequência mitocondrial e o tamanho do fragmento, por

441 exemplo o fragmento gerado em PCR com tamanho de 267pb do gene de citocromo oxidase I,
 442 foi nomeado como COI-267. O fragmento ND1-185 foi o que apresentou maior número de
 443 ampliações inespecíficas, ocorrendo em sete outras espécies. Além disto, foi o único
 444 fragmento que amplificou em espécies fora da família Psittacidae. O fragmento COII-203
 445 amplificou inespecificamente em três espécies de psitacédeos, em duas do gênero *Amazona* (*A.*
 446 *farinosa* e *A. vinacea*) e uma espécie *Pionus maximiliani*. Outros três fragmentos amplificaram
 447 inespecificamente em apenas uma espécie de psitacédeo, a *Amazona farinosa* no 16S-371 e a
 448 *Pionus maximiliani* no COIII-304 e COI-267. Os demais fragmentos (CR-281, ND3-288 e
 449 ND6-344), amplificaram apenas na espécie alvo e na amostra indefinida de psitacédeo,
 450 identificada como *Amazona sp.*, e suspeita de ser *Amazona aestiva* (amostra 79).

451 **Tabela 8 – Teste de especificidade dos primers de *Amazona aestiva***

Amostras	Nome comum	Gênero	Espécie	16S-371	ND1-185	COII-203	COI-267	CR-281	ND3-288	COIII-304	ND6-344
58	Bicudo	<i>Sporophila</i>	<i>maximiliani</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
63	Caburé	<i>Glauclidium</i>	<i>brasilianum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
71	Coleirinho	<i>Sporophila</i>	<i>caerulescens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
73	Maritaca	<i>Psittacara</i>	<i>leucophthalmus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
74, 191, 192	Periquito-rei	<i>Eupsittula</i>	<i>aurea</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
79	Papagaio "indefinido"	<i>Amazona</i>	<i>sp.</i>	X	X	X	X	X	X	X	X
82	Curuja-do-mato	<i>Megascops</i>	<i>choliba</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
83	Asa-branca	<i>Patagioenas</i>	<i>picazura</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
85	Pintasilgo	<i>Spinus</i>	<i>magellanica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
87	Pássaro-preto	<i>Gnorimopsar</i>	<i>chopi</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
89	Sofrê	<i>Icterus</i>	<i>jamacaii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
92	Tico-tico	<i>Zonotrichia</i>	<i>capensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
93, 190, 195	Periquito-do-encontro-amarelo	<i>Brotogeris</i>	<i>chiriri</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
99	Maitaca-verde	<i>Pionus</i>	<i>maximiliani</i>	-	-	X	X	-	-	X	-
106	Maracanã-verdadeiro	<i>Primolius</i>	<i>maracana</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
123	Gavião-de-cauda-branca	<i>Geranoaetus</i>	<i>albicadatus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
124	Tucano-toco	<i>Ramphastos</i>	<i>toco</i>	-	X	-	-	-	-	-	-
125	Coruja-buraqueira	<i>Athene</i>	<i>cunicularia</i>	-	X	-	-	-	-	-	-
127	Carcará	<i>Carcara</i>	<i>plancus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
128	Papagaio-verdadeiro	<i>Amazona</i>	<i>aestiva</i>	X	X	X	X	X	X	nt	nt
129	Japu	<i>Psarocolius</i>	<i>decumanus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
130	Suindara	<i>Tyto</i>	<i>furcata</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
131	Bem-te-vi	<i>Pitangus</i>	<i>sulphuratus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
132	Coruja-orelhuda	<i>Asio</i>	<i>clamator</i>	-	X	-	nt	-	-	-	-
133	Bico-de-veludo	<i>Schistochlamys</i>	<i>ruficapillus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
134	Canário-da-terra	<i>Sicalis</i>	<i>flaveola</i>	-	X	-	-	-	-	-	-
168	Tié-sangue	<i>Ramphocelus</i>	<i>breilius</i>	-	X	-	-	-	-	-	-
169	Siriema	<i>Cariama</i>	<i>cristata</i>	-	X	-	-	-	-	-	-
170	Arara-canindé	<i>Ara</i>	<i>ararauna</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
204	Papagaio-verdadeiro	<i>Amazona</i>	<i>aestiva</i>	X	X	X	X	X	X	X	X
193, 194	Papagaio-moleiro	<i>Amazona</i>	<i>farinosa</i>	X	X	X	-	-	-	-	-
196, 197	Papagaio-de-Peito-roxo	<i>Amazona</i>	<i>vinacea</i>	-	-	X	-	-	-	-	-

452

453 nt: não testado; realçado em verde as amostras controles de *Amazona aestiva*; o “-“ indica onde não ocorreu
 454 amplificação; o “X” indica onde ocorreu amplificação; o “X” realçado em vermelho indica as ampliações não-
 455 específicas para a espécie alvo; realçado em azul, os resultados de uma amostra de filhote de espécie do gênero
 456 *Amazona* indistinguível quanto a espécie pelo método morfológico. As espécies com letra azul claro possuem
 457 mitocôndria completa já sequenciada.

458 4.5. Análises moleculares de especificidade dos *primers*

459 A especificidade de uma PCR decorre de vários fatores físicos e químicos, além disto,
460 fatores moleculares como a disposição das bases nucleotídicas no *primer* têm forte influência
461 na especificidade da reação, principalmente, nas últimas bases da extremidade 3' (Newton *et*
462 *al.* 1989, Sarkar *et al.* 1990, Kwok *et al.* 1990, Stadhouders *et al.* 2010). Como um dos objetivos
463 deste trabalho é a busca por essa especificidade, duas abordagens de análise foram feitas para
464 estudar melhor esses fatores, a AMV e a AMH.

465 O teste de especificidade relevou na prática os diferentes graus dos pares de *primer*
466 desenhados. Em um par de *primer* ocorreu muitas amplificações não desejadas em outras
467 espécies testadas (ND1-185), já os pares de *primer* COI-267, COII-203 e COIII-304
468 amplificaram em espécies do gênero *Amazona* e *Pionus*. Um par de *primer* (16S-371)
469 amplificou apenas em algumas espécies do gênero *Amazona* (a espécie alvo e a *A. farinosa*), e
470 os últimos três pares de *primer* (CR-281, ND3-288 e ND-344) amplificaram apenas na espécie
471 alvo, a *Amazona aestiva*. Para avaliar esses diferentes graus de especificidade de amplificação
472 foi feita uma análise na composição e distribuição dos *mismatches*, denominada neste trabalho
473 de análise molecular de especificidade. Inicialmente serão abordadas as análises das sequências
474 dos grupos de “espécies silvestres testadas em PCR” (ESTP) e de “espécies exóticas
475 domésticas” (EED) para cada grau de especificidade dos pares de *primer*, e por último, será
476 abordado sobre grupo de “espécies mais similares” a *Amazona aestiva*.

477 Os *mismatches* totais (MT) foram definidos como a soma dos *mismatches* entre as
478 sequências das espécies e os *primers* inteiros (F e R), já os *mismatches* totais da extremidade
479 3' (MT3), são a soma dos *mismatches* apenas para as últimas cinco bases nucleotídicas da
480 porção 3' do *primer*. Um *mismatch* é geralmente representado por uma base do *primer* e sua
481 respectiva base incompatível no DNA molde, por exemplo, uma guanina no *primer*
482 emparelhado com uma timina no DNA molde ficaria representado como “G/T”.

483 Para o par de *primer* ND1-185 (Tabela 9), os MT e MT3 nas ESTP variaram,
484 respectivamente, entre 10 a 16 e 4 a 5. Das sete espécies com amplificação inespecífica, a
485 Seriema (*Cariama cristata*), foi a única com sequência mitocondrial disponível para análise,
486 essa espécie apresentou valores consideráveis de incompatibilidade (MT/MT3:13/4). Valores
487 de *mismatches* similares foram encontrados na *Primolius maraca* (10/4) e *Ara ararauna* (12/4),
488 porém, essas não amplificaram. Ao comparar essas sequências, observa-se que a *C. cristata*

489 difere dessas espécies nos *mismatches* do *primer* 41F, principalmente nos presentes na porção
490 5'. Nas espécies exóticas domésticas (EED) os MT variaram entre 10 e 16 e os MT3 entre 2 e
491 4.

492 O par de *primer* COII-203 amplificou em todas as espécies do gênero *Amazona* (três espécies)
493 e *Pionus* (uma espécie) testadas, mas não amplificou nas demais espécies que incluíam outros
494 cinco gêneros da família Psittacidae. Os *mismatches* nos membros das ESTP (Tabela 10) foram
495 entre 9 a 18 (MT) e 3 a 6 (MT3). No *primer* 57F todas as espécies analisadas apresentaram
496 *mismatch* na última base e no *primer* 58R a maioria apresentou mais de 3 *mismatches* nas
497 últimas cinco bases, entretanto a exceção foi a *Cariama cristata* com 2 *mismatches*. No grupo
498 de EED a composição de *mismatches* foi semelhante, sendo os MT3 mais elevados no *primer*
499 58R (entre 2 a 4). Baseado na configuração de *mismatches* dos membros de ESTP que não
500 apresentaram amplificação, supõe-se que, dificilmente ocorrerá uma amplificação em alguma
501 espécie de EED. Dois pares de *primer* amplificaram, além da espécie alvo, apenas na espécie
502 do gênero *Pionus* (*P. maximiliani*). O par de *primer* COIII-304 (Tabela 11) apresentou
503 *mismatches* relativamente altos no grupo de ESTP (MT: 9 a 16 e MT3: 4 a 5), e nas EED, a
504 calopsita (*Nymphicus hollandicus*) apresentou poucos *mismatches* (MT/MT3: 5/1), sendo o
505 com maior poder de inibição da PCR o *mismatch* A/C na penúltima base do *primer* 54R. O
506 restante dos membros de EED apresentaram *mismatches* significantes nos MT3 (4 a 5) e nos
507 MT (11 a 18).

508 O COI-267 (Tabela 12) foi o par de *primer* que apresentou menor relação de *mismatches*
509 variando entre 4 e 8 (MT) e 2 e 4 (MT3) em ESTP e entre 2 e 4 (MT) e 0 e 4 (MT3) em EED.
510 A sequência de COI de *P. maximiliani* estava disponível para análise, e em comparação as
511 outras espécies que não amplificaram, revelou a ausência de um *mismatch* na 4ª base a partir
512 da extremidade 3' do *primer* 62R, essa ausência aparenta ter influenciado no aumento
513 especificidade do *primer*. Devido ao amplo uso do gene mitocondrial COI em estudos de DNA
514 Barcode, existe uma vasta quantidade de sequências disponíveis em bancos de dados (Genbank
515 e BOLD), esse fato facilitou a análise em ESTP. Ao analisar as espécies do gênero *Amazona*
516 (*A. vinacea* e *A. farinosa*) que não amplificaram para o COI-267, observa-se que o *mismatch*
517 A/C na 4ª base da extremidade 3' do *primer* 62R acentuou a inespecificidade do *primer*, além
518 disto, na espécie *Eupsittula aurea*, esse *mismatch* juntamente com outros dois no *primer* 61F
519 na 1ª (C/A) e 4ª (G/T) base da extremidade 3', foram suficientes para evitar a amplificação.
520 Apesar da restrita especificidade do par de *primer* COI-267 com a *A. aestiva* e *P. maximiliani*,

Tabela 10 - Análises Moleculares de especificidade do par de primer COII-203

Espécie (Código de acesso Genbank)	Nome comum	Espécies silvestres testadas em PCR (ESTP)															Total		Prev.																	
		Primer 57F COII-203							Primer 58R COII-203								MT	MT3																		
<i>Amazona aestiva</i> (KT361659.1)	Papagaio-verdadeiro	G	C	C	G	C	C	A	T	C	G	T	C	C	T	A	T	C	T	A	C	T	G	M	P	10	18	5	não							
<i>Sporophila maximiliani</i> (MF327582.1)	Bicudo	C	C	A	G	C	T	A	T	A	G	T	T	C	T	A	A	C	G	A	A	G	T	G	C	C	C	T	A	A	G	8	18	5	não	
<i>Psittacara leucophthalms</i> (KF444466.1)	Maritaca	A	C	C	A	G	C	A	T	C	G	T	C	C	T	C	A	T	C	A	T	C	C	T	A	A	G	T	A	A	G	6	11	6	não	
<i>Gnorimopsar chagpi</i> (JX516055.1)	Pássaro-preto	C	C	T	G	C	C	T	G	G	T	C	C	T	A	G	T	A	G	C	C	T	A	G	C	C	T	A	G	A	G	10	18	7	não	
<i>Carilama cristata</i> (CM020379.1)	Seriema	A	C	C	A	G	C	C	A	T	C	G	T	C	C	T	A	A	T	C	T	A	C	T	A	G	T	A	G	C	C	4	9	3	não	
<i>Primolius maracana</i> (NC_029322.1)	Maracanã-verdadeiro	A	C	C	A	G	C	C	A	T	C	G	T	C	C	T	C	A	T	C	A	T	C	A	T	A	G	T	A	G	C	5	12	5	não	
<i>Ara ararauna</i> (NC_029319.1)	Arara-canindé	A	C	C	A	G	C	C	A	T	C	G	T	C	C	T	C	A	T	C	T	A	C	T	A	G	T	A	G	C	C	6	11	4	não	
		Espécies exóticas domésticas (EED)																																		
<i>Amazona aestiva</i> (KT361659.1)	Papagaio-verdadeiro	G	C	C	G	C	C	A	T	C	G	T	C	C	T	A	T	C	T	A	T	C	T	A	C	T	G	M	P	10	18	5	não			
<i>Gallus gallus</i> (AP003580.1)	Galinha	A	C	C	G	C	T	A	T	G	T	C	C	T	A	G	T	A	G	T	A	G	T	A	G	T	A	G	T	A	G	8	15	5	não	
<i>Coturnix japonica</i> (KX712089.1)	Codorna	C	C	A	G	C	T	A	T	C	G	T	C	C	T	A	G	T	C	C	T	A	G	T	A	G	T	A	G	T	A	G	7	16	4	não
<i>Columba livia</i> (GU908131.1)	Pombo	A	C	C	A	G	C	T	A	T	G	T	C	C	T	C	A	T	C	A	T	C	C	T	A	G	T	A	G	T	A	G	7	12	3	não
<i>Nymphicus hollandicus</i> (MH133968.1)	Calopsita	C	C	A	G	C	C	A	T	T	G	T	C	C	T	A	T	C	T	A	C	T	C	T	A	G	T	A	G	T	A	G	6	12	5	não
<i>Anas platyrhynchos</i> (EU009397.1)	Pato-real	A	C	C	G	C	C	A	T	C	G	T	C	C	T	A	G	T	A	G	T	A	G	T	A	G	T	A	G	T	A	G	6	10	5	não
<i>Meleagris gallopavo</i> (JF275060.1)	Peru	C	C	A	G	C	T	A	T	T	G	T	C	C	T	A	G	T	C	T	A	C	T	A	C	T	T	8	17	4	não					
		Espécies mais similares																																		
<i>Amazona aestiva</i> (KT361659.1)	Papagaio-verdadeiro	G	C	C	G	C	C	A	T	C	G	T	C	C	T	A	T	C	T	A	T	C	T	A	C	T	G	M	P	10	18	5	não			
<i>Amazona ochrocephala</i> (KM611467.1)	Papagaio-campeliro	G	C	C	G	C	C	A	T	C	G	T	C	C	T	A	T	C	T	A	T	C	T	A	C	T	G	0	0	0	sim					
<i>Amazona barbadensis</i> (JX524615.1)	Papagaio-de-ombro-amarelo	G	C	C	G	C	C	A	T	C	G	T	C	C	T	C	A	T	C	C	T	A	G	T	A	G	T	A	G	T	A	G	2	3	1	sim
<i>Amazona gualdingi</i> (NC052783.1)	Papagaio-de-são-vicente	A	C	C	G	C	T	A	T	C	G	T	C	C	T	T	C	T	A	T	C	T	A	C	T	G	4	5	1	incerta						
<i>Amazona ventralis</i> (KX925977.1)	Papagaio-de-hispaniola	A	C	C	G	C	C	A	T	C	G	T	C	C	T	T	C	T	A	T	C	T	A	C	T	A	6	8	3	incerta						
<i>Pionus menstruus</i> (KX295978.1)	Maitaca-de-cabeça-azul	A	C	C	G	C	C	A	T	C	G	T	C	C	T	C	A	T	C	A	T	C	A	C	T	A	4	5	2	incerta						

Realção em azul o primer forward (F) e em verde o primer reverse (R), as cores escuras das últimas cinco bases nucleotídicas (todas as sequências em sentido 5’ para 3’). As bases realçadas em vermelho ilustram os mismatches (incompatibilidades) entre o primer e as sequências das espécies. Os mismatches no primer (MP) contabiliza as variações de um único primer (F ou R). Os mismatches totais (MT) é a soma dessas variações nos primers F e R do mesmo par de primer. O “MT3” representa a soma das mismatches nos últimos cinco nucleotídeos da extremidade 3’ dos primers. “Amp.” é o resultado da amplificação da amostra das espécies. “Prev.” é a previsão hipotética da amplificação do par de primer naquela espécie. As espécies com nome em vermelho são animais silvestres presentes em outros países da América do Sul.

Tabela 12 - Análises Moleculares de especificidade do par de primer COI-267

Espécie (Código de acesso)	Nome comum	Espécies silvestres testadas em PCR (ESTP)												Total	Amp.																
		Primer 61F COI-267						Primer 62R COI-267																							
		C	C	A	T	A	T	C	C	A	T	A	T																		
<i>Amazona aestiva</i> (KT361659.1)	Papagaio-verdadeiro	C	C	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	C	C	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	6	7	2	não
<i>Sporophila maximiliani</i> (MF327582.1)	Bicudo	C	C	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	C	C	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	7	8	2	não
<i>Gnorimopsar chopi</i> (JX516055.1)	Pássaro-preto	C	C	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	C	C	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	3	4	2	não
<i>Cariama cristata</i> (CM020379.1)	Seriema	C	C	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	C	C	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	3	4	2	não
<i>Psittacara leucophthalmus</i> (KF444466.1)	Maritaca	C	C	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	C	C	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	3	4	2	não
<i>Prioniturus maracana</i> (NC_029322.1)	Maracanã-verdadeiro	C	C	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	C	C	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	3	6	3	não
<i>Ara ararauna</i> (NC_029319.1)	Arara-canindé	C	C	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	C	C	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	3	5	9	4
<i>Pionus maximiliani</i> (FJ028095.1)	Maitaca-verde	C	C	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	C	C	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	3	7	2	sim
<i>Eupsittula aurea</i> (NPARR312-08) ¹	Periquito-rei	C	C	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	C	C	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	3	6	9	3
<i>Brotogeris chiriri</i> (KAARG356-07) ¹	Periquito-do-encontro-amarelo	C	C	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	C	C	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	5	4	9	4
<i>Amazona vinacea</i> (BOLD:AAE5572) ¹	Papagaio-de-Peito-ruxo	C	C	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	C	C	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	1	3	4	2
<i>Amazona farinosa</i> (USNMB116-10) ¹	Papagaio-moleiro	C	C	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	C	C	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	1	3	4	3
Espécies exóticas domésticas (EED)																															
Primer 61F COI-267																															
<i>Amazona aestiva</i> (KT361659.1)	Papagaio-verdadeiro	C	C	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	C	C	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	4	8	3	não
<i>Gallus gallus</i> (AP003580.1)	Galinha	C	C	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	C	C	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	3	7	3	não
<i>Coturnix japonica</i> (KX712089.1)	Codorna	C	C	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	C	C	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	4	5	9	3
<i>Columba livia</i> (GU908131.1)	Pombo	C	C	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	C	C	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	4	3	7	4
<i>Nymphicus hollandicus</i> (MH133968.1)	Calopsita	C	C	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	C	C	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	2	4	0	sim
<i>Anas platyrhynchos</i> (EU009397.1)	Pato-real	C	C	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	C	C	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	2	4	0	sim
Espécies mais similares																															
Primer 61F COI-267																															
<i>Amazona aestiva</i> (KT361659.1)	Papagaio-verdadeiro	C	C	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	C	C	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	0	0	0	sim
<i>Amazona ochrocephala</i> (KM611467.1)	Papagaio-campeiro	C	C	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	C	C	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	0	1	1	sim
<i>Amazona barbadensis</i> (X524615.1)	Papagaio-de-ombro-amarelo	C	C	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	C	C	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	1	2	3	2
<i>Amazona guildingii</i> (NC052783.1)	Papagaio-de-são-vicente	C	C	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	C	C	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	4	3	7	3
<i>Amazona ventralis</i> (KX925977.1)	Papagaio-de-hispaniola	C	C	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	C	C	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	1	4	5	1
<i>Pionus menstruus</i> (KX925978.1)	Maitaca-de-cabeça-azul	C	C	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	C	C	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	1	4	5	1

¹ Sequências consultados no BOLD. Realçado em azul o primer forward (F) e em verde o primer reverse (R), as cores escuras das últimas cinco bases nucleotídicas (todas as sequências estão no sentido 5' para 3'). As bases realçadas em vermelho ilustram os mismatches (incompatibilidades) entre o primer e as sequências das espécies. Os mismatches no primer (MP) contabiliza as variações de um único primer (F ou R). Os mismatches totais (MT) é a soma dessas variações nos primers F e R do mesmo par de primer. O "MT3" representa a soma das mismatches nos últimos cinco nucleotídeos da extremidade 3' dos primers. "Amp." é o resultado da amplificação da amostra das espécies. "Prev." é a previsão hipotética da amplificação do par de primer naquela espécie. As espécies com nome em vermelho são animais silvestres presentes em outros países da América do Sul. As espécies com nome em azul correspondem a todos os psitacídeos tessados no teste de especificidade.

529 *mismatches* entre 10 e 17 (MT) e 4 a 6 (MT3). Infelizmente, as sequências parciais de
530 *A. farinosa* disponíveis em banco de dados não englobavam a região dos *primers*,
531 impossibilitando a análise. No grupo de EED a calopsita (*Nymphicus hollandicus*) foi a espécie
532 que apresentou menos *mismatches* (MT/MT3: 7/1), sendo o mais promissor o C/A na 5ª base a
533 partir da extremidade 3' do *primer* 70R, entretanto, as chances de amplificação desse par de
534 *primer* nessa espécie são altas. No restante dos membros de EED a composição de *mismatches*
535 foi satisfatória para a provável inibição da PCR (MT: 12 a 19 e MT3: 5 a 9).

536 Os três últimos pares de *primer* analisados apresentaram especificidade apenas para a
537 *Amazona aestiva* no teste *in vitro*. Para o par de *primer* ND3-288 (Tabela 14), os MT do grupo
538 ESTP, foi de no mínimo 11 e no máximo 18. Os MT3 dos *primers* variou entre 4 e 5. Os MT
539 dos membros das EED tiveram variação entre 16 e 19 incompatibilidades e os MT3 entre 2 e
540 7. Os *mismatches* observados indicam que dificilmente ocorrerá amplificação nas espécies de
541 ambos os grupos para esse fragmento. O par de *primer* ND6-344 (Tabela 15) apresentou uma
542 boa margem *mismatches* na maioria dos membros presentes nas ESTP, com exceção da
543 *Amazona farinosa*, o MT variou entre 14 e 22 e os MT3 variaram entre 5 e 6. A espécie *A.*
544 *farinosa* teve poucos *mismatches* (MT/MT3: 8/1), incluindo um na última base do *primer* 25F
545 (G/T). Apesar deste *mismatch* ser considerado fraco na inibição da PCR por alguns autores
546 (Tabela 1), a presença desse mais os demais sete no restante do par de *primer* foram suficientes
547 para evitar a amplificação. Nos membros de EED os *mismatches* variaram entre 15 e 22 (MT)
548 e 3 e 6, nessas espécies não se espera que ocorra amplificação. Já no par de *primer* CR-281
549 (Tabela 16) os *mismatches*, excluindo a espécie *Amazona farinosa*, variaram entre 17 e 25 nas
550 ESTP. Na *A. farinosa* a configuração de MT/MT3 foi 9/3, os prováveis *mismatches* inibitórios
551 foram o T/G na penúltima base do *primer* 16R e os *mismatches* C/A e C/C, respectivamente,
552 na última e penúltima base do *primer* 15F. Nas EED os *mismatches* variaram entre 18 e 28
553 (MT) e 2 a 6 (MT3), o *primer* 15F foi o mais apresentou *mismatches* no par de *primer* COI-
554 267.

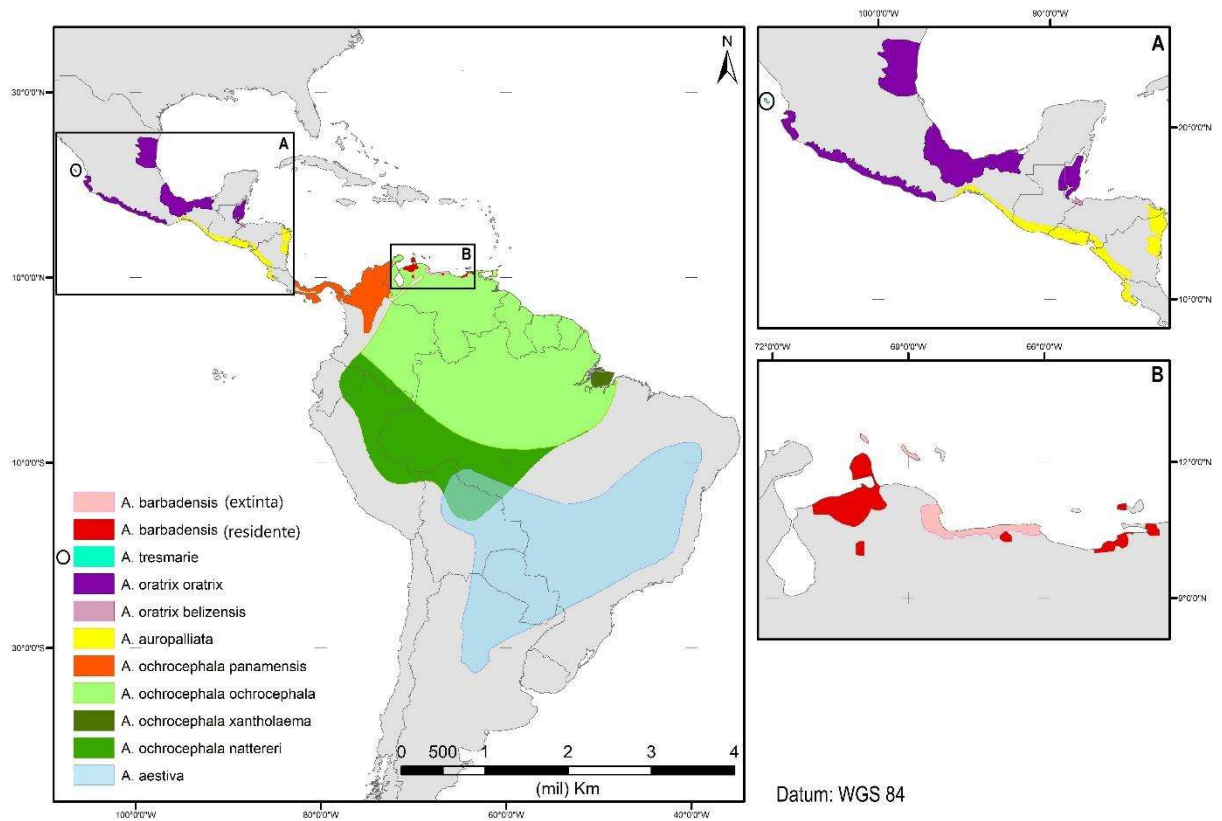
555 Nas espécies mais similares, espera-se amplificação nas espécies *Amazona*
556 *ochrocephala* e *Amazona barbadensis* para a maioria dos pares de *primer*. Em ND6-344, a
557 composição de *mismatches* G/T na 1ª e 4ª base a partir extremidade 3' do *primer* 25F, atribuíram
558 ao par de *primer* uma possível inibição da PCR na *Amazona barbadensis*. A sequência *Amazona*
559 *ochrocephala* apresentou alguns *mismatches* na última base em dois *primers*, C/A no *primer*
560 15F (CR-281) e T/G no *primer* 27R (ND6-344), porém esses não são considerados bons na

561 diminuição da eficiência da PCR (Newton *et al.* 1989, Kwok *et al.* 1990, Stadhouders *et al.*
 562 2010). O ND3-288 também teve previsão de amplificação em *A. ochrocephala* e *A.*
 563 *barbadensis*. Vários estudos filogenéticos já foram feitos sobre as relações entre *Amazona*
 564 *aestiva* e *Amazona ochrocephala*, mostrando que essas espécies são mais intimamente
 565 relacionadas do que entre as subespécies de *A. ochrocephala* (Eberhard & Bermingham 2004,
 566 Ribas *et al.* 2007, Chaves *et al.* 2014). Essa relação, chamada complexo *A. aestiva/A.*
 567 *ochrocephala*, possui três linhagens distintas que inclui dentre algumas espécies de *Amazona*
 568 (*A. aestiva*, *A. ochrocephala*, *A. tresmariae*, *A. oratrix*, *A. auropalliata* e *A. barbadensis*)
 569 (Urantówka *et al.* 2014). No Brasil, estão presentes apenas as espécies *A. aestiva* e *A.*
 570 *ochrocephala* (Figura 8).

571 No restante das “espécies similares” a *Amazona aestiva*, a amplificação hipotética dos
 572 pares de *primer* foi variada, em ND1-185 devido à grande inespecificidade apresentada, a
 573 previsão da amplificação é incerta. Em COI-267 e COII-203, as espécies do gênero *Amazona* e
 574 *Pionus* tem boas chances de amplificarem. No par de *primer* COIII-304, devido à disposição
 575 dos *mismatches* e da amplificação no teste de especificidade de *Pionus maximiliani*, espera-se
 576 a amplificação em *Pionus mestruius*. O 16S-371, assim como no teste de especificidade, prevê-
 577 se amplificação restrita ao gênero *Amazona* e inespecífica para *Pionus mestruius* (MT/MT3:
 578 9/5). Os *primers* que amplificaram apenas em *Amazona aestiva* no teste de especificidade
 579 (ND3-288, ND6-344 e CR-281) não apresentaram previsão de amplificação nas demais
 580 espécies.

581 Como os pares de *primer* foram desenhados visando o maior número de *mismatches*
 582 possíveis, as médias totais do grupo ESTP e EED foram comparadas para as espécies que
 583 coincidiram entre os pares de *primer*. A média global de *mismatches* em todo o *primer* (MGT)
 584 e média global *mismatches* nas últimas cinco bases da extremidade 3' (MG3) foram de,
 585 respectivamente, 13,9 e 4,5 para ESTP e 15,0 e 4,3 para EED. Nas ESTP a média de MT (\bar{x}
 586 MT) variou entre 6,9 a 20,4 e a média de MT3 (\bar{x} MT3) variou entre 2,5 e 5,7. Nas EED a média
 587 de MT variou entre 7,0 e 21,2 e a média de MT3 variou entre 2,6 e 5,8. Entre os pares de *primer*,
 588 o COI-267, apresentou as menores médias, porém mesmo assim, esse apresentou melhor
 589 especificidade que o ND1-185. Dois *primers* com amplificações apenas em *Amazona aestiva*,
 590 apresentaram \bar{x} MT elevadas em ESTP com valores de 18,0 (ND6-344) e 20,4 (CR-281).

591



592 **Figura 8 - Distribuição das espécies/subespécies do complexo *Amazona aestiva/Amazona***
 593 ***ochrocephala* e da *Amazona barbadensis*. Adaptado de Urantówka *et al.* (2014).**

594 **Tabela 17 – Médias de *mismatches* nos diferentes graus de especificidade**

Grau de especificidade	Várias espécies		Gêneros <i>Amazona</i> e <i>Pionus</i>						Gênero <i>Amazona</i>		<i>Amazona aestiva</i>						—	
	ND1-185	COII-203	COI-267	COIII-304	16S-371	CR-281	ND3-288	ND6-344	Média global									
Conjuntos	\bar{x} MT	\bar{x} MT3	\bar{x} MT	\bar{x} MT3	\bar{x} MT	\bar{x} MT3	\bar{x} MT	\bar{x} MT3	\bar{x} MT	\bar{x} MT3	\bar{x} MT	\bar{x} MT3	\bar{x} MT	\bar{x} MT3	MG1	MG3		
ESTP	13,2	4,2	13,2	5,0	6,9	2,5	12,5	4,7	13,7	4,7	20,4	4,4	13,2	4,7	18,0	5,7	13,9	4,5
EED	14,0	3,2	13,7	4,3	7,0	2,6	13,2	4,3	15,2	5,8	21,2	4,7	17,2	5,2	18,3	4,7	15,0	4,3

595 Apenas espécies presentes em todas as análises foram contabilizadas, com exceção da *Cariama cristata* em CR-
 596 281, que apresentou erro no alinhamento.

597

598 Todos os *primers* com ampliações apenas em *Amazona aestiva* tiveram \bar{x} MT altas em
 599 comparação a média global em EED, com valores de 17,2 (ND3-288), 18,3 (ND6-344) e 21,2
 600 (CR-281). As médias de MT3 não apresentaram diferenças muito divergentes da média global.
 601 As médias de MT elevadas nas espécies testadas em PCR dos pares de *primer* CR-281 e ND6-
 602 344, indicam que os *mismatches* adicionais da extremidade 5' podem ter auxiliado no aumento
 603 do grau de especificidade.

604 As estimativas de divergência evolutiva dos genes mitocondriais foram feitas entre a
 605 *Amazona aestiva* e outras espécies de psitacídeos, o critério para escolha dessas espécies foi
 606 possuir o genoma mitocondrial completo e ter alta identidade com *Amazona aestiva* em uma
 607 busca feita pela BlastN. Essa análise é interessante, pois é calculada pelo número de diferenças
 608 de bases entre uma sequência e as demais, sendo assim, uma contagem de *mismatches*. O
 609 resultado relevou baixa divergência entre *A. aestiva* e *A. ochrocephala* (média de divergências
 610 = 0,9) e entre *A. aestiva* e *A. barbadensis* (média de divergências = 2,2). As demais espécies
 611 apresentaram média de divergências acima de 7,9. Três espécies testadas em PCR e que não
 612 amplificaram em nenhum par de *primer* (*Psittacara leucophthalmus*, *Primolius maracana* e
 613 *Ara ararauna*), apresentaram média de divergências acima de 15,9. A região mitocondrial de
 614 menor média de divergência foi a do gene ribossomal 12S (5,5) média e a maior a região
 615 controle (19,2). O gênero com média de divergência mais próximo nessa estimativa é o *Pionus*
 616 (9,8/9,9), essa proximidade entre o gênero *Amazona* e *Pionus* já foi observado (Tavares *et al.*
 617 2006).

618 Os resultados da análise molecular confirmaram a força de diminuição da eficiência da
 619 PCR dos *mismatches* situados nas últimas cinco bases nucleotídicas, sendo que essa força é
 620 geralmente proporcional a quantidade de *mismatches* situados nessas bases. Os *mismatches* no
 621 restante da porção 5' do *primer* também podem atuar na perda de eficiência da PCR (Whiley &
 622 Sloots 2005), portanto, a maior especificidade de CR-281 e ND6-344 pode estar relacionado a
 623 sua alta média de MT.

624 **Tabela 18 – Estimativas de divergência evolutiva (%) entre a *Amazona aestiva* e outros psitacídeos**

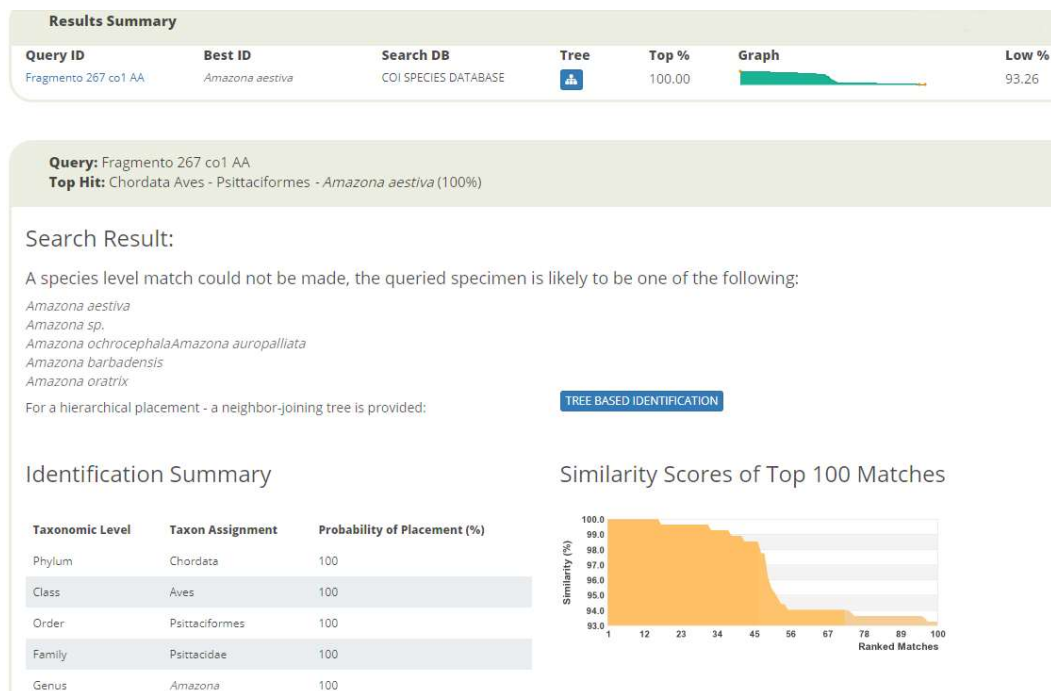
Espécies (código de acesso Genbank)	12S	16S	ATP6	ATP8	COI	COII	COIII	CR	CYTB	ND1	ND2	ND3	ND5	ND6	Média
<i>Amazona ochrocephala</i> (KM611467.1)	0,2	0,4	0,9	1,2	0,5	0,6	1,0	2,1	0,8	0,4	0,7	0,6	0,9	2,3	0,9
<i>Amazona barbadensis</i> (JX524615.1)	1,0	1,3	2,6	0,6	1,7	2,2	2,3	3,7	3,5	1,6	1,4	1,1	3,3	4,4	2,2
<i>Amazona ventralis</i> (KX925977.1)	3,4	4,2	8,6	13,7	6,5	7,7	6,6	12,4	8,3	7,8	7,1	6,6	8,5	9,6	7,9
<i>Amazona guildingii</i> (NC052783.1)	3,5	4,2	6,3	7,7	5,9	6,7	6,3	10,6	7,5	6,6	6,4	6,3	7,9	10,4	6,9
<i>Pionus menstruus</i> (KX925978.1)	5,3	6,0	9,2	9,5	8,1	7,9	6,9	23,7	10,0	9,3	10,4	8,5	10,7	12,5	9,9
<i>Pionus chalcopterus</i> (MF784450.1)	4,8	6,3	9,5	7,7	7,4	8,9	7,3	22,2	11,0	9,5	11,2	10,0	10,3	11,2	9,8
<i>Psittacara leucophthalmus</i> (KF444466.1)	10,5	11,6	15,8	19,6	11,6	14,8	13,9	32,6	15,4	14,8	15,6	14,5	14,8	17,2	15,9
<i>Primolius maracana</i> (NC_029322.1)	10,4	11,5	16,1	20,2	11,9	15,2	12,8	32,4	14,3	15,7	16,6	16,0	16,4	17,2	16,2
<i>Ara ararauna</i> (NC_029319.1)	10,6	11,6	16,4	19,6	12,2	15,4	13,9	32,9	14,2	15,6	16,7	15,7	15,7	15,8	16,2
Média	5,5	6,3	9,5	11,1	7,3	8,8	7,9	19,2	9,5	9,0	9,6	8,8	9,8	11,2	-

625 Em vermelho espécies silvestres exóticas; realçado em azul claro as regiões dos *primers* deste trabalho. O número
 626 de diferenças de base por local entre a *Amazona aestiva* e as sequências das espécies é mostrado. Essa análise
 627 envolveu 10 sequências de nucleotídeos por região. As posições de códon incluídas foram 1^a + 2^a + 3^a + Não
 628 codificantes. Todas as posições ambíguas foram removidas para cada par de sequência (opção *pairwise deletion*).
 629 As análises evolutivas foram conduzidas no MEGA X (Kumar *et al.* 2018).

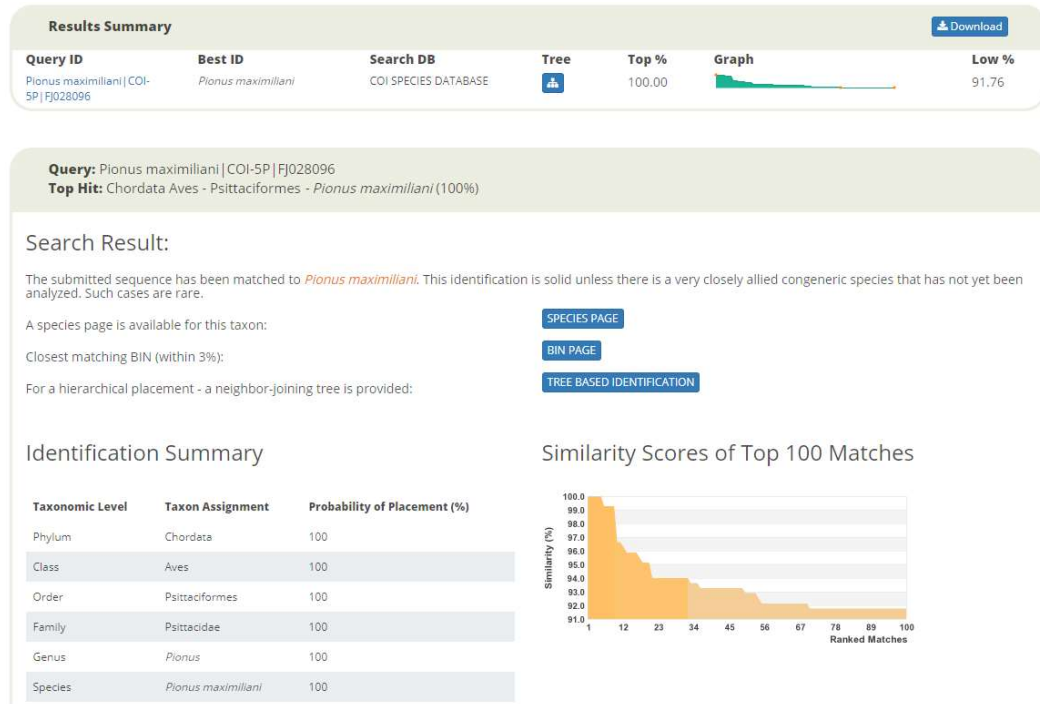
630 4.6 - Identificação usando as sequências esperadas

631 Muitos estudos de marcadores moleculares de DNA (seção 3.2) utilizaram as sequências
 632 geradas no sequenciamento para a posterior identificação da espécie. Nesse caso, eles usam os
 633 *primers* universais para a amplificação. Ademais, esse método é bastante eficiente, porém não
 634 é de fácil acesso em todos os laboratórios forenses do Brasil, pois ele exige um custo razoável
 635 com equipamento e reagentes. Sete pares de *primer* testados nesse trabalho possuem
 636 individualmente nível de especificidade limitado a família Psittacidae, porém quando
 637 agrupados, esse nível limita-se ao complexo *A. aestiva/A. ochrocephala*. Caso o laboratório
 638 forense deseje confirmar os resultados desses sete pares de *primer* com sequenciamento de
 639 algum fragmento gerado, foram testadas aqui duas abordagens de identificação utilizando as
 640 sequências esperadas de alguns pares de *primer*.

641 Uma abordagem foi a busca feita no banco de dados “*Species Level Barcode Records*”
 642 do BOLD usando o fragmento hipotético gerado pelo par de *primer* COI-267 na sequência de
 643 *Amazona aestiva* (Genbank-KT361659.1). A identificação quanto a espécie não foi possível,



644 **Figura 9 - Busca feita com o fragmento esperado do par de *primer* COI-267 de *Amazona aestiva***
 645 **(KT361659.1)**
 646



647 **Figura 10 - Busca feita com o fragmento esperado do par de *primer* COI-267 de *Pionus maximiliani***
 648 **(FJ028096)**

649 mas a suspeita ficou entre as espécies do complexo *A. aestiva/A. ochrocephala*. (Figura 9). A
 650 mesma busca foi feita com um fragmento da sequência de *Pionus maximiliani* (BOLD-
 651 FJ028096), que também amplificou para o par de *primer* COI-267. Por conseguinte, a
 652 identificação quanto a espécie foi possível, sendo que a similaridade dentro espécie variou entre
 653 99,25% a 100% (Figura 10).

654 A segunda abordagem foi feita utilizando ferramenta BlastN do Genbank, usando
 655 também fragmentos hipotéticos da sequência *Amazona aestiva* (Genbank-KT361659.1). A
 656 maioria dos fragmentos (Anexo A) também ficou restrita ao complexo *A. aestiva/A.*
 657 *ochrocephala* (identidade >95%), e somente dois fragmentos tiveram identidade menor que
 658 95% para *Amazona barbadensis*, tais fragmentos foram gerados por dois pares de *primer* que
 659 foram espécie-específico (CR-281 e ND6-344). Essa abordagem no Genbank é limitada, já que
 660 as sequências de outras regiões (excluindo o COI) são escassas, entretanto são possíveis buscas
 661 com outras regiões mitocondriais. Por outro lado, as sequências de COI no BOLD têm ampla
 662 distribuição entre as espécies, e também, sequências de mais de um indivíduo por espécie.

663 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

664 As principais limitações desse trabalho são a indisponibilidade de sequências
665 mitocondriais sequenciadas e de amostras de DNA de espécies de psitacídeos. Esse fato pode
666 ser explicado pelo motivo do grupo apresentar grande diversidade, tendo uma ampla quantidade
667 de espécies, e além disto, tem uma vasta distribuição geográfica. Para tentar diminuir o efeito
668 dessas limitações foram feitas as Análises Moleculares de Especificidade, essas mostraram
669 potencial na avaliação da especificidade do *primer* e na previsão de possíveis ampliações
670 inespecíficas em espécies indisponíveis para teste *in vitro*. Com isso, alterações da composição
671 das bases nucleotídicas do *primer* e de protocolos de PCR podem ser feitas para aumentar a
672 especificidade do mesmo. Mesmo assim, é desejável futuramente, avaliar a amplificação dos
673 pares de *primer* nas demais espécies do gênero *Amazona* de ocorrência no Brasil.

674 Cerca de 10% espécies compondo 24% dos gêneros de psitacídeos brasileiros foram
675 testadas no teste de especificidade interespecífica, incluindo duas espécies do gênero *Amazona*
676 e uma do gênero *Pionus*, o mais próximo filogeneticamente. Sete pares de *primer* desenhados
677 visando *Amazona aestiva*, apresentaram boa especificidade para a família Psittacidae,
678 amplificando nos gêneros *Amazona* e *Pionus*. Três desses pares de *primer* não amplificaram
679 em nenhuma espécie além da *A. aestiva* no teste de especificidade interespecífica, mas na AMH
680 é esperado ampliações em espécies do complexo *A. aestiva/A. ochrocephala*. Desse
681 complexo, além de *A. aestiva*, apenas *A. ochrocephala* tem ocorrência no Brasil, sendo ambas
682 protegidas pela lei de crimes ambientais (*lei 9.605/98*). Por isto, mesmo se a identificação
683 forense ficar restrita a essas espécies, ainda se configura como crime contra a fauna.

684 Sete pares de *primer* apresentaram especificidade de amplificação variada nas espécies
685 dos gêneros *Amazona/Pionus*, sendo assim, o teste está mais propenso a erro ao utilizar-se
686 individualmente apenas um desses pares de *primer* na identificação. Todavia, a confiabilidade
687 do teste é fortemente elevada ao utilizar os sete pares de *primer* ao mesmo tempo. A amostra
688 de psitacídeo sem classificação quanto a espécie (amostra 79), amplificou para todos os
689 *primers*, indicando que o filhote provavelmente é da espécie *Amazona aestiva* ou *Amazona*
690 *ochrocephala*.

691 Outrossim, duas estratégias de uso dos pares de *primer* desenvolvidos nesse trabalho
692 são sugeridas: 1) os quatro pares de *primer Amazona/Pionus* específicos são usados em uma
693 triagem inicial, diferenciando pelo menos cinco espécies destes gêneros (*A. aestiva*, *A.*

694 *ochrocephala*, *A. vinacea*, *A. farinosa* e *P. maximiliani*), em seguida, os três pares de *primer* *A.*
 695 *aestiva*/*A. ochrocephala* específicos são usados para restringir o número de espécies e aumentar
 696 a confiabilidade da identificação; 2) os sete pares de *primer* são testados simultaneamente e a
 697 identificação é determinada pelo agrupamento dos resultados da PCR.

698 O método de identificação por *primers* de especificidade restrita, exige poucos
 699 equipamentos e é de fácil execução, além disso, também é eficaz em amostras com quantidade
 700 escassa ou degradada de DNA. Os pares de *primer* desenvolvidos neste projeto possuem
 701 potencial para o uso em laboratórios forense, reforçando a prova pericial em suspeitas de tráfico
 702 de psitacídeos e impossibilitando a impunidade do infrator.

703 6. REFERÊNCIAS

704 ALACS, E.; GEORGES, A. Wildlife across our borders: a review of the illegal trade in
 705 Australia. **Australian Journal of Forensic Sciences**, v.40, n. 2, p. 147–160, 2008.

706 ALTSCHUL, S. F. *et al.* Basic local alignment search tool. **Journal of molecular biology**, v.
 707 215, n. 3, p. 403-410, 1990.

708 BASTOS, L. F. *et al.* Apreensão de espécimes da fauna silvestre em Goiás—situação e
 709 destinação. **Revista de Biologia Neotropical/Journal of Neotropical Biology**, v. 5, n. 2, p.
 710 51-63, 2008.

711 BIRDLIFE INTERNATIONAL. Country profile: Brazil. Disponível em
 712 <<http://www.birdlife.org/datazone/country/brazil>>. Acesso em: 08/01/2021.

713 BLANCO, G. *et al.* Parrots as key multilinkers in ecosystem structure and functioning. **Ecology**
 714 **and Evolution**, v. 5, n. 18, p. 4141-4160, 2015.

715 BOONSEUB, S.; TOBE, S. S.; LINACRE, A. M. T. The use of mitochondrial DNA genes to
 716 identify closely related avian species. **Forensic Science International: Genetics Supplement**
 717 **Series**, v. 2, n. 1, p. 275-277, 2009.

718 BOTTERO, M. T. *et al.* Identification of cow's milk in “buffalo” cheese by duplex polymerase
 719 chain reaction. **Journal of food protection**, v. 65, n. 2, p. 362-366, 2002.

720 BOTTERO, M. T.; DALMASSO, A. Animal species identification in food products: Evolution
 721 of biomolecular methods. **The Veterinary Journal**, v. 190, n. 1, p. 34-38, 2011.

722 BRANCIARI, R. *et al.* Species origin of milk in Italian mozzarella and Greek feta cheese.
 723 **Journal Of Food Protection**, v. 63, n. 3, p. 408-411, 2000.

724 BRASIL, Ministério do Meio Ambiente (MMA) Conservação de espécies, 2020.

725 BRASIL, Ministério do Meio Ambiente (MMA). Biodiversidade, 2020.

726 BRASIL. Decreto n. 3.607, de 21 de setembro de 2000. Brasília. 2000.

- 727 BRASIL. Lei 9.605, de 12 de fevereiro de 1998. Dispõe sobre as sanções penais e
728 administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente, e dá outras
729 providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 1998.
- 730 BRASIL. Portaria nº 444, de 17 de dezembro de 2014. Disponível em
731 <<https://www.icmbio.gov.br/portal/biodiversidade/fauna-brasileira/lista-de-especies.html>>
732 Acesso em: 21/11/2020.
- 733 CARVALHO, C. B. V. Identificação genética de aves vítimas do tráfico de animais silvestres.
734 **Atualidades Ornitológicas On-Line**, v. 165, p. 40–44, 2012.
- 735 CHAGAS, A. T. A. Caracterização de marcadores moleculares com aplicabilidade para
736 identificação de duas espécies de peixe com interesse forense: *Prochilodus argenteus* e
737 *Prochilodus costatus*. Dissertação (Mestrado em Genética). Universidade Federal de Minas
738 Gerais. Belo Horizonte, 2015a.
- 739 CHAGAS, A. T. A. *et al.* Illegal hunting and fishing in Brazil: a study based on data provided
740 by environmental military police. **Natureza & conservação**, v. 13, n. 2, p. 183-189, 2015b.
- 741 CHAVES, A. V. *et al.* Molecular taxonomy of Brazilian tyrant-flycatchers (Passeriformes:
742 Tyrannidae). **Molecular Ecology Resources**, v. 8, n. 6, p. 1169-1177, 2008.
- 743 CHAVES, A. V. *et al.* An online mtDNA tool for identification of Neotropical Psittacid species
744 and taxonomic issues: A study case of the *Amazona ochrocephala* complex. **Natural**
745 **Resources**, v. 2014, 2014.
- 746 COGHLAN, M. L. *et al.* Egg forensics: an appraisal of DNA sequencing to assist in species
747 identification of illegally smuggled eggs. **Forensic Science International: Genetics**, v. 6, n.
748 2, p. 268-273, 2012.
- 749 COMITÊ BRASILEIRO DE REGISTROS ORNITOLÓGICOS (CBRO). **Lista das aves do**
750 **Brasil**. 11ª Edição, 2014.
- 751 CONVENTION ON INTERNATIONAL TRADE IN ENDANGERED SPECIES OF WILD
752 FAUNA AND FLORA (CITES). What is CITES. Disponível em:
753 <<https://cites.org/eng/disc/what.php>>. Acesso em: 29/03/2021.
- 754 DALMASSO, A. *et al.* A multiplex PCR assay for the identification of animal species in
755 feedstuffs. *Molecular and cellular probes*, v. 18, n. 2, p. 81-87, 2004.
- 756 DESTRO, G. F. G. *et al.* Efforts to combat wild animals trafficking in Brazil. **Biodiversity**
757 **enrichment in a diverse world**, v. 1, p. 421-436, 2012.
- 758 DUBEY, B.; MEGANATHAN, P. R.; HAQUE, I. Multiplex PCR assay for rapid identification
759 of three endangered snake species of India. **Conservation Genetics**, v. 10, n. 6, p. 1861-1864,
760 2009.
- 761 EBERHARD, J.R.; BERMINGHAM, E. Phylogeny and Biogeography of the *Amazona*
762 *ochrocephala* (Aves: Psittacidaformee) Complex. *The Auk*, v. 121, p. 318-332, 2004.

- 763 FORMENTÃO, L. *et al.* **Identificação de espécies em ovos de aves apreendidos em situação**
764 **de comércio ilegal: aporte para aplicação da técnica de DNA barcode.** Dissertação
765 (Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2019.
- 766 FREITAS, A. C. P. **Distribuição espaço-temporal dos animais recebidos no Centro de**
767 **Triagem de Animais Silvestres de Belo Horizonte, Minas Gerais, 2003 a 2012.** Dissertação
768 (Mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2014.
- 769 GIOVANINI, D. **1º Relatório nacional sobre o tráfico de fauna silvestre. Brasília: Rede**
770 **Nacional de Combate ao Tráfico de Animais (RENCTAS), 2002**
- 771 GONÇALVES, P. F. M. *et al.* DNA barcoding identifies illegal parrot trade. **Journal of**
772 **Heredity**, v. 106, n. S1, p. 560-564, 2015.
- 773 GUEDES, N.M. R. Projeto Arara Azul – Biologia, Manejo e Conservação. **Instituto Arara**
774 **Azul**, p. 112, 2015. Disponível em <<https://www.institutoararaazul.org.br/a-arara-azul/>>.
775 Acesso em: 16/03/2021.
- 776 HEBERT, P. DN. *et al.* Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the
777 Royal Society of London. **Series B: Biological Sciences**, v. 270, n. 1512, p. 313-321, 2003.
- 778 INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE (ICMBIO).
779 **Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Volume III-Aves.** Livro
780 Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção, 2018.
- 781 IUCN 2020. **The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2020-3.** Disponível em
782 <<https://www.iucnredlist.org>>. Acesso em: 14/12/2020.
- 783 KARABASANAVAR, N. S. *et al.* Identification of avian species using polymerase chain
784 reaction and sequence analysis of mitochondrial 12S rRNA gene. **Veterinarski arhiv**, v. 80, n.
785 5, p. 653-661, 2010.
- 786 KERR, K. C. R. *et al.* Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds.
787 **Molecular ecology notes**, v. 7, n. 4, p. 535-543, 2007.
- 788 KIBBE, W. A. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. **Nucleic acids**
789 **research**, v. 35, n. suppl_2, p. W43-W46, 2007.
- 790 KUMAR S. *et al.* MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing
791 platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, p. 1547-1549, 2018.
- 792 LEE, J. C. *et al.* A novel strategy for avian species identification by cytochrome b gene.
793 **Electrophoresis**, v. 29, n. 11, p. 2413-2418, 2008.
- 794 LINACRE, A.; TOBE, S. S. An overview to the investigative approach to species testing in
795 wildlife forensic science. **Investigative genetics**, v. 2, n. 1, p. 2, 2011.
- 796 LINACRE, A.; TOBE, S. Wildlife DNA analysis: applications in forensic science. **John Wiley**
797 **& Sons**, 2013.
- 798 MARINI, M. A.; GARCIA, F. I. Conservação de aves no Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1,
799 p. 95-102, 2005.

- 800 NEWTON, C. R. *et al.* Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory
801 mutation system (ARMS). **Nucleic acids research**, v. 17, n. 7, p. 2503-2516, 1989.
- 802 OLIVEIRA-MARQUES, A. R. **Filogenia molecular das espécies do gênero Ara**
803 **(Psittaciformes, Aves)**. Tese (Doutorado), Universidade de São Paulo. São Paulo, 2006.
- 804 PALOMARES, F. *et al.* Faecal genetic analysis to determine the presence and distribution of
805 elusive carnivores: design and feasibility for the Iberian lynx. **Molecular ecology**, v. 11, n. 10,
806 p. 2171-2182, 2002.
- 807 PIMENTEL, P. C. B.; SANTOS, J. M. Diagnóstico do tráfico de animais silvestres na Bahia:
808 identificação, quantificação e caracterização das espécies-alvo. **Diálogos & Ciência - Revista**
809 **da Rede de Ensino FTC**, v. III, n. 8, p. 35–44, 2009.
- 810 QUEIROZ, A. L. L. **Estudos genéticos de *Myrmecophaga tridactyla* no contexto da ciência**
811 **forense**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2017.
- 812 QUEIROZ-FILHO, R. O. P. **Análise genética em psitacídeos de cativeiro**. Dissertação
813 (Mestrado), Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2008.
- 814 RATNASINGHAM, S.; HEBERT, P. DN. BOLD: The Barcode of Life Data System
815 Molecular. **Ecology notes**, v. 7, n. 3, p. 355-364, 2007.
- 816 RIBAS, C.C. *et al.* Phylogeny and Biogeography of Yellow-Headed and Blue-Fronted Parrots
817 (*Amazona ochrocephala* and *Amazona aestiva*) with Special Reference to the South American
818 Taxa. **Ibis**, v. 149, p. 564-574, 2007.
- 819 SANCHES, A. *et al.* Illegal hunting cases detected with molecular forensics in Brazil.
820 **Investigative genetics**, v. 3, n. 1, p. 17, 2012.
- 821 SANTOS, C. G. *et al.* Identification of hare meat by a species-specific marker of mitochondrial
822 origin. **Meat Science**, v. 90, n. 3, p. 836-841, 2012.
- 823 SARKAR, G. *et al.* Characterization of polymerase chain reaction amplification of specific
824 alleles. **Analytical biochemistry**, v. 186, n. 1, p. 64-68, 1990.
- 825 SCHUNCK, F., M. *et al.* Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Papagaios da Mata
826 Atlântica – PAN Papagaios, **Série Espécies Ameaçadas 20**. ICMBio. Brasília, 2011.
- 827 SICK, H. Ornitologia brasileira [Brazilian ornithology]. **Editora Nova Fronteira**, 1997.
- 828 TABARELLI, M. *et al.* Challenges and opportunities for biodiversity conservation in the
829 Brazilian Atlantic Forest. **Conservation Biology**, v. 19, n. 3, p. 695-700, 2005.
- 830 TAVARES, E. S. **Relações filogenéticas, biogeografia histórica e evolução da organização**
831 **de genes mitocondriais dos psitacídeos neotropicais (tribo Arini: Psittacidae:**
832 **Psittaciformes)**. Tese (Doutorado), Universidade de São Paulo. São Paulo, 2005.
- 833 TAVARES, E.; S. *et al.* Phylogenetic relationships and historical biogeography of neotropical
834 parrots (Psittaciformes: Psittacidae: Arini) inferred from mitochondrial and nuclear DNA
835 sequences. **Systematic Biology**, v. 55, n. 3, p. 454-470, 2006.

- 836 URANTÓWKA, A.D.; MACKIEWICZ, P.; STRZAŁA, T. Phylogeny of *Amazona*
837 *barbadensis* and the Yellow-Headed Amazon Complex (Aves: Psittacidae): A New Look at
838 South American Parrot Evolution. **PLoS ONE**, 9, 2014.
- 839 VILELA, D. A. R. **Diagnóstico de situação dos animais silvestres recebidos nos Cetas**
840 **brasileiros e *Chlamydophila psittaci* em papagaios (*Amazona aestiva*) no Cetas de Belo**
841 **Horizonte, MG. Tese (Doutorado em Ciência Animal).** Universidade Federal de Minas
842 Gerais. Belo Horizonte, 2012.
- 843 YI-MING, L. *et al.* Illegal wildlife trade in the Himalayan region of China. **Biodiversity &**
844 **Conservation**, v. 9, n. 7, p. 901-918, 2000.
- 845 WAN, Q.; FANG, S. Application of species-specific polymerase chain reaction in the forensic
846 identification of tiger species. **Forensic science international**, v. 131, n. 1, p. 75-78, 2003.
- 847 WHILEY, D, M.; SLOOTS, T, P. Sequence variation in *primer* targets affects the accuracy of
848 viral quantitative PCR. **Journal of clinical virology**, v. 34, n. 2, p. 104-107, 2005
- 849 ZHANG, L.; HUA, N.; SUN, S. Wildlife trade, consumption and conservation awareness in
850 southwest China. **Biodiversity and Conservation**, v. 17, n. 6, p. 1493-1516, 2008.

851 7. ANEXOS

852 A – Busca por sequências similares pela ferramenta BlastN usando fragmentos esperados dos
853 pares de *primer* padronizados

16S-371	Cobertura	Identidade	COII-203	Cobertura	Identidade
<i>Amazona ochrocephala</i> (KM611467.1)	100%	100.00%	<i>Amazona ochrocephala</i> (KM611467.1)	100%	99.51%
<i>Amazona barbadensis</i> (JX524615.1)	100%	98.92%	<i>Amazona barbadensis</i> (JX524615.1)	100%	98.52%
<i>Amazona guildingii</i> (NC_052783.1)	100%	97.58%	<i>Amazona guildingii</i> (NC_052783.1)	99%	94.55%
<i>Amazona ventralis</i> (KX925977.1)	100%	97.31%	<i>Pionus menstruus</i> (KX925978.1)	99%	94.06%
<i>Aratinga maculata</i> (KJ142239.1)	99%	95.42%	<i>Amazona ventralis</i> (KX925977.1)	99%	94.06%
<i>Aratinga jandaya</i> (KJ142238.1)	99%	95.42%	<i>Pionus chalcopterus</i> (MF784450.1)	99%	92.57%
<i>Aratinga auricapillus</i> (KJ142229.1)	99%	95.42%	<i>Psittacula eupatria</i> (NC_042765.1)	99%	92.08%
<i>Pionus menstruus</i> (KX925978.1)	100%	95.15%	<i>Psittacula roseata</i> (NC_045379.1)	99%	91.58%
<i>Aratinga solstitialis</i> (MK343132.1)	99%	95.15%	<i>Columba rupestris</i> (KX902246.1)	98%	91.50%
<i>Ara ararauna</i> (KF010315.1)	97%	94.78%	<i>Psittacula krameri</i> (MN065674.1)	99%	91.09%
COI-267	Cobertura	Identidade	CR-281	Cobertura	Identidade
<i>Amazona ochrocephala</i> (KM611467.1)	100%	99.63%	<i>Amazona ochrocephala</i> (KM611467.1)	99%	95.00%
<i>Amazona barbadensis</i> (JX524615.1)	100%	98.88%	<i>Amazona barbadensis</i> (JX524615.1)	99%	91.79%
<i>Amazona guildingii</i> (NC_052783.1)	100%	95.51%	<i>Amazona amazonica</i> (AF338278.1)	99%	90.00%
<i>Amazona amazonica</i> (KR017994.1)	100%	94.01%	<i>Amazona vittata</i> (GU380340.1)	100%	87.19%
<i>Amazona autumnalis</i> (JQ173996.1)	100%	94.01%	<i>Amazona guildingii</i> (NC_052783.1)	99%	87.14%
<i>Amazona amazonica</i> (JQ173995.1)	100%	94.01%	<i>Amazona brasiliensis</i> (AY820259.1)	100%	86.88%
<i>Amazona farinosa</i> (JQ174001.1)	99%	93.98%	<i>Amazona ventralis</i> (KX925977.1)	100%	86.83%
<i>Amazona dufresniana</i> (JQ173998.2)	100%	93.63%	<i>Amazona farinosa</i> (AF338821.1)	99%	86.83%
<i>Amazona viridigenalis</i> (KR017993.1)	100%	93.26%	<i>Amazona autumnalis</i> (AF338284.1)	99%	86.79%
<i>Amazona tucumana</i> (FJ027058.1)	100%	93.26%	<i>Amazona leucocephala</i> (U380317.1)	99%	86.43%
ND3-288	Cobertura	Identidade	COIII-304	Cobertura	Identidade
<i>Amazona ochrocephala</i> (KM611467.1)	100%	99.31%	<i>Amazona ochrocephala</i> (KM611467.1)	100%	100.00%
<i>Amazona barbadensis</i> (JX524615.1)	100%	98.96%	<i>Amazona barbadensis</i> (JX524615.1)	100%	99.34%
<i>Amazona guildingii</i> (NC_052783.1)	100%	94.44%	<i>Amazona guildingii P</i> (KX925978.1)	100%	93.75%
<i>Amazona ventralis</i> (KX925977.1)	100%	93.40%	<i>Amazona ventralis</i> (KX925977.1)	100%	93.75%
<i>Pionus menstruus</i> (KX925978.1)	100%	90.28%	<i>Amazona guildingii</i> (NC_052783.1)	100%	93.75%
<i>Pionus chalcopterus</i> (MF784450.1)	100%	89.24%	<i>Pionus chalcopterus</i> (MF784450.1)	100%	93.09%
<i>Pyrrhura rupicola</i> (KF751801.1)	100%	86.90%	<i>Nymphicus hollandicus</i> (MH133968.1)	100%	89.14%
<i>Pyrrhura frontalis</i> (JN614632.1)	100%	86.55%	<i>Myiopsitta monachus</i> (KM611471.1)	100%	88.82%
<i>Trichoglossus rubritorquis</i> (MN182499.1)	100%	86.11%	<i>Poicephalus senegalus</i> (NC_044083.1)	100%	88.49%
<i>Psittacula eupatria</i> (NC_042765.1)	100%	86.11%	<i>Ara severus</i> (KF946546.1)	100%	88.49%
ND6-344	Cobertura	Identidade			
<i>Amazona ochrocephala</i> (KM611467.1)	100%	97.39%			
<i>Amazona barbadensis</i> (JX524615.1)	100%	93.91%			
<i>Amazona ventralis</i> (KX925977.1)	100%	89.28%			
<i>Amazona guildingii</i> (NC_052783.1)	100%	87.83%			
<i>Pionus chalcopterus</i> (MF784450.1)	100%	87.54%			
<i>Amazona guildingii</i> (KX925978.1)	100%	86.38%			
<i>Ara macao</i> (MW584237.1)	100%	83.48%			
<i>Psittacula eupatria</i> (NC_042765.1)	100%	83.00%			
<i>Ara chloropterus</i> (NC_047199.1)	100%	82.32%			
<i>Ara militaris mexicanus</i> (JX524613.1)	100%	82.32%			

854

855

856