

A Genética contra os crimes ambientais: identificação de madeira ilegal provenientes de unidades de conservação utilizando marcador molecular*

ILLEGAL

Núbia Esther de Oliveira Miranda^{1,2}; Edivaldo Barbosa de Almeida Júnior^{1,3}; Rosane Garcia Collevatti^{1,2}

¹ Laboratório de Genética & Biodiversidade, ICB, Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia

² Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução, ICB, Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia

³ Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia.

Autor para correspondência: rosanec68@hotmail.com.

*Material didático desenvolvido na disciplina de Genética da Conservação, coordenado pela Profa. Rosane Garcia Collevatti, do curso de graduação em Ecologia e Análise Ambiental do Departamento de Ecologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, como uma atividade do Estágio Docência (bolsistas CAPES/UFG) dos discentes dos Programas de Pós-graduação em Ecologia e Evolução, Genética e Melhoramento de Plantas.

**ILEGAL**

A perda acelerada da cobertura vegetal coloca em risco os recursos naturais e a diversidade biológica, além de afetar a produtividade econômica. Atualmente, a despeito da fiscalização para coibir a prática, grande parte dos desmatamentos são feitos de forma ilegal. Para auxiliar o ensino de Genética da Conservação e Ecologia Molecular é proposta uma atividade que demonstra como o uso de marcador molecular, baseado no sequenciamento de DNA de cloroplasto, pode auxiliar na identificação de amostras apreendidas por órgãos ambientais para resolver e estabelecer provas em crimes ambientais envolvendo desflorestamentos. A atividade pode ser utilizada como simulação de aula prática ou como uma atividade complementar à aula expositiva para alunos de ensino superior.

O objetivo da atividade é mostrar como o uso de **marcadores moleculares**, baseados no **sequenciamento** de DNA de cloroplasto (cpDNA), pode ser empregado para determinar a origem da madeira extraída de florestas naturais a partir de amostras apreendidas pelos órgãos de fiscalização ambiental. Para essa finalidade, é preciso comparar as sequências de DNA de amostras apreendidas com as sequências de DNA de um banco de dados pré-existente contendo sequências de amostras de populações na área de ocorrência da espécie, especialmente nas unidades de conservação e nos locais destinados ao extrativismo, com a finalidade de determinar a origem da madeira e se a madeira foi removida de localidades em que o corte é ilegal.

A metodologia inclui a coleta de material apreendido, o sequenciamento e a comparação do mesmo com um banco de dados de sequências visando gerar provas sobre remoção ilegal de madeira, de modo que o relatório possa ser utilizado em processos de crime ambiental. É importante frisar que o pressuposto fundamental do uso desta técnica para identificar o local de origem é a existência de diferenças genéticas detectáveis entre as áreas. Desta forma, para que o local de origem seja determinado, é necessário ter um banco de dados de sequências de DNA abrangendo diversas áreas, tanto Unidades de Conservação quanto áreas de extrativismo. Além disso, muitas vezes somente um marcador molecular não é suficiente para diferenciar amostras de diferentes locais. Dessa forma, pode ser necessário, para determinar o local de origem definitivo, o sequenciamento de mais de um marcador molecular, embora a atividade, aqui apresentada, utilize somente um marcador molecular.

PROBLEMA PROPOSTO

O Brasil possuiu uma das maiores áreas de cobertura vegetal e de diversidade florística do planeta. Além da grande importância dessas áreas para a conservação, elas também constituem uma importante fonte de desenvolvimento econômico para o País, o que acarreta a substituição de áreas nativas por sistemas produtivos como pastagens,

lavouras, regiões para extrativismo, reflorestamento e mineração. Essa perda massificada e acelerada da cobertura vegetal, além de afetar a produtividade econômica, também coloca em risco os recursos naturais e a diversidade biológica. Nesse sentido, o Código Florestal, bem como a ação fiscalizatória das agências reguladoras ambientais (IBAMA, ICMBio, órgãos estaduais e municipais) são ferramentas utilizadas para controlar o uso das áreas destinadas ao uso antrópico e proteger os remanescentes florestais. A despeito disso, a taxa de desmatamento no Brasil continua aumentando e boa parte dessa prática está baseada na ilegalidade.

A utilização de técnicas genéticas em investigações forenses cada vez mais vem sendo utilizadas como fontes de evidências em investigações criminais. Na resolução e no estabelecimento de provas em crimes ambientais, esta ainda é uma ferramenta pouco utilizada no Brasil, mas que tem apresentado resultados positivos tanto na identificação de espécies quanto no rastreamento da origem de produtos obtidos por extrativismo ou caça (GRAVENA *et al.* 2008; SANCHES *et al.* 2011). Esses resultados positivos, aliados às técnicas que permitem a obtenção de material genético a partir de madeira já processada, abrem um importante campo de investigação para auxiliar o combate de crimes de desmatamentos florestais (DEGUILLOUX *et al.* 2003).

A aroeira, *Myracrodruon urundeuva* (sin. *Astronium urundeuva*) pertence à família Anacardiaceae e possui outros nomes comuns como aroeira-vermelha, aroeira-mansa, aroeira-branca, aroeira-da-praia, aroeira-do-sertão, aroeira-do-paraná. Outras espécies desta família que também são conhecidas por aroeira são: *Schinus molle*, *Astronium fraxinifolium* e *Lithraea brasiliensis*. De grande plasticidade ecológica, a aroeira ocorre nas Florestas Estacionais Semidecíduais, desde o Nordeste, passando pelo Centro-Oeste do Brasil, chegando ao Rio Grande do Sul e estendendo-se à Argentina e ao Paraguai (LORENZI, 1992). Devido ao extrativismo da madeira, *M. urundeuva* encontra-se atualmente ameaçada de extinção (MMA, 2008), sendo seu corte res-

Marcador Molecular

é qualquer dado molecular herdável capaz de evidenciar polimorfismo entre indivíduos. Pode ser um fragmento de DNA, codificante ou não, ou uma proteína.

Sequenciamento pode ser definido como a série de métodos empregados para determinar a ordem específica das bases nitrogenadas adenina (A), guanina (G), citosina (C) e timina (T) em uma molécula de DNA (veja o artigo Sequenciamento de DNA: decifrando o manual de instruções dos seres vivos, Genética na Escola 03.03, 45-52, 2009).



tringido e regulamentado pela Portaria N.º 83-N de 26 de Setembro de 1991 do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – Ibama:

“Art. 1º. Fica proibido o corte e a exploração da Aroeira legítima ou Aroeira do sertão (*Astronium urundeuva*), das Baraúnas (*Melanoxylon brauna* e *Schinopsis brasiliensis*), do Gonçalves Alves (*Astronium fraxinifolium*) em Floresta Primária.

Art. 2º. A exploração da Aroeira ou Aroeira do Sertão (*Astronium urundeuva*) das Baraúnas (*Melanoxylon brauna* e *Schinopsis brasiliensis*), do Gonçalves Alves (*Astronium fraxinifolium*) em Floresta Secundária, só poderá ser efetivada através de Plano de Manejo Florestal de Rendimento Sustentado, dependendo de projeto previamente aprovado pelo Ibama.”

Nesta atividade foi proposta a determinação da origem de madeiras cortadas de aroeira com a utilização de um marcador molecular cloroplastidial (cpDNA) como evidência para uma investigação criminal de exploração madeireira em áreas ilegais.

O Instituto Chico Mendes (ICMBio) recebeu uma denúncia anônima de que quatro lojas moveleiras, de uma cidade localizada no sudeste do estado de Goiás, estariam comercializando produtos provenientes de madeiras de uso não certificado, i.e., oriundas de áreas onde a extração é proibida. Nas quatro lojas denunciadas, no entanto, os proprietários apresentaram documentos certificando que a origem da madeira era de áreas de extrativismo certificado, **Áreas A1 e A2**. Para avaliar a procedência do material, os fiscais do ICMBio coletaram um lote de amostras de cada loja. Este lote era composto por câmbio da madeira de cinco pranchas por loja, totalizando 20 amostras. Os fragmentos de tecidos do câmbio de cada amostra foram acondicionados em saquinhos esterilizados individuais e conduzidos a um laboratório de análise genética. O DNA das amostras de câmbio foi extraído e a região cloroplastidial trnS-trnG foi sequenciada por pesquisadores deste laboratório. As sequências obtidas foram comparadas com bancos de dados do laboratório, contendo informações da composição genética

das duas áreas de extrativismo certificado (**Áreas A1 e A2**) e de duas populações de aroeira de unidades de conservação onde a extração da espécie é proibida por lei (**Áreas B1 e B2**).

Para determinar a origem da madeira é preciso:

1. Observar as sequências de DNA do banco de dados das áreas de plantio (A1 e A2) e das unidades de conservação (B1 e B2).
2. Determinar as sequências de DNA de cada amostra dos lotes apreendidos nas quatro lojas moveleiras.
3. Comparar as sequências de DNA de cada amostra com as do banco de dados das sequências de DNA de cada área (A1, A2, B1 e B2).
4. A partir da comparação das sequências de DNA, determinar se a madeira é oriunda das áreas de extrativismo A1 ou A2 e, portanto, é realmente certificada, ou se a madeira é oriunda das unidades de conservação, portanto de origem ilegal.

INSTRUÇÕES PARA O PROFESSOR

1. Esta atividade poderá ser realizada individualmente, ou em grupos de alunos de, no máximo, quatro pessoas.
2. Cada grupo deverá receber o problema proposto, uma cópia do procedimento para realizar a atividade, uma cópia de cada painel, de cada tabela e das questões para serem discutidas.
3. É recomendável que o professor aplique esta atividade em turmas que já tiveram contato prévio com os conceitos de genética mendeliana e de populações.

Os recursos didáticos que deverão ser utilizados consistem em três painéis, conforme descrito a seguir:

1. **Painel 1** – Banco de dados contendo as sequências de DNA para o marcador molecular cloroplastidial trnS-trnG das áreas de extrativismo certificado (A1 e A2) e de unidades de conservação (B1 e B2) no estado de Goiás.



Área A1:

```

T C C T A A T T G A A A A A A G A C A A T T A C T A T G T T A C A T T A C A C
T C C T A A T T G A A A A A A G A C A A T T A C T A T G T T A C A T T A C A C
T C C T A A C T G A A A A A A G A C A A A T A C T A T G T C A C A T T A C A C
T C C T A A T T G A A A A A A A C A C A A T T A C T A T G T T A C A T T A C A C
T C C T A A C C G A A A A A A A G A C A A A T A C T A T G T C A C A T T A C A C
T C C T A A T T G A A A A A A A C A C A A T T A C T A T G T T A C A T T A C A C

```

Área A2:

```

T C C T A A T T G A A A A A A G A C A A T T A C T A T G T T A C A T T A C A C
T C C T A A T T G A A A A A A A C A C A A T T A C T A T G T T A C A T T A C A C
T C C T A A C C G A A A A A A A G A C A A T T A C T A T G T T A C A T T A C A C
T C C T A A C T G A A A A A A A G A C A A A T A C T A T G T C A C A T T A C A C
T C C T A A T T G A A A A A A A C A C A A T T A C T A T G T T A C A T T A C A C
T C C T A A C C G A A A A A A A G A C A A A T A C T A T G T C A C A T T A C A C

```

Área B1:

```

T C C T A A T T G A G A A A A A G A C A A T T A C T A T G T T A C A T T A C A C
T C C T A A T T G A G A A A A A C A C A A T T A C T A T G T T A C A T T A C A C
T C C T A A C C G A A A A A A A G A C A A T T A C T A C C C T A C A T T A C A C
T C C T A A C T G A A A A A A A G A C A A A T C C T A T G T C A C A T T A C A C
T C C T A A C C G A A A A A A A C C C A A T T A C T A T G T T A C A T T A C A C
T C C T A A C C G A A A A A A A G A C A A A T A C T A T G T C A C A T T A C A C

```

Área B2:

```

T C C T A A T T G A G A A A A A G A C A A T T A C T A T G T T A C A T T A C A C
T C C T A A T T G A G A A A A A C A C A A T T A C T A T G T T A C A T T A C A C
T C C T A A C C G A A A A A A A G A C A A T T A C T A C C C T A C A T T A C A C
T C C T A A C T G A A A A A A A G A C A A A T C C T A T G T C A C A T T A C A C
T C C T A A C C G A A A A A A A C A C A A T T A C T A T G T T A C A T T A C A C
T C C T A A C C G A A A A A A A G A C A A A T A C T A T G T C A C A T T A C A C

```

Painel 1.

Banco de dados contendo as sequências de DNA para o marcador molecular cloroplastidial trnS-trnG das áreas de extrativismo certificado (A1 e A2) e das unidades de conservação (B1 e B2) no estado de Goiás.

2. **Painel 2** – Localização geográfica das áreas de extrativismo certificado (A1 e A2) e das unidades de conservação (B1 e B2) no estado de Goiás. Os pontos indicam os locais de ocorrência das populações naturais de aroeira e, os quadrados, as áreas para as quais o laboratório de análise genética possui banco de dados.

3. **Tabela 1** – Sequências de DNA de aroeira encontradas nas áreas de extrativismo

certificado (A1 e A2) e nas unidades de conservação (B1 e B2).

4. **Painel 3** – Sequências de DNA das amostras dos lotes apreendidos nas quatro lojas moveleiras.

5. **Tabela 2** – Sequências de DNA de aroeira encontradas nos lotes de madeira amostrados nas quatro lojas moveleiras e origem das amostras.

Painel 2.

Localização geográfica das áreas de extrativismo certificado (A1 e A2) e das unidades de conservação (B1 e B2) no estado de Goiás. Os pontos indicam os locais de ocorrência das populações naturais de aroeira e, os quadrados, as áreas para as quais o laboratório de análise genética possui banco de dados.

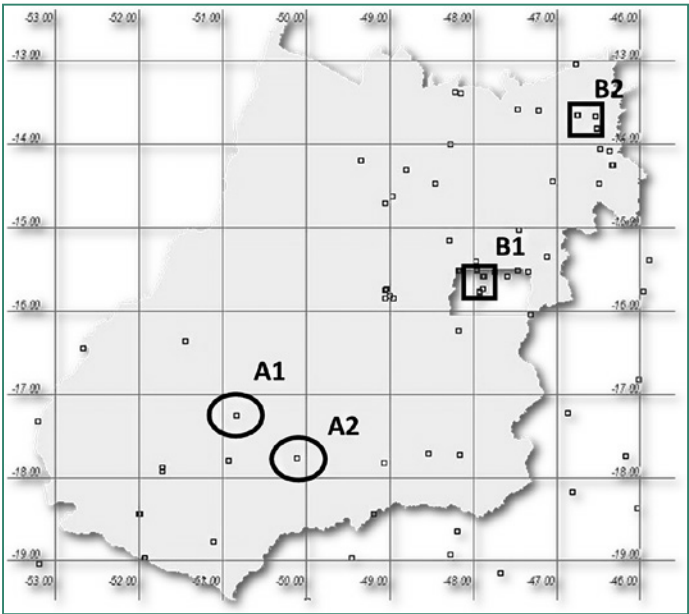


Tabela 1.

Sequências de DNA de aroeira encontradas nas áreas de extrativismo certificado (A1 e A2) e das unidades de conservação (B1 e B2).

Área	Sequências de DNA
A1	
A2	
B1	
B2	

Painel 3.

Sequências de DNA das amostras dos lotes apreendidos nas quatro lojas moveleiras.

Lote 1:	
AMOSTRA 1:	TCCTAATTGAAAAAAGACAATTACTATGTTACATTACAC
AMOSTRA 2:	TCCTAATTGAAAAAAGACAATTACTATGTTACATTACAC
AMOSTRA 3:	TCCTAACTGAAAAAAGACAAATACTATGTCACATTACAC
AMOSTRA 4:	TCCTAACTGAAAAAAGACAAATACTATGTCACATTACAC
AMOSTRA 5:	TCCTAACTCGAAAAAAGACAAATACTATGTCACATTACAC
Lote 2:	
AMOSTRA 1:	TCCTAATTGAAAAAAGACAATTACTATGTTACATTACAC
AMOSTRA 2:	TCCTAACTGAAAAAAGACAAATACTATGTCACATTACAC
AMOSTRA 3:	TCCTAATTGAAAAAACAATTACTATGTTACATTACAC
AMOSTRA 4:	TCCTAACTCGAAAAAAGACAAATACTATGTCACATTACAC
AMOSTRA 5:	TCCTAACTCGAAAAAAGACAATTACTATGTTACATTACAC
Lote 3:	
AMOSTRA 1:	TCCTAACTCGAAAAAAGACAAATACTATGTCACATTACAC
AMOSTRA 2:	TCCTAATTGAGAAAAACAATTACTATGTTACATTACAC
AMOSTRA 3:	TCCTAACTCGAAAAAAGACAATTACTACCTACATTACAC
AMOSTRA 4:	TCCTAACTGAAAAAAGACAAATCCTATGTCACATTACAC
AMOSTRA 5:	TCCTAACTCGAAAAAACCAATTACTATGTTACATTACAC
Lote 4:	
AMOSTRA 1:	TCCTAATTGAAAAAAGACAATTACTATGTTACATTACAC
AMOSTRA 2:	TCCTAACTCGAAAAAAGACAAATACTATGTCACATTACAC
AMOSTRA 3:	TCCTAACTCGAAAAAACCAATTACTACCTACATTACAC
AMOSTRA 4:	TCCTAACTCGAAAAAAGACAAATACTATGTTACATTACAC
AMOSTRA 5:	TCCTAACTCGAAAAAAGACAAATACTACCTACATTACAC

Lote	Amostras	Sequências de DNA	Área
1	1		
	2		
	3		
	4		
	5		
2	1		
	2		
	3		
	4		
	5		
3	1		
	2		
	3		
	4		
	5		
4	1		
	2		
	3		
	4		
	5		

Tabela 2.

Sequências de DNA de aroeira encontradas nos lotes de madeira amostrados nas quatro lojas moveleiras e origem das amostras.

PROCEDIMENTO PARA OS ESTUDANTES

1. Ler atentamente o problema proposto.
2. Analisar o Painel 1 e Painel 2 – Sequências de DNA cloroplastidial do marcador molecular trnS-trnG para amostras das áreas de extrativismo certificado, A1 e A2,

e para as unidades de conservação, B1 e B2, e localização geográfica das áreas:

- a) analisar as sequências e determinar quais são presentes em cada área;
- b) preencher a Tabela 1 com os resultados, atribuindo nomes diferentes para as sequências diferentes, por exemplo,

S1, S2, S3 etc. As sequências estão alinhadas de forma que cada base nitrogenada em uma posição no DNA em um indivíduo corresponde à mesma posição no indivíduo abaixo;

c) para analisar as sequências de DNA e determinar se são iguais ou diferentes, deve-se comparar cada base nitrogenada (total de 40) e verificar se são iguais ou diferentes;

d) lembrar-se de que sequências diferentes devem possuir nomes diferentes.

3. Analisar o Painel 3 - A partir das sequências de DNA de cada uma das amostras dos quatro lotes apreendidos nas lojas moveleiras:

a) determinar as sequências de DNA de cada amostra;

b) comparar as sequências de DNA das amostras com as do banco de dados das diferentes áreas (A1, A2, B1 e B2), conforme descrito no procedimento 2;

c) atribuir nomes às sequências de DNA das amostras da seguinte forma: se a sequência da amostra for igual à sequência de alguma das áreas do banco de dados, dar o nome igual às sequências de DNA do banco de dados; se as sequências de DNA forem diferentes, atribuir um novo nome; sequências iguais sempre devem ter o mesmo nome;

d) preencher a Tabela 2 com os resultados das sequências de DNA de cada amostra, para cada lote.

4. Analisar os resultados da Tabela 2:

a) determinar quais amostras são realmente oriundas de áreas de extrativismo (Áreas 1 e 2) e quais não são oriundas;

b) preencher os resultados na Tabela 2.

ENTENDENDO A ATIVIDADE

Questão 1: Em relação ao banco de dados das áreas A1, A2, B1 e B2. Quantas e quais sequências de DNA são exclusivas de cada área? Quantas e quais são compartilhadas? Quais áreas são mais semelhantes entre si? Discutir sobre a semelhança entre as áreas.

Questão 2: Foi possível encontrar a origem de todas as madeiras dos quatro lotes de aroeira? O banco de dados utilizado só possuía sequências de DNA de duas áreas de extrativismo e duas unidades de conservação? Este fato causou problemas para a atribuição dos locais de origem das amostras? Comentar sobre os problemas envolvidos na atribuição dos locais de origem e apontar soluções para eles.

Questão 3: Como a genética contribuiu para a elucidação do crime ambiental?

Questão 4: Quais as principais dificuldades na utilização deste método baseado em marcador molecular?



RESPOSTAS

Conjunto de sequências de DNA da Área A1:

```

TCCTAATTGAAAAAAGACAATTACTATGTTACATTACAC [1]
TCCTAATTGAAAAAAGACAATTACTATGTTACATTACAC [1]
TCCTAACTGAAAAAAGACAATACTATGTTACATTACAC [2]
TCCTAATTGAAAAAACAATTACTATGTTACATTACAC [3]
TCCTAACTGAAAAAAGACAATACTATGTTACATTACAC [4]
TCCTAATTGAAAAAACAATTACTATGTTACATTACAC [3]

```

Sequências (S1, S2, S3 e S4)

Conjunto de sequências de DNA da Área A2:

```

TCCTAATTGAAAAAAGACAATTACTATGTTACATTACAC [1]
TCCTAATTGAAAAAACAATTACTATGTTACATTACAC [3]
TCCTAACTGAAAAAAGACAATTACTATGTTACATTACAC [5]
TCCTAACTGAAAAAAGACAATACTATGTTACATTACAC [2]
TCCTAATTGAAAAAACAATTACTATGTTACATTACAC [3]
TCCTAACTGAAAAAAGACAATACTATGTTACATTACAC [4]

```

Sequências (S1, S2, S3, S4 e S5)

Conjunto de sequências de DNA da Área B1:

```

TCCTAATTGAGAAAAAGACAATTACTATGTTACATTACAC [6]
TCCTAATTGAGAAAAACAATTACTATGTTACATTACAC [7]
TCCTAACTGAAAAAAGACAATTACTACCTACATTACAC [8]
TCCTAACTGAAAAAAGACAATACTATGTTACATTACAC [9]
TCCTAACTGAAAAAACAATTACTATGTTACATTACAC [10]
TCCTAACTGAAAAAAGACAATACTATGTTACATTACAC [4]

```

Sequências (S4, S6, S7, S8, S9 e S10)

Conjunto de sequências de DNA da Área B2:

```

TCCTAATTGAGAAAAAGACAATTACTATGTTACATTACAC [6]
TCCTAATTGAGAAAAACAATTACTATGTTACATTACAC [7]
TCCTAACTGAAAAAAGACAATTACTACCTACATTACAC [8]
TCCTAACTGAAAAAAGACAATACTATGTTACATTACAC [9]
TCCTAACTGAAAAAACAATTACTATGTTACATTACAC [11]
TCCTAACTGAAAAAAGACAATACTATGTTACATTACAC [4]

```

Sequências (S4, S6, S7, S8, S9 e S11)

Painel 1.

Banco de dados contendo as sequências de DNA para o marcador molecular cloroplastidial trnS-trnG das áreas de extrativismo certificado (A1 e A2) e das unidades de conservação (B1 e B2) no estado de Goiás.

Área	Sequências de DNA
A1	S1, S2, S3 e S4
A2	S1, S2, S3, S4 e S5
B1	S4, S6, S7, S8, S9 e S10
B2	S4, S6, S7, S8, S9 e S11

Tabela 1.

Sequências de DNA de aroeira encontradas nas áreas de extrativismo certificado (A1 e A2) e das unidades de conservação (B1 e B2).

Painel 3.

Sequências de DNA das amostras dos lotes apreendidos nas quatro lojas moveleiras.

Sequências de DNA do Lote 1:

AMOSTRA 1: TCCTAATTGAAAAAAGACAATTACTATGTTACATTACAC [1]
 AMOSTRA 2: TCCTAATTGAAAAAAGACAATTACTATGTTACATTACAC [1]
 AMOSTRA 3: TCCTAACTGAAAAAAGACAAATACTATGTTACATTACAC [2]
 AMOSTRA 4: TCCTAACTGAAAAAAGACAAATACTATGTTACATTACAC [2]
 AMOSTRA 5: TCCTAACCGAAAAAAGACAAATACTATGTTACATTACAC [4]

Sequências (S1, S2, e S4)**Sequências de DNA do Lote 2:**

AMOSTRA 1: TCCTAATTGAAAAAAGACAATTACTATGTTACATTACAC [1]
 AMOSTRA 2: TCCTAACTGAAAAAAGACAAATACTATGTTACATTACAC [2]
 AMOSTRA 3: TCCTAATTGAAAAAAGACAATTACTATGTTACATTACAC [3]
 AMOSTRA 4: TCCTAACCGAAAAAAGACAAATACTATGTTACATTACAC [4]
 AMOSTRA 5: TCCTAACCGAAAAAAGACAATTACTATGTTACATTACAC [5]

Sequências (S1, S2, S3, S4 e S5)**Sequências de DNA do Lote 3:**

AMOSTRA 1: TCCTAACCGAAAAAAGACAAATACTATGTTACATTACAC [4]
 AMOSTRA 2: TCCTAATTGAGAAAAAGACAATTACTATGTTACATTACAC [7]
 AMOSTRA 3: TCCTAACCGAAAAAAGACAATTACTACCTACATTACAC [8]
 AMOSTRA 4: TCCTAACTGAAAAAAGACAAATCTATGTTACATTACAC [9]
 AMOSTRA 5: TCCTAACCGAAAAAAGACAATTACTATGTTACATTACAC [10]

Sequências (S4, S7, S8, S9 e S11)**Sequências de DNA do Lote 4:**

AMOSTRA 1: TCCTAATTGAAAAAAGACAATTACTATGTTACATTACAC [1]
 AMOSTRA 2: TCCTAACCGAAAAAAGACAAATACTATGTTACATTACAC [4]
 AMOSTRA 3: TCCTAACCGAAAAAAGACAATTACTACCTACATTACAC [12]
 AMOSTRA 4: TCCTAACCGAAAAAAGACAAATACTATGTTACATTACAC [13]
 AMOSTRA 5: TCCTAACCGAAAAAAGACAAATACTACCTACATTACAC [14]

Sequências (S1, S4, S12, S13 e S14)

Questão 1: Em relação ao banco de dados das áreas A1, A2, B1 e B2, quantas e quais sequências de DNA são exclusivos de cada área? Quantas e quais são compartilhadas? Quais áreas são mais semelhantes entre si? Discutir a semelhança entre as áreas.

A Área A1 não apresenta nenhuma sequência exclusiva. A Área A2 apresenta todas as quatro sequências presentes em A1 mais

a sequência S5, que é exclusiva. A Área B1 tem uma sequência exclusiva (S10), compartilha a sequência S4 com todas as outras áreas e as sequências S6, S7, S8 e S9 com a área B2. Esta última tem uma sequência exclusiva (S11). As áreas A1 e A2 são mais semelhantes entre si, bem como as Áreas B1 e B2. Provavelmente, a maior semelhança entre as áreas A1 e A2 e B1 e B2 se deve à proximidade entre as áreas.

Lote	Amostras	Sequências de DNA	Área
1	1	S1	A1 ou A2
	2	S1	A1 ou A2
	3	S2	A1 ou A2
	4	S2	A1 ou A2
	5	S4	A1 ou A2 ou B1 ou B2
2	1	S1	A1 ou A2
	2	S2	A1 ou A2
	3	S3	A1 ou A2
	4	S4	A1 ou A2
	5	S5	A2
3	1	S4	A1 ou A2 ou B1 ou B2
	2	S7	B1 ou B2
	3	S8	B1 ou B2
	4	S9	B1 ou B2
	5	S10	B1
4	1	S1	A1 ou A2
	2	S4	A1 ou A2 ou B1 ou B2
	3	S12	?
	4	S13	?
	5	S14	?

Tabela 2.

Sequências de DNA de aroeira encontradas nos lotes de madeira amostrados nas quatro lojas moveleiras e origem das amostras.

Questão 2: Foi possível encontrar a origem de todas as madeiras dos quatro lotes de aroeira? O banco de dados utilizado só possuía sequências de DNA de duas áreas de extrativismo e duas unidades de conservação. Este fato causou problemas para a atribuição dos locais de origem das amostras? Comentar os problemas envolvidos na atribuição dos locais de origem e apontar soluções para eles.

O rastreamento da origem do material baseia-se nas variações observadas em cada uma das áreas e nas diferenças entre as sequências de DNA de cada área. Seguem as análises:

Lote 1: Não conseguimos determinar a área exata das amostras, mas conseguimos determinar que 4 amostras (1 a 4) são oriundas de áreas de extrativismo. Já a origem da amostra 5 não pode ser determinada



porque possui as sequências de DNA S4, compartilhada por todas as áreas.

Lote 2: Também conseguimos determinar que 4 amostras são de áreas de extrativismo, mas não exatamente qual é a área. Porém, para a amostra 5, conseguimos determinar que é oriunda da Área 2 porque esta amostra possui a sequência S5, exclusiva desta Área.

Lote 3: Não conseguimos determinar a origem da amostra 1 porque esta amostra possui as sequências de DNA S4, compartilhada por todas as áreas. Já para as amostras 2, 3, 4, conseguimos determinar apenas que elas são oriundas de unidades de conservação (B1 ou B2), porque estas amostras têm sequências de DNA compartilhadas entre as áreas. Para a amostra 5, determinamos que é oriunda da Área B1. Desta forma, por comercializar madeiras de plantios, a loja moveleira correspondente ao lote 3 pode ser autuada por crime ambiental.

Lote 4: A amostra 1 é proveniente de área de extrativismo (A1 ou A2), mas a amostra 2 pode ser oriunda de qualquer uma das quatro áreas. Entretanto, as amostras 3, 4 e 5 não puderam ser rastreadas, ou seja, não podem ter origem determinada. Só sabemos que se trata de material ilegal porque podemos excluir as Áreas A1 e A2 como fontes de origem. As sequências de DNA do lote 4 são muito diferentes das presentes nestas duas áreas. Apesar disso, não conseguimos rastrear sua origem porque o material apreendido apresenta sequências que não estão presentes nos bancos de dados e este problema só poderia ser contornado se contássemos com um banco de dados maior, que englobasse grande parte das populações naturais da aroeira, ao longo de toda sua distribuição.

Questão 3: Como a genética contribuiu para a elucidação do crime ambiental?

As análises genéticas, além de permitirem a identificação de espécies, também permitiram rastrear a origem do material com base na comparação de sequências obtidas a partir da análise de uma região do DNA. Isto só foi possível porque o marcador molecular utilizado foi capaz de evidenciar o polimorfismo entre indivíduos (amostras) e apresentar

variação ao longo da distribuição da espécie investigada. Assim, fomos capazes de rastrear essa variabilidade e identificar sua provável origem. Desta forma, a análise genética é fundamental em problemas onde a identificação por características morfológicas não pode contribuir, por exemplo, para a identificação de origem.

Questão 4: Quais as principais dificuldades na utilização deste método baseado em marcador molecular?

A principal dificuldade é estabelecer bancos de dados robustos e abrangentes, ou seja, com muitos marcadores moleculares e com sequências de indivíduos de muitas áreas, para a maioria das espécies que se encontram ameaçadas por atividades exploratórias ilegais. Isso envolveria a capacitação de profissionais para lidar com a geração de dados genéticos e a designação de verbas específicas para a implementação desse banco de dados. A partir disso, a utilização do método seria facilitada e poderia ser realizada rapidamente, fornecendo indícios robustos para solucionar casos de crimes ambientais.

REFERÊNCIAS

- DEGUILLLOUX, M.F; PEMONGE, M. H; PETIT, R. J. DNA-based control of oak wood geographic origin in the context of the cooperation industry. *Ann. For. Sci.*, v. 61, p. 97-104, 2004.
- GRAVENA, W.; HRBEK, T.; SILVA, V. M. F.; FARIAS, I. P. Amazon river dolphin love fetishes: from folklore to molecular forensics. *Mamm. Sci.*, v. 24, p. 969-978, 2008.
- LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. São Paulo: *Plantarum*, v.1, p. 368, 1992.
- MMA. Instrução Normativa MMA nº 6, de 23 de setembro de 2008, que reconhece as espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/documentos/lista-de-especies-ameacadas-de-extincao>.
- SANCHES, A.; PEREZ WAM; FIGUEIREDO, M. G.; ROSSINI, B. C.; CERVINI, M.; GALETTI JR, P.M.; GALETTI, M. Wildlife forensic DNA and lowland tapir (*Tapirus terrestris*) poaching. *Conservation Genet. Resour.*, v. 3, p. 189-193, 2011.

