



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE EDUCAÇÃO CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS AQUÁTICOS E PESCA

CAMILLA FERNANDA LIMA SODRÉ

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE TUBARÕES DO GÊNERO *Sphyrna* sp.
(ELASMOBRANCHII, CHONDRICHTHYES) DA COSTA DO MARANHÃO

SÃO LUÍS

2019

CAMILLA FERNANDA LIMA SODRÉ

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE TUBARÕES DO GÊNERO *Sphyrna* sp.
(ELASMOBRANCHII, CHONDRICHTHYES) DA COSTA DO MARANHÃO

Dissertação apresentada em cumprimento às exigências do Programa de Pós-Graduação em Recursos Aquáticos e Pesca, da Universidade Estadual do Maranhão, para obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Ligia Tchaicka

Coorientadora: Profa. Dra. Raimunda Fortes

São Luís

2019

Sodré, Camilla Fernanda Lima.

Identificação molecular de tubarões do gênero *Sphyrna* sp. (*Elasmobranchii*, *Chondrichthyes*) da costa do Maranhão / Camilla Fernanda Lima Sodré. – São Luís, 2019.

... 43 f

Dissertação (Mestrado) – Curso de Recursos Aquáticos e Pesca, Universidade Estadual do Maranhão, 2019.

Orientador: Profa. Dra. Lígia Tchaika.

Co-orientadora: Profa. Dra. Raimunda Fortes.

1.Elasmobrânquios. 2.*Sphyrnidae*. 3.Identificação. 4.COI. I.Título

CDU: 639.2.053.3:597.3(812.1)

Elaborado por Giselle Frazão Tavares- CRB 13/665

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE TUBARÕES DO GÊNERO *Sphyrna* sp.
(ELASMOBRANCHII, CHONDRICHTHYES) DA COSTA DO MARANHÃO

Dissertação apresentada em cumprimento às exigências do Programa de Pós-Graduação em Recursos Aquáticos e Pesca, da Universidade Estadual do Maranhão, para obtenção do grau de Mestre.

Aprovada: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Profa. Dra. Ligia Tchaicka - Orientadora
Universidade Estadual do Maranhão –UEMA

Profa. Dra. Zafira Da Silva De Almeida - UEMA

1ª Examinadora

Profa. Dra. Ligia Almeida Pereira – Membro externo

2ª Examinadora

RESUMO

Os tubarões do gênero *Sphyrna* estão globalmente sob intensa exploração pesqueira e são classificados, segundo a IUCN, como espécie em risco de extinção. Na costa Norte do Brasil, essa família tem grande expressividade em desembarques pesqueiros. Estudos realizados citam a ocorrência de quatro espécies de *Sphyrna* para essa região, sendo duas costeiro-oceânicas (*Sphyrna lewini* e *Sphyrna mokarran*) e duas de pequeno porte costeiro-estuarinas (*Sphyrna tiburo* e *Sphyrna tudes*). Porém, devido a dificuldade de identificação específica quando desembarcado, uma vez que são processados como “cartucho”, a maior parte dos registros apenas relatam o gênero *Sphyrna*. Para avaliar a efetividade do DNA barcode e de fragmentos do gene ITS2 na identificação de espécies de tubarão-martelo, bem como determinar quais espécies são mais frequentemente capturadas, empregamos estas ferramentas moleculares na identificação de amostras de tecido muscular adquiridos nos principais portos pesqueiros. Após a extração e amplificação do DNA, sequenciamos o gene mitocondrial citocromo oxidase sub unidade I (COI) e comparamos estas sequências com as disponíveis no Barcode of Life Database (BOLD) e NCBI GenBank. Foram obtidas 46 sequências, indicando a ocorrência de *Sphyrna mokarran* (67%), *Sphyrna lewini* (15%), *Sphyrna tudes* (3%) e *Sphyrna tiburo* (15%), listadas como espécies ameaçadas de extinção pela UICN e protegidas legalmente pela Portaria 445/2014 (Em perigo/Criticamente em Perigo). A análise filogenética utilizando COI revelou clados bem apoiados para cada uma das quatro espécies descritas para a costa norte do MA. Para *Sphyrna lewini* e para *Sphyrna tiburo* observou-se estruturação genética intra-específica. Para o gene ITS2, empregamos o protocolo de Ambiercrombie (2005), porém, sugerimos a otimização da técnica através da utilização de novos primers. Podemos afirmar que o DNA barcoding é uma ferramenta de identificação eficiente e precisa para espécies de *Sphyrna*. Dessa forma, a identificação molecular pode contribuir para fiscalização, controle e monitoramento da pesca da costa norte do Maranhão.

Palavras- chaves : Elasmobrânquios; Sphyrnidae ; identificação; COI

ABSTRAT

The Sphyrna are globally under intense fishing exploitation and are classified, according to the IUCN, as species at risk of extinction. In the north coast of Brazil, this family has great expressiveness in fishing landings, in studies carried out they mention the occurrence of four species of *Sphyrna* for this region, being two coastal-oceanic (*Sphyrna lewini* and *Sphyrna mokarran*) and two small coastal-estuarine (*Sphyrna tiburo* and *Sphyrna tudes*). However, due to the difficulty of specific identification when landed, because they are processed as "cartridge", most of the records only report the genus *Sphyrna*. To assess the effectiveness of DNA barcode and ITS2 gene fragments in identifying hammerhead shark species, as well as determining which species are most frequently captured, we employ these molecular tools to identify muscle tissue samples acquired at major fishing ports. After DNA extraction and amplification, we sequenced the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (COI) gene and compared these sequences to those available in the Barcode of Life Database (BOLD) and NCBI GenBank. A total of 46 sequences were obtained indicating *Sphyrna mokarran* (67%), *Sphyrna lewini* (15%) and *Sphyrna tudes* (3%) and *Sphyrna tiburo* (15%), both listed as endangered species by IUCN and legally protected by IUCN. Ordinance 445/2014 (Endangered / Critically Endangered). Phylogenetic analysis using IOC revealed well supported clades for each of the four species described for the north coast of the MA. For *Sphyrna lewini* and for *Sphyrna tiburo* it was observed intra-specific genetic structuring. For the ITS2 gene, we used the Ambiercrombie protocol (2005), however, we suggest the optimization of the technique through the use of new primers. We can state that DNA barcoding is an efficient and accurate identification tool for *Sphyrna* species. Thus, molecular identification can contribute to control, control and monitoring of the fishing of the northern coast of Maranhão.

Keywords: Elasmobranch; Sphyrnidae; identification; PCR-multiple

AGRADECIMENTO

Chego ao fim de mais uma etapa, olho para trás e vejo que seria impossível percorrer este caminho se não fosse pela ajuda de inúmeras pessoas. Tenho a plena certeza que sem a amizade, confiança, motivação, paciência, solidariedade, além do convívio com essas pessoas, esta trajetória de maneira alguma seria tão especial, proveitosa e enriquecedora como foi.

Agradeço primeiramente a Deus Pai pela minha vida e por não me deixar desistir, apersar das dificuldades e enfrentamentos. Agradeço a minha família, que foram fundamentais neste processo. Minha mãe, companheira e incentivadora (Eliane) e meu pai tão prestativo sempre, (José Sodré), pela ajuda em viagens de coleta com meu irmão (Camillo Sodré) e muitas idas durante a semana e alguns domingos no laboratório dos solos Labwik/ UEMA na companhia dos meus irmãos (Pedro Neto e José Pedro). Sempre pude contar para tudo, só não para pipeta.

Agradeço aos meus amigos por todo apoio nesses anos de mestrado, tentando me ajudar a fazer essa “genética funcionar”, nem que seja com uma palavra amiga (Ingrid Tayane). Ou então, seja indo ao lab. seja respondendo um milhão de mensagens no WhatsApp, perguntado sobre tudo, ne, amiga (Elidy Rayane) ?. Nosso clube da Luluzinha criado para disciplinas, que foi virando nossa segunda família (Denise e Rosana). Yraiana Fernanda, sempre ali par ajudar. Obrigada migs!

Ganhei muitos amigos durante a construção dessa pesquisa e, nessas várias idas e vindas aos diversos laboratórios. Porquê sem parceria , apoio e suporte técnico não seria possível essa realização. Primeiramente, as meninas do LABIMOL (Laboratório Biodiversidade Molecular), na pessoa de (Josy e Júlia), ao meu colega Márcio Leandro e Wagner, que já estavam no projeto iniciamente. Ao apoio técnico e disponibilidade do professor Ribamar, em colaborar com nossa pesquisa, cedendo espaço e equipamentos do LABWICK/ LAB.SOLOS(laboratório de Genética e Biologia Molecular Warwick Estevam Kerr), aos seus alunos e bolsistas (Diego e André). Ao suporte do LAPMOL(Laboratório de Patologia Molecular) por toda ajuda durante muitas fases da minha pesquisa (Danille, Hanna e Elizildo). Muito obrigada!

Agradeço a minha orientadora Dr^a. Ligia Tchaicka pela oportunidade , pelos ensinamentos e paciência durante esse tempo. A genética sempre foi um sonho, mas na prática do dia a dia, percebi quanto é difícil e necessário resiliência para não desistir de tentar e repetir e repetir... fazer o marcador funcionar e termos análise realizada.

Ao programa de Pós-Graduação em Recursos Aquáticos e Pesca, na pessoa da coordenadora Prof^a .Dr^a. Débora, por sua ajuda, paciência e adaptação aos prazos. A todos os docentes do programa, pela contribuição em minha formação. E nossa querida secretária (Hilanna) que é pau para toda obra, que foi uma das grandes amigas e presente que ganhei deste mestrado. Agradeço ao financiamento dessa pesquisa pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Maranhão (FAPEMA) e recursos da Fundação Boticário.

A todos que me ajudaram de alguma forma a chegar até aqui...

Gratidão !

*“A persistência é o menor
caminho do êxito.”*

(Charles Chaplin)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1. Biologia e Pesca de tubarões – martelos	11
2.2. <i>Sphyrna lewini</i> (Griffith e Smith, 1834).....	13
2.3. <i>Sphyrna mokarram</i> (Ruppel, 1837).....	15
2.4. <i>Sphyrna tiburo</i> (Linnaeus, 1758).....	16
2.5. <i>Sphyrna tudes</i> (Valenciennes, 1822).....	17
2.6. Marcadores moleculares	17
3. OBJETIVO.....	20
3.1. Objetivo Geral.....	20
3.2. Objetivos específicos.....	20
4. MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1. Área de estudo	20
4.2. Autorização Ambiental.....	21
4.3. Coleta de dados	22
4.4. Extração e Visualização do DNA Genômico.....	23
4.5. Amplificação do do DNA Mitocondrial (COI e PCR - Multiplex).....	23
4.6. Sequenciamento do DNA Mitocondrial (COI).....	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
5.1. Amostragem dos principais portos pesqueiros do Maranhão.....	25
5.2. Identificação das espécies de <i>Sphyrnas</i>	26
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	34
7. REFERÊNCIAS.....	35
8. APÊNDICE.....	41

1 INTRODUÇÃO

Os tubarões (Superordem Selachimorpha) exercem uma função chave para estruturação e o equilíbrio das cadeias alimentares de ecossistemas estuarinos, marinhos e oceânicos em todo planeta (DULVY et al., 2014; LIBRALATO ;CHRISTENSEN, 2005; MARTINS et al. 2018).

Esses animais desempenham um papel importante nos ecossistemas devido à sua posição como predadores de nível alto ou médio (DÍAZ -JAIME et al., 2016), além de serem um dos grupos mais antigos da natureza, com uma diversificação datada de 460 a 300 milhões de anos atrás (HEINICKE et al., 2009). Isso destaca a importância da diversidade e o valor dos estudos evolutivos sobre os tubarões, uma vez que muitas espécies são exploradas por seres humanos em todo o mundo (DULVY et al., 2014).

A sobrepesca tem um profundo impacto sobre os elasmobrânquios devido aos traços típicos da história de vida desses organismos (FEITOSA et al., 2018). Entre eles podemos destacar características biológicas e ecológicas que combinadas a longa vida útil, maturidade sexual tardia, baixa fecundidade e baixas taxas de mortalidade natural, podem resultar em condições críticas de vulnerabilidade (STEVENS et al., 2000; WALKER et al., 2005; MARTINS et al., 2018).

Nos últimos 60 anos, a captura de tubarão pela pesca industrial, artesanal e esportiva aumentaram em todo o mundo, levando a declínios significativos das populações (FALTA, 2006; FREIRE et al., 2015). Assim, os elasmobrânquios são considerados o grupo de peixes marinhos mais ameaçados do mundo (DAVIDSON, 2017).

O Brasil está entre os principais países que se destacam pela pesca de elasmobrânquios e figura como possivelmente o maior exportador de carne de tubarão do mundo (DENT ;CLARKE; DENT, 2015; BARRETO et al., 2017; FEITOSA et al., 2018). Atualmente, 33% da fauna de tubarão brasileira é incluída em alguma categoria de ameaça de extinção baseada em listas vermelhas nacionais e internacionais de espécies ameaçadas (BARRETO et al., 2017; FEITOSA et al., 2018) .

A colheita é feita principalmente com carcaças processadas sem cabeça e barbatanas, o que dificulta a identificação confiável de espécies e a aplicação da lei em

capturas ilegais (FEITOSA et al., 2018). Os tubarão-martelo, do gênero *Sphyrna*, estão entre os tubarões mais capturados devido à sua ampla distribuição e especialmente ao alto valor comercial de suas grandes barbatanas (BEZERRA, 2016).

Por esta razão estão classificados na International Union for Conservation of Nature and Natural Resources- IUCN como ameaçados de extinção, e pela Portaria 445/2014 do Ministério do Meio Ambiente (MMA) do Brasil, classificado como “Em perigo / Criticamente em Perigo” (MMA, 2014).

Durante as últimas três décadas foram desenvolvidos trabalhos sobre tubarões no estado do Maranhão, voltados à aspectos da biologia reprodutiva (LESSA ; ALMEIDA, 1999; LESSA, 1997); dinâmica populacional (ALMEIDA et al., 2011; ALMEIDA , 2008; BARRETO et al., 2016; LESSA et al., 1998; LESSA; ALMEIDA, 1999; LESSA; NÓBREGA, 2000; LESSA, 1986 ; LESSA ; ALMEIDA, 2009) cadeia produtiva e status de conservação (MARTINS et al. 2018).

Para a família Sphynidae, quatro espécies podem ser encontradas nesta região: *Sphyrna lewini*, *Sphyrna mokarran*, *Sphyrna tiburo*, *Sphyrna tudes* (LESSA; SANTANA; SOUZA, 1995; LESSA; ALMEIDA, 1999) porém, obter estimativas de pesca para cada espécie desse gênero é difícil, devido a dificuldade de identificação específica quando desembarcado processado como “cartucho”.

A identificação específica eficaz, para tubarões, tem sido relatada em diversos trabalhos utilizando marcadores moleculares. Nesse contexto, apenas os trabalhos de (SILVA, 2017; FEITOSA et al., 2018) realizaram estudos voltados para a identificação molecular de espécies de elasmobrânquios na Costa Norte Brasileira, incluindo um pequeno número de amostras para *Sphyrna* e não obtendo resultado conclusivo para todas as espécies do gênero com base em um único marcador molecular. Dessa forma, a padronização de um marcador molecular eficaz para *Sphyrna* pode contribuir com a obtenção de dados precisos para cada espécie do gênero, na Costa Norte Brasileira.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Biologia e pesca de tubarões- martelos

A forte demanda por barbatanas de tubarão é indiscutivelmente a principal causadora da mortalidade global de tubarões, com estimativas de entre 26 e 73 milhões

de tubarões mortos anualmente para abastecer os mercados (CLARKE et al., 2006; CHAPMAN et al., 2009). Além disso, a remoção de barbatanas dispende recursos, acelera o colapso de populações e nega os objetivos de conservação de espécies (CHUANG et al., 2016).

Embora a remoção de barbatanas de tubarão tenha sido proibida em muitos países (FLOWLER et al., 2005; CHUANG et al., 2016; MARTINS et al., 2018), a pesca ilegal de tubarões parece continuar (GRAHAM et al., 2010; CHUANG et al., 2016). Somente no Brasil, 200 mil toneladas de peixes cartilagosos (categoria não especificada de tubarões, raias e quimeras) foram desembarcados entre 2000 e 2011 (BARRETO et al., 2017).

Grande parte das capturas pesqueiras brasileiras são derivadas de operações artesanais (pequenas e médias embarcações com capacidade de armazenamento reduzida), que são tipicamente pouco sofisticadas e praticam técnicas de pesca predatória (BARRETO et al., 2017; MARTINS et al., 2018).

Entre 1970 e 1980, os elasmobrânquios eram mais de 60% do total capturado no Maranhão (LESSA, 1986), indicando a importância dos produtos de tubarão para a economia (FEITOSA et al., 2018).

Entre 1970 e meados da década de 2000, as barbatanas representavam o produto de tubarão mais rentável do estado, seguido pela carne (ALMEIDA et al., 2006; ALMEIDA, 2008; ALMEIDA et al., 2011). Desde 2010, esse padrão mudou lentamente (MARTINS et al., 2018).

Para reforçar a conservação de tubarões, a Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies da Fauna e da Flora Selvagens Ameaçadas de Extinção (CITES) acrescentou recentemente várias espécies de tubarões ao Anexo II para regulamentações do comércio internacional e as organizações regionais de gestão das pescas (ORGP) aplicaram as medidas anti-captura (CHUANG et al., 2016).

No Brasil, os esforços para garantir a conservação dos tubarões foram adotados na última década, como o estabelecimento de limites mínimos de tamanho, regulamentação das malhagens de redes e proibição de pescarias dirigidas de tubarões e práticas de finning (MARTINS et al., 2018). Com a portaria de nº 14, de 26 de Novembro de 2012, o Ministério do Meio Ambiente (MMA) tomou a ser obrigatório o

desembarque dos tubarões e raias com as nadadeiras naturalmente aderidas ao corpo. Apenas após os procedimentos de registro e fiscalização, as nadadeiras podem ser cortadas para envio ao comércio asiático.

Em 2014, o Ministério do Meio Ambiente (MMA) do Brasil publicou a portaria 445/2014 que proíbe a colheita de certas espécies de peixes, incluindo alguns elasmobrânquios (FEITOSA et al., 2018). Essa portaria classifica espécies de elasmobrânquios que habitam águas brasileiras nas seguintes categorias de ameaça de extinção: Extinta na natureza (EW), Criticamente ameaçada (CR), Em perigo (EN) e Vulnerável (VU). Todas as espécies listadas nesta portaria, exceto aquelas classificadas como VU, são protegidas sendo proibidas sua captura, transportar, armazenar, manusear, processar e comercializar (MARTINS et al. 2018).

Também foi desenvolvido um plano nacional de ação para a conservação de tubarões e arraias, conhecido como PAN- Tubarões (BRASIL, 2014). Espécies vulneráveis podem ser colhidas somente se a agência ambiental brasileira conceder autorização. Apesar disso é frequente em desembarques pesqueiros em todo Brasil (BARRETO et al., 2017).

Apesar da introdução de medidas de gestão, os dados das pescarias brasileiras são limitados, obsoletos e raramente consideram o contexto social e econômico dos pescadores (MARTINS et al., 2018).

2.2 *Sphyrna lewini* (Griffith & Smith, 1834)

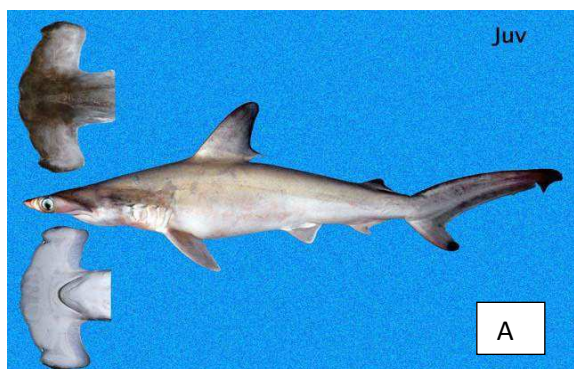
Os tubarões-martelo (família Sphyrnidae) são uma linhagem derivada de Carcharhiniformes, pertencem a família Sphyrnidae e gênero *Sphyrna*, sendo esse último composto atualmente por nove espécies (CAMPOS et al., 2011).

Entre estas, sete podem ser encontradas no oceano Atlântico Sul: *Sphyrna media* (Springer, 1940), *Sphyrna mokarran* (RÜPPELL, 1837), *Sphyrna tiburo* (LINNAEUS, 1758), *Sphyrna tudes* (VALENCIENNES, 1822), *Sphyrna zygaena* (LINNAEUS, 1758), *Sphyrna lewini* (GRIFFITH E SMITH, 1834) e espécie descrita recentemente *Sphyrna gilberti* (COMPAGNO et al., 2005; PINHAL et al., 2012; QUATTRO, DRIGGERS III, GRADY, ULRICH E ROBERTS, 2013).

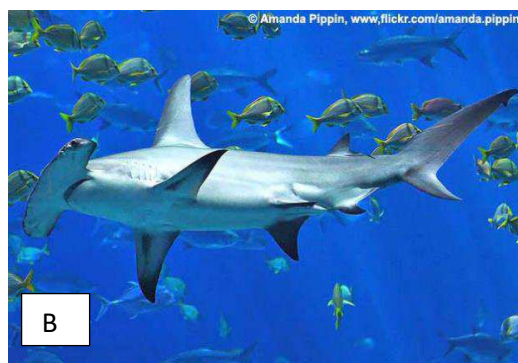
As espécies do gênero *Sphyrna* são facilmente distinguidas em decorrência da anatomia peculiar da sua cabeça, que é um atributo incomum às demais espécies de

tubarões. Os olhos e as fossas olfativas são situados nas extremidades laterais dessas extensões da cabeça (VOOREN et al., 2005). Essa posição dos olhos aumenta o campo de visão do animal, e a grande distância entre as fossas olfativas aumenta a capacidade de seguir rastros de cheiro na coluna d'água (VOOREN et al., 2005).

Figura 1. Imagem de *Sphyrna lewini* A, *Sphyrna mokarran* B, *Sphyrna tiburo* em C, *Sphyrna tudes* em D.



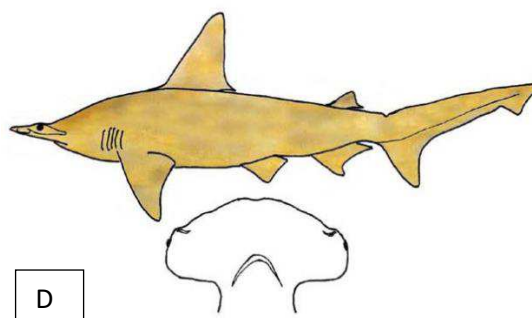
Fonte: : Ross Robertson



Fonte: Amanda Pippin



Fonte: Ross Robertson



Fonte: Ernesto Peña

O tubarão-martelo-recortado, *Sphyrna lewini* possui distribuição circungalbal em mares temperados e tropicais e dos oceanos Atlântico, Índico e Pacífico (COMPAGNO et al., 2005). É um dos mais valiosos recursos marinhos, e o preço pago por suas barbatanas no mercado asiático pode atingir mais de U\$ 100,00 dólares por kg. (KOTAS et al., 2006).

Denominado de panã branco no Maranhão, este tubarão são geralmente encontrados em profundidade a partir de 30 metros, sendo os adultos capturados com espinhel e jovens capturados incidentalmente com redes de emalhar (ALMEIDA et al., 2011).

Na costa Norte do Brasil, *S. lewini* é uma das poucas espécies com informações geradas sobre exploração, alimentação e reprodução, tendo sido verificado um declínio populacional nos últimos anos (PINHAL, 2010).

Este tubarão pode ser considerado como um recurso migratório e sazonal, que vem sendo capturado como fauna acompanhante (bycatch) por diversas artes de pesca na costa brasileira, e como uma das espécies-alvo das pescarias de emalhe e com espinhel de superfície (LESSA et al., 1999).

2.3 *Sphyrna mokarran*(Ruppel, 1837)

Considerada a maior dentre as espécies de tubarões-martelo, popularmente chamado de panã também pertence à família Sphyrnidae. *S.mokarran* é classificada como circunglobal, com ocorrência registrada em mares temperados, tropicais costeiros em oceanos Atlântico, Índico e Pacífico (COMPAGNO et al., 2005).

S.mokarran é distinguível de seus congêneres menores por uma grande barbatana dorsal em forma de foice e cefalofólio largo faltando um entalhe (HAMMERSCHLAG et al., 2011). Eles se reproduzem uma vez a cada 2 anos, o que o tornando vulnerável a rápida e excessiva exploração levando a declínios populacionais (STEVENS ELYLE 1989, DENHAM et al. 2010; HAMMERSCHLAG et al.. 2011).

Gadig (2001) sugere, então, que indivíduos de grande porte estejam restritos a águas mais profundas, enquanto neonatos e jovens utilizam áreas mais rasas, protegidas e que ofereçam condições ambientais para o recrutamento de uma determinada faixa da população.

Sendo uma espécie altamente migradora, a obtenção de dados usando métodos não invasivos que podem contribuir para a compreensão da história de vida de *S. mokarran* é muitas vezes difícil (O'CONNELL, E LEURS, 2016). Há baixo número de estudos sobre sua utilização do habitat e comportamento (ROEMER et al. 2016). Foram publicados três estudos de rastreamento de telemetria com foco no movimento desta espécie que determinaram grandes migrações (HAMMERSCHLAG et al., 2011b; GRAHAM et al., 2016; QUEIROZ et al., 2016). Hammerschlag et al.(2011) documentou sua extensão

para o Oceano Atlântico com base em um tubarão fêmea que migrou da Florida ao meio do Atlântico.

Queiroz et al. (2016) constataram que *S.mokarran* faz movimentos repetidos no Oceano Atlântico associado ao uso de zonas frontais, onde constitui-se alvo de pesca de espinhel comercial. Ainda há muito a aprender sobre o uso do habitat, especialmente em ambientes costeiros rasos.

2.4. *Sphyrna tiburo* (Linnaeus, 1758)

Este tubarão é denominado no Maranhão de sirizeira (ALMEIDA et al., 2011). É continuamente distribuído da Carolina do Norte, EUA, para sul do Brasil no oeste do Oceano Atlântico e do sul da Califórnia ao Equador no leste do Oceano Pacífico (CAMPOS et al., 2016). Populações fisicamente disjuntas também estão localizadas ao longo do ilhas do Arquipélago das Bahamas e do Caribe (COMPAGNO, 1984).

Compreende-se *S. tiburo* como uma única espécie amplamente distribuída, embora ocorra em sete principais barreiras à dispersão de peixes marinhos ao longo de sua distribuição (por exemplo, os Deltas do Mississipi e do Amazonas), limites filogeográficos (por exemplo, as bacias do Oceano Atlântico e do Golfo do México) e um limite físico (continente americano) (CAMPOS et al. 2016). A espécie alcançou esta ampla distribuição apesar da baixa dispersão individual, com muito poucos movimentos documentados(> 100 km) (KOHLE E TURNER, 2001; HEUPEL et al., 2006; KOHLER et al., 2013).

Silva (1987), em um estudo realizado na costa ocidental do Maranhão, relatou o comprimento máximo de 125 cm para os animais.O maior comprimento total estimado foi de 150cm (COMPAGNO, 1999),sendo que os maiores exemplares eram provenientes do Brasil com 130cm (ALMEIDA et al., 2011).

Apesar da pressão da pesca, esta é uma espécie abundante, com algumas das maiores taxas de crescimento populacional para tubarões, tornando-se muito menos susceptível às mudanças que a maioria das outras espécies de elasmobrânquios (ALMEIDA et al., 2011).

Embora as populações de *S. tiburo* tenham uma taxa intrínseca de aumento que deve ser capaz de suportar maior mortalidade por pesca do que muitos outros tubarões (WALKER, 1998), é necessário uma imagem clara da estrutura da população para garantir que sejam explorados de forma sustentável e uma perspectiva de gestão pesqueira (CAMPOS et al., 2016).

Naylor et al.(2012), discute em seu trabalho a possibilidade de especiação críptica, em *S. tiburo* coletados em Trinidad quando em comparação com 12 *S. tiburo* coletados ao longo da costa dos EUA no Golfo do México.

Lor et al. (2012) sugeriram que os indivíduos de Trinidad eram uma espécie distinta e provisoriamente chamou-lhes *S. cf. tiburo*. Escatel-Luna et al., (2015) mostraram que existe estrutura populacional genética nesta espécie entre os EUA Oceano Atlântico e Golfo do México e estrutura superficial no Golfo do México, mais não encontrou evidência de especiação críptica como sugerido por (NAYLOR et al., 2012).

Campos et al. (2016), sugerem evidência de especiação críptica, e que *S. tiburo* compreende um complexo de espécies e apóia pesquisas prévias indicando boa estrutura populacional, por meio de sequencias da Região Controle do Dna mitocondrial (1080 pb).

2.5. *Sphyrna tudes* (Valenciennes, 1822)

O panã amarelo é uma espécie de tubarão martelo, que se distribui no Atlântico do sudoeste da Venezuela até o Uruguai, assim como no Mar Mediterrâneo e no Pacífico Oriental (QUEIRÓZ E REBOUÇAS, 1995; COMPAGNO et al., 2005).

Em estudos realizados no Maranhão por Stride et al. (1992) demonstraram que os machos mediam entre 43 - 122cm de comprimento enquanto as fêmeas mediam entre 45 – 132 cm. A espécie é avaliada pela IUCN como vulnerável, devido seu habitat costeiro, sua capacidade de reprodução limitada, susceptibilidade para a captura e crescente pressão da pesca em toda a sua distribuição (ALMEIDA et al. 2011).

2.6. Marcadores moleculares

A identificação molecular de carne processada ou amostras sem partes do corpo de diagnóstico é uma ferramenta altamente eficaz para identificação de espécies, complementando a tradicional identificação morfológica (FEITOSA et al. 2018).

A biologia molecular tem gerado numerosas técnicas de acesso à variabilidade genética dentro e entre as populações, tanto através de polimorfismos de proteínas quanto de DNA (AVISE, 1994).

A técnica do DNA *barcoding*, também conhecido como código de barras de DNA consiste no uso de uma região do gene específico do DNA mitocondrial (mtDNA), o citocromo oxidase subunidade I (COI), para reconhecer espécies animais por comparação com sequências de referência validadas (FOTEDAR et al. 2019).

O conceito inovador de código de barras de DNA foi apresentado no ano de 2003 pelo professor Paul Hebert e colaboradores na University of Guelph, Canadá (HEBERT et al., 2003). Logo tornou-se uma ferramenta emergente na identificação de espécies constituindo-se uma das visões científicas mais importantes e populares da última década (SUBRATA et al., 2016).

Nesta técnica, são utilizados fragmentos de aproximadamente 690 bp (pares de bases) de COI obtidos com o uso de *primers* universais, permitindo uma avaliação rápida e reprodutível para identificação das espécies, tanto no campo quanto nos mercados consumidores (KOLMANN et al., 2017).

WARD et al., (2005) sequenciaram a região barcode de 61 espécies de tubarões e raias, e padronizaram essas regiões como marcadores para identificação de espécies. Posteriormente, WONG et al. (2009) expandiram essa análise e obtiveram sucesso na identificação de 20% de todos os elasmobrânquios conhecidos utilizando a região barcode.

O Consórcio para o Código de Barras da Vida (CBOL) foi criado para suportar o código de barras mundial do DNA e, subsequentemente, um sistema internacional de gerenciamento de dados on-line -o *Barcode of Life Data Systems*(<http://www.barcodinglife.org>) entrou em vigor (SUBRATA et al. 2016). Como resultado do crescente número de seqüências de COI no *BOLD* (Barcode of Life Database), o método de código de barras DNA é capaz de ser aplicado a um número crescente de espécies em todo o mundo (CARVALHO et al., 2015)

Outra técnica muito eficaz para os tubarões é a PCR multiplex que usa múltiplos primers buscando a amplificação de fragmentos diferenciais baseados em polimorfismos específicos de cada espécie (PINHAL, 2010). A utilização do multiplex,

em comparação com as outras técnicas, mostra-se uma ferramenta eficaz, mais rápida e barata.

Uma região genômica muito útil para identificação, utilizando o multiplex, é a região ITS que se refere ao Espaçador Interno do DNA ribossomal nuclear (MENEZES et al. 2010). O ITS é dividido em ITS1, localizado entre os gens 18S e o 5.8S, e o ITS2, que separa os genes 5.8S e 28S (HILLIS E DIXON, 1991; SCHLOTTERER et al., 1994). O ITS 2 é a região mais utilizada como marcador genético para identificação de tubarões (PANK et al. 2001).

Collins e Paskewitz (1996); Taylor e Bruns, (1999), utilizaram em seus estudos o locus do gene ITS que demonstrou ser altamente conservado dentro das espécies de tubarão, mas também suficientemente divergente para permitir a discriminação entre espécies estreitamente relacionadas.

Pank et al. (2001) aplicou a reação de PCR Multiplex para ITS2 com dois primers universais para tubarões (FISH5.8S-F e FISH28SR) e primers específico para espécie *Carcharhinus obscurus* e *Carcharhinus plumbeus*.

Shivji et al. (2002), utilizou múltiplos primers para identificar espécies tubarões de pescarias do Atlântico Norte. Baseando-se em diferenças do ITS2, utilizou os mesmos primers universais (FISH5.8S-F e FISH28SR) e outros seis primers específicos.

A identificação molecular por multiplex já foi utilizada para identificar espécies de tubarões processados com identificação incorreta, afetados pela pesca em muitos países (ABERCROMBIE et al. 2005; CLARKE et al. 2006; CHEN et al. 2015; RUCK et al. 2017) , incluindo o Brasil (RODRIGUES-FILHO et al. 2009; PINHAL et al. 2008; CARVALHO, CBV E FREITAS, 2013; MATINS et al. 2018; FEITOSA et al. 2018).

Utilizando o gene ITS 2,. Abercrombie et al. (2005), conseguiram identificar três espécies da família Sphyrnidae (*S. lewini* , *S. mokarran* e *S. zygaena*). Porém, sua utilização em *Sphyrna* restringiu-se a poucas amostras, com amostragem bastante localizada, e essa proposta não foi aplicada em nenhum trabalho posterior.

Em dois trabalhos recentes os tubarões pescados foram estudados na Costa Norte Brasileira através de marcadores moleculares. Feitosa et al. (2018), utilizaram sequências parciais do COI (Citocromo Oxidase Subunidade I) (515pb) e identificaram

duas ordens (Carcharhiniformes e Orectolobiformes), três famílias (Carcharhinidae, Sphyrnidae, Ginglymostomatidae), seis gêneros (*Carcharhinus*, *Galeocerdo*, *Ginglymostoma*, *Isogomphodon*, *Rhizoprionodon*, e *Sphyrna*) e 11 espécies, entre elas *Sphyrna mokarran*, *Sphyrna tudes* e *S. lewini*. Adicionando sequências de NDH2, o trabalho registrou também *S. tiburo*.

Silva (2017) identificou 14 espécies de ocorrência no Maranhão, das quais *Sphyrna tudes* e *Sphyrna mokarran* utilizando COI e *Sphyrna lewini* através do ITS2. Tanto este trabalho, quanto o de Feitosa et al (2018) incluíram poucas amostras de *Sphyrna* na análise molecular para a Costa Norte.

Hipótese

Um único marcador molecular pode identificar com precisão as quatro espécies de gênero *Sphyrna* pescados na Costa Maranhense.

3.OBJETIVO

3.1Objetivo geral: Identificar em nível específico as amostras do gênero *Sphyrna* coletadas na costa do Maranhão

3.2Objetivos específicos:

3.2.1 Verificar a efetividade do gene COI como *barcoding* para espécies do gênero *Sphyrna*.

3.2.2.Verificar a efetividade do uso de fragmentos do gene ITS2 para identificação de espécies do gênero *Sphyrna*. da Costa Maranhense

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área de Estudo

O litoral Norte do Brasil é um dos hotspots de conservação de elasmobrânquios do mundo (DULVY et al. 2014; FEITOSA et al., 2018). A extensão total da costa do Maranhão é conhecida como uma importante área de pesca e conservação de elasmobrânquios (BARRETO, 2017).

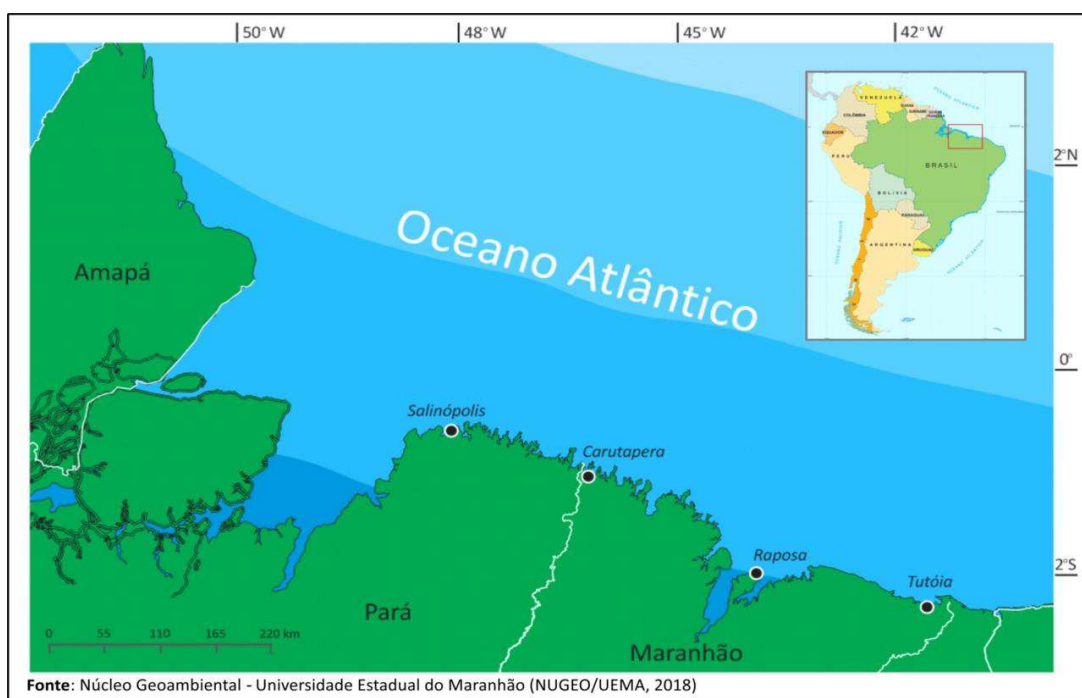
O Maranhão possui o segundo maior litoral do Brasil, estendendo-se por 640 km (MARTINS et al., 2018). A costa maranhense é reconhecida pela alta biomassa de

peixes, sendo destacada a diversidade de espécies de tubarões, proveniente da riqueza de nutrientes transportados pelos rios e pela ampla e recortada área de manguezais, o que resulta em abundância de recursos alimentares e alta produtividade na plataforma continental (NUNES; SANTOS, 2006).

As amostras de tubarão do gênero *Sphyrna* utilizadas para esse estudo foram obtidas por coletas realizadas em locais reconhecidos como centros de desembarques da pesca oceânica e costeira da Costa do Maranhão e Pará.

Os municípios com maiores taxas de capturas de tubarões foram selecionados como pontos amostrais para realização das coletas: Tutóia (área do delta do rio Parnaíba/costa leste), da Raposa (golfo do Maranhão), e Carutapera (costa oeste). Algumas amostras foram coletadas no estado do Pará (Salinópolis) e Amapá. Além de representarem pontos aproximadamente equidistantes e abrangerem as três regiões da costa maranhense, Litoral Ocidental, Golfão maranhense e Litoral Oriental.

Figura 2. Mapa dos locais de coleta de tecido de tubarões dos principais portos de desembarque pesqueiros da Costa Norte.



Fonte: Núcleo Geoambiental- UEMA, 2018.

4.2 Autorização Ambiental

A pesquisa possui Autorização Ambiental do Ministério do Meio Ambiente - MMA Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade –ICMBio por meio do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO. (Solicitação N°

48601 para atividades com finalidade científica Atividades da solicitação: Coleta/transporte de amostras biológicas in situ). Todas as amostras obtidas para este estudo são espécimes já pescados sem quaisquer violações às leis relativas à pesca de espécies ameaçadas de extinção.

4.3 Coleta de Dados

As coletas ocorreram durante período de Março de 2017 e Março de 2018, foram utilizados também dados pretéritos de materiais tombados anteriormente na Coleção de tecidos e DNA da fauna Maranhense (CoFauMA), ligada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Aquáticos e Pesca (PPGRAP/UEMA), coletas a partir de 2015.

Amostras de tecido de tubarões(n = 69) foram coletadas em mercados e barcos pesqueiros dos principais portos do Maranhão. As carcaças de tubarões desembarcadas nesses mercados são tipicamente decapitadas e evisceradas, conhecidas como “cartuchos” de difícil identificação. Obtidos de frota de pesca artesanal ou semi-industrial que operam com rede-de-espera, rede-de-arrasto ou espinhel-de-fundo. Em muitos casos essa embarcações vem pescando ao longo da costa e o porto de desembarque não corresponde ao local de origem ou ao ponto de coleta.

A identificação da amostra da coletada foi realizada de acordo com nome local informado pelo pescador e confirmado posteriormente com os resultados da análise molecular.

Figura 3. Tubarões processados nos principais portos pesqueiros da costa do Maranhão. (A e B) Carcaça desembarcada sem barbatana e (C) desembarque pesqueiro em Carutapera.



Fonte : Autora

Para extração de DNA foram retirado pequenos pedaços de tecido, utilizando material esterilizado e condicionados em eppendorfs, conservados em caixa térmica.

Todas as amostras obtidas, foram depositadas na CoFauMa , sendo fixadas em etanol 95% e estocadas em freezer -20°C até o momento do isolamento do material genético.

4.4 Extração e Visualização do DNA Genômico

O DNA total foi extraído utilizando Wizard Genomic DNA purification kit, seguindo o protocolo do fabricante . A visualização do DNA total extraído foi feita em gel de agarose a 1% corado com Gel Red .

4.5 Amplificação do DNA

A partir do material genético extraído, foram realizadas as amplificações das regiões genômicas: COI e ITS 2 utilizando dois primers universais e dois *primers* espécie -específico (ABERCROMBIE et al. 2005). Os primers utilizados estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Sequências e referências dos *primers* utilizados na amplificação dos fragmentos mitocondriais.

<i>Primers</i>	<i>Sequências</i>	<i>Referências</i>
Citocromo Oxidase I		
FISH F1 (forward)	5' TCA ACC AAC CAC AAA GAC ATT GGC AC	
FISH R1 (reverse)	5' TAG ACT TCT GGG TGG CCA AAG AAT CA	Geraghty et al. (2013)
Multiplex		
FISH5.8S-F (forward)	5'-TAGCGGTGGATCACTCGGCTCGT-3'	
FISH28SR (reverse)	5'TCCTCCGCTTAGTAATATGCTTAAATTCAGC-3'	Abercrombie et al. (2005).
GtHH123F (específico)	5'AGCAAAGAGCGTGGCTGGGGTTTCGA-3'	
ScHH401F (específico)	5'-GGTAAAGGATCCGCTTTGCTGGA-3'	

Fonte: Autora

A PCR foi feita em um volume final de 10µL, com os seguintes reagentes :utilizados 1µL de DNA, 8 µL de Master Mix e 0,5 µL de cada primer.Os parâmetros de amplificação de cada região mitocondrial encontram-se na tabela 2.

Tabela 2. Descrição dos ciclos de cada região mitocondrial amplificada na PCR.

<i>Primers</i>	<i>Ciclos</i>	<i>Inicial</i>	<i>Desnaturação</i>	<i>Anelamento</i>	<i>Extensão</i>	<i>Extensão Final</i>
COI	35	15 mint	95°C/15 s	55°C/30 s	72°C/1 min	72 ° C / 5mint
Multiplex	35	15 mint	94°C/1mint	65°C/1 min	72°C/ min	2 72 ° C / 5mint

Fonte: Autora

Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose a 1% corado com Gel Red. Além disso, foi inserido um controle negativo a fim de detectar possíveis contaminações.

4.6 Sequenciamento do Dna Mitocondrial (COI)

Após a amplificação, as amostras foram purificadas com PEG 20%. Foram sequenciado pelo método didesoxiterminal (SANGER; NICHLEN; COULSON, 1977), com reagentes do kit DYEnamic™™ dye terminator (MEGABACE™) (Amersham Biosciences UK), no seqüenciador automático MegaBACE 1000 (GE HealthCare).

As sequências foram corrigidas manualmente utilizando o programa MEGA 7.0 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016) e submetidas à plataforma BOLDSYSTEMS (<http://www.boldsystems.org/>) e ao NCBI GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) para verificar o nível de similaridade com as sequências disponíveis no banco de dados.

Para análise filogenética, foi utilizado o programa MEGA 7.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

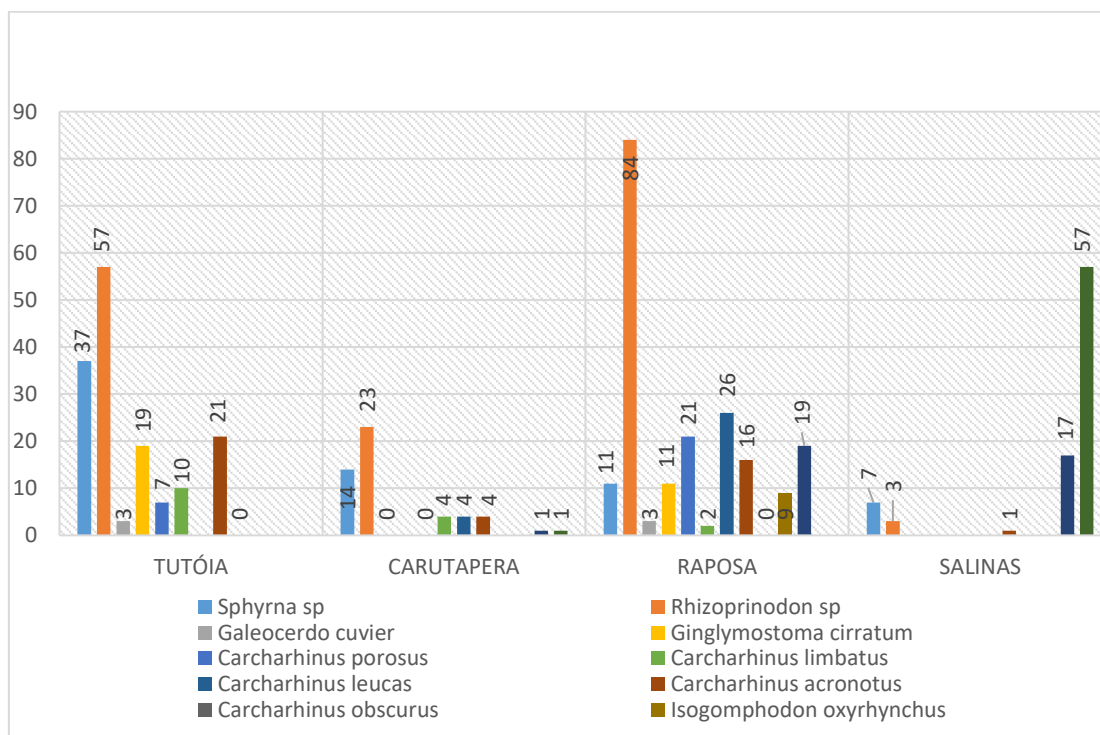
5.1 Amostragem dos principais portos pesqueiros do Maranhão

A Amostragem total obtida foi de 492 espécimes de tubarões coletados e tombados na CoFauMA, destes 77 indivíduos para o gênero *Sphyrna*. Podemos destacar também o gênero *Rhizoprionodon* n =167, com uma alta frequência na coleta, principalmente no porto da Raposa.

Para a maioria das pescarias do norte do Brasil, raias ou tubarões representam as capturas acessórias, principalmente durante a pesca de arrasto na plataforma continental, quando os alvos primários são camarões e outras espécies de peixes com valor comercial (GEMAQUE et al. 2017).

O gráfico a seguir representa o quantitativo de amostras que foram coletadas nos principais portos de desembarques na costa norte brasileira.

Gráfico 1 – Total de amostras coletadas e tombados na coleção COFAUMA de espécimes de tubarões desembarcados nos principais portos pesqueiros da costa norte brasileira.



Fonte: Autora

Para as espécies de *Sphyrna*, obtivemos dados de capturas em todos os pontos de coleta, com números mais representativos para Tutóia. Martins et al. (2018), em seu trabalho sobre a análise da cadeia de pesca e status de conservação de tubarões, também obteve em sua amostragem *Sphyrna* (Em Perigo e Criticamente em Perigo/ Portaria 445/ 2014), como um dos taxon mais frequentes nos desembarques pesqueiros do Maranhão.

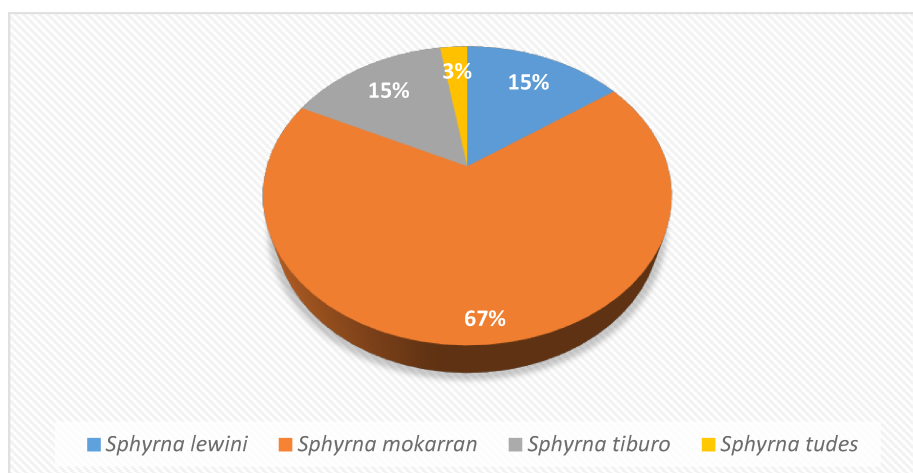
5.2 Identificação das espécies de *Sphyrna*

Dos espécimes do gênero que foram coletados, obtivemos boas ampliações para 24, e mais 22 sequencias foram incluídas a partir do trabalho de Feitosa et al. (2018), somando 46 sequencias para a Costa Norte brasileira. Este recorte amostral significa um mapeamento importante da ocorrência de quatro espécies de tubarão - martelos ameaçados de extinção mundialmente.

No trabalho de Feitosa et al. 2018 com espécimes desembarcados na costa do Maranhão, apenas três espécies de *Sphyrna* puderam ser confirmadas utilizando o gene COI (*S. lewini*, *S. mokarran* e *S.tudes*) e foi utilizado outro marcador NAH2, para identificação *Sphyrna tiburo*. Assim, este é o primeiro trabalho a identificar as quatro espécies de *Sphyrna* na Costa Norte Brasileira utilizando um único marcador molecular. Tal resultado pode ser atribuído ao aumento do depósito de sequencias em bancos de dados públicos, o que aumenta o potencial de uso das ferramentas moleculares.

A frequência de ocorrência de cada espécie em nossa amostragem está expressa no gráfico 2. A maior captura de espécies oceânicas pode estar relacionada ao interesse comercial devido ao tamanho de suas barbatanas (MARTINS et al. 2018).

Gráfico 2. Amostragem de seqüências obtidas para gene COI para identificação de espécies do gênero *Sphyrna* de ocorrência descrita para a Costa Norrte Brasileira.



Fonte: Autora

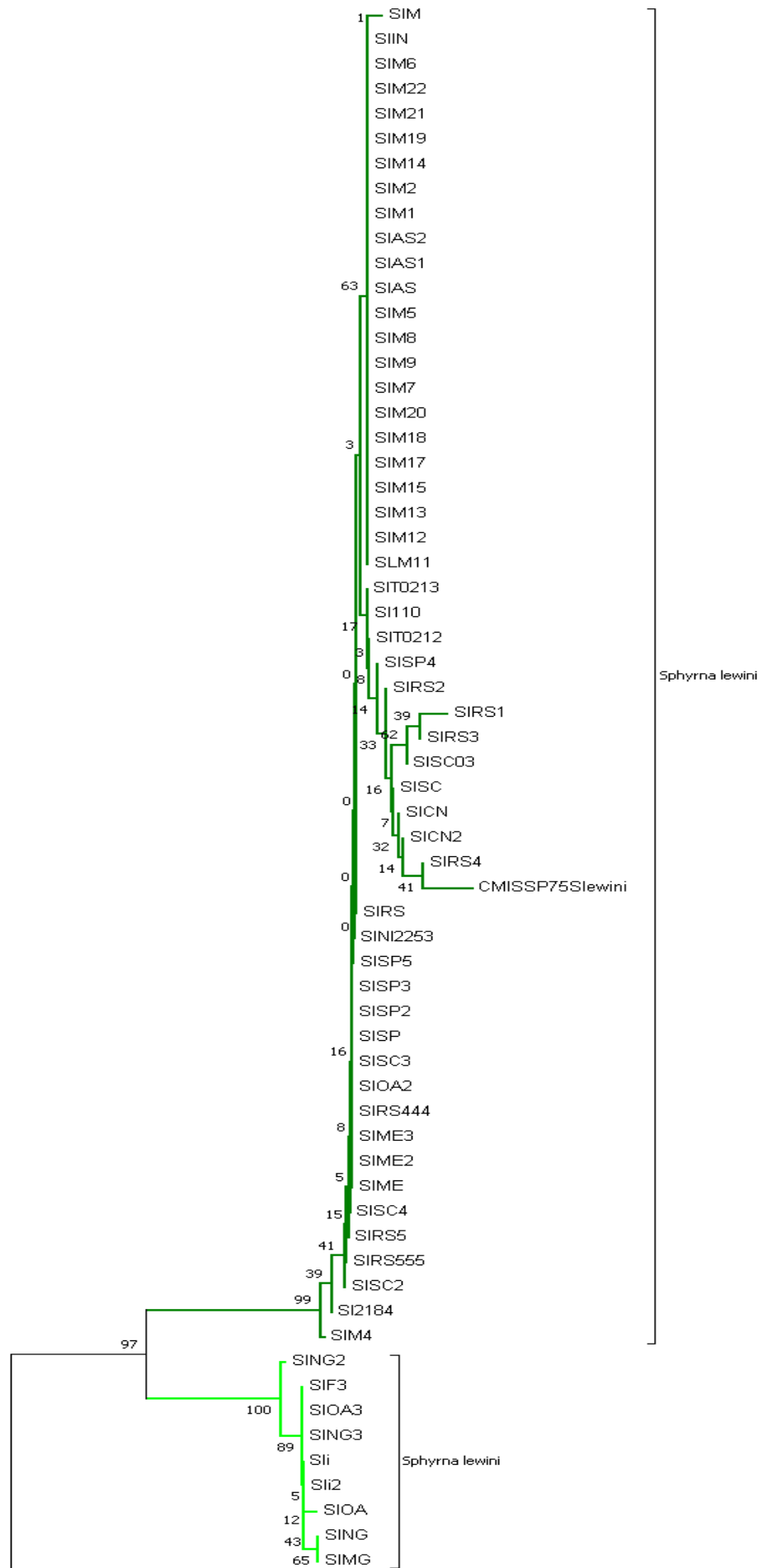
Obtivemos como espécie mais frequente nessa amostragem a espécie *Sphyrna mokarran*. Um resultado muito preocupante, pois os *S.mokarran* são altamente vulneráveis a qualquer pressão de pesca devido às suas características ecológicas, como reprodução e uso do habitat (DENHAM et al. 2010). Sua reprodução ocorre apenas uma vez a cada dois anos e tem áreas de uso maiores que as outras espécies de tubarão martelo (HAMMERSCHLAG et al. 2011; STEVENS e LYLE 1989, DENHAM et al. 2010).

A baixa frequência em nossa amostragem de *S. tiburo* e *S.tudes* é justificada por vários fatores, entre eles o de serem espécies costeiras estuarinas, locais não alvo da frota pesqueira que desembarca nos portos estudados, formada principalmente por desembarques da pesca oceânica. Lessa (1991) descreveu em seus estudos a ocorrência de *S. tiburo* e *S.tudes* na costa do Maranhão, capturados mais próximo ao estuário. Porém, não descartamos a baixa frequência nas coletas, com a possibilidade de declínio populacional desta espécies.

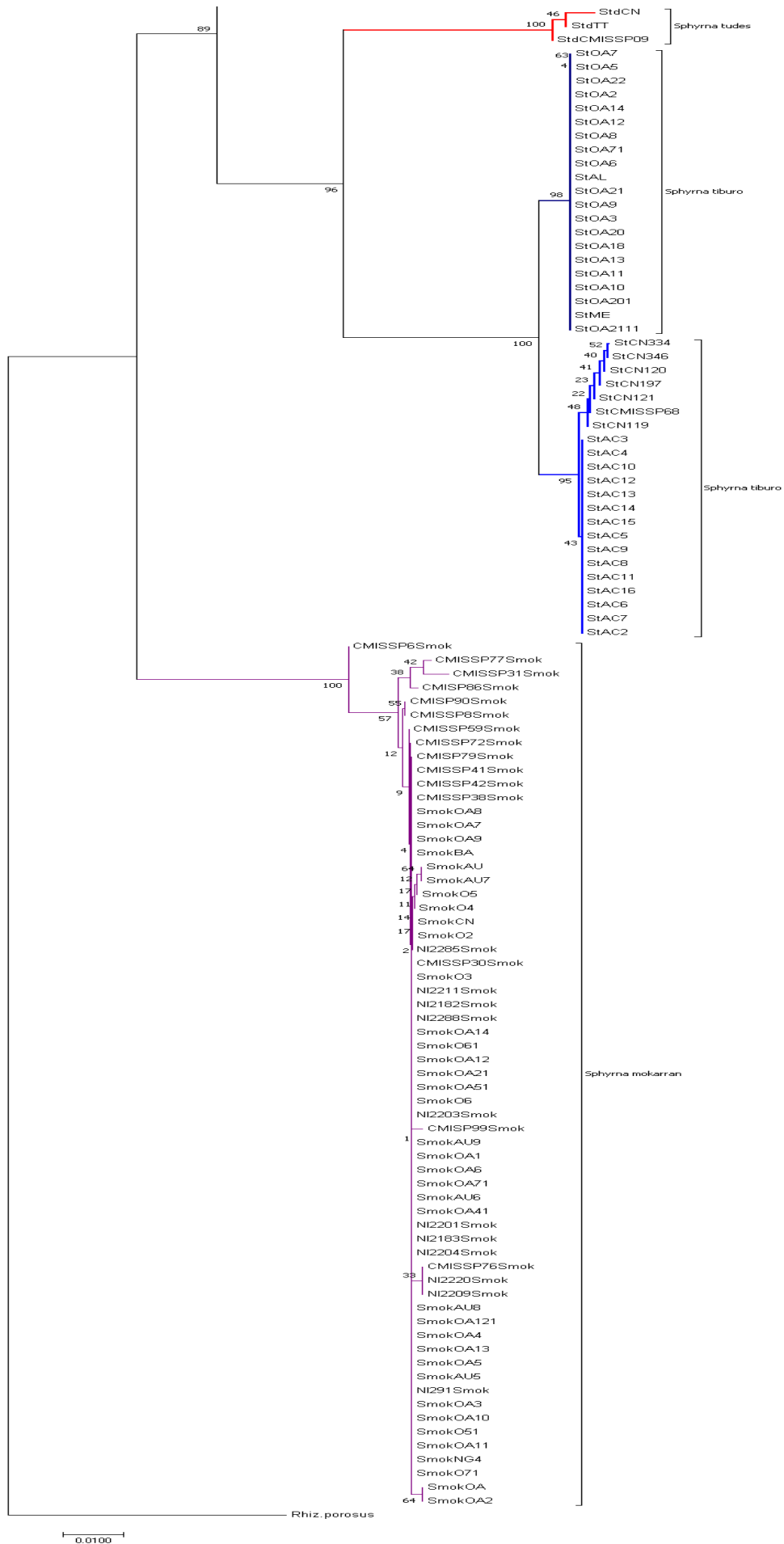
A presença de tantas espécies em risco de extinção em uma das mais importantes zonas de pesca e hotspots de preservação de elasmobrânquios é uma grande preocupação para garantir a conservação como para a sustentabilidade a longo prazo da pesca local (FEITOSA et al. 2018).

O COI codifica parte da enzima terminal da cadeia respiratória da mitocôndria. A variação dentro das espécies para este gene é baixa em comparação com variação entre espécies (WARD et al., 2005). Como critério de delimitação de espécies, precisa apresentar distâncias genéticas interespecíficas acima do limiar de 2% (HERBERT, 2003) e valores abaixo deste na variação intraespecífica.

Figura 4. Árvore filogenética inferida para *Sphyrna* usando o método Neighbor-Joining (Kimura 2 parametros). Os numeros acima dos ramos representam os valores de bootstrap.



Cont.



A árvore gerada mostra a formação de quatro grupos monofiléticos bem apoiados, representando as quatro espécies registradas. As distâncias genéticas entre estes grupos são da ordem de 7 a 10% (Tabela 4) e dentro dos grupos a maior distância foi de 1,18 % (para *S. lewini* – Tabela 3). Assim, o gene COI identificou com eficácia e confirmou a ocorrência das quatro espécies de *Sphyrna* descrita para a Costa Norte Brasileira, mostrando distâncias condizentes com as propostas para delimitação de espécies por barcode.

Para *S. lewini*, observa-se dois clados intraespecíficos, relacionados a diferentes regiões geográficas. Na cor verde clara observa-se o grupo formado por sequências provenientes de animais da Índia, Madagascar e África, enquanto que no outro clado são agrupados os animais da Costa brasileira (Norte até o Sul do Brasil) e leve estruturação em sequências do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo e nossas amostras da costa norte brasileira. No outro clado de *Sphyrnas lewini*, observamos uma outra linhagem distintas para sequências (Idonésia, Phylândia, Oceano Atlântico e Índia) representa na cor verde clara.

A existência de estruturação genética nessa espécie foi já indicada para o Atlântico Ocidental (três grupos distintos) pela análise da região controladora do DNAm (DUNCAN et al. 2006; CHAPMAN et al 2009; OVENDER et al. 2009) e para o Pacífico Oriental utilizando 15 loci de microssatélites (NANCE et al 2011).

O gene COI é mais conservado do que o gene do mtCR e os microssatélites, no entanto pode identificar padrões de estruturação genética em nosso estudo, em uma primeira análise em macro escala ao longo da distribuição da espécie. Estes padrões de estruturação devem-se provavelmente à filopatria das fêmeas já que são inexistentes as barreiras geográficas óbvias ao longo da área abordada no presente estudo e nos anteriores (CHAPMAN et al. 2009).

Segundo Kinney e Simpfendorfer 2008, as fêmeas indiscutivelmente são um grupo demográfico crítico para proteger para sustentar ou recuperar populações. Para a espécie *S.tiburo* observa-se a formação de dois clados intraespecíficos, no entanto, sem relação com a distribuição geográfica. Já para *S. mokarran* não observa-se a formação de agrupamentos dentro da espécie. Esses resultados são refletidos nos valores de distância genética observados dentro das espécies (Tabela 3), mais altos para *S. lewini* e

S. tiburo. Para estas, estudos futuros podem evidenciar a existência de diferentes linhagens evolutivas.

Tabela 3. Distâncias genéticas (K2P) entre indivíduos da mesma espécie de tubarões –martelos da costa norte brasileira com base nas seqüências gene COI.

Espécie	Distância
<i>S. lewini</i>	0,0118
<i>S.mokarran</i>	0.0055
<i>S.tiburo</i>	0.0067
<i>S.tudes</i>	0.000

Fonte:Autora

Tabela 4. Distâncias genéticas (K2P) entre espécies de tubarões –martelos da costa norte do Maranhão com base nas sequências gene COI.

Espécie	1	2	3	4
<i>S. lewini</i>	-	-	-	-
<i>S.mokarran</i>	0.1033	-	-	-
<i>S.tiburo</i>	0.1095	0.1103	-	-
<i>S.tudes</i>	0.0947	0.1191	0.0728	-

Fonte:Autora

Para a PCR multiplex do gene ITS2, não obtivemos o padrão de duplas bandas descrito no trabalho de Abercrombie et al., (2005), onde *S. lewini* apresenta uma banda espécie -específica de 792pb e *S. mokarran* uma de 455pb. Apenas obtivemos o padrão de banda universal para tubarões (1000pb) foi amplificada em nossas amostras.

Tal situação pode ocorrer quando há presença de polimorfismos em posições críticas para anelamento dos primers. Abercrombie et al. (2005) quando testam os referidos primers espécie – específico para *S. lewini* relatam que três amostras não puderam ser amplificadas e atribuem a uma nova linhagem evolutiva de tubarão-martelo de águas costeiras costa leste dos USA, compreendidas como uma linhagem diferenciada de *S.lewini*.

Da mesma forma, as amostras incluídas em nosso estudo podem representar uma linhagem diferenciada. Os produtos de ITS obtidos em nosso estudo foram sequenciados e não foram encontradas as regiões de anelamento dos primers utilizados, mostrando que os sítios de anelamento dos primers estão ausentes no genoma dos animais da costa norte brasileira. O sequenciamento de ITS, revelou, porém áreas de polimorfismo considerável entre as espécies e possibilitou o desenho de primers específicos para as quatro Sphyrna da Costa Norte (Tabela 5 e 6).

Tabela 5. Posições polimórficas entre os haplótipos do locus ITS para primers espécies- específicos de *Sphyrna lewini*, *S. mokarran*, *S.tiburo* e *S.tudes* para comparação com primers espécie específico proposto por Abercrombie et al.2005 e propostos neste estudo. Os diferentes haplótipos estão destacados e os sítios polimórficos apresentam-se na linha superior.

```

1111111111 1223333333 4444444444 4444455555 5555666666 777778]
2222345569 9380134899 0011234555 6778800124 4588113489 333670]
0347011513 5932585018 2429534346 6137867414 6707076269 067921]

#Sphyrna_tudes          CTCAGCGCTTTCCCGTGGCTCTTCAAGGTC TGCCGATCATTGCTTCTCTGCTC
#Sphyrna_tudes_2      .....G
#CMISSP9_ITS_S. tudes .CT.....CGT...T...G...TG...T..
#Sphyrna_tiburo       .C.....C...T.....GC.TC...C.....C...A.
#Sphyrna_tiburo_2     .C.....C...T.....GC.TC...C.....C...A.
#CMISSP29.S.mok_ITS   .CTTATTA.CA.A..GACT. .GC.C.TC.T .AT.A.CTG. ....T. GAT...
#Sphyrna_mokarran_02 ..CTTATTA.CA.A..GACT. .GC.C.TC.T .AT.A.CTG. ...A...T. GAT...
#Sphyrna_mokarran     ..CTTATTA.CA.A..GACT. .GC.C.TC.T .AT.A.CTG. ...A...T. GAT...
#Sphyrna_lewini_03    .TCT.....TA.C...CA..-C.--GT C.T..G..G. .AC...C..C .....
#CMISSP_28_ITS_S.lewini .TCT.....TA.C...CA..-C.--GT C.T..G..G. .AC...C..C ...-..

```

Fonte: Autora

Tabela 6. Sequências dos *primers* espécies- específicos de *Sphyrna lewini*, *S. mokarran*, *S.tiburo* e *S.tudes*. Propostos para locus ITS para espécies da costa do Maranhão.

<i>Primers</i>	<i>Sequencias</i>
<i>S.lewini</i> : CMLEW1	5` TGTGTGTCCAGTGCCTGT 3`
<i>S.lewini</i> : CMLEW2	5` CAGAGGGTCTGGCCTTCC 3`
<i>S.mokarran</i> : CMMOK	5` TGGGCCAGATCGTAT 3`
<i>S.tudes</i> : CMTUD	5` GTGGCTCCTCTCCAGGTA 3`
<i>S.tiburo</i> : CMTIB	5` CACTGGGTTTCCGTTACTGC 3`

Fonte: Autora

Os *primers* acima descrito deverão ser testados para sua validação como ferramenta de identificação molecular.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi confirmada a ocorrência das quatro espécies de *Sphyrna* descritas na literatura para a Costa Norte Brasileira e evidenciado que as espécies oceânicas do grupo *S. mokarran* e *S. lewini* foram capturadas com mais frequência em nosso estudo.

O DNA barcode apresentou eficiência para identificação das quatro espécies do gênero *Sphyrna* de ocorrência para costa norte do Brasil, comprovando que um único marcador genético pode ser utilizado com esse objetivo. Para obter um diagnóstico mais rápido e barato, propomos a validação de novos primers específicos para o ITS2. Dentre as espécies estudadas apenas *S. lewini* apresentou grupos geograficamente estruturados. Junto a *S. tiburo*, apresentam as maiores distâncias genéticas intraespecíficas.

7.REFERÊNCIAS

ABERCROMBIE, D. L.; CLARKE, S. C.; SHIVJI, M. S. Global-scale genetic identification of hammerhead sharks: Application to assessment of the international fin trade and law enforcement. **Conservation Genetics**, 2005.

ALMEIDA ZS, FRÉDOU FL, NUNES JLS, LESSA RP, P. A. Biodiversidade de elasmobrânquios. *In*: NUNES JLS, P. N. (Ed.). **Peixes marinhos e estuarinos do Maranhão**. São Luís: Editora Café e Lápis, 2011.

ALMEIDA ZA. Recursos pesqueiros marinhose estuários do Maranhão: Biologia, Tecnologia, Socioeconomia, Estado da Arte e Manejo. **Tese de doutorado**. Belém: Museu Emílio Goeldi; 2008.

Disponível em: <http://livros01.livrosgratis.com.br/cp094153.pdf/> Acesso: 12 de novembro de 2018).

ALMEIDA ZS, V. H. Distribuição e abundância de elasmobrânquios no litoral maranhense, Brasil. **Pesquisa em foco**, 2008.

ALMEIDA ZS, NUNES JLS, PAZ AC. Elasmobrânquios no Maranhão: Biologia, pesca e ocorrência. Em: Silva AC, Bringel JMM, editores. Projeto e ações em biologia e química. São Luís: **EDUEMA**; 2006. p. 35–57.

BARRETO, R.; FERRETTI, F; FLEMMING, J.M.; AMORIM.A;
ANDRADE.H;BORIS.V; LESSA.R. Trends in the exploitation of South Atlantic shark populations. **Conservation biology : the journal of the Society for Conservation Biology**, 2016.

BARRETO, R. R.BORNATOWSKI.H; MOTTA.S.F;SANTANDER –NETO.J;
VIANNA.G.M.S; LESSA.R.. Rethinking use and trade of pelagic sharks from Brazil. **Marine Policy**, 2017.

CHAPMAN, D. D., BABCOCK, E. A., GRUBER, S. H., DIBATTISTA, J. D., FRANKS, B. R., KESSEL, S. A., GUTTRIDGE, T., PIKITCH, E. K. E FELDHEIM, K. A. Long-term natal site fidelity by immature lemon sharks (*Negaprion brevirostris*) at a subtropical island. **Molecular Ecology** 18, 3500–3507. (2009).

CHAPMAN DD, PINHAL D, SHIVJI MS .Tracking the fin trade: genetic stock

identification in western Atlantic scalloped hammerhead sharks *Sphyrna lewini*.

Endang Species Res 9:221–228.(2009).

CLARKE SC, MCALLISTER MK, MILNER-GULLAND EJ, KIRKWOOD GP AND OTHERS .Global estimates of shark catches using trade records from commercial markets. **Ecol Lett** 9:1115–1126. (2006).

COMPAGNO, L. *et al.* Checklist of Philippine Chondrichthyes. **Knowledge Creation Diffusion Utilization**, 2005.

COMPAGNO, J. FAO species catalogue vol. 4. Sharks of the world. An annotated and illustrated catalogue of shark species known to date. II Carcharhiniformes. FAO Fisheries Synopsis 125. (1984).

CHUANG, PS, HUNG, TC E CHANG, HA A Espécie e a Origem das Barbatanas de Tubarão nos Portos de Pesca de Taiwan, Mercados e Detenção Aduaneira: Uma Análise de Código de Barras de DNA. **PloS One** 11 , e0147290, (2016).

DAVIDSON, L. N. K.; DULVY, N. K. Global marine protected areas to prevent extinctions. **Nature Ecology and Evolution**, 2017.

DENT, F.; CLARKE, S.; DENT, F. State of the global market for shark products. **FAO technical paper**. 590 (2015).

DENHAM J, STEVENS J, SIMPFENDORFER CA, HEUPEL MR AND OTHERS .*Sphyrna mokarran*. **IUCN Red List**. Available at www.iucnredlist.org. (2010)

DULVY, N. K. *et al.* Extinction risk and conservation of the world’s sharks and rays. **eLife**, 2014.

DULVY. N.K; SIMPFENDORFER.C.A; DAVIDSON.L.N.; FORDHAM.S.V; BRÄUTIGAM.A; SANT GLENN E WELCH. Desafios e Prioridades na Conservação de Tubarões e Raios. **Current Biology** . 27 (11), 565-572 (2017)

DUNCAN, K. M., MARTIN, A. P., BOWEN, B. W. E DE COUET, H. G. Global phylogeography of the scalloped hammerhead shark (*Sphyrna lewini*). **Molecular Ecology** 15, 2239–2251. (2006).

ESCATEL-LUNA, ADAMS, D. H., URIBE-ALCOCER, M., ISLAS-VILLANUEVA,

V. E DÍAZ-JAIMES, P. . Population genetic structure of the Bonnethead Shark, *Sphyrna tiburo*, from the western north Atlantic Ocean based on mtDNA sequences. **Journal of Heredity**, 106, 355–365. doi: 10.1093/jhered/esv030(2015).

FEITOSA, L. M. *et al.* DNA-based identification reveals illegal trade of threatened shark species in a global elasmobranch conservation hotspot. **Scientific Reports**, 2018.

FREIRE KMF, ARAGÃO JAN, ARAÚJO ARR, ÁVILA-DA-SILVA AO, BISPO MCS, VELASCO G. Reconstrução das estatísticas de captura para as águas marinhas brasileiras (1950-2010): reconstrução das capturas de pesca para as ilhas continentais e oceânicas do Brasil. Peixe. **Centro Res. Rep.** 2015; 23 (4): 3–30.

FIELDS.A.T; FELDHEIM.A.J; GELSLEICHTER; PFPERTER.C ;CHAPMAN.D.D. Population structure and cryptic speciation in bonnethead sharks *Sphyrna tiburo* in the south-eastern U.S.A. and Caribbean. **Journal of Fish Biology** (2016).

FOTEDAR S, LUKEHURST S, JACKSON G, SNOW M .Molecular tools for identification of shark species involved in depredation incidents in Western Australian fisheries. **PLoS ONE** 14(1): e0210500. (2019).

GEMAQUE, R..MONTEIRO. I.L.P; GOMES.F; SODRÉ. D; SAMPAIO,I; SALES. J.B.L. ;RODRIGUES-FILHO. L.F.S. Por que implementar medidas para conservar a diversidade de Elasmobrânquios? O caso da costa norte do Brasil. **Revista da Biologia** 17 (2), 1-7,

HAMMERSCHLAG.N. Use of marine protected areas and exclusive economic zones in the subtropical western North Atlantic Ocean by large highly mobile sharks.**Diversity and Distributions.** 22, 534-546. (2016).

HAMMERSCHLAG, N. *et al.* Range extension of the endangered great hammerhead shark *Sphyrna mokarran* in the Northwest Atlantic: Preliminary data and significance for conservation. **Endangered Species Research**, 2011.

HEBERT, PDN, CYWINSKA, A., BOLA, SL E DE WAARD, JR. Identificações biológicas através de códigos de barras de DNA. **Proc. R. Soc.Lond.** 270 , 313-321, (2003).

KOLMANN, M. A., ELBASSIOUNY, A. A., LIVERPOOL, E. A. E LOVEJOY, N. R. DNA barcoding reveals the diversity of sharks in Guyana coastal markets. **Neotrop.**

Ichthyol. 15 (4), e170097, (2017).

KOHLER, N. E., SAWICKI, E., TURNER, P. A. E MCCANDLESS, C.
Mark/Recapture Data for the Bonnethead (*Sphyrna tiburo*), in the Western North Atlantic from the NEFSC Cooperative Shark Tagging Program. **SEDAR34-WP-26**. Charleston, SC: SEDAR. (2013).

LESSA, R.; SANTANA, F. M.; SOUZA, R. **Abundância relativa, frequência e reprodução sexual das raias capturadas no litoral de Recife: VII Reunião do grupo de trabalho sobre pesca e pesquisa de tubarões e raias no Brasil**. Rio grande do sul: [s.n.].

LESSA, R. P. T.; MENNI, R. C.; LUCENA. Biological observations on *Sphyrna lewini* and *Sphyrna tudes* (Chondrichthyes: Sphyrnidae) from Northern Brazil. **vie milieu**, 1998.

LESSA, R.; BATISTA, V.; ALMEIDA, Z. Occurrence and biology of the daggernose shark *Isogomphodon oxyrinchus* (chondrichthyes: Carcharhinidae) off the Maranhão coast (Brazil). **Bulletin of Marine Science**, 1999.

LESSA, R.; NÓBREGA, M. **Guia de Identificação de Peixes Marinhos da Região Nordeste**. [s.l: s.n.].

LESSA, R. P. Levantamento faunístico dos Elasmobrânquios (Pisces: Chondrichthyes) do litoral ocidental do estado do Maranhão, Brasil. **Boletim do Laboratório de Hidrobiologia**, 1986.

LESSA, R. P. Sinopse dos estudos sobre Elasmobrânquios da Costa do Maranhão. **Boletim do Laboratório de Hidrobiologia, São Luís**, 1997.

LESSA, R.; SANTANA, F. M.; ALMEIDA, Z. D. S. DE. Age and growth of the Brazilian sharpnose shark, *Rhizoprionodon lalandii* and Caribbean sharpnose shark, *R. porosus* (Elasmobranchii, carcharhinidae) on the northern coast of Brazil (Maranhão). **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, 2009.

LIBRALATO S, CHRISTENSEN V, P. D. No TitleUm método para identificar espécies-chave em modelos de redes alimentares. **Modelo Ecol**, v. 195: 153–7, 2005.

MARTINS, A. P. B. *et al.* Analysis of the supply chain and conservation status of sharks (Elasmobranchii: Superorder Selachimorpha) based on fisher knowledge. **PLoS ONE**, 2018.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA). Portaria N. 445 Lista nacional oficial de espécies da fauna ameaçadas de extinção - peixes e invertebrados aquáticos. Diário Oficial da União. **17 de dezembro de 2014**, 2014. (acessado : 22 de julho de 2018).

MENDONÇA, F. F., OLIVEIRA, C., BURGESS, G., COELHO, R., PIERCY, A., GADIG, O. B. F. E FORESTI, F. Species delimitation in sharpnose sharks (genus *Rhizoprionodon*) in the western Atlantic Ocean using mitochondrial DNA. **Conservation Genetics** 12, 193–200. (2011).

NAYLOR, G. J. P., CAIRA, J. N., JENSEN, K., ROSANA, K. A. M., WHITE, W. T. E LAST, P. R. Sequence-based approach to the identification of shark and ray species and its implications for global elasmobranch diversity and parasitology. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 367, 1–262. (2012).

O'CONNELL, C. P.; LEURS, G. A minimally invasive technique to assess several life-history characteristics of the endangered great hammerhead shark *Sphyrna mokarran*. **Journal of Fish Biology**, 2016.

PANK, M. *et al.* Rapid and simultaneous identification of body parts from the morphologically similar sharks *Carcharhinus obscurus* and *Carcharhinus plumbeus* (Carcharhinidae) using multiplex PCR. **Marine Biotechnology**, 2001.

PINHAL, D., SHIVJI, M. S., NACHTIGALL, P. G., CHAPMAN, D. D. E MARTINS, C. A streamlined DNA tool for global identification of heavily exploited coastal shark species (Genus *Rhizoprionodon*). **PloS One**7, 1–6, (2012).

Pinhal, D. GADIG, O. B. F.; WASKO, A. P.; OLIVEIRA, C.; RON, E.; FORESTI, F.; MARTINS, C. Discrimination of shark species by simple PCR of 5S rDNA repeats. **Genetica Biologia Molecular** 31, 361–365, (2008).

RODRIGUES-FILHO, LFS. ROCHA, T. C.; RÊGO, P. S.; SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I.; VALLINOTO, M. Identificação e inferências filogenéticas sobre estoques de tubarões afetados pela indústria pesqueira no litoral norte do Brasil. **Genética e Biologia Molecular** 32 (2), 405-413, (2009).

SILVA, W. M. DA. **Diversidade de Tubarões (Elasmobranchii, Chondrichthyes) da Costa do Maranhão: Abordagem Molecular e Etnoconhecimento**. [s.l.] Universidade Estadual do Maranhão, 2017.

STEVENS, J. D. *et al.* **The effects of fishing on sharks, rays, and chimaeras (chondrichthyans), and the implications for marine ecosystems** ICES Journal of Marine Science. **Anais**.2000

STEVENS JD, LYLE JM .Biology of three hammerhead sharks (*Eusphyrna blochii*, *Sphyrna mokarran*, and *S. lewini*) from northern Australia. **Aust J Mar Freshw Res** 40:129–146. (1989)

SHIVJI, MS, CHAPMAN, DD, PIKITCH, EK E RAYMOND, PW O perfil genético revela o comércio internacional ilegal de barbatanas do grande tubarão branco. *Carcharodon carcharias*. **Conserv. Genet** 6, 1035-1039 (2005).

QUATTRO, J.M., STONER, D.S., DRIGGERS, W.B., ANDERSON, C.A., PRIEDE, K.A., HOPPMANN, E.C., CAMPBELL, N.H., DUNCAN, K.M. E GRADY, J.M. Genetic evidence of cryptic speciation within hammerhead sharks (Genus *Sphyrna*). **Marine Biology** 148, 1143–1155. (2006).

QUATTRO, J. M., ROBERTS, M. A., DRIGGERS, I. W. B., GRADY, J. M. E ULRICH, G. F. *Sphyrna gilberti* sp. nov., a new hammerhead shark (Carcharhiniformes, Sphyrnidae) from the western Atlantic Ocean. **Zootaxa** 3702, 159–178. (2013).

WALKER, T. I.; HUDSON, R. J.; GASON, A. S. Catch evaluation of target, by-product and by-catch species taken by gillnets and longlines in the shark fishery of South-eastern Australia. **Journal of Northwest Atlantic Fishery Science**, 2005.

WARD, R. D. ZEMLAK, T. S., INNES, B. H., LAST, P. R. E HEBERT, P. D. N. DNA barcoding Australia's fish species. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, 2005.

WARD, R. D.; HANNER, R.; HEBERT, P. D. N. **The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL** *Journal of Fish Biology*, 2009.

8.APÊNDICE

Tabela 7. Identificação molecular dos animais do gênero *Sphyrna* realizada através da comparação de sequências obtidas na costa do Maranhão com sequências disponíveis na plataforma BOLDSystems e NCBI Genbank .

CÓDIGO	BOLDSYSTEMS	SIMILARIDADE (%)	NCBI Genbank	SIMILARIDADE (%)
CMISSP 9	<i>Sphyrna tudes</i>	100	<i>Sphyrna tudes</i>	94
N2183	<i>Sphyrna mokarran</i>		<i>Sphyrna mokarran</i>	
CMISSp 29	<i>Sphyrna mokarran</i>	100	<i>Sphyrna mokarran</i>	98
N291	<i>Sphyrna mokarran</i>	100	<i>Sphyrna mokarran</i>	98
N2209	<i>Sphyrna mokarran</i>	99,81	<i>Sphyrna mokarran</i>	96
N2220	<i>Sphyrna mokarran</i>	99,84	<i>Sphyrna mokarran</i>	97
N2211	<i>Sphyrna mokarran</i>	99,84	<i>Sphyrna mokarran</i>	98
NI2288	<i>Sphyrna mokarran</i>	100	<i>Sphyrna mokarran</i>	95
N2203	<i>Sphyrna mokarran</i>	100	<i>Sphyrna mokarran</i>	98
NI2285	<i>Sphyrna mokarran</i>	100	<i>Sphyrna mokarran</i>	96
NI2204	<i>Sphyrna mokarran</i>	100	<i>Sphyrna mokarran</i>	96
NI2103	<i>Sphyrna mokarran</i>	100	<i>Sphyrna mokarran</i>	98
NI2182	<i>Sphyrna mokarran</i>	100	<i>Sphyrna mokarran</i>	97
NI2179	<i>Sphyrna mokarran</i>	100	<i>Sphyrna mokarran</i>	96
CMISSP 59	<i>Sphyrna mokarran</i>	100	<i>Sphyrna mokarran</i>	91
CMISSP 79	<i>Sphyrna mokarran</i>	100	<i>Sphyrna mokarran</i>	97

CMISSP 86	<i>Sphyrna mokarran</i>	99,79	<i>Sphyrna mokarran</i>	94
CMISSP90	<i>Sphyrna mokarran</i>	99,81	<i>Sphyrna mokarran</i>	96
CMISSP99	<i>Sphyrna mokarran</i>	99,83	<i>Sphyrna mokarran</i>	95
CMISSP6	<i>Sphyrna mokarran</i>	99,27	<i>Sphyrna mokarran</i>	90
CMISSP8	<i>Sphyrna mokarran</i>	99,83	<i>Sphyrna mokarran</i>	95
CMISSP 30	<i>Sphyrna mokarran</i>	100	<i>Sphyrna mokarran</i>	99
CMISSP 38	<i>Sphyrna mokarran</i>	99,79	<i>Sphyrna mokarran</i>	96
CMISSP 41	<i>Sphyrna mokarran</i>	99,81	<i>Sphyrna mokarran</i>	95
CMISSP 42	<i>Sphyrna mokarran</i>	99,83	<i>Sphyrna mokarran</i>	90
CMISSP 76	<i>Sphyrna mokarran</i>	99,27	<i>Sphyrna mokarran</i>	95
CMISSP77	<i>Sphyrna mokarran</i>	99,83	<i>Sphyrna mokarran</i>	99
CMISSP31	<i>Sphyrna mokarran</i>	99,79	<i>Sphyrna mokarran</i>	96
CMISSP 34	<i>Sphyrna mokarran</i>	99,81	<i>Sphyrna mokarran</i>	95
CMISSP36	<i>Sphyrna mokarran</i>	99,83	<i>Sphyrna mokarran</i>	90
CMISSP72	<i>Sphyrna mokarran</i>	99,27	<i>Sphyrna mokarran</i>	95
CMISSP66	<i>Sphyrna mokarran</i>	99,83	<i>Sphyrna mokarran</i>	99
N2184	<i>Sphyrna lewini</i>	99,83	<i>Sphyrna lewini</i>	96
NI253	<i>Sphyrna lewini</i>	100	<i>Sphyrna lewini</i>	94
N2201	<i>Sphyrna lewini</i>	99,83	<i>Sphyrna lewini</i>	96
TO212	<i>Sphyrna lewini</i>	100	<i>Sphyrna lewini</i>	96
TO213	<i>Sphyrna lewini</i>	100	<i>Sphyrna lewini</i>	95
CMISSP 75	<i>Sphyrna lewini</i>	100	<i>Sphyrna lewini</i>	78
CN110	<i>Sphyrna lewini</i>	100	<i>Sphyrna lewini</i>	95
N119	<i>Sphyrna tiburo</i>	100	<i>Sphyrna tiburo</i>	95

CN120	<i>Sphyrna tiburo</i>	99,83	<i>Sphyrna tiburo</i>	96
N 123	<i>Sphyrna tiburo</i>	100	<i>Sphyrna tiburo</i>	95
N197	<i>Sphyrna tiburo</i>	99,83	<i>Sphyrna tiburo</i>	90
CN334	<i>Sphyrna tiburo</i>	100	<i>Sphyrna tiburo</i>	95
CN 346	<i>Sphyrna tiburo</i>	100	<i>Sphyrna tiburo</i>	99
CMISSP 68	<i>Sphyrna tiburo</i>	100	<i>Sphyrna tiburo</i>	99

Fonte: Autora