



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DO MARAJÓ – BREVES
FACULDADE DE CIÊNCIAS NATURAIS

CINTIA NEGRÃO DE OLIVEIRA

**UTILIZAÇÃO DA FERRAMENTA DE DNA BARCODING SUGERE ESPÉCIE
CRÍPTICA DENTRO DA RAIA CRITICAMENTE AMEAÇADA
Aetobatus narinari Euphrasen, 1790 NO ATLÂNTICO SUL OCIDENTAL.**

PORTEL-PA
2016

CINTIA NEGRÃO DE OLIVEIRA

**UTILIZAÇÃO DA FERRAMENTA DE DNA BARCODING SUGERE ESPÉCIE
CRÍPTICA DENTRO DA RAIA CRITICAMENTE AMEAÇADA
Aetobatus narinari Euphrasen, 1790 NO ATLÂNTICO SUL OCIDENTAL.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Faculdade de Ciências Naturais da Universidade Federal
do Pará, como requisito parcial para a obtenção do grau
de Licenciado em Ciências Naturais.

Orientador: Prof. Dr. João Bráulio de Luna Sales

PORTEL-PA
2016

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

- O48u Oliveira, Cintia Negrão de.
Utilização da ferramenta de DNA Barcoding sugere espécie críptica dentro da raia criticamente ameaçada *Aetobatus narinari* Euphrasen, 1790 no atlântico sul ocidental / Cintia Negrão de Oliveira, . — 2016.
33 f. : il. color.
- Orientador(a): Prof. Dr. João Bráulio de Luna Sales
Trabalho de Conclusão (Graduação) - Universidade Federal do Pará,
Campus Universitário de Breves, Faculdade de Ciências Naturais, Breves,
2016.
1. Elasmobrânquios. 2. *Aetobatus narinari*. 3. DNA barcoding. 4.
Espécie Críptica. 5. Arraia Pintada. I. Título.

CDD 597.098115

CINTIA NEGRÃO DE OLIVEIRA

**UTILIZAÇÃO DA FERRAMENTA DE DNA BARCODING SUGERE ESPÉCIE
CRÍPTICA DENTRO DA RAIÁ CRITICAMENTE AMEAÇADA
Aetobatus narinari Euphrasen, 1790 NO ATLÂNTICO SUL OCIDENTAL.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Faculdade de Ciências Naturais da Universidade Federal
do Pará, como requisito parcial para a obtenção do grau
de Licenciado em Ciências Naturais.

Orientador: Prof. Dr. João Bráulio de Luna Sales

Data de Aprovação: 19/02/2016.

Conceito: Excelente

Comissão Examinadora:

Prof. Msc. Tiago Magalhães da Silva Freitas (Titular)
FACIN – UFPA.

Profa. Msc. Yrlene Ferreira (Titular)
Campus Universitário de Bragança – UFPA.

Prof. Dr. Luiz Marcelo de Lima Pinheiro
FACIN – UFPA.

Dedico este trabalho aos meus pais, irmãos e ao meu esposo, pela força e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS por ser a base de todas as minhas conquistas e por ter me guiado desde a inscrição até a conclusão desse sonho. Aos meus pais Manoel e Rozinete que me ajudaram nessa trajetória.

Ao meu esposo Valdenilson pela força e companheirismo a cada passo desse curso. As minhas irmãs Cibely, Sirlene, Cimara e ao meu irmão Ryan que me apoiaram durante todo esse tempo.

Ao meu orientador Prof. Dr. João Bráulio de Luna Sales, pela oportunidade de trabalhar com ele, pelo o apoio, compreensão, paciência e pelos os ensinamentos que me deu para concluir este trabalho.

As minhas colegas de curso Renilde Moreira e Selma Moreira que ao longo do tempo se tornaram grandes amigas, pelo incentivo, apoio e amizade durante os momentos difíceis que passamos, pelos momentos felizes, pelas risadas, brincadeiras, conselhos, pelos momentos de descontração em períodos difíceis que enfrentamos, enfim por tudo que me proporcionaram.

A turma de Ciências Naturais, ao qual faço parte em especial a Laudicéia, Luciléia e Tatiane que me ajudaram sempre que precisei durante todo esse percurso.

A todos os professores do Curso Licenciatura em Ciências Naturais, que foram importantes para minha formação acadêmica e fundamental para ampliar meus conhecimentos.

A minha vizinha Ivanilza, a “Xuxa”, que sempre estava disponível em todas as vezes que precisei de sua ajuda, mesmo debaixo de chuva, ela estava sempre lá.

E por fim, a todos que me ajudaram direta e indiretamente, nesta formação. Obrigada por acreditarem em mim, que iria conseguir, por me apoiarem e por sonharem junto comigo que esse dia iria chegar.

“Bem-aventurado o homem que acha sabedoria, e o homem que adquire conhecimento”. (Provérbios 3:13)

“O sábio ouvirá e crescerá em conhecimento e o entendido adquirirá sábios conselhos”. (Provérbios 1:05)

RESUMO

Os elasmobrânquios (peixes cartilaginosos) estão inseridos no grupo dos vertebrados vivos mais antigos que existem, com registro fóssil datado entre 350-400 milhões de anos atrás, inserido dentro da classe Chondrichthyes, a qual se divide em duas subclasses: Elasmobranchii (Tubarões e Arraias) e Holocephalii (Quimeras). Apresentam atualmente cerca de 1.100 espécies. O gênero *Aetobatus* é composto por pelo menos quatro espécies nominais das quais *A. narinari* é a mais importante dentro do gênero devido ao fato de possuir distribuição global. Estudos realizados nos últimos anos tem confirmado a presença de espécies crípticas dentro de *A. narinari*, entretanto, a fauna do Atlântico Sul Ocidental ainda não foi alvo de investigações morfológicas ou moleculares. O presente estudo pretende testar a eficiência da ferramenta de DNA *barcoding* na identificação de *A. narinari* vendida e processada em mercados de Bragança-PA e Valença-BA, identificadas como arraia pintada. Os resultados indicam que as amostras provenientes de Bragança e Valença, são geneticamente idênticas a indivíduos provenientes da Florida, Belize e Cayman, havendo ainda a formação de vários subgrupos ao longo das sequências utilizadas no presente estudo. Adicionalmente, os resultados também indicam que sequências provenientes de indivíduos do estado de São Paulo, são geneticamente muito distantes de todas as outras sequências utilizadas no presente estudo, indicando a presença de possíveis espécies crípticas dentro de *A. narinari* no Atlântico Sul Ocidental. Novos estudos moleculares e morfológicos são necessários para tentar elucidar quantas espécies realmente existem dentro de *A. narinari*, bem como se existem ainda subpopulação ao longo de sua área de ocorrência na região do Atlântico Sul Ocidental.

Palavras-chave: Elasmobrânquios, *Aetobatus narinari*, DNA *barcoding*, Espécie Críptica, Arraia Pintada

ABSTRACT

Elasmobranch (cartilaginous fish) are included in the group of the oldest vertebrates that exist in the fossil record dating of 350-400 million years ago, inserted into the class Chondrichthyes, which is divided into two subclasses: Elasmobranchii (Sharks and Skates) and Holocephalii (Chimera), currently have about 1,100 species. The genus *Aetobatus* is composed of at least four nominal species including *Aetobatus narinari* is the most important within the genus due to the fact that it has a global distribution around the world. In recent years, molecular and morphological studies have confirmed the presence of cryptic species within the genus *Aetobatus* is composed of at least four nominal species including *Aetobatus narinari* which is the most important species given the fact of its worldwide distribution. Recent studies confirm the presence of cryptic genetic species inside the *Aetobatus narinari* however, the fauna of the Southwestern Atlantic Ocean has not been yet subject of morphological or molecular investigations. This study aims to test the efficiency of DNA barcoding tool in identifying *A. narinari* specimens sold processed in fish markets in Bragança, and Valença city, popular known as spotted rays. The results indicate that samples from Bragança and Valença, are genetically identical from individuals belonging to Florida, Belize and Cayman, and confirms the formation of various subgroups along the sequences used in this study. In addition, the results also indicate that sequences from individuals in the state of São Paulo, are genetically very distant from all other sequences used in this study, indicating the possible presence of cryptic species within *A. narinari* in the Southwestern Atlantic Ocean. More molecular and morphological studies are needed to try to elucidate how many species actually exist within *A. narinari* and if there are still sub-population throughout its range in the region of the southwestern Atlantic.

Keywords: Elasmobranch, *Aetobatus narinari*, DNA barcoding, Cryptic Species, Spotted Rays.

LISTA DE ILUSTRAÇÃO

Figura 1 -	<i>Aetobatus narinari</i> . Indivíduo capturada na cidade de Bragança, PA. Imagem retirada de Carmona <i>et al</i> , (2008).....	14
Figura 2 -	Mapa do genoma mitocondrial humano (16.569 bp) com destaque para o citocromo <i>c</i> oxidase subunidade I (Modificado de Taanman, 1999). Imagem retirada de Rocha (2014).....	18
Figura 3 -	Amostra de <i>A. narinari</i> coletada em Bragança-PA, vendida como arraia pintada.....	20
Figura 4 -	Mapa de amostragem de <i>A. narinari</i> do presente estudo, com o respectivo número de indivíduos por localidade. Vermelho corresponde a Cidade de Bragança-PA, Azul a Cidade de Valença-BA e Verde a Cidade de Mazatlan-MX.....	21
Figura 5 -	Árvore filogenética de Agrupamento de vizinhos (NJ), baseado no modelo de Kimura 2 parâmetros. Valores da árvore representam as pseudo-réplicas de <i>bootstrap</i>	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Principais famílias de arraias marinhas com gêneros e espécies com ocorrência no litoral brasileiro. Modificado de McEachran & Carvalho, 2002.....	13
Tabela 2 -	Distância genéticas baseadas no modelo de Kimura 2 parâmetros dos indivíduos do gênero <i>Aetobatus</i> utilizados no presente estudo. Valores são demonstrados em porcentagem.....	25

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
1.1	Elasmobrânquios.....	11
1.2	Raias.....	12
1.3	O Gênero <i>Aetobatus</i> Blainville 1816 e a espécie alvo de estudo <i>Aetobatus Narinari</i> EUPHRASEN, 1790.....	14
1.4	As principais ameaças a conservação e diversidade das espécies de elasmobrânquios.....	16
1.5	O código de barras de DNA (DNA Barcoding).....	17
2	OBJETIVOS.....	19
2.1	Objetivo Geral.....	19
2.2	Objetivos Específicos.....	19
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1	Amostragem.....	20
3.2	Extração de DNA, PCR e sequenciamento.....	21
3.3	Alinhamento de DNA e análises moleculares.....	22
4	RESULTADOS.....	22
5	DISCUSSÃO.....	26
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	28
	REFERÊNCIAS.....	29

1 INTRODUÇÃO

1.1 Elasmobrânquios

Os elasmobrânquios (peixes cartilagosos) estão inseridos no grupo dos vertebrados viventes mais antigos, com registro fóssil datado entre 350-400 milhões de anos atrás (Palmeira, 2009 *apud*; Cappetta *et al.*, 1993). Este grupo está inserido dentro da classe Chondrichthyes, a qual se divide em duas subclasses: Elasmobranchii (Tubarões e Raias) e Holocephalii (Quimeras) (Nelson, 1994). Apresentam atualmente cerca de 1.100 espécies (Campagno, 2005), possuindo uma estratégia de vida diferente da maioria das espécies de peixes ósseos, devido a apresentarem longo desenvolvimento com maturação sexual tardia e baixa fecundidade (Lessa *et al.*, 1999).

Elasmobrânquios são geneticamente distantes dos teleósteos, e sendo assim, desenvolveram adaptações independentes no ambiente marinho (Moyle & Cech, 2000). Entretanto, a diferença mais importante entre os peixes ósseos e os cartilagosos é a estratégia reprodutiva. Os teleósteos contam, em sua grande maioria, com fecundação externa, tendo uma alta fecundidade, enquanto que os condricthyes apresentam fecundação interna, sendo que os machos possuem um apêndice sustentado por cartilagens, denominado cláspes, que se desenvolve na margem interna de cada nadadeira pélvica, e por ocasião da cópula, é introduzido na abertura genital da fêmea, garantindo a passagem do espermatozoide e a fecundação (Figueiredo, 1977).

No caso dos tubarões, a maioria das espécies são carnívoras e pelágicas, e em sua quase totalidade, habitando águas costeiras e oceânicas, da superfície ao fundo, em todos os mares (Rodrigues-Filho, 2008). São peixes altamente adaptáveis, ocupando diversos nichos ecológicos, dos mares tropicais aos oceanos Ártico e Antártico. Ao redor do planeta são conhecidas cerca de 400 espécies (88 delas no Brasil), cujos tamanhos podem variar de 0,16 m (tubarão vagalume – *Etmopterus perryi*) a 18 m de comprimento (tubarão baleia – *Rhiniodon typus*) (Benson *et al.*, 2001; Szpilman, 2004).

Tal diversidade não fica restrita apenas ao tamanho das espécies, mas a vários outros aspectos, tais como a distribuição geográfica, a forma e até os aspectos alimentares, onde estes organismos são encontrados no topo da rede trófica (tubarão branco – *Carcharodon carcharias*; tubarão tigre – *Galeocerdo cuvier*) ou mesmo planctívoros (tubarão peregrino – *Cetorhinus maximus*) (Moyle & Cech, 2000). Tais características conferem a estes peixes uma importância significativa na preservação e na manutenção da chamada “saúde da vida

marinha”, pois como predadores no topo da rede alimentar, mantém um controle populacional de suas presas habituais, exercendo assim, um importante papel na seleção natural ao predar os mais lentos e os mais fracos, assim como, ao comerem os animais doentes, feridos ou mortos (Camhi *et al.*, 1998; Szpilman, 2004).

1.2 Raias

O grupo de elasmobrânquios conhecidos como raias ou arraias, são recursos pesqueiros com distribuição mundiais, predominantemente marinhos e habitantes de águas tropicais (Nelson, 1994), possuindo atualmente 20 famílias, 72 gêneros e 513 espécies descritas (Palmeira, 2009). São caracterizados por corpo achatado dorso-ventralmente e nadadeiras peitorais fundidas à cabeça formando um contorno único, apresentando entre cinco a seis pares de fendas braquiais situadas na parte ventral anterior do corpo (Gadig, 2001). Neste grupo de elasmobrânquios também estão presentes os espiráculos, que são fendas situadas atrás de cada olho, conectadas à câmara branquial e que tem função no processo respiratório. Adicionalmente, boca e fendas braquiais estão dispostas na região ventral, nadadeiras dorsais e caudais normalmente são reduzidas ou ausentes e nadadeira anal inexistente (Bigelow & Schroeder, 1953; Nelson, 1994).

Diferentemente das espécies de tubarões, a grande maioria das espécies de arraias apresenta hábito bentônico e sedentário, sendo encontradas associadas a fundos marinhos e oceânicos onde, na presença de areia, podem se enterrar, comportamento que auxilia na captura de presas (Gadig, 2001). Algumas espécies também apresentam hábitos pelágicos, ou seja, mais ativos, utilizando a boca aberta durante a natação para entrada de grande quantidade de água que passa pelas brânquias (Szpilman 2004). Para o litoral brasileiro, são reportadas 15 espécies pertencentes a 10 famílias (McEachran & Carvalho, 2002) (Tabela 1). Para o litoral paraense, são registradas seis espécies principais: *Aetobatus narinari*, *Dasyatis guttata*, *D. geijskesi*, *Gymnura micrura*, *Narcine brailiensis* e *Rhinoptera bonasus* (Pinheiro & Frédou, 2004).

Tabela 1: Principais famílias de arraias marinhas com gêneros e espécies com ocorrência no litoral brasileiro. Modificado de McEachran & Carvalho, 2002.

Família	Gênero	Espécie
Torpedinidae Bonaparte, 1838	<i>Torpedo</i> Houttuyn, 1764	<i>nobiliana</i> Bonaparte, 1835
Narcinidae T. N. Gill, 1862	<i>Narcine</i> Henle, 1834	<i>brasiliensis</i> Olfers, 1831
Pristidae Bonaparte, 1838	<i>Pristis</i> Linck, 1790	<i>perotetti</i> Muller & Henle, 1841
Dasyatidae Jordan, 1888	<i>Dasyatis</i> Rafinesque, 1810	<i>americana</i> Hildebrand & Schroeder, 1928
		<i>geijskesi</i> Boeseman, 1948
		<i>guttata</i> Block & Schneider, 1801
		<i>say</i> Lesueur, 1817
Urotrygonidae McEachran, Dunn & Miayake, 1996	<i>Urotrygon</i> T. N. 1863	<i>microphthalmum</i> Delsman, 1941
Gymnuridae Fowler, 1934	<i>Gymnura</i> Van Hasselt, 1823	<i>micrura</i> Block & Schneider, 1801
Myliobatidae Bonaparte, 1838	<i>Aetobatus</i> Blainville, 1816	<i>narinari</i> Euphrasen, 1790
Rhinopterae Jordan & Evermann, 1896	<i>Rhinoptera</i> Van Hasselt, 1824	<i>bonasus</i> Mitchill, 1815
		<i>brasiliensis</i> Muller, 1836

Fonte: Autoria própria

1.3 O Gênero *Aetobatus* Blainville 1816 e a espécie alvo de estudo *Aetobatus Narinari* Euphrasen, 1790.

O gênero *Aetobatus* é composto por pelo menos cinco espécies nominais: *Aetobatus flagellum* Block & Schneider 1801, *Aetobatus laticeps* Gill 1865 *Aetobatus narinari* Euphrasen 1790 e *Aetobatus ocellatus* Khul 1823 e *Aetobatus narutobiei* White, Yamagichi & Furumitsu, 2013 (White *et al.*, 2013). Estas últimas três pertencem ao complexo de espécies dentro de *A. narinari* conhecido como complexo de raias marinhas de manchas brancas, os quais nos últimos anos tem atraído a necessidade de revisões taxonômicas extensivas para determinar quantas espécies realmente existem dentro deste complexo.

Um dos exemplos mais recentes da problemática taxonômica dentro deste complexo foi a recente descrição de mais uma espécie para a região nordeste do Pacífico, chamada de *Aetobatus narutobiei*, previamente identificada como *A. flagellum* (White *et al.*, 2013). Um dos principais problemas associados à presença de espécies crípticas dentro de *Aetobatus narinari* é o fato de esta espécie ser considerada cosmopolita, ou seja, presente em todas as regiões marinhas do globo (Richards *et al.*, 2009). Assim como muitas outras espécies de elasmobrânquios, *A. narinari* (figura 1) apresenta crescimento e maturação lentos, além da geração de poucos indivíduos por evento reprodutivo (Schluessel, 2008; Schluessel, *et al.*, 2010).

Figura 1: *Aetobatus narinari*. Indivíduo capturada na cidade de Bragança, PA.



Fonte: Carmona *et al.*, (2008).

Desta forma, a espécie pode ser bastante afetada por fatores como a sobrepesca, uma das maiores ameaças as populações de peixes teleósteos (Bonfil, 1994). *Aetobatus narinari* esta listada na Lista vermelha da União de Conservação Mundial como Criticamente Ameaçada (Kyne *et al.*, 1996). Por volta de 1914, pesquisadores reconheceram uma quantidade considerável de plasticidade fenotípica entre indivíduos de diferentes áreas geográficas, dentre elas, o padrão de colorações de dorso (Gudger, 1914). Atualmente a espécie é considerada cosmopolita ao longo de águas mornas a temperadas (Campagno & Last, 1999), sendo reconhecida atualmente como um complexo de espécies (White *et al.*, 2013);

Estudos realizados nos últimos anos tem confirmado a presença de espécies crípticas dentro de *A. narinari*, desde a proposição de pelo menos duas espécies (Richards *et al.*, 2009), até mais de três (Schluessel *et al.*, 2010). Fato interessante é que ate o momento, as populações de *A. narinari* do Atlântico Sul Ocidental, região onde a espécie é frequentemente encontrada, desde a região norte do Brasil (Carmona *et al.*, 2008) passando pela região nordeste (Nunes *et al.*, 2005) e região sudeste do Atlântico Sul Ocidental (Monteiro-Neto, 2008) não foram alvo de investigações taxonômicas ou moleculares as quais poderiam elucidar se nesta região, existe a presença ou não de espécies crípticas dentro das populações de *A. narinari* na região Sul do Atlântico Ocidental. Nestas regiões, a presença de *A. narinari* se dá apenas por capturas acidentais em currais de peixe, entretanto, a carne desta espécie é bastante apreciada pelos pescadores, sendo popularmente conhecida como arraia pintada ou chita (Pinheiro & Frédou, 2004; Nunes *et al.*, 2005; Carmona, 2008).

Devido a toda a problemática a qual esta espécie possuiu, assim como outras populações de elasmobrânquios, como baixo índice de neonatos, alto tempo de maturação sexual e crescimento esta espécie está incluída na lista vermelha de espécies ameaçadas da IUCN de extinção tendo atualmente o status de criticamente ameaçada, ou seja, estando a apenas uma classificação de ser considerada extinta em seu ambiente natural pela IUCN (IUCN 2006; 2007).

1.4 As principais ameaças a conservação e diversidade das espécies de elasmobrânquios.

No Brasil, a produção pesqueira anual de elasmobrânquios estabilizou-se em torno de 30.000 toneladas anuais nas décadas de 80 e 90 pesca (Boeckmann, 1996) onde a região norte do Brasil concentra uma grande parte dos desembarques de elasmobrânquios. Para o ano de 2005, um total de 6.590 toneladas foram desembarcadas na região, onde mais de 90% destas capturas foram realizadas por pequenas embarcações artesanais (MMA-IBAMA, 2004). Entretanto, a estimativa de quais espécies são as espécies mais exploradas comercialmente ainda permanece não elucidada, devido a alguns fatores.

Inicialmente, os elasmobrânquios não são o alvo direto da pesca, sendo capturados como fauna acompanhante, principalmente das pescarias de atum (*Thunnus albacares*), serra (*Scomberomorus brasiliensis*) e o pargo vermelho (*Lutjanus purpureos*) (Elias, 2004). Adicionalmente, a identificação das espécies capturadas não é realizada. No caso dos tubarões, os indivíduos são processados logo após a captura, tendo suas barbatanas removidas ainda vivos, onde estas tem como principal destino mercados asiáticos (Szpilman, 2004). Neste contexto, tubarões e arraias têm interesses diferentes dentro das pescarias tanto nos mercados mundiais quanto nos mercados regionais como na região norte do Brasil.

Raias são recursos pesqueiros com distribuição mundial, predominantemente marinho e habitante de águas tropicais. McEachran & Carvalho (2002), reportam para o Atlântico Ocidental 11 famílias de raias, divididas em 31 gêneros e 74 espécies. Para o estado do Pará, foram desembarcadas 1.242 toneladas de arraias marinhas e estuarinas no ano de 2005, sendo nove toneladas oriundas da pesca industrial e 1.233 da pesca artesanal, compreendendo várias espécies das famílias Rajidae, Rhinobatidae, Myliobatidae, Gymnuridae, Narcinidae e Dasyatidae (ESTATPESCA, 2006). Esta falta de detalhamento taxonômico decorre possivelmente do fato destes peixes chegarem aos portos de desembarque já processados, sem cabeça e cauda, dificultando assim uma identificação precisa.

Diferentemente dos tubarões, não existe pescarias direcionadas a espécies de arraias. Entretanto, mesmo assim, algumas espécies são alvo de pesca esportiva, ou vítimas de redes de arrasto de fundo para pesca de camarão, sendo considerada fauna acompanhante e descartadas depois de já estarem mortas nas redes (Lessa, 1986; Nunes *et al.*, 2005). Nesta vertente, algumas espécies de raias marinhas estão criticamente ameaçadas de extinção como o peixe serra ou espadarte (*Pristis perotteti*), a qual ocupa o ranking de umas das espécies de elasmobrânquios mais ameaçadas devido a captura acidental e perda de hábitat (Burgess *et*

al., 2009), sendo listada pela IUCN como criticamente ameaçada (CR) A2abcd (Charvet-Almeida *et al.*, 2007).

Sua captura e comercialização é proibida em vários países ao redor do mundo, onde no Brasil, esta proibição ocorre desde 2004. Entretanto, esta espécie continua sendo comercializada de diferentes formas, seja apenas o rostrum, vendido como troféu principalmente para os mercados asiáticos, ou tendo suas barbatanas secas e salgadas também vendidas aos mercados asiáticos, atingindo altos valores de mercado (Feldheim *et al.*, 2010). Ao longo da costa norte do Brasil, a carne de *Pristis* é rotineiramente vendida fresca ou salgada na forma de files, sendo vendida sobre o nome genérico de cação, nome utilizado para se referir ao nome de várias espécies de elasmobranquios (Palmeira *et al.*, 2013).

Todas estas espécies são capturadas facilmente por várias artes de pesca ao redor do mundo (Vooren *et al.*, 2005; Costa & Chaves, 2006). No Brasil estas espécies são filetadas e vendidas em feiras, muitas vezes sendo referidas apenas como “raias ou arraias” ou vendidas sobre a alcunha de nomes extremamente regionais, que mudam de acordo com a região do litoral brasileiro (Carmona *et al.*, 2008).

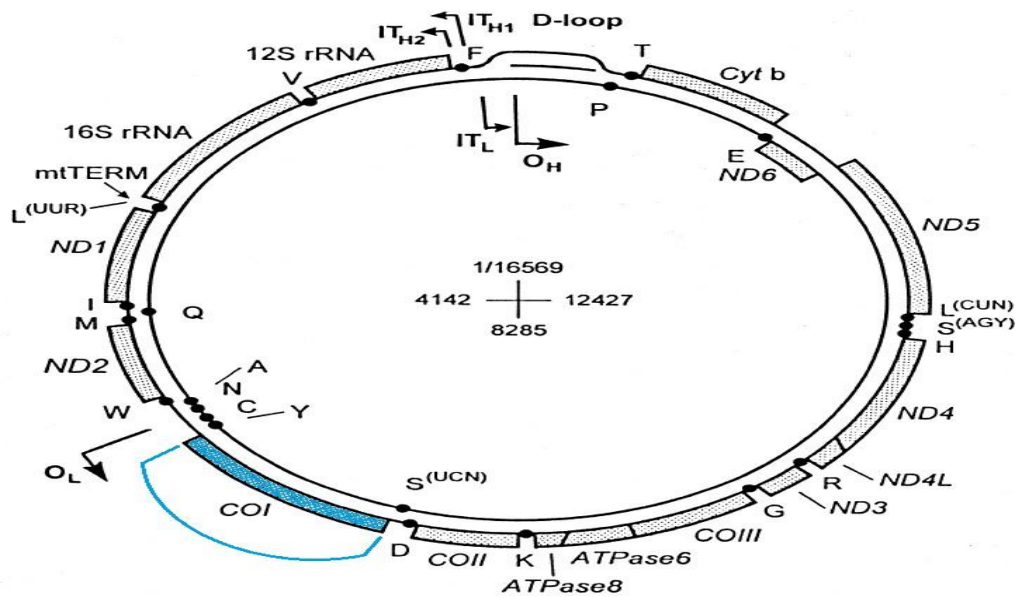
1.5 O código de barras de DNA (DNA *Barcoding*).

Apesar de o Brasil possuir um número significativo de taxonomistas, ainda existem grupos de espécies pouco estudadas, as quais podem apresentar espécies que não foram descritas e que precisam de identificação, o qual requer tempo, recursos e pessoas capacitadas para tal atividade. Por isso, a ampliação de estudos integrados com dados moleculares que possam facilitar o processo de identificação de espécies e resolver os problemas taxonômicos vem se intensificando ao longo do tempo (Silva, 2013).

Dentre as principais técnicas de identificação utilizadas neste sentido, está a identificação morfológica, principalmente usando caracteres merísticos. Entretanto muitas vezes um grupo específico pode apresentar ausência de caracteres morfológicos informativos para correta classificação das espécies, desta forma outras técnicas são necessárias para tal (Rocha, 2014). Pensando nisto a utilização de dados moleculares esta sendo essencial para facilitar a identificação de espécies (Herbert *et al.*, 2003). O DNA *barcoding* é um método rápido, eficiente e acessível globalmente para delimitar e identificar novas espécies (Herbert *et al.*, 2003; Ribeiro, 2006). O benefício da técnica de DNA *barcoding* abrange não somente estudos taxonômicos, mas também filogenéticos e de genética de populações (Silva, 2013).

A técnica de DNA *barcoding* utiliza o gene mitocondrial citocromo *c* oxidase subunidade I (COI), com um par de iniciadores universais para reação em cadeia da polimerase (PCR) amplificando aproximadamente 650 pares de base (bp) do gene COI (Figura 2). Depois de sequenciada, esta região do espécime em questão pode ser comparada com outras sequências, como um código de barras de DNA, para se obter a identificação da mesma.

Figura 2: Mapa do genoma mitocondrial humano (16.569 bp) com destaque para o citocromo *c* oxidase subunidade I (Modificado de Taanman, 1999).



Fonte: Rocha (2014).

A sequência obtida de uma determinada espécie é armazenada em um banco de dados de vida online, o *Barcode of Life Data Systems* (BOLD) (Herbert *et al.*, 2003) ou então a plataforma GenBank disponível no endereço eletrônico (www.ncbi.nlm.nih.gov). Para reunir em uma biblioteca online todas as sequências de peixes obtidas com o *DNA barcoding*, criou-se o *Fish Barcode of Life Initiative* (FISH-BOL), um banco de dados que armazena as sequências, imagens, coordenadas geográficas e informações importantes dos espécimes analisados, facilitando a identificação de espécies para os usuários do mesmo (Rocha, 2014). Este banco de dados compara a sequência atual com a sua biblioteca, se caso a sequência tiver uma similaridade considerável podemos dizer que a espécie foi identificada, caso contrário podemos ter uma nova espécie. É importante destacar que o *DNA barcoding* emprega o conceito filogenético de espécies (Rocha, 2014).

Atualmente, existem várias ameaças as populações de elasmobrânquios, especialmente raias como *A. narinari*, devido a sua captura como fauna acompanhante nas pescarias de camarão ou outras espécies que utilizam redes de arrasto de fundo. Adicionalmente, a comercialização de indivíduos processados em feiras e mercados, muitas vezes impossibilita a correta identificação da espécie e conseqüentemente, a quantificação do esforço de pesca sobre a mesma, o que a médio longo prazo pode acarretar na extinção desta espécie em ambiente natural. Desta forma, o uso de uma ferramenta molecular se torna de suma importância para a correta identificação de indivíduos processados em feiras e mercados na região Sul do Atlântico Ocidental, região esta, a qual os estoques de *A. narinari* ainda não foram realizados uma investigação molecular, o que pode evidenciar tanto uma redução na variabilidade genética, como a presença de espécies crípticas ainda não descritas, fato ocorrido para outras regiões do mundo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Testar a efetividade da ferramenta de *DNA barcoding*, para identificação de indivíduos comercializados como raia pintada provenientes dos mercados da região norte e nordeste do Brasil.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Identificar geneticamente os indivíduos vendidos como raia pintada comercializados em mercados do norte e nordeste do Brasil;
- b) Inferir a existência de possíveis espécies crípticas de *Aetobatus narinari* no Atlântico Sul Ocidental;
- c) Verificar se existem mais de um estoque genético de *A. narinari* ao longo de sua área de ocorrência, baseado em dados moleculares.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostragem

Amostras de tecido muscular de *Aetobatus narinari* comercializadas como arraia pintada foram coletadas nas cidades de Bragança, estado do Pará e no município de Valença, Bahia (Figura 3).

Figura 3: Amostra de *A. narinari* coletada em Bragança-PA, vendida como arraia pintada.



Fonte: Autoria própria.

Adicionalmente, uma amostra coletada na cidade de Mazatlan, México foi adicionada ao banco de dados tanto no intuito da verificação da presença possível de espécies crípticas bem como de estoques genéticos diferentes na região do Atlântico Sul Ocidental em relação a outras localidades onde esta espécie está presente (Figura 4). Na cidade de Bragança também foi coletado um indivíduo inteiro da espécie, contendo todas as características morfológicas desta espécie, tendo tecido muscular retirado e incorporado no presente estudo. Este indivíduo servirá para comparação entre as sequências obtidas de indivíduos processados, utilizados no presente estudo. Também foi incorporado ao banco de dados, sequências disponíveis no Genbank, de espécies do gênero *Aetobatus* sequenciadas com o mesmo marcador do presente estudo.

Figura 4: Mapa de amostragem de *A. narinari* do presente estudo, com o respectivo número de indivíduos por localidade. Vermelho corresponde a Cidade de Bragança-PA, Azul a Cidade de Valença-BA e Verde a Cidade de Mazatlan-MX



Fonte: Autoria própria.

3.2 Extração de DNA, PCR e sequenciamento

O DNA foi isolado com a utilização do Kit Wizard Genomics DNA Purification (Promega Corporation, Madison, USA), seguindo-se o protocolo Mouse Tail. A partir da extração, foram realizadas as amplificações, através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) do gene Citocromo oxidase subunidade I – COI, utilizando os seguintes pares de *primers*: FishF1, 5'-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3' e FishR1, 5'-TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA-3' (Ward *et al.*, 2005). Os PCR's foram realizados com uma concentração final de 25 μ l contendo: 0.5 μ l de cada primer, 2 μ l de $MgCl_2$, 4 μ l de dNTP (1.25mM), 5.0 μ l de 5x buffer, 0.2 μ l de Taq polimerase (5U/ μ l) e o restante completado com água ultra pura.

As condições de amplificação dos PCR's foram as seguintes: 35 ciclos de desnaturação a 92°C por 1 minuto; anelamento de 52°C por 35 segundos; extensão a 72°C por 90 segundos e uma extensão final foi realizada a 72°C por 5 minutos. Para o sequenciamento dos fragmentos

obtidos, as PCR's foram previamente purificadas com a enzima ExoSAP-IT (Amersham Pharmacia Biotech Inc.), e as reações de sequenciamento realizadas com os reagentes do Kit BigDye (AppliedBiosystems) e então sequenciadas no sequenciador automático ABI 3500 (AppliedBiosystems).

3.3 Alinhamento de DNA e análises moleculares

As sequências obtidas foram alinhadas no programa BioEdit v.5.0.6 (Hall, 1999), através da ferramenta Clustal X (Thompson *et al.*, 1997). A divergência genética foi calculada através do modelo de substituição Kimura 2 parâmetros (K2P) (Kimura, 1980), no programa MEGA 5.0 (Tamura *et al.*, 2011). O critério de identificação foi estabelecido através da similaridade genética de pelo menos 95% de comparação entre as sequências obtidas e os bancos de dados utilizados. Uma árvore de agrupamento de vizinhos (NJ) (Saitou & Nei, 1987) foi construída no programa MEGA 5.0 (Tamura *et al.*, 2011) com o intuito de fornecer uma representação das divergências entre as amostras analisadas. O suporte para nós foi verificado através de 1.000 réplicas de *bootstrap* (Felsenstein, 1985). Distâncias genéticas foram calculadas no programa MEGA 5.0 (Tamura *et al.*, 2011), usando distâncias *p* não corrigidas.

4 RESULTADOS

Foram obtidos 658 pares de base do gene mitocondrial COI de todos os 15 indivíduos. Quando as sequências do presente estudo foram comparadas com as sequências presentes no site Genbank, o banco de dados resultante foi montado com 41 indivíduos, entre sequências no presente estudo + sequências de outras espécies do gênero *Aetobatus*. Inicialmente, todas as amostras coletadas no presente estudo comercializadas sobre o nome de “arraia pintada” foram identificadas geneticamente como *Aetobatus narinari* (Figura 5). As amostras coletadas no presente estudo foram agrupadas com sequências baixadas no Genbank provenientes da Flórida, Belize e Ilhas Cayman, todos provenientes do Oceano Atlântico, formando um grande clado com alto valor de suporte (99 de *bootstrap*). Curiosamente, dentre deste clado, um subclado foi formado com as amostras de Mazatlan do presente estudo e mais sequência proveniente do México, ambas provenientes do lado do Oceano Pacífico (Figura 5).

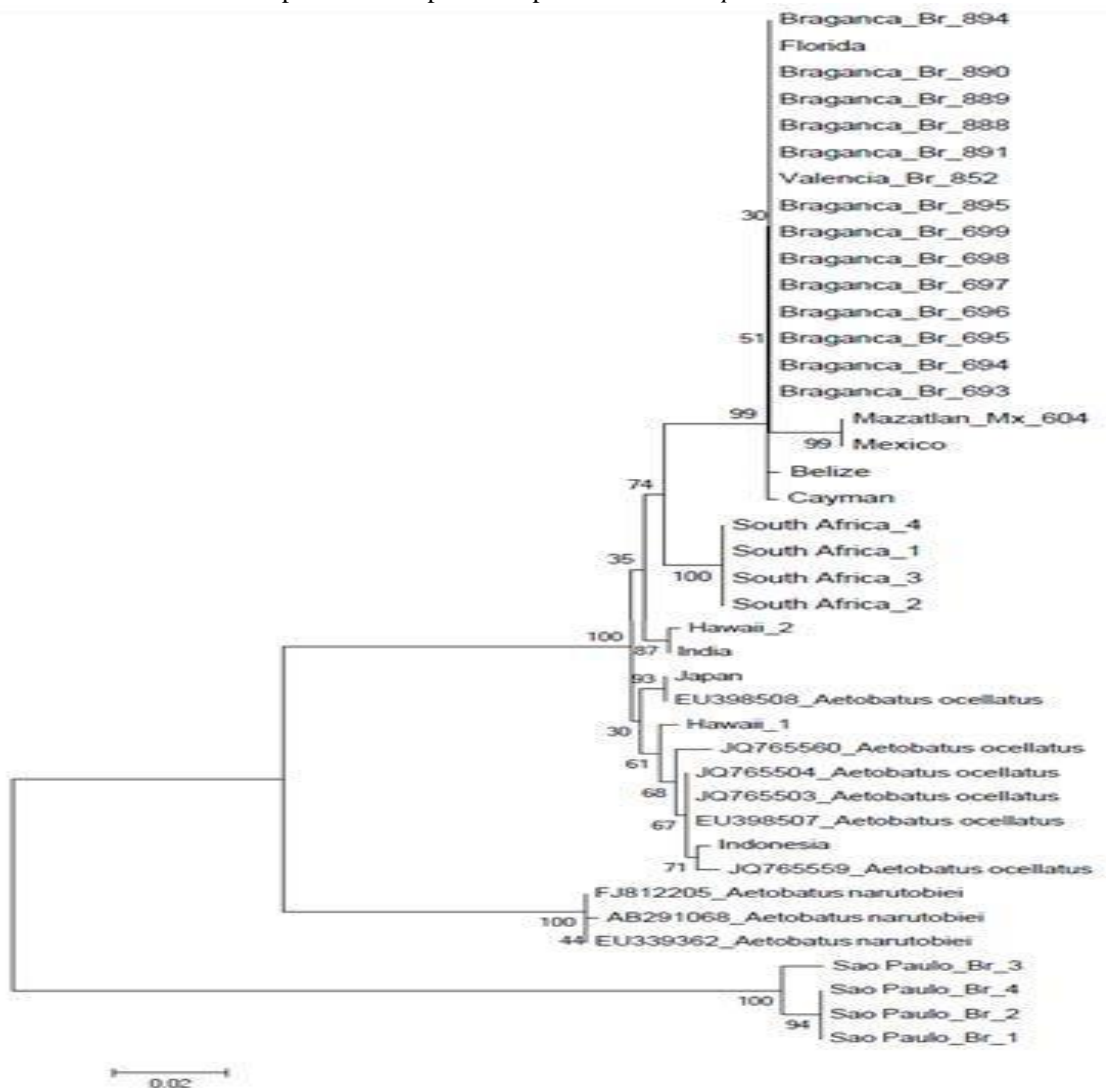
Adicionalmente ao agrupamento encontrado com as amostras do presente estudo, é possível perceber que, ao longo de sua distribuição mundial, *A. narinari* forma clados

diferenciados em outras regiões do mundo como África do Sul (100 de valor de suporte), e região asiática (Índia + Hawaii 2) Japão, Indonésia e Hawaii 1 (Figura 5). Curiosamente, *Aetobatus ocellatus*, foi recuperada na árvore filogenética dentro do grande clado formado por

A. narinari fazendo com que, tanto *A. narinari* quanto *A. ocellatus*, não sejam monofiléticas.

A. narutobiei, a espécie mais nova do gênero recentemente descrita foi recuperada como espécie irmã da clado formado por *A. narinari* + *A. ocellatus*. Outro fato que chama atenção é a posição das sequências de *A. narinari* provenientes de São Paulo. Elas foram geneticamente diferentes das sequências do presente estudo e das outras sequências da espécie retirados do Genebank. É possível perceber a formação ainda de dois subgrupos dentro das sequências de São Paulo, ambos fortemente suportados pelos valores de *bootstrap* (Figura 5).

Figura 5: Árvore filogenética de Agrupamento de vizinhos (NJ), baseado no modelo de Kimura 2 parâmetros. Valores da árvore representam as pseudo-réplicas de *bootstrap*



Fonte: Autoria própria.

As distâncias genéticas calculadas para os indivíduos do presente estudo confirmam o padrão observado na árvore filogenética de agrupamentos de vizinhos. A distância genética variou entre 0% ou seja, geneticamente idênticos, em relação aos indivíduos da Flórida até 27.9% em relação a uma sequência de *Aetobatus* proveniente do estado de São Paulo (Tabela 2). A divergência nucleotídica entre *A. narinari* (São Paulo) com relação às outras duas espécies do gênero variou bastante, onde entre *A. narinari* x *A. ocellatus* os níveis foram de 1.4 -3.6% enquanto que entre *A. narinari* x *A. narutobiei* os índices foram entre 12.4 – 13.8%. O destaque fica quando comparamos os valores interespecíficos de *A. narinari*. Como um todo, todas as sequências utilizadas no presente estudo foram muito diferentes geneticamente de indivíduos de São Paulo, tendo valores entre 25.5% (Indonésia X São Paulo 1, 2 e 4) até 27.9% (Cayman x São Paulo 3) (Tabela 2).

Tabela 2: Distância genéticas baseadas no modelo de Kimura 2 parâmetros dos indivíduos do gênero *Aetobatus* utilizados no presente estudo. Valores são demonstrados em porcentagem.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1-Norte/Nordeste	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Flórida	0.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3-Belize	0.2	0.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4-Cayman	0.2	0.2	0.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5-Africa do Sul	2.6	2.6	2.6	2.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6-Hawai_2	2.6	2.6	2.6	2.8	2.0	-	-	-	-	-	-	-	-
7-Índia	2.4	2.4	2.4	2.6	1.8	0.2	-	-	-	-	-	-	-
8-Japão	2.8	2.8	2.8	3.0	2.2	1.0	0.8	-	-	-	-	-	-
9-Hawai_1	3.0	3.0	3.0	3.2	2.4	1.2	1.0	1.0	-	-	-	-	-
10-Indonésia	3.6	3.6	3.6	3.8	3.0	1.8	1.0	1.6	1.0	-	-	-	-
11-Aetobatus ocellatus	3.4	3.4	3.4	3.6	2.8	1.6	1.6	1.8	1.6	1.4	-	-	-
12-Aetobatus narutobiei	13.6	13.6	13.6	13.8	12.0	13.0	13.0	12.4	12.8	12.8	13.0	-	-
13-São Paulo (1, 2 e 4)	26.7	26.7	26.7	26.9	26.9	25.9	25.6	25.5	25.9	25.5	25.5	24.4	-
14-São Paulo 3	27.7	27.7	27.7	27.9	27.9	27.6	26.3	25.6	25.9	25.6	26.3	24.7	1.4

Fonte: Autoria própria.

5 DISCUSSÃO

Com a ajuda do DNA *Barcoding*, foi confirmada a identificação da espécie *A. narinari* conhecida popularmente como arraia pintada. Os dados combinados do sequenciamento do gene mitocondrial COI, nos mostram uma relação interessante dentro do gênero *Aetobatus*. Inicialmente, todas as amostras coletadas no presente estudo foram geneticamente idênticas a sequências de indivíduos provenientes da Flórida, Cayman e Belize na região do Caribe, ou seja, todas no Atlântico Ocidental. Richards *et al.*, (2009) realizando uma análise filogeográfica de *A. narinari* coletadas ao redor do mundo, encontrou 3 linhagens genéticas para esta espécie. Pacífico Oeste/Central, Leste do Pacífico e Atlântico Central. As amostras do presente estudo, desta forma, se enquadram a linhagem do Atlântico Central.

Entretanto, este mesmo autor recomenda que a linhagem do Pacífico Oeste/Central seja considerada como uma espécie diferente das outras duas linhagens (Richards *et al.*, 2009). No presente estudo, tanto os valores de suporte de *bootstrap* obtidos pela árvore de NJ (100% de separação em relação aos indivíduos do Indo/Oeste Pacífico) quanto os níveis de divergência nucleotídica (mínimo de 2.6%) apoiam o resultado propostos por Richards *et al.*, (2009), indicando que as maiores divergências moleculares das amostras do presente estudo são em sequências destas regiões.

Schluessel *et al.*, (2010) realizaram uma inferência populacional com indivíduos de *A. narinari* da região Indo-Oeste do Pacífico para testar as teorias propostas por Richards *et al.*, (2009). Os autores encontraram não só, indícios que sustentaram os achados prévios como também novas sub-estruturas nesta região, indicando que provavelmente, existam mais de duas espécies crípticas dentro de *A. narinari* nesta região. Adicionalmente, estes padrões de alta diversidade genética indicam que possivelmente, o ancestral de *A. narinari* surgiu nesta região e posteriormente irradiou o Atlântico e Leste do Pacífico via África do Sul. Infelizmente os marcadores genéticos utilizados por Schluessel *et al.*, (2010) são diferentes do utilizado no presente estudo não podendo ser utilizadas a nível de comparação. Posteriormente, estes marcadores também poderão ser testados nas nossas amostras.

Outro fato interessante mostrado em nossos resultados foi a presença de *A. ocellatus* dentro dos clados formados pelas sequências de *A. narinari* do Oeste do Pacífico. Tendo em mente que esta espécie faz parte do complexo de espécies juntamente com, *A. narinari* e *A. latticeps* duas suposições são possíveis: a) provavelmente as sequências depositadas no Genbank como *A. ocellatus* foram identificadas erroneamente; b) As sequências do trabalho de Richards *et al.*, (2009) são na verdade *A. ocellatus*. Levando em consideração os valores de

suporte de *bootstrap* e divergências nucleotídicas, os dois cenários são possíveis. Entretanto, caso as sequências realmente pertençam a *A. ocellatus*, esta espécie juntamente com *A. narinari* não são espécies geneticamente monofiléticas de acordo com os resultados do presente estudo. Mais marcadores moleculares, além de revisões taxonômicas detalhadas são necessárias para a resolução destes resultados.

Todos estes indicativos da presença de espécies crípticas dentro do complexo de espécies de *A. narinari* levaram a recentes investigações dentro do grupo. Inicialmente, White & Moore, (2013) reescreveram *A. flagellum*, espécie que anteriormente apresentava uma ampla distribuição, ao longo do Indo-Oeste do Pacífico, do Golfo Pérsico até o Sul do Japão, teve distribuição limitando sua distribuição a regiões do Golfo Pérsico (Kuwait), Indonésia e Malásia. Levando em consideração dados morfológicos e moleculares, White *et al.*, (2013) descreveram uma nova espécie chamada *Aetobatus narutobiei*, sendo esta distribuída na porção mais asiática do Pacífico, tendo sido encontrada no Vietnã, Hong Kong, China, Coréia e Sul do Japão. As sequências depositadas no Genbank como *A. flagellum* são na verdade *A. narutobiei* e devido a isso, foram já identificadas desta forma no presente estudo (White comunicação pessoal). Este caso apenas reforça a presença de espécies crípticas dentro do complexo *A. narinari*.

No presente estudo, as sequências de *A. narinari* provenientes do litoral de São Paulo (Ribeiro *et al.*, 2012) depositadas no Genbank apresentaram níveis de divergências nucleotídicas muito superiores a média de divergência a nível de espécie (entre 24.4-27.9% contra 2.8-13.6% do restante das amostras). Segundo os autores, os 4 indivíduos foram coletadas na região do Guarujá, litoral do São Paulo, onde todas as características morfológicas foram condizentes com *A. narinari*. Infelizmente, segundo os mesmos, não existe mais tecido muscular que possa ser sequenciado novamente para obter mais informações a cerca dessa variação.

Das 4 amostras disponíveis no Genbank, houve a subdivisão molecular em 2 grupos, um composto pelas sequências 1, 2 e 4 e outro pela sequência 3 (Figura 1, tabela 2). Pelo nível de variação observado, aparentemente se tratam de uma espécie diferente de *A. narinari* que possui duas subpopulações na região. Este nível de divergência muito grande em relação às outras sequências também indica na árvore filogenética que esta espécie de São Paulo seria a mais ancestral dentro do gênero *Aetobatus*, com base nas sequências utilizadas no presente estudo. Novas coletas estão em andamento na região para obtenção de novas amostras (Sales, comunicação pessoal).

De acordo com Carmona (2005), em Bragança a espécie *Aetobatus narinari* é conhecida vulgarmente na região como arraia pintada ou xita. Sua identificação é muito fácil e a concordância entre a informação dos comerciantes e a análise de DNA é de 100%, é a única espécie descrita para a costa atlântica da América do Sul até o momento. Interessante é que tanto os indivíduos amostrados em Bragança, Valença e Mazatlan são prontamente conhecidos pelos pescadores pelo mesmo nome vulgar (Arraia Pintada) fato este incomum quando se trata de espécies de elasmobrânquios (Carmona, 2005; Rodrigues-Filho, 2008).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo a ferramenta de *DNA barcoding*, se mostrou eficiente na identificação da espécie conhecida como arraia pintada na região norte e nordeste do Brasil. A mesma foi identificada como a espécie *Aetobatus narinari* (Euphrasen, 1790), pertencente ao gênero *Aetobatus*, onde este espécie é a espécie tipo do gênero. Nossos dados também indicaram a possível presença de ao menos uma espécie críptica dentro de *A. narinari* na região do Atlântico Sul Ocidental, além de confirmar os resultados de estudos prévios da existência de mais de um estoque populacional desta espécie ao redor do mundo, onde os espécimes coletados no presente estudo fazem parte da população do Atlântico Central. Novos esforços morfológicos e genéticos devem ser realizados na tentativa de elucidar os resultados preliminares revelados pelo presente estudo.

REFERÊNCIAS

- BENSON, A.J.;MCFARLANE, G.A. & KING, J.R. 2001. A Phase “0” Review of Elasmobranch Biology, Fisheries, Assessment and Management. Fisheries and Oceans Canada. **Pacific Biological Station Nanaimo**, B. C. V9T6N7.
- BIGLOW, H.B. & SCHOROEDER, W.C. 1953. Sawfish, guitarfish, skates and rays. Fishes of the Western North Atlantic. Part 2. **Memmoir Sears Foundation for Marine Research**. Yale University: New Haven, 588p.
- BOECKMANN, C.E. 1996. **Dinâmica populacional e avaliação de estoques de cação-anjo, *Squatina guggenheim* Marini, 1936, e *Squatina occulta* Vooren & Silva, 1991, na plataforma continental do Sul do Brasil**. Dissertação de Mestrado. Rio Grande do Sul. Furg, 78p.
- BONFIL. 1994. **Overview of World Elasmobranch Fisheries**. FAO Fisheries Technical Paper No. 341. Rome.
- BURGESS, G.H.;CARVALHO, J. & IMHOFF, J.L. 2009. **An evaluation of the status of the largetooth sawfish, *Pristis perotteti*, based on historic and recente distribution and quantitative observations of abundance**. Internal report to National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA).
- CAMHI, M.;FOWLER, S.;MUSICK, J. & BRÄUTIGAN, F.S. 1998. Sharks and their relatives. Ecology and Conservation. Occas. **Paper of the IUCN Species Survival Commission**, 20: 39.
- CAMPAGNO, L.J.V. & LAST, S. 1999. FAO species catalogue. Vol. 4. Sharks of the world. An annotated and illustrated catalogue of shark species known to date. Part 2. Carcharhiniformes. **FAO Fish.Synop.** (125)Vol.4, Pt.2:251-655.
- CAMPAGNO, L.J.V. 2005. Checklist of Living Chondrichthtes. In: Hamlett, W. **Reproductive Biology and Phylogeny of Chondrichthyes: Sharks, skates and rays**. Ed. p. 503-548.
- CAPPETTA, H.;DUFFIN, C. & ZIDEK, J. 1993. Chondrichthyes. In: Benton, M. J. **The Fossil Record 2**. Ed. Chapman & Hall: London, p 593-609.
- CARMONA, N.P. 2005. **Filogenia Molecular de arraias da Costa Norte Brasileira**. Dissertação de Mestrado. Bragança. Universidade Federal do Para, Campus de Bragança, 90p.
- CARMONA, N.P.;SAMPAIO, I.;SANTOS S.;SOUZA, R.F.C. & SCHNEIDER, H. 2008. Identificação de arraias marinhas comerciais da costa norte brasileira com base em sequências de DNA mitocondrial. **Boletim Técnico-Científico do CEPNOR**, 8: 1-10.
- CHARVET-ALMEIDA, P.;FARIAS, V.;FURTADO, M.;COOK, S.V.;CAMPAGNO, L.J.V. & OETINGER, M.I. 2007. ***Pristis perotteti***. In: **IUCN 2011. IUCN Red List of threatened species. Version 2011.2**. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org>. Acessado em 30 de maio 2014.

COSTA, L. & CHAVES, P.T.C. 2006. Elasmobrânquios capturados pela pesca artesanal na costa sul do Paraná e norte de Santa Catarina, Brasil. **Biota Neotropica**, v6 (n3).

ELIAS, M.P. 2004. **Diagnóstico da pesca de elasmobrânquios oriundos da Costa Norte Brasileira e desembarcados nos portos da região Bragantina (Pará)**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Pará - Campus de Bragança.

ESTATPESCA. (2006). **Relatório final do Projeto de Monitoramento da Atividade Pesqueira no Litoral do Brasil**. Convênio SEAP/IBAMA/PROZEE Nº 109/2004 (Processo No. 00350.000749/2004-19).

FELDHEIM, K.A.;CHAPMAN, D.D.;SIMPENDORFER, C.A.;RICHARDS, V.P.;SHIVJI, M.S.;WILEY, T.R.;POULAKIS, G.R.;CARLSON, J.K.;ENG, R. & SAGARASE, S. 2010. Genetic tools to support the conservation of the endangered smalltooth sawfish, *Pristis pectinata*. **Conservation Genetics Resources**, **2**: 105-113.

FELSENSTEIN J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, **39**: 783-791.

FIGUEIREDO, J.L. 1977. Manual de Peixes Marinhos do Sudeste do Brasil: I. Introdução. Cações, raias e quimeras. **Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo**. São Paulo. 104p.

GADIG, O. 2001. **Tubarões da Costa Brasileira**. Tese de Doutorado. São Paulo. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro. 377p.

GUDGER, E.W. 1914. History of the spotted eagle ray, *Aetobatus narinari*, together with a study of its external structures. **Carnegie Inst. Washington**, 183: 241-323.

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

HEBERT, P.D.N.;CYWINSKA, A.;BALL, S.L. & DEWAARD, J.R 2003. Biological identification through DNA barcodes. Proceedinh of the Royal Society of London, Series B. **Biological Sciences**, **270**: 313-321.

IUCN (2006). (<http://www.iucn.org/themes/ssc/redlist2004/redlist2004.htm>), acessado em 25-05-2014.

IUCN (2007). (<http://www.iucn.org/themes/ssc/redlist2004/redlist2004.htm>), acessado em 25-05-2014.

KIMURA, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, **16**: 111-120.

KYNE, P.M.;ISHIHARA, H.;DUDLEY, S.F.J. & WHITE, W.T. 2006. *Aetobatus narinari*. **2007 IUCN red list of threatened species**. Available from: URL <http://www.iucnredlist.org>.

- LESSA, R.P.T. 1986. Levantamento faunístico dos elasmobrânquios (Piscis, Chondrichthyes) do litoral ocidental do Estado do Maranhão. **Bol. Lab. Hidrobiol**, **7**: 27-41.
- LESSA, R.;SANTANA, F.M.;RINCÓN, G.;GADIG, O.B. & EL-DEIR, A.C.A. 1999. **Biodiversidade de Elasmobrânquios no Brasil**. Ministério do Meio Ambiente. Projeto de Conservação e utilização da Diversidade Biológica Brasileira (PROBIO).
- MCEACHRAN, J.D. & CARVALHO, M.R. 2002. Batoid Fishes. In: Carpenter, K. E. The living marine resources of the western Central Atlantic. Introduction, mollusk's, crustaceans, hagfishes, sharks, batoid fishes and chimaeras. **FAO Species Identification Guide for Fisheries Purposes and American Society of Ichthyologists and Herpetologists Special Publication 5**: 508-530.
- MMA (Ministério do Meio Ambiente). Instrução Normativa n° 5, de 21 de Maio de 2004: Anexo I – **Lista Nacional de Espécies de Invertebrados Aquáticos e Peixes Ameaçadas de Extinção**. Diário Oficial da União – seção 1 n°102, sexta-feira, 28 de Maio de 2004.
- MONTEIRO-NETO, C.;TUBINO, R.A.;MORAES, L.E.S.;MENDONÇA NETO, J.P.;ESTEVES, G. & FORTES, W.L. 2008. Associações de peixes na região costeira de Itaipu. **Iheringia Série Zoologia**, **98**: 50-59.
- MOYLE, P.B & CECH, J.J. 2000. **Fishes: an introduction to ichthyology**. 4^a Ed. Prentice-Hall, New Jersey.
- NELSON, J.S. 1994. **Fishes of the World. Third Edition**. John Wiley & Sons Inc. 600p.
- NUNES, J.L.S.;ALMEIDA, Z.S. & PIORSKI, N.M. 2005. Raias Capturadas pela pesca artesanal em águas rasas do Maranhão-Brasil. **Arquivo Científico Marinhos de Fortaleza**, **38**: 49-54.
- PALMEIRA, C.A.M. 2009. **Identificação genética de arraias espadarte (*Pristis*) oriundas do desembarque no Pará**. Dissertação de Mestrado. Pará: Bragança. Universidade Federal do Pará, Campus de Bragança, 70p.
- PALMEIRA, C.A.M.;RODRIGUES-FILHOS, L.F.S.;SALES, J.B.L.;VALLINOTO, M.;SCHNEIDER, H. & SAMPAIO, I. 2013. Commercialization of a critically endangered species (largetooth sawfish, *Pristis perotteti*) in fish markets of northern Brazil: Authenticity by DNA analysis. **Food Control**, **34**: 249-252.
- PINHEIRO, L.A. & FRÉDOU, F.L. 2004. Caracterização geral da pesca industrial desembarcada no estado do Pará. **Ver. Científica de Universidade Federal do Pará**, **4**: 1-16.
- RIBEIRO, D.T. 2006. **História Evolutiva de espécies do gênero *Potamotrygon* Garman, 1877 (*Potamotrygonidae*) na Bacia Amazônica**. Dissertação de mestrado. Amazonas. Universidade Federal Amazonas, 146p.
- RIBEIRO, A.O.;CAIRES, R.A.;MARIGUELA, T.C.;PEREIRA, L.H.G.;HANNER, R. & OLIVEIRA, C. 2012. DNA barcodes identify marine fishes of São Paulo State, Brazil. **Molecular Ecology Resources**, **12**: 1012-1020.

- RICHARDS, V.P.;HENNING, M.;WITZEL, W. & SHIVJI, M. 2009. Species Delineation and Evolutionary History of the Globally Distributed Spotted Eagle Ray (*Aetobatus narinari*). **Journal of Heredity**, 100: 273-283.
- ROCHA, A.C.G. 2014. **Identificação Molecular (DNA Barcoding) de Peixes de Igarapés da Região Costeira do Nordeste Paraense**. Dissertação de mestrado. Pará: Bragança. Universidade Federal do Pará, Campus de Bragança, 68p.
- RODRIGUES-FILHO, L.F.S. 2008. **Identificação e Inferência Filogenética de Espécies de Tubarões da Costa Norte Brasileira e Variabilidade Genética da População da Espécie *Carcharhinus porosus***. Dissertação de mestrado. Pará: Bragança. Universidade Federal do Pará, Campus de Bragança, 98p.
- SAITOU, N & NEI, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstruction phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution** 4: 406-425.
- SCHLUESSEL, V. 2008. **Life history, population genetics and sensory biology of the white spotted eagle ray *Aetobatus narinari* (Euphrásen, 1790) with emphasis on the relative importance of olfaction**. Dissertação de Mestrado. The University of Queensland, Brisbane. 368p.
- SCHLUESSEL, V.;BRODERICK, D.;COLLIN, S.P. & OVENDEN, J.R. 2010. Evidence for extensive population structure in the White-spotted eagle ray within the Indo-Pacific inferred from mitochondrial gene sequences. **Journal of Zoology** 281: 46-55.
- SILVA, T.F.S. 2013. **Aplicação do Sistema de Código de Barras de DNA para avaliar a biodiversidade amazônica: uma análise com peixes da ordem *Gymnotiformes***. Trabalho de Conclusão de Curso. Pará: Bragança. Universidade Federal do Pará, Campus Bragança, 37p.
- SZPILMAN, M. 2004. **Tubarões no Brasil: guia prático de identificação**. Rio de Janeiro: Aqualittera e Manual Editora, 160p.
- TAANMAN, J.W. 1999. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and Replication. **Biochemical Biophys. Acta**, 1410: 103-123.
- TAMURA, K.;PETERSON, D.;PETERSON, N.;STECHEER, G.;NEI, M & KUMAR, S. 2011. **MEGA5: Molecular Evolutionary Genetic Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods**. *Molecular Biology and Evolution*.
- THOMPSON, J.D.;GIBSON, T.J.;PLEWNIAK, F.;JEANMOUGIN, F. & HIGGINS, D.G. 1997. The CLUSTALX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tool. **Nucleic Acids Research**, 24: 4876-4882.
- VOOREN, C.M.;KLIPPEL, S. & GALINA, A.B. 2005. Os elasmobrânquios das águas costeiras da Plataforma Sul. In: **Ações para conservação de tubarões e raias no sul do Brasil** (Vooren, C.M. & Klippel, S. Eds). Porto Alegre, Igaré, p. 113-120.

WARD, R.D.;ZEMPLAK, T.S.;INNES, B.H.;LAST, P.R. & HEBERT, P.D. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B. Biological Sciences*, 360: 1847-1857.

WHITE, W.T & MOORE, A.B.M. 2013. Redescription of *Aetobatus flagellum* (Block & Schneider, 1801), an endangered eagle ray (Myliobatoidea: Myliobatidae) from the Indo-West Pacific. *Zootaxa*, 3752: 199-213.

WHITE, W.T.;FURUMITSU, K. & YAMAGUCHI, A. 2013. A New Species of Eagle Ray *Aetobatus narutobiei* from the Northwest Pacific: An Example of the Critical Role Taxonomy Plays in Fisheries and Ecological Sciences. *PLOS ONE* 8: 83785.