

Junielson Soares da Silva  
Renato Corrêia Lima  
Simone Cardoso Soares  
Jacqueline da Silva Batista  
Kyara Martins Formiga

Organizadores

# DNAlogando sobre conservação e biologia evolutiva na Amazônia



Mute Stop Video Participants Chat Share Screen Record Reactions Leave

Junielson Soares da Silva  
Renato Corrêia Lima  
Simone Cardoso Soares  
Jacqueline da Silva Batista  
Kyara Martins Formiga

**Organizadores**

# **DNAlogando sobre conservação e biologia evolutiva na Amazônia**

1ª edição

**Editora Itacaiúnas**

Ananindeua - Pará

2021

**Presidente da República**  
Jair Messias Bolsonaro

**Ministro da Ciência, Tecnologia e Inovações**  
Marcos Cesar Pontes

**Diretora do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia**  
Antônia Maria Ramos Franco Pereira

**Coordenadora de Capacitação - COCAP**  
Beatriz Ronchi Teles

**Coordenador Geral de Pós Graduação - COPOG**  
Paulo Maurício Lima de Alencastro Graça

**Conselho do Programa de Pós Graduação em Genética  
Conservação e Biologia Evolutiva – PPG-GCBEv**  
Jacqueline da Silva Batista – coordenadora;  
Vera Maria Fonseca de Almeida e Val – vice coordenadora;  
Eliana Feldberg – membro docente;  
Junielson Soares da Silva – representante discente;  
Renato Corrêia Lima – vice representante discente.

**Organizadores**

Junielson Soares da Silva  
Renato Corrêia Lima  
Simone Cardoso Soares  
Jacqueline da Silva Batista  
Kyara Martins Formiga

## Organização



## Financiamento e apoio



PARA AS MULHERES NA CIÊNCIA  
EM PARCERIA COM

©2021 por Junielson Soares da Silva, Renato Corrêa Lima, Simone Cardoso Soares, Jacqueline da Silva Batista e Kyara Martins Formiga (Orgs.)

©2021 por vários autores  
*Todos os direitos reservados.*

**Diagramação:** Deivid Edson

**Preparação e organização de originais:** Walter Rodrigues

**Projeto de capa:** Walter Rodrigues

**Foto de capa:** dos autores e organizadores.

**Revisão:** Juliana Nascimento da Silva, Junielson Soares da Silva, Renato Corrêa Lima, Sabrina da Fonseca Meireles, Ana Caroline Viana da Silva, Kyara Martins Formiga, Gabriel José da Silva Serra e Vanessa Sales Pereira de Oliveira

#### **Conselho editorial / Colaboradores**

Márcia Aparecida da Silva Pimentel – Universidade Federal do Pará, Brasil

José Antônio Herrera – Universidade Federal do Pará, Brasil

Márcio Júnior Benassuly Barros – Universidade Federal do Oeste do Pará, Brasil

Miguel Rodrigues Netto – Universidade do Estado de Mato Grosso, Brasil

Wildoberto Batista Gurgel – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Brasil

André Luiz de Oliveira Brum – Universidade Federal de Rondônia, Brasil

Mário Silva Uacane – Universidade Licungo, Moçambique

Francisco da Silva Costa – Universidade do Minho, Portugal

Ofélia Pérez Montero - Universidad de Oriente – Santiago de Cuba, Cuba

Editora-chefe: Viviane Corrêa Santos – Universidade do Estado do Pará, Brasil

Editor e web designer: Walter Luiz Jardim Rodrigues – Editora Itacaiúnas, Brasil

Editor e diagramador: Deivid Edson Corrêa Barbosa - Editora Itacaiúnas, Brasil

#### **Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD**

D629 DNAlógando sobre conservação e biologia evolutiva na Amazônia [recurso eletrônico] / vários autores ; organizado por Junielson Soares da Silva ... [et al.]. - Ananindeua : Itacaiúnas, 2021.

105 p. ; il. : PDF ; 3 MB.

Inclui bibliografia.

ISBN: 978-65-89910-03-9 (Ebook)

DOI:10.36599/itac-dna

1. Biologia. 2. Conservação. 3. Amazônia. 4. Biologia evolutiva. 5. Diversidade. I. Silva, Junielson Soares da. II. Lima, Renato Corrêa. III. Soares, Simone Cardoso. IV. Batista, Jacqueline da Silva. V. Formiga, Kyara Martins. VI. Título.

2021-1716

CDD 570

CDU 57

**Elaborado por Vagner Rodolfo da Silva - CRB-8/9410**

#### **Índice para catálogo sistemático:**

1. Biologia 570

2. Biologia 57

---

O conteúdo desta obra, inclusive sua revisão ortográfica e gramatical, bem como os dados apresentados, é de responsabilidade de seus participantes, detentores dos Direitos Autorais.

Esta obra foi publicada pela [Editora Itacaiúnas](#) em novembro de 2021.

# Sumário

## **APRESENTAÇÃO .....9**

Jacqueline da Silva Batista

## **SERÁ A *Disciseda bovista* (BASIDIOMYCOTA, LYCOPERDACEAE) DO BRASIL, A MESMA DA EUROPA? .....11**

DOI: 10.36599/itac-dna.0001

Rafaela Araújo Ferreira Gurgel

Iuri Goulart Baseia

Tiara Sousa Cabral

## **AVANÇOS PARA O CONHECIMENTO DA DIVERSIDADE DE FUNGOS GASTÉROIDES NA AMAZÔNIA BRASILEIRA .....15**

DOI: 10.36599/itac-dna.0002

Tiara Sousa Cabral

Charles Roland Clement

Kentaro Hosaka

Iuri Goulart Baseia

## **EXISTE *Saccharomyces cerevisiae* TOLERANTE A TEMPERATURA NO CUPUAÇUZEIRO? .....19**

DOI: 10.36599/itac-dna.0003

Flávia da Silva Fernandes

João Vicente Braga de Souza

Jacqueline da Silva Batista

## **COMO PODEMOS EXTRAIR O MELHOR DNA DO APURÚ (RUBIACEAE)? .....24**

DOI: 10.36599/itac-dna.0004

Juliana Nascimento da Silva

Cecilia Veronica Nunez

Jacqueline da Silva Batista

## **QUAL O EFEITO DO DILAPIOL E SEUS DERIVADOS EM *Aedes aegypti* E *Aedes albopictus*? .....29**

DOI: 10.36599/itac-dna.0005

Junielson Soares da Silva

Ana Cristina da Silva Pinto

Sabrina da Fonseca Meireles

Daniel Luís Viana Cruz

João Marcelo de Castro Sousa

Miriam Silva Rafael

## **ATIVIDADE LARVICIDA DA SUBSTÂNCIA NEROLIDOL CONTRA *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE).....33**

DOI: 10.36599/itac-dna.0006

Sabrina da Fonseca Meireles

Ana Cristina da Silva Pinto

Junielson Soares da Silva

Joaquim Ferreira do Nascimento Neto

Daniel Luís Viana Cruz

Miriam Silva Rafael

**MAPEAMENTO FÍSICO DE GENES DE RESPOSTA IMUNE EM *Anopheles darlingi*** .....38

DOI: 10.36599/itac-dna.0007

Leticia Cegatti Bridi  
Míriam Silva Rafael

**O QUE O CÓDIGO DE BARRAS DE DNA NOS CONTA SOBRE A DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DO COMPLEXO *Anopheles albitarsis*?** .....42

DOI: 10.36599/itac-dna.0008

Wagner Oliveira de Azevedo  
Jacqueline da Silva Batista  
Míriam Silva Rafael

**EXISTEM “GENES SALTADORES” NO GENOMA?** .....46

DOI: 10.36599/itac-dna.0009

Simone Cardoso Soares  
Eliana Feldberg

**DIVERSIDADE DE ANFÍBIOS E RÉPTEIS NAS FLORESTAS NEOTROPICAIS ÚMIDAS**.....51

DOI: 10.36599/itac-dna.0010

Renata M. Pirani  
Fernanda P. Werneck

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE QUEIJO COALHO COMERCIALIZADO EM FEIRA DE MANAUS, AMAZONAS**.....56

DOI: 10.36599/itac-dna.0011

Gabriel José da Silva Serra  
Caroline Sobrinho Barros  
Gisele Macedo de Souza  
Hudson Batista da Costa  
Ricardo Felipe Caramês

**CÓDIGO DE BARRAS DE DNA APLICADO AOS PEIXES ORNAMENTAIS DO GÊNERO *Hypessobrycon***.....61

DOI: 10.36599/itac-dna.0012

Francis Paola Castro Paz  
Jacqueline da Silva Batista  
Jorge Ivan Rebelo Porto

**ABELHAS E FUNGOS PODEM VIVER JUNTOS?** .....65

DOI: 10.36599/itac-dna.0013

Michael Rubem Miranda Tiago  
João Vicente Braga de Souza  
Gislene Almeida Carvalho Zilse

**POR ONDE A PIRAMUTABA MIGRA E POR QUE CONSERVAR ESSE RECURSO PESQUEIRO?** .....70

DOI: 10.36599/itac-dna.0014

Kyara Martins Formiga  
Jacqueline da Silva Batista  
José Antônio Alves-Gomes

**SENSIBILIZAR PARA CONSERVAR: IMPORTÂNCIA DO MÉTODO DIDÁTICO LÚDICO PARA O ENSINO DE EDUCAÇÃO AMBIENTAL .....75**

DOI: 10.36599/itac-dna.0015

Ana Caroline Viana da Silva  
Aldalúcia Macedo dos Santos Gomes  
Jacqueline da Silva Batista  
Kyara Martins Formiga

**QUEM FREQUENTA O ENCONTRO DAS ÁGUAS? DETECTANDO VERTEBRADOS AQUÁTICOS E TERRESTRES .....79**

DOI: 10.36599/itac-dna.0016

Larissa Matos Batista  
Carolina Sousa de Sá-Leitão  
Vera Maria Fonseca de Almeida-Val

**O QUE OLHOS NÃO VEEM, O DNA EXPLICA: DIVERSIDADE CRÍPTICA DO CALANGO-LISO..... 83**

DOI: 10.36599/itac-dna.0017

Erik L. Choueri  
Adriana V. Castro  
Rafael N. Leite  
Fernanda P. Werneck

**IMPACTO DA IGREJA SOBRE O APRENDIZADO DA EVOLUÇÃO HUMANA NA ESCOLA..... 88**

DOI: 10.36599/itac-dna.0018

Gildean Macedo do Nascimento  
Ingrety Lorrana Alves da Silva  
Jayane Sousa Santos  
Mark Henrique Santana Silva  
Viktória Letícia Ribeiro de Oliveira  
Jacqueline da Silva Batista  
Renato Corrêia Lima

**“SHOW DA EVOLUÇÃO”: UM JOGO LÚDICO PARA ENSINAR BIOLOGIA EVOLUTIVA.....92**

DOI: 10.36599/itac-dna.0019

Adrielle de Jesus Machado Santos  
Wanderson Lima Cunha  
Gabriel Guzzard Santos da Cruz  
Luiz Fernando Lima Carvalho  
Jacqueline da Silva Batista  
Renato Corrêia Lima

**GLOSSÁRIO ..... 97**

**SOBRE OS ORGANIZADORES..... 102**



## APRESENTAÇÃO

A elaboração desta obra ocorre em um ano (2020) em que o Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), uma das três instituições vinculadas ao MCTI da região Norte, completa 68 anos de criação. O Programa de Pós Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva do INPA (PPG-GCBEv), o único do Estado do Amazonas na área de Ciências Biológicas I na CAPES, completa 17 anos de existência e ao longo desse tempo tituló 215 discentes sendo 158 mestres e 57 doutores. Em 2020 também completam 10 anos de realização do Workshop do Programa, no qual reunimos estudantes de graduação para conhecer o PPG, alguns dos estudos que são conduzidos e setores do INPA, entre eles um dos maiores Programas de Coleções Biológicas do País, além do Bosque da Ciência, onde o visitante pode ver o peixe boi, ariranha, poraquê (peixe elétrico), tartarugas, jacarés, a tanibuca (árvore com cerca de 600 anos), entre outros seres da fauna e da flora, bem como uma Casa da Ciência totalmente modernizada.

A ideia deste E-book teve origem por parte de um grupo de discentes do PPG-GCBEv e logo apoiada pelo Conselho do Programa, durante um momento em que o mundo passou a vivenciar a Pandemia Viral da COVID-19 e seus drásticos e inesquecíveis impactos. Atividades presenciais acadêmicas, e em Laboratório, ficaram suspensas ou consideravelmente restritas. As reuniões virtuais e “Lives” passaram abruptamente a fazer parte do nosso cotidiano. Um período em que a importância da ciência, e de se investir nela, foi propagado aos quatro cantos do mundo.

O exercício dos diferentes atores da academia científica vinculados ao Programa, aflorou no sentido de intensificar a produção científica neste período singular. Em gerar uma obra que pudesse ser de divulgação científica, sobre pesquisas realizadas no INPA, na Amazônia, no PPG-GCBEv por seus discentes, docentes, egressos e colaboradores. Além disso, que pudesse ser em língua portuguesa, em meio a uma área em que o idioma universal é basicamente a língua inglesa, e assim pudesse ser disponibilizada e “DNAlogar” com um amplo público, especialmente os estudantes da educação básica e de graduação além de seus professores. Sim, acreditamos que entre eles também

estão os futuros atores da sociedade, formadores de opinião e reflexões. Profissionais de uma Sociedade mais justa.

Este E-book reúne 19 capítulos referente a pesquisas com organismos integrantes da fauna e flora amazônica, realizadas dentro das três áreas do Programa: Genética de Organismos Tropicais (11), Conservação de Espécies Neotropicais (04) e Biologia Evolutiva (02). Pelo menos duas destas linhas de pesquisa são contempladas em mais dois capítulos. Para que nosso “DNAlogo” flua da melhor forma possível, incluímos um glossário com termos e conceitos biológicos citados ao longo dos capítulos.

Um time que inclui 12 egressos, 14 discentes e 11 docentes vinculados ao Programa, além de 12 estudantes de graduação e oito participantes e colaboradores externos, atuaram como autores ao longo de boa parte do ano de 2020 para que esta obra se tornasse realidade. Estes autores são oriundos de sete instituições nacionais e uma Instituição internacional.

Agradecemos a toda equipe de autores, bem como às agências de fomento de bolsas e auxílios à Pesquisa, por oportunizar a realização de pesquisa científica no âmbito do Programa e junto com os revisores, editores e editora pudésemos cumprir com um de nossos objetivos com a publicação desta obra, ao divulgar um pouco de nossas perguntas e algumas respostas.

Sigamos em frente a favor da ciência, da divulgação científica e em busca de conhecer a biodiversidade amazônica para melhor preservá-la ou conservá-la.

Desejamos uma ótima leitura!

**Dra. Jacqueline da Silva Batista**

Coordenadora do PPG-GCBEv/INPA

## SERÁ A *Disciseda bovista* (BASIDIOMYCOTA, LYCOPERDACEAE) DO BRASIL, A MESMA DA EUROPA?

DOI: 10.36599/itac-dna.0001

Rafaela Araújo Ferreira GURGEL<sup>1</sup>; Iuri Goulart BASEIA<sup>2</sup>; Tiara Sousa CABRAL<sup>3</sup>

Autores correspondentes: [rafaelaf.gurgel@gmail.com](mailto:rafaelaf.gurgel@gmail.com); [ttiara@gmail.com](mailto:ttiara@gmail.com)

<sup>1</sup>Discente de mestrado do PPG-GCBEV, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

<sup>2</sup>Docente do PPG-SE, Departamento de Botânica e Zoologia, Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte

<sup>3</sup>Docente do PPG-GCBEV, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

### 1. O que fazemos?

Estima-se que existam entre 2,2 e 3,8 milhões de espécies de fungo em todo o planeta<sup>1</sup>. No entanto, na melhor das hipóteses, conhecemos hoje 8% desse potencial imenso. Dentre tanta diversidade, existem aqueles que são conhecidos como *puffballs*, que recebem tal nome devido ao basidioma permanecer fechado até a completa maturação dos basidiósporos.

Os *puffballs* são decompositores da matéria orgânica e participam de processos simbióticos. Na medicina, já foram utilizados como cicatrizantes, podendo possuir propriedades anti-inflamatórias, antibacterianas, antimaláricas, antimicrobianas, antioxidantes, antitumorais e antivirais<sup>2</sup>.

Dentre os *puffballs* o foco deste estudo foi o gênero *Disciseda*. Estes são macrofungos da família Lycoperdaceae, filo Basidiomycota, que possui distribuição mundial e estão restritos à habitats arenosos e desérticos. Sua principal característica é a formação de uma estrutura denominada *sand case* ou “caixa de areia”, que seria uma parte remanescente do perídio encontrada em sua porção basal, que auxilia na dispersão dos esporos<sup>3</sup>. Algumas espécies, como *Disciseda bovista* teve sua ocorrência diminuída na Europa em mais de 50%, devido à destruição de seu hábitat, sendo inserida na lista vermelha em vários países<sup>4</sup>.

A identificação das espécies desses fungos tem sido tradicionalmente baseada em dados morfológicos de seus basidiósporos. O pequeno número de caracteres morfológicos para identificar ou segregar as espécies, além da similaridade macroscópica dos basidiomas leva então à limitação dos estudos sobre esse gênero. Nossa hipótese é que as espécies de *Disciseda* no Brasil

não estão bem identificadas, pois devem pertencer a espécies diferentes das do Hemisfério Norte.

Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo integrar a taxonomia morfológica e molecular, utilizando sequências de DNA da região do espaçador interno transcrito (ITS) para delimitar algumas espécies do gênero *Disciseda*, para verificar a identidade de espécies coletadas no Brasil em relação às coletadas na Europa.

## 2. Como fazemos?

Para atingir nosso objetivo, analisamos espécimes oriundas de Herbários nacionais e internacionais identificados como *Disciseda* e foram realizadas análises morfológicas e moleculares. As análises macro e micromorfológicas incluíram o perídio (porção que reveste a gleba) e a gleba (porção onde se encontra os esporos), e seguiram literaturas padrões<sup>5</sup>. As microestruturas foram observadas com auxílio de Microscópio Óptico.

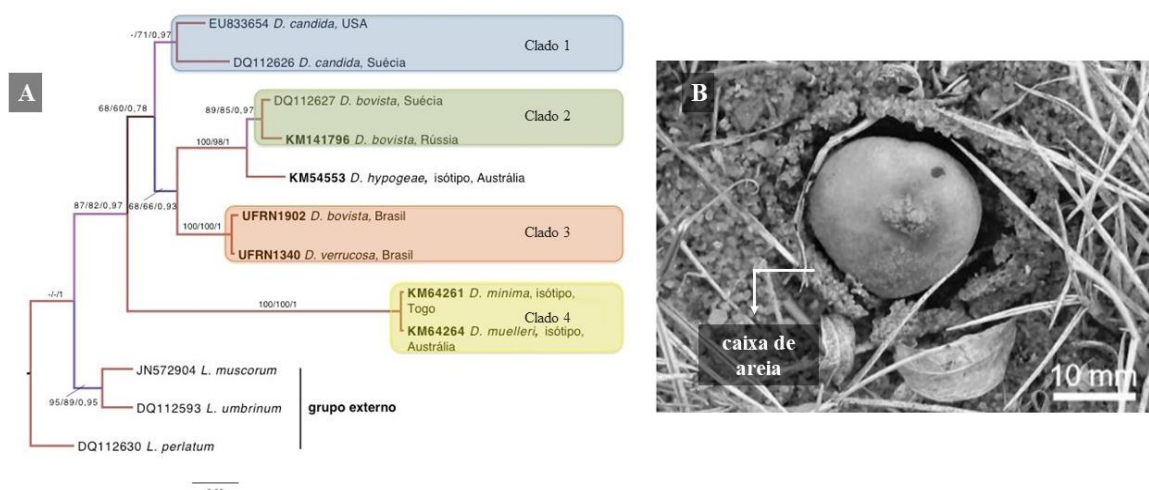
As análises moleculares foram realizadas a partir da comparação de sequências de DNA ribossômico dos espécimes, onde foram extraídas, amplificadas e sequenciadas a região do ITS. Após obtenção das sequências, estas foram utilizadas na construção de árvores filogenéticas/genealógicas para demonstrar as diferenças entre os indivíduos de *Disciseda*.

## 3. O que percebemos/observamos?

Na árvore filogenética gerada (Figura 1A), podemos observar a representação da melhor hipótese a respeito de como um conjunto das espécies de *Disciseda* evoluíram de um ancestral comum, e foram gerados quatro clados terminais bem apoiados dentro de *Disciseda*.

No clado 2, estavam agrupados os espécimes de *Disciseda bovista*, oriundo da Europa, localidade do material tipo. *Disciseda bovista* é uma espécie descrita por Johann Friedrich Klotzsch em 1843 e são reconhecidos pelas grandes dimensões de seus basidiomas (15–25 mm diam.) em comparação com outras espécies, como por exemplo, *Disciseda candida* (11–13 mm diam.), e por ter basidiósporos globosos, medindo 5,5–6,4 x 7-7,4 µm diam., fortemente verrucoso, com verrugas e espinhos irregulares em tamanhos, truncados no ápice. O resultado mais significativo obtido deste estudo foi a descrição de uma

nova espécie (Figura 1B) a partir de uma exsicata onde o material coletado era da Floresta Nacional do Araripe (CE). O espécime antes identificado como *D. bovista* (clado 3) difere morfológica e filogeneticamente dos espécimes de *D. bovista* descritos para a Europa (clado 2). Os basidiósporos são menores nos espécimes do Brasil, medindo 4,8–5,4 x 4,8–5,7 µm diam., com verrugas pontudas, espaçadas entre si, além disso, possui poros menores em suas hifas. Por possuir a ornamentação de espinhos em forma de dedos, o material brasileiro se aproxima de *D. verrucosa*, mas esta possui esporos formados por espinhos, que se curvam na extremidade, e não apresentam poros nas hifas, diferente das hifas da nova espécie proposta. Os dois espécimes do clado 3 apresentam o mesmo tipo de basidiósporos e de hifas, apresentando apenas diferentes estágios de maturação, além de uma sequência ITS idêntica.



**Figura 1:** A utilização de ferramentas moleculares e morfológicas entre os espécimes de *Disciseda* demonstra a existência de uma nova espécie para a ciência. Em A, árvore filogenética demonstrando as relações evolutivas entre as espécies de *Disciseda* analisadas no estudo. Em B, foto do basidiomas da nova espécie encontrada na Chapada do Araripe, demonstrando o sand case, adaptada de Silva *et. al.* (2014)<sup>5</sup>.

#### 4. Para que fazemos?

Neste trabalho, demonstra-se a importância de utilizar ferramentas moleculares para auxiliar a elucidar problemas taxonômicos no estudo dos fungos. O estudo de fungos se demonstra importante não só devido a seus benefícios diretos e indiretos, mas também pela grande diversidade que não se conhece. Todas as formas de vida dependem de alguma forma dos fungos para sobreviver, então se conhecermos os fungos, estaremos de certa forma protegendo todas as outras formas de vida. O conhecimento sobre quais espécies existem ou estão ameaçadas, servem de base para estratégias de

conservação, para políticas públicas e até defesa dos ambientes onde essas espécies ocorrem.

### Agradecimentos

Os autores agradecem às agências de fomento PIBIC / CNPq e CAPES pelas bolsas.

### Referências

1. Hawksworth, D. L.; Lucking, R. 2017. "Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species" *Microbiology Spectrum*, 5: 4.
2. Guzmán, G. 1994. Los hongos en la medicina tradicional de Mesoamérica y de México. *Revista Iberoamericana de Micología*, 11: 81-85.
3. Cortez, V. G.; Baseia, I.G.; Silveira, R. M. B. 2010. Gasteroid mycobiota of Rio Grande do Sul, Brazil: *Arachnion* and *Disciseda* (Lycoperdaceae). *Acta Biológica Paranaense.*, 39: 19–27.
4. Venturella, G; Perini, C; Barluzzi, C; Pacioni, G; Bernicchia, A; Padovan, F; Quadraccia, L.; Onofri, S. 1997. Towards a Red Data List of fungi in Italy. *Boccone*, 5: 867-872.
5. Silva, B.; Baseia, I. 2014. New records of *Disciseda* (Agaricales Fungi) in the semiarid regions of Northeast Brazil. *Journal of the Torrey Botanical Society*, 141(4):353-362.

# AVANÇOS PARA O CONHECIMENTO DA DIVERSIDADE DE FUNGOS GASTEROIDES NA AMAZÔNIA BRASILEIRA

DOI: 10.36599/itac-dna.0002

Tiara Sousa CABRAL<sup>1</sup>; Charles Roland CLEMENT<sup>2</sup>; Kentaro HOSAKA<sup>3</sup>; Iuri Goulart BASEIA<sup>4</sup>

Autores correspondentes: [ttiara@gmail.com](mailto:ttiara@gmail.com); [cclement@inpa.gov.br](mailto:cclement@inpa.gov.br)

<sup>1</sup>Egresso de doutorado do PPG-GCBEv, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

<sup>2</sup>Docente do PPG-GCBEv, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

<sup>3</sup>National Museum of Nature and Science, Tsukuba, Ibaraki, Japão

<sup>4</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN

## 1. O que fazemos?

Os fungos compõem um reino de organismos eucariotos e heterotróficos, mais proximamente relacionados aos animais que às plantas; exercem importante papel nos ecossistemas, participando de diversas relações, como decompositores, parasitas, predação e mutualismo. Além disso, apresentam alto potencial biotecnológico, sendo capazes de sintetizar bioprodutos que são naturalmente utilizados em estratégias de sobrevivência, como a mundialmente reconhecida penicilina.

No reino Fungi, a classe Agaricomycetes (Basidiomycota) é composta pelos fungos que produzem corpos de frutificação conhecidos popularmente por cogumelos. Os agaricomycetes do tipo gasteroide possuem liberação e dispersão dos esporos dependentes de agentes externos, como vento, insetos e pequenos mamíferos. Assim, possuem variadas morfologias e hábitos, adaptados principalmente à forma de dispersão dos esporos.

As estimativas mais recentes de diversidade mundial dos fungos sugerem cerca de 2,2 a 3,8 milhões de espécies. No entanto, até 2017, as espécies que foram formalmente descritas correspondiam a apenas 8 % da diversidade estimada<sup>1</sup>. Tendo em vista o baixo conhecimento da diversidade fúngica amazônica, especialmente para os fungos gasteroides, estudos têm sido realizados desde 2012, resultando no descobrimento de novas espécies e novos registros a partir de análises taxonômicas integrativas que reúnem informações das características morfológicas e genéticas que auxiliam na classificação e sistemática da espécie.

## 2. Como fazemos?

Primeiramente, as coletas foram realizadas em diversas áreas da Amazônia brasileira. Os espécimes coletados foram morfológicamente identificados por análises macro e microscópicas, seguindo literatura disponível<sup>2</sup>. Regiões específicas do DNA foram amplificadas e sequenciadas, e utilizadas para análises de DNA *barcode* e filogenia molecular, que mostram as relações de parentesco entre as espécies em estudo.

## 3. O que percebemos/observamos?

As análises de taxonomia integrativa mostraram que há diversas espécies ainda desconhecidas para a ciência. Com este trabalho, de 2012 a 2019 foram descritas oito espécies novas e oito novos registros de fungos gasteroides para a Amazônia brasileira, que exercem papel importante no ecossistema por meio da ciclagem de nutrientes (Tabela 1, Figura 1). Além disso, encontramos que algumas espécies que eram conhecidas por terem distribuição mundial na verdade são compostas por várias unidades evolutivas diferentes (espécies diferentes).

**Tabela 1:** Lista das espécies novas e novos registros de fungos gasteroides para a Amazônia brasileira, de 2012 a 2019. Números sobrescritos indicam a fonte de citação.

Novas espécies	Novos registros
<i>Geastrum echinulatum</i> <sup>3</sup>	<i>Geastrum lloydianum</i> <sup>2</sup>
<i>Geastrum inpaense</i> <sup>2</sup>	<i>Geastrum schweinitzi</i> <sup>2</sup>
<i>Geastrum verrucoramulosum</i> <sup>4</sup>	<i>Lysurus arachnoideus</i> <sup>8</sup>
<i>Mutinus verrucosus</i> <sup>5</sup>	<i>Mutinus fleischeri</i> <sup>2</sup>
<i>Phallus denigricans</i> <sup>6</sup>	<i>Phallus atrovolvatus</i> <sup>2</sup>
<i>Phallus purpurascens</i> <sup>6</sup>	<i>Phallus cinnabarinus</i> <sup>8</sup>
<i>Phallus squamulosus</i> <sup>6</sup>	<i>Phallus merulinus</i> <sup>2</sup>
<i>Xylophallus clavatus</i> <sup>7</sup>	<i>Staheliomyces cinctus</i> <sup>2</sup>





**Figura 1:** Exemplos das novas espécies: (A) *Phallus denigricans*, e (B) *Geastrum verrucoramulosum*. Exemplo de um novo registro: (C) *Staheliomyces cinctus*. As barras indicam 20 mm.

#### 4. Para que fazemos?

Este trabalho resume as principais publicações sobre fungos gasteroides da Amazônia brasileira, no período de 2012 a 2019, sendo, portanto, uma contribuição para o entendimento da diversidade e evolução destes fungos de forma geral. O número de novas espécies descritas e novos registros reflete a falta de estudos deste grupo nas áreas de florestas Neotropicais, especialmente para a Amazônia. Este trabalho também mostra a importância da inclusão de dados moleculares no estudo de taxonomia e sistemática de fungos, pois a delimitação das espécies só pode ser realizada ao se utilizar taxonomia integrativa.

A continuidade de estudos com propósito de observar a diversidade de fungos em ambientes pouco explorados é de extrema importância, principalmente em áreas que sofrem intensa atividade humana, como é o caso da Amazônia. O conhecimento desses fungos permite um maior entendimento da diversidade e evolução do grupo, assim como, possibilita futuros estudos

taxonômicos, ecológicos e de conservação. Por fim, o conhecimento da diversidade fúngica também permite a exploração sustentável para diversos fins, como alimentar e biotecnológico<sup>9</sup>, uma vez que espécies deste grupo já são reconhecidamente comestíveis em vários locais no mundo.

### Agradecimentos

Os autores agradecem aos órgãos de financiamento CAPES (Código de Financiamento 001), CNPq (473422/2012-3, 160321/2013-1 e 458210/2014-5) e FAPEAM (3137/2012).

### Referências

1. Hawksworth, D.L.; Lücking, R. 2017. Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. *Microbiology Spectrum* 5.
2. Cabral, T.S.; da Silva, B.D.B.; Ishikawa, N.K.; Alfredo, D.S.; Braga-Neto, R.; Clement, C.R.; et al. 2014. A new species and new records of gasteroid fungi (Basidiomycota) from Central Amazonia, Brazil. *Phytotaxa* 183: 239–253.
3. da Silva, B.D.B.; Cabral, T.S.; Marinho, P.; Ishikawa, N.K.; Baseia, I.G. 2013. Two new species of *Geastrum* (Geastraceae, Basidiomycota) found in Brazil. *Nova Hedwigia* 96: 445–456.
4. Cabral, T.S.; Sousa, J.O.; Silva, B.D.B.; Martín, M.P.; Clement, C.R.; Baseia, I.G. 2017. A remarkable new species of *Geastrum* with an elongated branched stipe. *Mycoscience* 58: 344–350.
5. Crous, P.W.; Wingfield, M.J.; Burgess, T.I.; Carnegie, A.J.; St.J. Hardy, G.E.; Smith, D.; et al. 2017. Fungal Planet description sheets : 625 – 715. *Persoonia* 39: 270–467.
6. Cabral, T.S.; Silva, B.D.B.; Martín, M.P.; Clement, C.R.; Hosaka, K.; Baseia, I.G. 2019. Behind the veil – exploring the diversity in *Phallus indusiatus* s.l. (Phallomycetidae, Basidiomycota). *MycKeys* 127: 103–127.
7. Crous, P.W.; Wingfield, M.J.; Burgess, T.I.; Hardy, G.E.S.J.; Gené, J.; Guarro, J.; et al. 2018. Fungal Planet description sheets: 716 – 784. *Persoonia* 40: 240–393.
8. Cabral, T.S.; Clement, C.R.; Baseia, I.G. 2015. Amazonian phalloids: New records for Brazil and South America. *Mycotaxon* 130: 315–320.
9. Begerow, D.; Nilsson, H.; Unterseher, M.; Maier, W. 2010. Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures. *Applied microbiology and biotechnology* 87: 99–108.

## EXISTE *Saccharomyces cerevisiae* TOLERANTE A TEMPERATURA NO CUPUAÇUZEIRO?

DOI: 10.36599/itac-dna.0003

Flávia da Silva FERNANDES<sup>1</sup>; João Vicente Braga de SOUZA<sup>2</sup>

Jacqueline da Silva BATISTA<sup>2</sup>

Autores correspondentes: [flaviafernandes19@gmail.com](mailto:flaviafernandes19@gmail.com); [jac@inpa.gov.br](mailto:jac@inpa.gov.br)

<sup>1</sup>Discente de doutorado do PPG-GCBEv, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

<sup>2</sup>Docente do PPG-GCBEv, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

### 1. O que fazemos?

Diversos estudos científicos no campo microbiológico têm sido cruciais para a evolução da indústria de etanol no Brasil, auxiliando no aprimoramento e desenvolvimento de novos processos de fermentação, melhor controle de contaminantes bacterianos, melhoria do controle químico e microbiológico nas destilarias. Atualmente, novas fronteiras científicas e tecnológicas são enfrentadas pela indústria para melhorar o processo de fermentação da produção de etanol no Brasil, uma delas é a seleção de novas linhagens robustas de leveduras para o ramo industrial<sup>1,2</sup>. *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 1), é uma levedura amplamente encontrada em plantas, frutas, solo, alimentos, bebidas cozidas e fermentadas. **Sim! Ela está mais presente em sua vida do que você imagina.**



**Figura 1:** Levedura *Saccharomyces cerevisiae*. (Fonte: Própria).

Essa espécie de levedura é a mais conhecida, por apresentar importância biotecnológica para diferentes setores econômicos, pois realiza fermentação

alcoólica, além de ser comumente utilizada na produção de pães, bolos, bebidas alcoólicas e etanol<sup>3</sup>.

O Brasil é o segundo maior produtor de etanol no mundo e o custo efetivo da produção desse combustível está sujeito, entre outros fatores, ao elevado rendimento e a rápida conversão dos carboidratos a etanol. Contudo, a temperatura em excesso pode se tornar um fator de estresse substancial durante o processo fermentativo. **Mas o que há de importante em uma levedura termotolerante?** Uma das principais aplicações é o seu uso no método de sacarificação (conversão do amido em açúcar) e fermentação simultâneas da biomassa, pois nesse procedimento, a temperatura ótima para a sacarificação é mais alta do que pode ser tolerada pela maioria das leveduras produtoras de etanol, fato que poderia ser otimizado por meio da utilização destas leveduras termotolerantes<sup>4,5</sup>.

As espécies de leveduras do gênero *Saccharomyces* sp. têm sido estudadas como modelo há muitos anos, sendo o primeiro organismo eucarioto a ter seu genoma completamente sequenciado<sup>6</sup>. Nessa espécie, as sequências de DNA da região do espaço interno transcrito (ITS) do rDNA, são altamente conservadas. Tal fato, possibilita a distinção em nível intra e interespecífico tornando-se uma ferramenta útil na identificação molecular de espécies de fungos<sup>7,8</sup>. Dessa forma, a Subcomissão Internacional de Barcode em fungos propôs a região ITS como o principal código de barras fúngico ou a região padrão para identificação de espécies.

As leveduras desempenham um papel essencial na fermentação, uma vez que esses microrganismos são responsáveis pela produção de etanol a partir dos açúcares fermentáveis presentes na polpa das sementes, também facilitando a ingestão de oxigênio por meio da degradação da polpa<sup>9</sup>. No entanto, não há relatos na literatura sobre a microflora presente na maioria das plantas da região amazônica, uma região tropical com bastante potencial para descoberta de novas leveduras em suas frutíferas pouco estudadas. Entre elas se destaca o cupuaçuzeiro [*Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex Spreng.) Schum fruit] (Figura 2), uma planta de grande importância econômica para essa região.



**Figura 2:** Cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*). (Fonte: Própria).

O cupuaçu, é uma fruta ácida rica em celulose que é fermentada por leveduras em sua fase de decomposição e pouco colonizadas por bactérias por sua acidez. Visto que não há muitos estudos realizados sobre a presença de *Saccharomyces* sp. em amostras de frutíferas regionais, o isolamento e o estudo genético desses fungos no cupuaçuzeiro irá adicionar informações ao corpo de conhecimento sobre as espécies desse gênero presentes nessa frutífera.

Diante do exposto, o presente estudo buscou isolar *Saccharomyces* sp. do cupuaçuzeiro, bem como averiguar a presença de linhagens tolerantes sob diferentes temperaturas e gerar o código de barras de DNA a fim de identificar geneticamente as cepas isoladas com base na aplicação do marcador ITS (ITS1 e ITS4 – *internal transcribed spacer*).

## 2. Como fazemos?

Cerca de 5 gramas da amostra foram transferidos para Erlenmeyer (125 mL) contendo 50 mL de meio *Yeast extract – Peptone – Dextrose* (YPD), eles foram incubados a 25 °C e 40 °C por 48 h. Após turbidez no meio, 0,1 mL da suspensão foram transferidos para placas de petri contendo o mesmo meio e incubadas nas mesmas condições por 48h. Após a incubação, as colônias foram isoladas e examinadas diretamente. Sua pureza foi verificada através da visualização de células de levedura em um microscópio.

Foi realizada a extração de DNA das leveduras com morfologia semelhante a *S. cerevisiae* através do protocolo de extração de DNA Fenol: Clorofórmio: Álcool Isoamílico descrito por Ferrer e colaboradores (2001). Em

seguida, foi realizada à amplificação do fragmento ITS, uma região altamente conservada. A amplificação dessa região ocorreu conforme o estudo de Schoch *et al* (2012)<sup>17</sup>. Em seguida, foi realizado o sequenciamento de DNA, as sequências foram analisadas com auxílio do software Chromas LITE (v. 2.01) editadas e exportadas em formato FASTA para o software MEGA X e alinhadas por meio do programa Clustal X2 e comparadas com o banco genético público (NCBI) para identificar as espécies isoladas da planta em estudo.

### 3. O que percebemos/observamos?

Foram identificadas 2 espécies de leveduras com morfologia semelhante a espécie *S. cerevisiae* (Tabela 1). Após a identificação genética confirmamos que as duas cepas pertenciam a espécie, sendo que uma das cepas isoladas apresenta termotolerância (crescimento em temperatura de 40°C).

**Tabela 1:** Leveduras com morfologia semelhante a espécie *Saccharomyces cerevisiae*.

Espécie	Cupuaçuzeiro		Termotolerância
	Casca	Serapilheira	
<i>S. cerevisiae</i>	0	2	1

Diante do trabalho realizado, desde o isolamento das leveduras até a identificação molecular, nota-se que a região amazônica é amplamente rica tanto na sua fauna quanto na flora, comprovando a riqueza da biodiversidade e que estudos relacionados a isolamentos de leveduras presentes na floresta é promissor. Pois, nesse estudo, obteve-se cepas que pertencem a espécie *S. cerevisiae* isoladas da serapilheira de cupuaçuzeiro, sendo uma delas termotolerante com alto potencial biotecnológico.

### 4. Para que fazemos?

A busca por novas linhagens de leveduras da espécie *S. cerevisiae* com alto potencial fermentativo se torna cada vez mais importante, devido ao aumento estimado da população mundial e conseqüentemente da produção de etanol. Assim, estudos de isolamento de novas cepas com características excepcionais, como termotolerância, são estratégias importantes que trazem

ganhos não somente científicos, mas também socioeconômicos, visto o potencial biotecnológico dessas leveduras.

### Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio do Governo do Estado do Amazonas, Secretaria de Estado de Desenvolvimento Econômico, Ciência, Tecnologia e Inovação (SEDECTI), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) - POSGRAD e Bolsa (FAPEAM).

### Referências

1. Amorim, H. V.; Gryscek, M.; Lopes, M. L. 2010. The success and sustainability of the Brazilian sugarcane–fuel ethanol industry. In: *Sustainability of the Sugar and Sugar– Ethanol Industries*. ACS Publications. p.73–82.
2. Fermentec. 2018. Características da produção de etanol no Brasil. *Fermentec News*.
3. Venturini Filho, W. G.; Mendes, P. 2003. Fermentação alcoólica de raízes tropicais. In: *Culturas de tuberosas amiláceas latino-americanas*, 3: 531–573.
4. Choudhary, J.; Singh, S.; & Nain, L. 2017. Bioprospecting thermotolerant ethanologenic yeasts for simultaneous saccharification and fermentation from diverse environments. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 3: 342–346.
5. Nwuche, C. O.; Murata, Y.; Nweze, J. E.; Ndubuisi, I. A.; Ohmae, H.; Saito, M.; Ogbonna, J. C. 2018. Bioethanol production under multiple stress condition by a new acid and temperature tolerant *Saccharomyces cerevisiae* strain LC 269108 isolated from rotten fruits. *Process Biochemistry*, 67: 105–112.
6. Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; Bender, K. S.; Buckley, D. H.; Stahl, D. A. 2016. *Microbiologia de Brock*. 14a ed. Artmed, Porto Alegre, 560p.
7. Porter, T. M.; Golding, G. B. 2012. Factors that affect large subunit ribosomal DNA amplicon sequencing studies of fungal communities: classification method, primer choice, and error. *PLoS One* 7: e35749.
8. Fungaro, D. A.; Brett, C. 2000. Eletrodos modificados com polímeros perfluorados e sulfonados: aplicações em análises ambientais. *Química Nova*, 23: 805–811.
9. Ho, V.T.T.; Zhao, J.; Fleet, G. 2014. Yeasts are essential for cocoa bean fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 174: 72–87.

## COMO PODEMOS EXTRAIR O MELHOR DNA DO APURUÍ (RUBIACEAE)?

DOI: 10.36599/itac-dna.0004

Juliana Nascimento da SILVA<sup>1</sup>; Cecilia Veronica NUNEZ<sup>2</sup>; Jacqueline da Silva BATISTA<sup>3</sup>

Autores correspondentes: [julianasnsilva@gmail.com](mailto:julianasnsilva@gmail.com); [jac@inpa.gov.br](mailto:jac@inpa.gov.br)

<sup>1</sup>Discente de mestrado do PPG-GCBEv, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA

<sup>2</sup>Tecnologista Sênior, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA

<sup>3</sup>Docente do PPG-GCBEv, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA

### 1. O que fazemos?

O Apuruí (*Duroia macrophylla*) (Figura 1), também conhecido como cabeça-de-urubu ou puruí-grande-da-mata, é uma espécie arbórea pertencente à Família Rubiaceae, que possui frutos comestíveis. Ocorre nos Estados brasileiros Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia e Mato Grosso, bem como nos países Peru e Venezuela<sup>1</sup>.



**Figura 1:** Parte da apuruí (*Duroia macrophylla*) com fruto. (Fonte: [www.kew.org](http://www.kew.org))

Essa espécie possui grande potencial biotecnológico, devido às atividades biológicas que os metabólitos secundários produzidos pela planta apresentam. Dentre estas, a atividade antitumoral<sup>2</sup> e atividade antituberculose<sup>3</sup>. A presença dessas substâncias podem influenciar na qualidade da extração de DNA genômico da espécie, pois são liberadas durante o rompimento da membrana celular e podem impedir a precipitação do DNA.

Dessa forma, este trabalho teve como objetivo testar nove condições diferentes de extração de DNA genômico a partir de um protocolo bastante



utilizado nos laboratórios, a fim de identificar qual apresentava maior qualidade e integridade do DNA extraído.

## 2. Como fazemos?

Foram coletadas duas folhas de cada um dos quatro indivíduos localizados na Reserva Florestal Adolpho Ducke, Manaus, Amazonas. Estas foram utilizadas para extração de DNA genômico<sup>4</sup>, seguindo metodologia tradicional, com nove ajustes e condições diferentes, a fim de verificar qual apresentava maior eficiência (Tabela 1).

**Tabela 1:** Condições utilizadas para as nove diferentes extrações de DNA genômico de *Duroia macrophylla*.

Extração de DNA	Indivíduo/ Amostra	Método de fragmentação	Tempo de digestão	Precipitação do DNA genômico	Adição de RNase
1	1	<i>TissueLyser</i>	30 minutos	1 hora a -80 °C	Não
2	1	<i>Bead Beater</i>	<i>Overnight</i>	<i>overnight</i> a -20 °C	Não
3	2	<i>Bead Beater</i>	30 minutos	1 hora a -80 °C	Sim
4	2	Cadinho	<i>Overnight</i>	<i>overnight</i> a -20 °C	Não
5	3	<i>Bead Beater</i>	30 minutos	1 hora a -80 °C	Não
6	3	<i>BeadBeater</i>	30 minutos	1 hora a -80 °C	Sim
7	3	<i>BeadBeater</i>	60 minutos	<i>overnight</i> a -20 °C	Não
8	4	<i>BeadBeater</i>	30 minutos	1 hora a -80 °C	Sim
9	4	Cadinho	60 minutos	<i>overnight</i> a -20 °C	Não

Inicialmente, as folhas foram lavadas com água destilada, secas com papel toalha, recortadas em pequenos pedaços e maceradas com três métodos diferentes de fragmentação. O produto foi transferido para um microtubo, fragmentado a pequenas partículas com o auxílio de dois equipamentos (*TissueLyser* ou *Bead Beater*) ou manualmente com cadinho e pistilo. Posteriormente foram adicionados reagentes para digestão da membrana celular, o tubo foi incubado por um tempo que variou de acordo com a condição de extração de DNA, bem como precipitado em diferente temperatura e duração.

As etapas seguintes permitiram a separação de duas fases, na qual na fase aquosa foi adicionado o isopropanol para precipitação do DNA genômico. Foram realizadas lavagens com etanol 70% e 100%, respectivamente. Depois de seco, o material foi ressuspendido, incubado e armazenado. Foi realizada uma eletroforese horizontal em gel de agarose 1%, com o DNA genômico extraído da planta e o DNA do *fago lambda*, para verificar a integridade e estimar qualitativamente a concentração de DNA.

### 3. O que percebemos/observamos?

As nove diferentes condições de extração de DNA genômico da *D. macrophylla* mostraram resultados diversificados quando analisadas em eletroforese em gel de agarose 1% juntamente com o marcador, o DNA do *fago lambda* com as concentrações de 50 ng/ $\mu$ L e 100 ng/ $\mu$ L (Figura 2).



**Figura 2:** Eletroforese em gel de agarose 1% do DNA genômico de indivíduos de *Duroia macrophylla* usando nove condições diferentes de extração de DNA (1 - 9). Legenda: m1 e m2, são marcadores de DNA do *fago lambda* que apresentaram concentração de 50 e 100 ng/ $\mu$ L, respectivamente.

A extração de DNA na condição 2, apresentou DNA em maior integridade e concentração, enquanto na condição 8 mostrou-se ineficaz, devido à ausência de DNA em gel de agarose. Levando em consideração o conhecimento da concentração do marcador, estimou-se que o DNA oriundo da condição 2 apresentava cerca de 300 ng/ $\mu$ L, as condições 3, 5, 6 e 7 com concentração entre 50 e 100 ng/ $\mu$ L, a condição 1 em torno de 25 ng/ $\mu$ L.

Nesse estudo, notou-se que o método 2 de extração de DNA de *D. macrophylla* foi o mais eficaz, por apresentar maior concentração, bem como maior integridade do material genético. Nele utilizou-se o equipamento *Bead*

*Beater* para fragmentação do material vegetal, o tempo de digestão foi *overnight*, o tempo de precipitação do DNA genômico também foi *overnight* a uma temperatura de -20 °C e não foi adicionada a RNase.

Em outro estudo, foram comparados seis métodos de extração de DNA genômico com espécies da Família Fabaceae<sup>5</sup>, produtoras de compostos secundários de importância terapêutica e necessitaram de otimização nos protocolos de extração para melhorar a qualidade de DNA extraído. Os pesquisadores verificaram que um dos métodos apresentavam uma melhor resolução no gel de agarose, indicando um elevado grau de pureza adequado para estudos moleculares futuros.

#### 4. Para que fazemos?

A extração de DNA genômico de *D. macrophylla* e a qualidade do material é o primeiro passo para que possam ser utilizadas técnicas moleculares em estudos futuros com a espécie. Portanto, a otimização de protocolos torna-se crucial, principalmente quando se trata de espécies com características que dificultam uma extração de DNA de qualidade, que é o caso das espécies da Família Rubiaceae, devido a produção de metabólitos secundários com potenciais farmacológicos. Ainda assim, são escassos os estudos genéticos com plantas dessa Família, relatados na literatura. Esse trabalho poderá contribuir com estudos futuros, otimizando a extração de DNA das espécies de Rubiaceae.

## Agradecimentos

Aos órgãos financiadores, FAPEAM, CNPq e CAPES. Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), em especial ao Laboratório Temático de Biologia Molecular (LTBM) pela infraestrutura para realização das atividades laboratoriais.

## Referências

1. Zappi, D. 2015. *Duroia* in *Lista de Espécies da flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB24436>). Accessed on 04 Jul. 2019.
2. Nunez, C.V.; Vasconcelos, M.C. 2012. Novo Alcaloide Antitumoral de *Duroia macrophylla*. *Patente: Privilégio de Inovação*.
3. Martins, D. 2014. *Estudo químico e biológico de Duroia macrophylla Huber (Rubiaceae)*. Universidade Federal do Amazonas, 231p.
4. Doyle, J.J.; Doyle, J.L. 1990. Isolation of plants DNA from fresh tissue. *Focus*, 3:13-15.
5. Oliveira, L.C.; Rodrigues, D.P.; Hopkins, M.J.G. 2017. Comparação de seis protocolos de extração de DNA para análises moleculares em espécies de Fabaceae. *Scientia Amazonia*, 6: 38-45.

## QUAL O EFEITO DO DILAPIOL E SEUS DERIVADOS EM *Aedes aegypti* E *Aedes albopictus*?

DOI: 10.36599/itac-dna.0005

Junielson Soares da SILVA<sup>1\*</sup>; Ana Cristina da Silva PINTO<sup>2</sup>; Sabrina da Fonseca MEIRELES<sup>1</sup>; Daniel Luís VIANA CRUZ<sup>1</sup>; João Marcelo de Castro SOUSA<sup>3</sup>; Miriam Silva RAFAEL<sup>4\*\*</sup>

Autores correspondentes: [junielsonbio10@gmail.com](mailto:junielsonbio10@gmail.com); [miriamsilvarafael.r@gmail.com](mailto:miriamsilvarafael.r@gmail.com)

<sup>1</sup>Discente de doutorado do PPG-GCBEV, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA

<sup>2</sup>Pós-doutoranda, Universidade Federal do Amazonas – UFAM

<sup>3</sup>Docente da Universidade Federal do Piauí – UFPI

<sup>4</sup>Docente do PPG-GCBEV, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

### 1. O que fazemos?

*Aedes aegypti* é o principal transmissor dos sorotipos do vírus Dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4), chikungunya, zika e febre amarela, já o *Aedes albopictus* atua como vetor secundário desses arbovírus<sup>1</sup>. O controle populacional desses mosquitos tem sido um desafio para os programas de vigilância epidemiológica, devido à sua resistência aos inseticidas sintéticos. Nesse sentido, o uso de extratos orgânicos, óleos essenciais (OE) botânicos e seus derivados semissintéticos têm sido uma alternativa promissora para o controle desses vetores<sup>2-7</sup>. Estudos sobre a letalidade de tais substâncias contra ovos e larvas de mosquitos são comuns, mas análises dos efeitos genotóxicos (danos ao DNA), ainda são escassos.

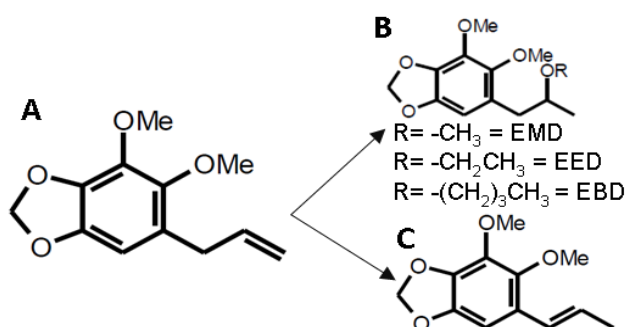
O dilapiol é o componente majoritário do OE da planta *Piper aduncum*, conhecida como pimenta-de-macaco, encontrada na Amazônia<sup>2-7</sup>. Esta substância e seus derivados têm apresentado ação tóxica e genotóxica contra *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*. Estudar seus efeitos em ovos, larvas, na oviposição de adultos, bem como os danos ao DNA desses mosquitos vetores é de fundamental importância. Com isso, o presente estudo descreve os efeitos tóxicos (fecundação e mortalidade) e genotóxicos do dilapiol e seus derivados, como uma ferramenta útil, voltada para programas de controle de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*.

## 2. Como fazemos?

Ovos, larvas e pupas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* são capturados na natureza, levados ao Insetário do Laboratório de Malária e Dengue do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), onde são mantidos a  $26 \pm 2$  °C, umidade relativa a 70%, com ciclo claro-escuro (12 horas-12 horas). Os adultos são identificados, segundo a chave taxonômica especializada para Culicídeos<sup>8</sup>, e transferidos para gaiolas para acasalamento e oviposição.

Larvas de terceiro estágio (L<sub>3</sub>), foram utilizadas nos seguintes testes: i) toxicidade, contra ovos e larvas, por 24 e 48 horas de exposição a cinco concentrações das substâncias, e; ii) genotoxicidade, expondo às larvas por 4 horas a três concentrações não letais, de substâncias teste, por quatro gerações sucessivas (G<sub>1</sub> – G<sub>4</sub>).

A partir de neuroblastos de larvas e ovócitos de fêmeas adultas inseminadas e ingurgitadas, preparam-se lâminas citológicas. Em microscópio óptico, analisam-se as lâminas coradas para verificar a ocorrência de anormalidades nucleares e cromossômicas, causadas pelo dilapiol e seus derivados semissintéticos (Figura 1). Além disso, é analisada a viabilidade de ovos e a oviposição de fêmeas previamente tratadas, por quatro gerações.



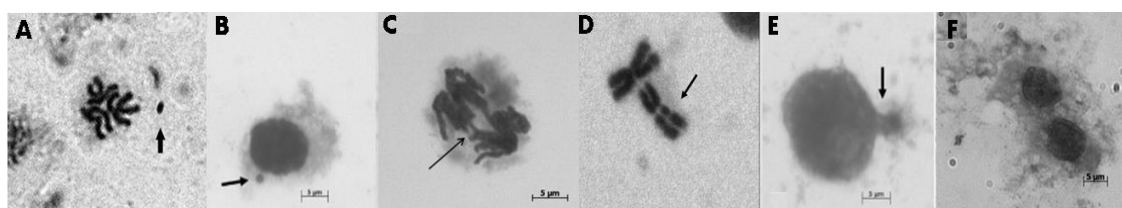
**Figura 1:** Dilapiol (A) e seus derivados semissintéticos: EMD, EED, EBD (B) e ISD (C). (Fonte: Autores, 2020).

## 3. O que percebemos/observamos?

Os estudos já realizados em nosso laboratório, mostraram que o dilapiol nas concentrações de 200 e 400  $\mu\text{g}/\text{mL}^2$  e seus derivados éter etil dilapiol (EED), entre 25 a 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e éter *n*-butil dilapiol (EBD), entre 12,5 e 50  $\mu\text{g}/\text{mL}^{4,5}$ , éter metil dilapiol (EMD) a 60 a 140  $\mu\text{g}/\text{mL}^{6,7}$  e isodilapiol (ISD) a 20 e 40  $\mu\text{g}/\text{mL}^9$ , apresentaram toxicidade contra ovos e larvas de *Ae. aegypti*<sup>2-4,6,7</sup> e *Ae. albopictus*<sup>5</sup>, causando mortalidade de até 100%.

O semissintético EMD causou um declínio na oviposição e redução da viabilidade de ovos de *Ae. aegypti* tratados por 4 horas, durante quatro gerações<sup>6,7</sup>. Além disso, o ISD nas concentrações 20 e 40 µg/mL também aumentou a expressão dos genes de resistência a inseticidas em *Ae. aegypti* exposto por 4 horas a essa substância<sup>9</sup>.

Nos testes de genotoxicidade, o dilapiol e seus derivados foram utilizados em concentrações mais baixas e não letais, por quatro gerações, e os mosquitos sobreviventes, após 4 horas de exposição, mostraram danos genotóxicos<sup>2,4,5,7</sup> (Figura 2). O éter *n*-butil (EBD) causou alterações morfológicas nos tecidos hepáticos, renais e cardíacos de camundongos da linhagem Balb/C, além de maiores danos genotóxicos e mutagênicos em concentrações bem superiores, comparadas às do dilapiol e de seus derivados utilizados em mosquitos<sup>10</sup>.



**Figura 2:** Danos genotóxicos de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* expostos ao dilapiol e seus derivados: A - micronúcleo em metáfase; B - micronúcleo em intérfase; C - ponte anafásica; D - quebra cromossômica; E - broto nuclear; F - célula binucleada<sup>2,4,5,8</sup>.

#### 4. Para que fazemos?

O dilapiol e seus derivados, mesmo em baixas concentrações, têm demonstrado efeitos tóxicos contra ovos, larvas e adultos de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, bem como danos genotóxicos ao genoma desses mosquitos. Tais substâncias são potenciais candidatas ao controle desses insetos, podendo ser extremamente relevantes aos programas de controle vetorial, para diminuir o índice de infecções virais transmitidas por estes mosquitos.

#### Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Projeto Estudos de Adaptação da Biota Aquática da Amazônia (Adapta II - CNPq) e do Governo do Estado do Amazonas, Secretaria de Estado de Desenvolvimento Econômico, Ciência, Tecnologia e Inovação (SEDECTI), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) - POSGRAD, Programa de Pós-Graduação

em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva, (PPG-GCBEv) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

## Referências

1. Kraemer M.U.G.; Sinka M.E.; Duda K.A.; Mylne A.Q.N.; Shearer F.M.; Barker C.M.; et al. 2015. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Elife*, 4: 1–18.
2. Rafael, M. S.; Hereira-Rojas, W.J.; ROPER, J.; Nunomura, S.M.; Tadei, W.P. 2008. Potential control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) with *Piper aduncum* L. (Piperaceae) extracts demonstrated by chromosomal biomarkers and toxic effects on interphase nuclei. *Genetics and Molecular Research*, 7: 772-781.
3. Pinto, A.C.S.; Nogueira, K.L.; Chaves, F.C.M.; Silva, L.V.S.; Tadei, W.P.; Pohlit, A.M. 2012. Adulticidal activity of dillapiol and semi-synthetic derivatives of dillapiol against adults of *Aedes aegypti* (L.) (Culicidae). *International Journal for Mosquito Research*, 2: 1-7.
4. Domingos, P.R.C.; Pinto, A.C.S.; Santos, J.M.M.; Rafael, M.S. 2014. Insecticidal and genotoxic potential of two semi-synthetic derivatives of dillapiole for the control of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae). *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 772: 42-52.
5. Meireles, S.F.; Domingos, P.R.C.; Pinto, A.C.S.; Rafael, M.S. 2016. Toxic effect and genotoxicity of the semisynthetic derivatives dillapiole ethyl ether and dillapiole n-butyl ether for control of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 807: 1-7.
6. Silva, J.S.; Pinto, A. C.S.; Santos, L.H.F.; Rafael, M.S. 2019. Efeito ovicida e larvicida do eter metil dilapiol (EMD) em *Aedes aegypti*, Manaus-AM. In: Salgado, Y.C.S. 2019. *Patologias: Doenças Parasitárias*. 1ed. Ponta Grossa: Atena Editora 2: 192-204.
7. Silva, J.S. 2018. *Avaliação do semissintético éter metil dilapiol (EMD) em Aedes aegypti, da Amazônia: uma abordagem genotóxica em nível cromossômico*. Dissertação (Mestrado) Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas.92p.
8. Consoli, R.A.G.B; Oliveira, R. L. 1994. *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*. Rio de Janeiro: Fiocruz. 228p.
9. Lima, V.S.; Pinto, A.C.; Rafael, M.S. 2015. Effect of isodillapiole on the expression of the insecticide resistance genes GSTE7 and CYP6N12 in *Aedes aegypti* from central Amazonia. *Genetics and Molecular Research*, 14: 16728-16735.
10. Cruz, D.L.V.; Sumita, T.C.; Ferreira, M.S.L.; Da Silva, J.S.; Pinto, A.C.S.; Barcellos, J.F. M.; Rafael, M.S. 2020. Histopathological, cytotoxicological, and genotoxic effects of the semi-synthetic compound dillapiole n -butyl ether in Balb/C mice. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part A*, p. 1-12.



## ATIVIDADE LARVICIDA DA SUBSTÂNCIA NEROLIDOL CONTRA *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE)

DOI: 10.36599/itac-dna.0006

Sabrina da Fonseca MEIRELES<sup>1</sup>; Ana Cristina da Silva PINTO<sup>2</sup>; Junielson Soares da SILVA<sup>1</sup>;  
Joaquim Ferreira do NASCIMENTO NETO<sup>1</sup>; Daniel Luís Viana CRUZ<sup>1</sup>; Miriam Silva RAFAEL<sup>3</sup>

Autores correspondentes: [sabrinameireles.com@gmail.com](mailto:sabrinameireles.com@gmail.com); [miriamsilvarafael.r@gmail.com](mailto:miriamsilvarafael.r@gmail.com)

<sup>1</sup>Discentes de doutorado do PPG-GCBEV, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

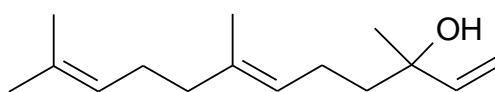
<sup>2</sup>Pós-doutoranda, Universidade Federal do Amazonas – UFAM

<sup>3</sup>Docente do PPG-GCBEV, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

### 1. O que fazemos?

*Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) é um mosquito de grande importância na saúde pública devido sua capacidade vetorial dos quatro sorotipos do vírus dengue (DENV-1, 2, 3 e 4), chikungunya (CHIKV), febre amarela (YFV) e zika (ZIKV)<sup>1-3</sup>. A dengue é a virose transmitida por mosquitos, que mais infecta os humanos. No Brasil, em 2019 foram registrados 1.439.471 casos prováveis de dengue e no mundo, 3,9 bilhões de pessoas vivem em áreas com risco de infecção pelo vírus<sup>4,5</sup>. Óleos essenciais (OE) e extratos de plantas com atividade ovicida, larvicida e adulticida têm sido alternativas para ações de controle de mosquitos vetores de arbovírus, como o *Ae. aegypti*, resistente aos inseticidas sintéticos<sup>6-9</sup>.

O nerolidol (3,7,11-trimethyl-1,6,10-dodecatrien-3-ol) (Figura 1), também conhecido como peruviol, é um composto químico presente no OE de muitas plantas, como *Piper aduncum* e *Geophila repens*<sup>11,12</sup>. Essa substância apresenta propriedades biológicas variadas, a saber: antioxidante, anti-úlceras, antitumoral, antibacteriano e tripanocida<sup>13-15</sup>. Dados na literatura sobre seus efeitos contra mosquitos em geral, ainda são raros. Neste estudo foi avaliada a atividade larvicida da substância nerolidol em *Ae. aegypti* de Manaus, Amazonas, Brasil, para auxiliar iniciativas voltadas ao desenvolvimento de novos inseticidas contra a fase larval deste vetor.

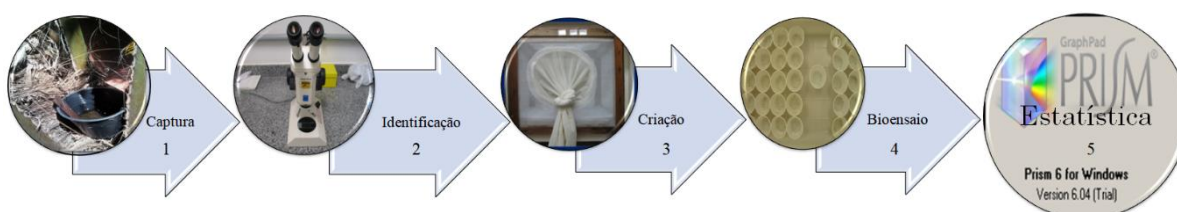


nerolidol

**Figura 1:** Representação da estrutura química do nerolidol. (Fonte: Autores, 2020).

## 2. Como fazemos?

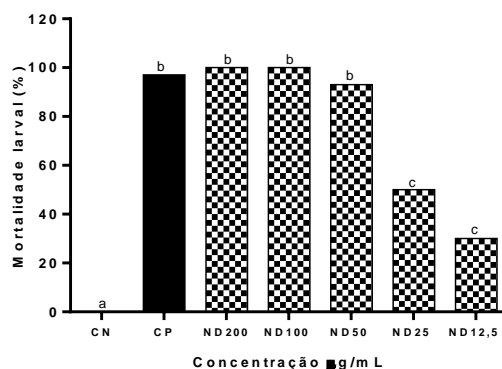
Os procedimentos metodológicos foram realizados na seguinte ordem: (1) captura de larvas de *Ae. aegypti* em domicílios no bairro Centro, Manaus, AM, por meio de armadilhas do tipo ovitrampa (vasilha de plástico + solução atrativa à base de capim colônio misturado com água potável e tiras estreitas de tecido vegetal prensado); (2) identificação das formas adultas, segundo Consoli & Oliveira (1994)<sup>16</sup>; (3) formação de colônia em Insetário, Laboratório de Vetores da Malária e Dengue, Coordenação de Sociedade, Ambiente e Saúde (COSAS), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA); (4) bioensaio com o nerolidol a 97% de pureza, Sigma-Aldrich: larvas de 3º estágio de *Ae. aegypti* (n=250) em cinco réplicas, que foram submetidas a diferentes concentrações do nerolidol: 200, 100, 50, 25, 12,5 microgramas ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) do nerolidol, ao controle negativo - CN (água + Dimetilsulfóxido -DMSO a 0,02) e, controle positivo - CP (água + larvicida comercial temefós a 0,002  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), por 24 horas de exposição e, (5) análise estatística para determinar as concentrações letais de nerolidol (Figura 2).



**Figura 2:** Representação esquemática das etapas metodológicas utilizadas para avaliar a toxicidade da substância nerolidol contra larvas de *Ae. aegypti*. (Fonte: Autores, 2020).

## 3. O que percebemos/observamos?

Após 24 horas de exposição, o nerolidol, nas concentrações de 200 e 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , causou mortalidade de 100% das larvas de 3º estágio de *Ae. aegypti*, assim como no CP. Nas concentrações 25 e 12,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , o nerolidol causou mortalidade de 50% e 30%, respectivamente. E no CN não houve mortalidade larval (Figura 3).



**Figura 3:** Atividade larvicida do nerolidol contra *Ae. aegypti*, após 24 horas de exposição. <sup>a,b,c</sup> = letras diferentes, indicam diferença estatística entre as concentrações testadas desse composto, pelo teste *t*, em nível de 5% de probabilidade. CN = controle negativo; CP = controle positivo; ND = nerolidol.

O nerolidol foi tóxico em concentrações a partir de 50 µg/mL, causando alta mortalidade de larvas de *Ae. aegypti*. Dados semelhantes foram observados ao utilizar o dilapiol a 200 e 400 µg/mL em *A. aegypti*<sup>7</sup> e isodilapiol (Santos et al. colaboradores, *in press*), além de ovos e larvas de *Ae. albopictus* expostos aos semissintéticos (éter etil dilapiol e éter *n*-butil dilapiol)<sup>8,9,10</sup>.

Diante do exposto, a atividade larvicida do nerolidol contra *Ae. aegypti* é promissora. No entanto, estudos futuros devem ser realizados, visando o esclarecimento dos mecanismos de ação inseticida dessa substância.

#### 4. Para que fazemos?

O *Ae. aegypti*, principal vetor de arbovírus no mundo, é resistente a inseticidas químicos. Nas últimas décadas, buscas intensas por inseticidas alternativos à base de plantas como óleos essenciais e/ou derivados semissintéticos têm sido realizadas, visando o controle eficaz desse mosquito. Este bioensaio, utilizando o nerolidol em *Ae. aegypti*, causou alta mortalidade de larvas, cuja substância mostrou-se promissora ao controle alternativo desse mosquito.

#### Agradecimentos

Agradecemos à Coordenação de Apoio à Formação de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de fomento, ao Projeto número 465540 / 2014-7 (CNPq), Coordenador Dr. Adalberto Luis Val e FAPEAM / SEPLANCTI / Governo

do Estado do Amazonas, POSGRAD, projeto número 002/2016, Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva, PPG - GCBEv/Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, pelos suportes financeiros e técnicos recebidos.

## Referências

1. Kurane, I. 2007. Dengue hemorrhagic fever with special emphasis on immunopathogenesis. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, 30: 329-340.
2. Kraemer, M.U.; *et al.* 2015. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *eLife*, 4: e08347.
3. Kindhauser, M.K.; Allen, T.; Frank, V.; Santhana, R. S.; Dye, C. 2016. Zika: the origin and spread of a mosquito-borne virus. *Bulletin of the World Health Organization*, 94 (9): 675-686C.
4. Brasil. Boletim Epidemiológico | Secretaria de Vigilância em Saúde | Ministério da Saúde. Volume 50 | Nº 22 | Set. 2019 (<https://www.saude.gov.br/images/pdf/2019/setembro/11/BE-arbovirose-22.pdf>). Acesso em: 26/08/2020.
5. World Health Organization. 2012. Epidemiology. (<http://www.who.int/denguecontrol/epidemiology/en/>). Acesso em: 26/08/2020.
6. Pohlit, A.M.; *et al.* 2004. Screening of plants found in the State of Amazonas, Brazil for larvicidal activity against *Aedes aegypti* larvae. *Acta Amazonica*, 34(1): 97-105.
7. Rafael, M.S.; Hereira-Rojas, W.J.; Roper, J.J.; Nunomura, S.M.; Tadei, W.P. 2008. Potential control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) with *Piper aduncum* L. (Piperaceae) extracts demonstrated by chromosomal biomarkers and toxic effects on interphase nuclei. *Genetics and Molecular Research*, 7: 772-781.
8. Domingos, P.R.C.; Pinto, A.C.; Santos, J.M.M.; Rafael, M.S. 2014. Insecticidal and genotoxic potential of two semi-synthetic derivatives of dillapiole for the control of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae). *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 772: 42-52.
9. Meireles, S.F.; Domingos, P.R.; Pinto, A.C.; Rafael, M.S. 2016. Toxic effect and genotoxicity of the semisynthetic derivatives dillapiole ethyl ether and dillapiole *n*-butyl ether for control of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 807: 1-7.
10. 7. Silva, J.S. (2018) *Avaliação do semissintético éter metil dilapiol (EMD) em Aedes aegypti, da Amazônia: uma abordagem genotóxica em nível cromossômico*. Dissertação (Mestrado) Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, p. 92.
11. Villamizar, L.H.; Cardoso, M.G.; Andrade, J.; Teixeira, M.L.; Villamizar, M.J.S. 2017. Linalool, a *Piper aduncum* essential oil component, has selective activity against *Trypanosoma cruzi* trypomastigote forms at 4°C. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 112 (2): 131–139.
12. Rao, H.; Lai, P.; Gao, Y. 2017. Chemical composition, antibacterial activity, and synergistic effects with conventional antibiotics and nitric oxide production inhibitory activity of essential oil from *Geophila repens* (L.) I.M. Johnst. *Molecules*, 22: 9.
13. Nogueira Neto, J.D.; de Almeida, A.A.; da Silva Oliveira, J.; Dos Santos, P.S.; de Souza, D.P.; de Freitas, R.M. 2013. Antioxidant effects of nerolidol in mice hippocampus after open field test. *Neurochemical Research*, 38: 1861-1870.

14. Klopell, F.C.; Lemos, M.; Sousa, J.P.; Comunello, E.; Maistro, E.L.; Bastos, J.K.; de Andrade, S.F. 2007. Nerolidol, an antiulcer constituent from the essential oil of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae). *Zeitschrift für Naturforschung C*, 62: 537-542.
15. Baldissera, M.D. *et al.* 2016. Nerolidol nanospheres increases its trypanocidal efficacy against *Trypanosoma evansi*: New approach against diminazene aceturate resistance and toxicity. *Experimental Parasitology*, 166: 144-149.
16. Consoli, R.A.G.B; Oliveira, R. L. 1994. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: *Fiocruz*. 228 p.

# MAPEAMENTO FÍSICO DE GENES DE RESPOSTA IMUNE EM

## *Anopheles darlingi*

DOI: 10.36599/itac-dna.0007

Leticia Cegatti BRIDI<sup>1</sup>; Míriam Silva RAFAEL<sup>2</sup>

Autores correspondentes: [lcbridi@gmail.com](mailto:lcbridi@gmail.com); [miriamsilvarafael.r@gmail.com](mailto:miriamsilvarafael.r@gmail.com)

<sup>1</sup>Egressa de doutorado do PPG-GCBEv, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

<sup>2</sup>Docente do PPG-GCBEv, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

### 1. O que fazemos?

A malária é uma doença infecciosa febril aguda, causada por protozoários transmitidos pela picada da fêmea de *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* Root, 1926 (Figura 1A). Este mosquito é o principal vetor da malária na América do Sul, especialmente na bacia amazônica<sup>1</sup>. As fêmeas adultas alimentam-se de sangue, que contém os nutrientes necessários para a maturação dos ovos, ocasião em que acabam ingerindo sangue infectado com plasmódio<sup>2</sup>. Outra forma de infecção natural é por meio das larvas em sítios de reprodução natural, que acabam se contaminando com fungos, bactérias e outros microrganismos<sup>3</sup>, os quais desencadeiam a reação de defesa em seu sistema imune<sup>4</sup>.

Considerando o mapeamento físico de genes relacionados ao sistema imune, foram estudados dois genes do genoma de *A. darlingi*, para mapeamento cromossômico: *Toll*, que apresenta resposta imune a fungos e infecções bacterianas gram-positiva<sup>5</sup>. E, também, a sequência gênica da proteína *mitochondrial ribosomal protein S7* (Prb S7), que foi relacionada à infecção por *Plasmodium* em *Anopheles dirus*<sup>6</sup>.

Este trabalho objetivou mapear fisicamente os genes *Toll* e Prb S7 em núcleos politênicos (poli= muitos, tênicos= fios; é o alongamento dos cromossomos, visto que sofrem várias duplicações e não se separam) de *A. darlingi*, para inferir sobre padrões de variabilidade cromossômica (que são formas alternativas de sítios de ocorrência de um mesmo gene).

## 2. Como fazemos?

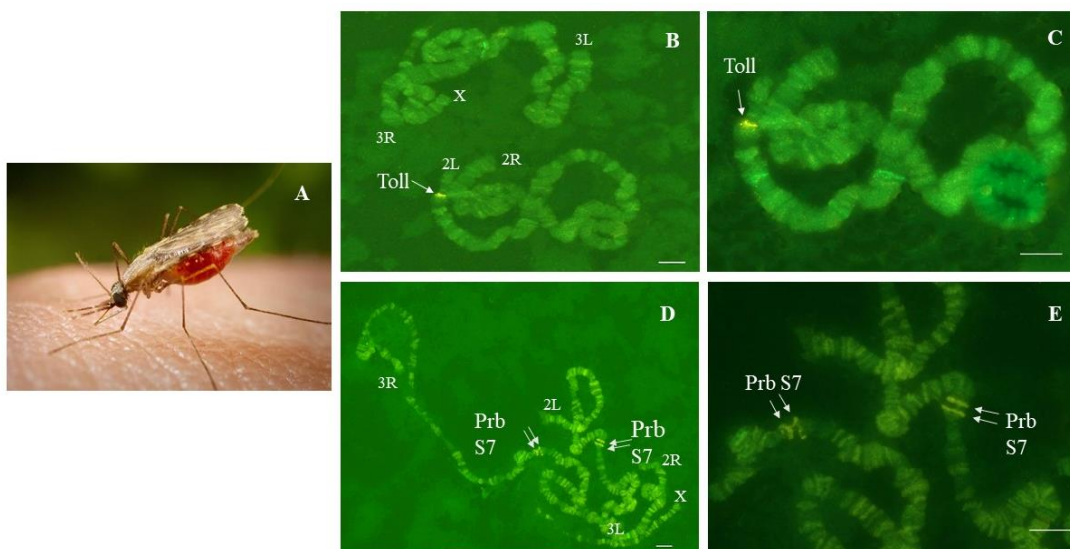
Aproximadamente 100 larvas de *A. darlingi* foram coletadas em Manaus, Amazonas, e identificadas de acordo com chaves taxonômicas<sup>7,8</sup>. As larvas criadas em Insetário até alcançarem a fase de 4º estágio foram utilizadas nas preparações citológicas de cromossomos politênicos, a partir de glândulas salivares<sup>9,10</sup>. Essas lâminas foram utilizadas na realização do método de hibridização *in situ* fluorescente (FISH).

As sequências dos genes *Toll* e Prb S7 de *A. darlingi* foram obtidas no site <https://www.vectorbase.org>, e utilizadas nos desenhos dos *primers*, conforme o programa *Gene Runner* 3.01 (<https://www.generunner.net>).

Para a marcação das sequências gênicas, os cromossomos foram corados com o fluorocromo *Cy*<sup>TM</sup> 3 dUTP e o kit *Random Primers DNA Labeling System*. Os cromossomos foram hibridizados a 40 °C, por 18 horas. Após a coloração dos cromossomos com *YOYO-1* em tampão fosfato salino, por 10 minutos, os sinais fluorescentes foram observados em um microscópio de luz. E, as localizações dos sinais foram determinadas, com o auxílio do fotomapa de *A. darlingi*<sup>11</sup>.

## 3. O que percebemos/observamos?

O gene *Toll* é considerado como uma sequência conservada evolutivamente em anofelinos, porém não foi encontrada nenhuma sintonia com outros mosquitos do mesmo gênero. Em *A. darlingi*, o gene *Toll* está localizado no braço cromossômico 2L, região 25C (Figura 1B, C). O gene Prb S7 apresentou sintonia com o cromossômico politênico da mosca *Drosophila melanogaster*, possui também uma sequência gênica evolutivamente próxima à de *A. albimanus*. Em *A. darlingi*, foi mapeado em mais de uma cópia no seu genoma. A marcação dessa sonda foi no braço cromossômico 2L, próximo ao centrômero (região 16AB), região 22C (inversão 2Lb), e no braço 3L, região 36CD (Figura 1D, E).



**Figura 1.** A. Mosquito fêmea de *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* alimentando-se de sangue humano. B. Gene *Toll* marcado com o fluorocromo Cy<sup>TM</sup> 3 (setas) e contra corados com YOYO-1 em cromossomos politênicos de *A. darlingi*: braço 2L, região 25C (seta). C. *Toll* (sinal ampliado). D. Gene *Prb S7*: braço 2L, 16AB e braço 3L, 36CD (setas). E. *Prb S7* (sinal ampliado). Barra: 10 μm.

#### 4. Para que fazemos?

Ao longo da história evolutiva, os cromossomos de *A. darlingi* sofreram mutações (rearranjos)<sup>12</sup>. E, a utilização de métodos citogenéticos, como a FISH, permite a localização de sítios de ocorrência de determinada sequência no genoma de mosquitos e sua comparação com genes sintênicos (são aqueles que apresentam correspondência na localização nos cromossomos), como entre *A. darlingi* e *A. gambiae* (principal vetor da malária na África), o que corresponde a 60% de todos os genes codificadores de proteínas em *A. darlingi*<sup>13</sup>.

Estudar o mapeamento físico de sequências gênicas de *A. darlingi* no genoma desse mosquito é uma ferramenta útil ao entendimento da evolução cromossômica, e corrigir falhas na montagem do genoma desse mosquito, principal vetor da malária na Amazônia.

#### Agradecimentos

Ao Laboratório de Citogenética, Genômica e Evolução de Mosquitos (LCGEM) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Coordenação de Sociedade, Ambiente e Saúde (CSAS) – (INPA), pelos suportes financeiros e técnicos recebidos; ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/FAPEAM/MCT/CT-INFRA, Processo 2680/2009; ADAPTA I-



CNPq) e, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (PAPAC-Processo no. 1570-20131). E, à FAPEAM pela concessão da bolsa de estudos durante a realização deste trabalho.

## Referências

1. Tadei, W.P.; Thatcher, B.D.; Santos, J.M.; Scarpassa, V.M.; Rodrigues, I.B.; Rafael, M.S. 1998. Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg*, 59:325-335.
2. Hogg, J.C.; Hurd, H. 1997. The effects of natural *Plasmodium falciparum* infection on the fecundity and mortality of *Anopheles gambiae* s.l. in northeast Tanzania. *Parasitology*, 114:325-331.
3. Walker, E.D.; Merritt, R.W. 1993. Bacterial enrichment in the surface microlayer of an *Anopheles quadrimaculatus* (Diptera: Culicidae) larval habitat. *J Med Entomol*, 30:1050-1052.
4. Osta, M.A.; Christophides, G.K.; Vlachou, D.; Kafatos, F.C. 2004. Innate immunity in the malaria vector *Anopheles gambiae*: comparative and functional genomics. *J Exp Biol*, 207:2551-2563.
5. Ligoxygakis, P.; Pelte, N.; Hoffmann, J.A.; Reichhart, J.M. 2002. Activation of *Drosophila* Toll during fungal infection by a blood serine protease. *Science*, 297:114-116.
6. Xu, W.Y.; Huang, F.S.; Duan, J.H. 2003. The internal control role of ribosomal protein S7 in the defense of *Anopheles dirus* against *Plasmodium* infection. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi*, 21:264-267.
7. Forattini, O.P. 1962. *Entomologia médica*. Faculdade de Saúde Pública da USP, São Paulo.
8. Consoli, R.A.G.B.; Lourenço-de-Oliveira, R. 1994. *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*. FIOCRUZ, Rio de Janeiro.
9. French, W.L.; Baker, R.H.; Kitzmiller, J.B. 1962. Preparation of mosquito chromosomes. *Mosquito News*, 22:377-383.
10. Kumar, V.; Collins, F.H. 1994. A technique for nucleic acid in situ hybridization to polytene chromosome of mosquitoes in the *Anopheles gambiae* complex. *Insect Mol Biol*, 3:41-47.
11. Rafael, M.S.; Rohde, C.; Bridi, L.C.; Gaiesky, V.L.S.V.; Tadei, W.P. 2010. Salivary polytene chromosome map of *Anopheles darlingi*, the main vector of neotropical malaria. *Am J Trop Med Hyg*, 83:241-249.
12. Sharakhov, I.V.; Serazin, A.C.; Grushko, O.G.; Dana, A.; Lobo, N.; Hillenmyer, M.E.; Westerman, R. et al. 2002. Inversions and gene order shuffling in *Anopheles gambiae* and *Anopheles funestus*. *Science*, 298:182-185
13. Marinotti, O.; Cerqueira, G.C.; de Almeida, L.G.P.; Ferro, M.I.T.; Loreto, E.L.S.; Zaha, A. et al 2013. The genome of *Anopheles darlingi*, the main neotropical malaria vector. *Nucleic Acids Res.*, 41:7387-7400.

# O QUE O CÓDIGO DE BARRAS DE DNA NOS CONTA SOBRE A DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DO COMPLEXO *Anopheles albitarsis*?

DOI: 10.36599/itac-dna.0008

Wagner Oliveira de AZEVEDO<sup>1</sup>; Jacqueline da Silva BATISTA<sup>2</sup>; Míriam Silva RAFAEL<sup>2</sup>

Autores correspondentes: [woa\\_wagner@hotmail.com](mailto:woa_wagner@hotmail.com); [miriamsilvarafael.r@gmail.com](mailto:miriamsilvarafael.r@gmail.com)

<sup>1</sup>Discente de mestrado do PPG-GCBEv, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

<sup>2</sup>Docente do PPG-GCBEv, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

## 1. O que fazemos?

*Anopheles albitarsis sensu lato* (s.l.) é transmissor de malária e o mais comum dentre os mosquitos do gênero *Anopheles* (*An.*), com vasta distribuição geográfica no Brasil. *An. albitarsis sensu lato* compreende nove espécies que são, entre si, indistinguíveis ou ligeiramente distintas: *An. albitarsis*, *An. marajoara*, *An. deaneorum*, *An. janconnae*, *An. oryzalimnetes*, *An. albitarsis* F, *An. albitarsis* G, *An. albitarsis* H e *An. albitarsis* I. Devida à similaridade morfológica entre estas espécies, o conjunto delas é chamado de complexo *An. albitarsis*.

Neste estudo foi realizada a caracterização genética de espécies do complexo *An. albitarsis*, utilizando o gene Citocromo Oxidase Subunidade I (COI), presente no DNA da Mitocôndria, por meio da metodologia do “código de barras de DNA” (DNA barcode) para a identificação molecular, verificação da variabilidade genética e mapeamento da distribuição geográfica, sobretudo, das espécies de *An. albitarsis* oriundas de localidades outrora não estudadas. O termo *DNA barcode* foi atribuído para sequências de DNA que possuíssem uma capacidade confiável de identificação molecular de vários organismos.

## 2. Como fazemos?

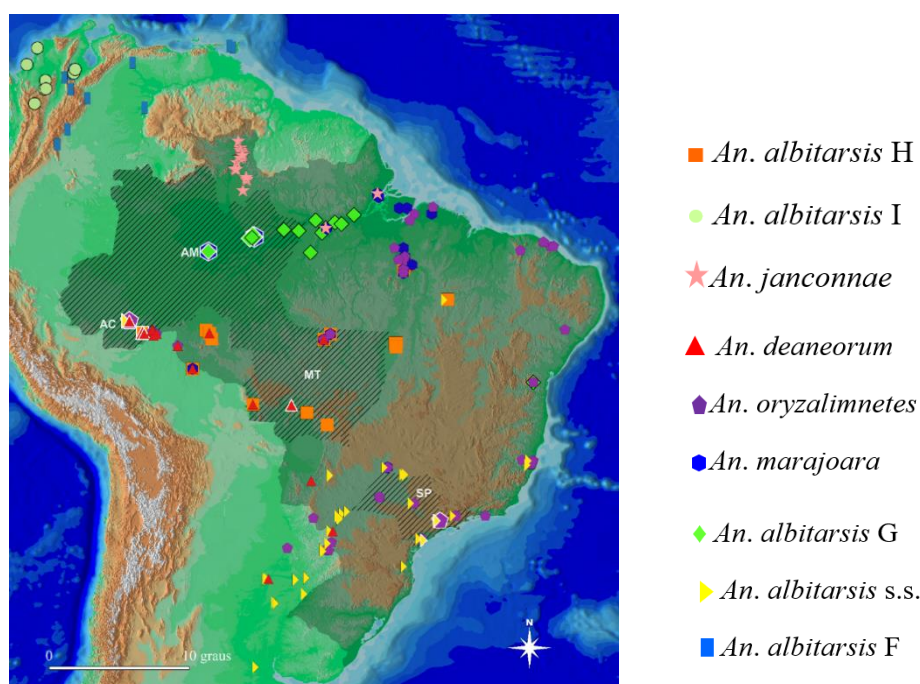
As amostras de *An. albitarsis* s.l. (n = 134) foram coletadas em cinco municípios da Amazônia brasileira (Manaus, Iranduba, Coari, Rio Branco, Sena Madureira), um na região centro-oeste (Barra do Bugres) e dois no Sudeste brasileiro (São Paulo, Mairiporã).

Dentre os métodos de isolamento do DNA dos organismos para estudos genéticos, foi utilizado um protocolo desenvolvido especificamente para mosquitos<sup>1</sup>. Em seguida foi realizada a amplificação (PCR) da região do código

de barras de DNA (sequência parcial do gene COI), que após edição, resultou em um fragmento de 584 pares de base (pb) nitrogenadas. A região amplificada (amplicons) foi purificada para remoção de elementos que podem interferir na leitura do DNA, na ocasião da reação de sequenciamento nucleotídico, no qual a região do gene alvo (COI) é, então, convertida em arquivo de dados, para posterior análise em programas de bioinformática e plataformas digitais específicas.

### 3. O que percebemos/observamos?

A análise do gene COI possibilitou caracterizar, identificar e determinar a distribuição geográfica de seis espécies do complexo *An. albitarsis* amostradas (*An. albitarsis* s.s., *An. marajoara*, *An. deaneorum*, *An. oryzalimnetes*, *An. albitarsis* G e *An. albitarsis* H), (Figura 1).



**Figura 1:** Distribuição atualizada de *Anopheles albitarsis* s.l., utilizando dados da literatura e da presente pesquisa. Formas com contorno branco: Distribuição de *Anopheles albitarsis* s.l. do presente trabalho. Linhas transversais: Estados onde as amostras foram coletadas. AC: Acre; AM: Amazonas; SP: São Paulo. Mapa gerado com base em dados do *The Malaria Atlas Project*.

A região do código de barras de DNA utilizada neste estudo foi de 584 pb. A região do COI (658 pb), também, relativamente curta foi analisada<sup>2</sup>, contendo resultados similares a de estudos nos quais foi utilizado o DNA mitocondrial completo<sup>3</sup> e a região completa do gene COI<sup>4</sup>. Isso reforça a efetividade na identificação de espécies, utilizando a região gênica COI, que foi proposta para

ser utilizada na metodologia do código de barras de DNA, para caracterização genética de mosquitos pertencentes ao complexo *An. albitarsis*.

#### 4. Para que fazemos?

Os mosquitos do gênero *Anopheles* são de grande importância epidemiológica, porque transmitem protozoários, chamados plasmódios, que causam a malária humana. No Brasil, o *An. darlingi* é o principal vetor dessa parasitose<sup>5</sup>.

Algumas espécies do complexo *An. albitarsis*, possuem papel importante na transmissão da malária, como *Anopheles marajoara*, principal vetor da malária no Nordeste da Amazônia, além de ser um dos principais vetores, no Estado do Pará. *Anopheles deaneorum*, importante vetor de malária no Estado de Rondônia; e *Anopheles janconnae*, principal vetor da malária em Boa Vista / Roraima.

As similaridades morfológicas dificultam a distinção entre espécies do complexo *An. albitarsis*. Métodos moleculares são necessários para um melhor entendimento sobre a estrutura populacional, linhagens e relações evolutivas entre espécies do gênero *Anopheles*. A identificação taxonômica de mosquitos vetores de malária, bem como o conhecimento sobre sua distribuição geográfica são aspectos importantes para o entendimento de fatores que afetam o controle e a transmissão, e o direcionamento de medidas de erradicação e prevenção desta doença. Os dados gerados no presente estudo contribuiram para um melhor entendimento da diversidade genética e distribuição geográfica das espécies do complexo *An. albitarsis*.

#### Agradecimentos

Ao CNPq, CAPES (Código de financiamento 001), SEDECTI e FAPEAM-POSGRAD 2017; Projeto Estudos de Adaptação da Biota Aquática da Amazônia (Adapta II - CNPq), Proc. 465540/2014-7.

#### Referências

1. Wilkerson RC, Parsons TJ, Albright DG, Klein TA, Braun MJ. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers readily distinguish cryptic mosquito species (Diptera: Culicidae: Anopheles). *Insect Mol Biol.* 1993;1:205–11.
2. Ruiz-Lopez F, Wilkerson RC, Conn JE, McKeon SN, Levin DM, Quiñones ML, et al. DNA

barcoding reveals both known and novel taxa in the Albitarsis Group (Anopheles: Nyssorhynchus) of Neotropical malaria vectors. *Parasit Vectors* [Internet]. 2012;5(1):44.

3. Krzywinski J, Li C, Morris M, Conn JE, Lima JB, Povoá MM, et al. Analysis of the evolutionary forces shaping mitochondrial genomes of a Neotropical malaria vector complex. *Mol Phylogenet Evol* [Internet]. 2011 Mar;58(3):469–77.

4. Mckeon SN, Lehr MA, Wilkerson RC, Ruiz JF, Sallum MA, Lima JBP, et al. Lineage divergence detected in the malaria vector *Anopheles marajoara* (Diptera : Culicidae) in Amazonian Brazil. *Malar J*. 2010;9:1–13.

5. Tadei WP, Thatcher BD, Santos JMM, Scarpassa VM, Rodrigues IB, Rafael MS. Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg*. 1998;59(2):325–35.

## EXISTEM “GENES SALTADORES” NO GENOMA?

DOI: 10.36599/itac-dna.0009

Simone Cardoso SOARES<sup>1,3</sup>; Eliana FELDBERG<sup>2,3</sup>

Autores correspondentes: [saybio@hotmail.com](mailto:saybio@hotmail.com); [feldberg@inpa.gov.br](mailto:feldberg@inpa.gov.br)

<sup>1</sup>Discente de doutorado do PPG-GCBEV, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia –INPA

<sup>2</sup>Docente do PPG-GCBEV, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

<sup>3</sup>Laboratório de Genética Animal (LGA), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

### 1. O que fazemos?

Elementos Transponíveis (ETs) ou "genes saltadores" têm sido associados como componentes biológicos do genoma de mamíferos, sendo classificados como transposons ou retrotransposons de acordo com a capacidade de se mover por meio de um DNA ou RNA como intermediário. Também têm sido associados como fator evolutivo no genoma de tetrapodas (vertebrados que possuem quatro patas/membros), visto terem sido encontrados em linhagens ancestrais de mamíferos, anfíbios e répteis<sup>1,2</sup>.

O desenvolvimento das técnicas de sequenciamento viabilizou a análise dos genomas de diferentes espécies, o que possibilitou a constatação da presença de elementos transponíveis em praticamente todos os organismos<sup>3</sup>. A comprovação de que estes elementos podem amplificar-se e gerar variação no número de cópias e na distribuição entre diferentes grupos, bem como a habilidade de introduzir inovações nos aspectos regulatórios e codificantes dos genes, suscitou discussão sobre a importância filogenética dos mesmos entre as espécies, estabelecendo o papel desses elementos na estrutura e regulação de genes<sup>4</sup>.

Pouco se sabe, no entanto, sobre a influência dos ETs na variação estrutural dos genomas de mamíferos. Como esses elementos se encontram dispersos no genoma de vertebrados, é de fundamental importância a identificação da localização destes ao longo dos cromossomos em diferentes espécies, de forma a compreender sua evolução. Vale ressaltar ainda que 42% de DNA eucromático deriva de elementos transponíveis<sup>5</sup>.

Nesse cenário, os roedores são considerados organismos modelos para o estudo de "genes saltadores" em virtude de sua diversidade em termos taxonômicos, ecológicos, morfológicos e adaptativos; além de apresentarem instabilidade taxonômica e indefinições relativas à filogenia<sup>6,7</sup>. Diante disso, o

presente trabalho objetivou mapear elementos transponíveis no genoma de roedores do gênero *Proechimys* (Echimyidae)<sup>8</sup> de forma a identificar a disposição destes na arquitetura do genoma.

## 2. Como fazemos?

Para a realização de técnicas moleculares, utilizamos suspensão celular e Ácido Desoxirribonucleico (DNA) extraído de tecido muscular de *Proechimys* sp. A suspensão celular foi preparada a partir da medula óssea retirada do fêmur. Inicialmente, foi aplicada colchicina nos indivíduos capturados para impedir a formação do fuso acromático e acúmulo de células em metáfase. Em seguida, foi retirado o fêmur, adicionado solução hipotônica (KCL) para rompimento das membranas e dispersão dos cromossomos, e solução fixadora para preservação da estrutura deles.

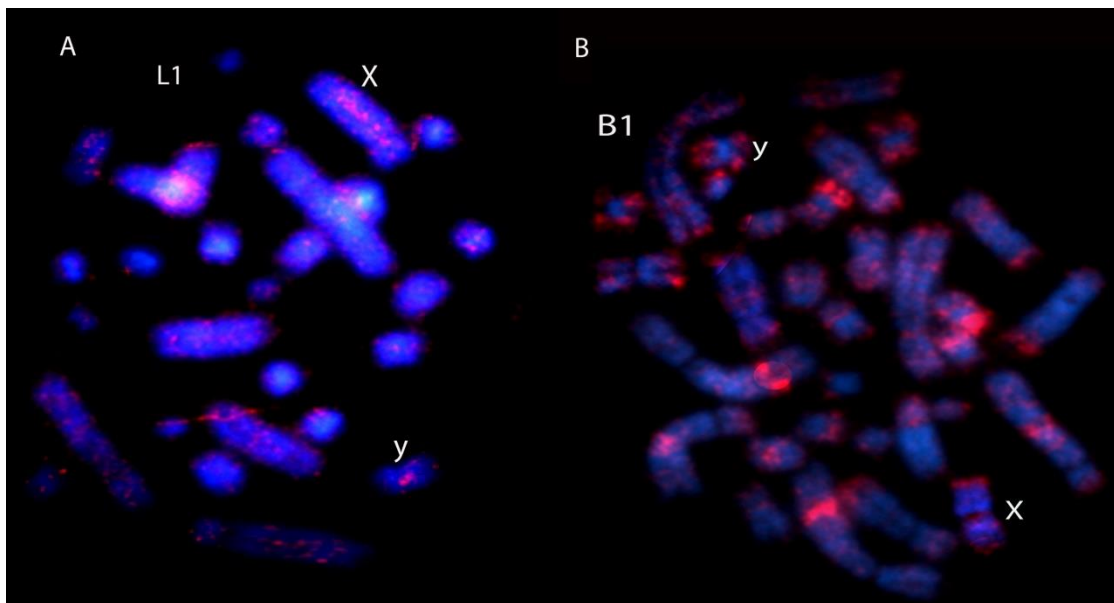
As metáfases foram coradas com giemsa e analisadas em microscópio óptico<sup>9</sup>. Para extração do DNA utilizamos SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) para lisar as membranas + enzima (Proteinase K) para degradar proteínas. Sendo o DNA precipitado com uso de álcool + tampão em PH neutro<sup>10</sup>. Em seguida submetemos o DNA extraído a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), técnica que permite amplificar de forma seletiva uma sequência de DNA de interesse delimitada por iniciadores (*primers*)<sup>11</sup>, sendo que usamos *primers* específicos para os retroelementos transponíveis LINE 1 (L1) e SINE B1 (B1).

Os produtos de PCR foram clonados no kit pGEM-T Easy Vector (Promega). Os plasmídeos recombinantes foram sequenciados na Plataforma ABI3130 (Myleus Biotechnology)<sup>12</sup>. As sequências geradas foram submetidas a um BLASTN para detectar similaridade com sequências de domínio público contidas no banco de dados do Repbase<sup>13</sup>.

Os plasmídeos sequenciados foram marcados com digoxigenina (coloração vermelha) e usados como sondas para hibridização *in situ fluorescence* (FISH) em metáfases provenientes da suspensão celular previamente preparada. A imunodeteção ocorreu com antidigoxigenina conjugada com rodamina e as metáfases contracoradas com DAPI (coloração azul)<sup>14</sup>. Os cromossomos metafásicos foram analisados e fotografados em um microscópio de fluorescência Olympus BX51; e as imagens foram capturadas através do software Image-PRO MC 6.0.

### 3. O que percebemos/observamos?

Ao analisar as metáfases provenientes de *Proechimys* sp., observamos que a disposição do elemento retrotransponível LINE 1 ocorreu de forma dispersa e intercalada (Figura 1A) conforme o padrão de variação proposto por outros estudos<sup>15</sup>. Enquanto SINE B1 mostrou um padrão com preponderância para compartimentalização, principalmente em regiões terminais (Figura 1B).



**Figura 01:** **A)** FISH com o elemento transponível L1 (LINE) marcado com digoxigenina em células de *Proechimys* sp. **B)** FISH com o elemento transponível B1 (SINE) marcado com digoxigenina em células de *Proechimys* sp.

Elementos transponíveis (ETs) são agentes de variabilidade genética, e em *Proechimys* sp., a disposição de L1 e B1 demonstrou diversidade na arquitetura do genoma, e ainda particularidades como formação de blocos nos cromossomos sexuais. O mapeamento de “genes saltadores” em espécies diferentes demonstra que estes estão integrados no genoma de forma a gerar variabilidade genética, e evidencia possíveis relações entre grupos, sendo, portanto, considerados como fonte de evolução adaptativa através da diversificação do genoma<sup>16</sup>.

### 4. Para que fazemos?

O conhecimento sobre a disposição dos Elementos Transponíveis associados a rearranjos cromossômicos no genoma de espécies diferentes permite um maior entendimento sobre a diversidade e evolução do grupo, assim



como possibilita resoluções quanto à instabilidade taxonômica e indefinições pautadas em relações filogenéticas.

### Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) – POSGRAD; Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva (PPG-GCBEv) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

### Referências

1. Vandeweghe, MW; Platt, RN; Ray, DA; Hoffmann, FG. 2016. Transposable Element Targeting by piRNAs in Laurasiatherians with Distinct Transposable Element Histories. *Genome Biology and Evolution*, 8(5): 1327–37.
2. Barbara McClintock, B. 1984. The significance of responses of the genome to challenge. *Genetics*, 23, 315-376.
3. Huang, CRL; Burns, KH; Boeke, JD. 2012. Active Transposition in Genomes. *Annual Review of Genetics*, 46: 651–675.
4. Razali, NM; Cheah, BH; Nadarajah, K. 2019. Transposable Elements Adaptive Role in Genome Plasticity, Pathogenicity and Evolution in Fungal Phytopathogens. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(14): 1-14.
5. Capuchina AS; Matute, DR. 2018. The Role of Transposable Elements in Speciation. The Role of Transposable Elements in Speciation. *Genes*, 9(254): 1-29.
6. Eler, ES; Silva, CEF; Da Silva, MNF; Feldberg, E. 2020. New karyotype records for the genus *Proechimys* (Rodentia: Echimyidae) from Brazilian Amazonia. *Genetics and molecular research*, 43 (3): 1-11.
7. Galewski, T; MauVrey, JF; Leite, YLR; Patton, JL; Douzery, EJP. 2005. Ecomorphological diversification among South American spiny rats (Rodentia; Echimyidae): a phylogenetic and chronological approach. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 34: 601–615.
8. Gray, YHM. 2000. It takes two transposons for a tango – element mediated chromosomal rearrangements. *Trends in Genetics*, 16: 461–468.
9. Ford, C; Hamerton, J. 1956. A colchicine, hypotonic citrate, squash sequence for mammalian chromosomes. *Stain Technology*, 31: 247-251.
10. Sambrook, J; Russell, DW. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Vol. I. Cold Spring Harbor Press. Cold Spring Harbor, NY. 2344p (<http://www.cshlpress.com/pdf/sample/2013/MC4/MC4FM.pdf>). Acesso em 23 de março de 2017.
11. Saiki, RK; Gelfand, DH; Stoffel, S; Scharf, SJ; Higuchi, R; Horn, GT; Mullis, KB; Erlich, HA. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239: 487-491.

12. Sanger, F; Nicklen, S; Coulson, AR. 1977. DNA Sequencing with chain terminating inhibitors. *Proceedings of National Academy of Science*, 74: 5463-5467.
13. Jurka, J; Smith T. 1988. A fundamental division in the Alu family of repeated sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85: 4775-4778.
14. Pinkel, D; Straume, T; Gray, JW. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the Natural Academy of Science*, 83: 2934-38.
15. Araújo, NP; Kuhn, GCS; Vieira, FN; Morcatty, TQ; Paglia, AP; Svartman, M. 2017. Comparative genomic in situ hybridization and the possible role of retroelements in the karyotypic evolution of three Akodontini species. *International journal of genomics*, 2017: 1-11.
16. Razali, NM; Cheah, BH; Nadarajah, K. 2019. Transposable Elements Adaptive Role in Genome Plasticity, Pathogenicity and Evolution in Fungal Phytopathogens. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(14): 1-14.

# DIVERSIDADE DE ANFÍBIOS E RÉPTEIS NAS FLORESTAS NEOTROPICAIS ÚMIDAS

DOI: 10.36599/itac-dna.0010

Renata M. PIRANI<sup>1</sup>; Fernanda P. WERNECK<sup>2</sup>

Autores correspondentes: [renatampirani@gmail.com](mailto:renatampirani@gmail.com); [fewerneck@gmail.com](mailto:fewerneck@gmail.com)

<sup>1</sup>Egressa do doutorado do PPG-GCBEv, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

<sup>2</sup>Docente do PPG-GCBEv, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

## 1. O que fizemos?

Os Neotrópicos são conhecidos por possuir a maior e mais significativa biodiversidade do mundo. Mas de onde veio tamanha diversidade? Na ciência existem várias hipóteses que tentam explicar este padrão. Por exemplo, antigas conexões entre a Mata Atlântica e a Amazônia podem nos ajudar a entender as relações históricas entre espécies irmãs ou entre populações de uma mesma espécie hoje distribuídas disjuntas nestes dois biomas, e com isso compreender também sobre a história evolutiva das florestas tropicais úmidas<sup>1</sup>.

Além disso, grandes mudanças na geografia da América do Sul também influenciaram este cenário, como o soerguimento da Cordilheira dos Andes e do Escudo Brasileiro, que promoveram transformações profundas em toda a região Neotropical<sup>2</sup>. Uma destas transformações foi a mudança no curso dos grandes rios amazônicos, rios estes que podem funcionar como barreiras naturais para a migração de espécies<sup>3</sup>, podendo até mesmo influenciar na formação de novas espécies<sup>4</sup>. Por último, mas não menos importante, temos também a influência dos refúgios históricos causados por flutuações climáticas do passado que também afetaram a distribuição das espécies atuais<sup>5</sup>. Todas estas hipóteses influenciaram de alguma forma e em diferentes graus os padrões de diversidade de diversos organismos que vemos atualmente.

Para se entender como tais processos históricos estão relacionados à alta diversidade de espécies nas florestas Neotropicais úmidas, trabalhamos com dois grupos de espécies com diferentes ecologias, histórias de vidas, e distribuição. O primeiro grupo de espécies é o grupo das pererecas de moldura *Dendropsophus leucophyllatus* (Figura 1A), pertencente à família dos anfíbios Hylidae. Este grupo de pererecas de cores vibrantes possui sua maior diversidade de espécies distribuídas na Amazônia e com apenas poucas espécies na Mata Atlântica, ex: *D. elegans* (Figura 1B)<sup>6</sup>. O segundo conjunto de

dados é da espécie de lagarto *Gonatodes humeralis* (Figura 1C). Este lagartinho, pertencente à família dos répteis Sphaerodactylidae, é um gekkonideo de pequeno porte com ampla distribuição na Amazônia. Usando esses organismos como modelos de estudo, procuramos entender como os processos históricos nas florestas Neotropicais úmidas influenciaram na diversidade genômica destas duas espécies em diferentes níveis estruturais, populacional e de espécies, e em níveis comparativos entre os anfíbios e répteis.

## 2. Como fizemos?

Por meio de técnicas mais avançadas, pudemos acessar os SNPs (em inglês), ou regiões de polimorfismo de nucleotídeos únicos, que nada mais são que uma variação na sequência de DNA, ou uma mutação, que afeta somente uma base nitrogenada, adenina (A), timina (T), citosina (C) ou guanina (G), na sequência do genoma dos indivíduos de uma população ou de uma espécie. Assim, estas informações nos ajudam a entender e investigar melhor como tais processos biológicos que ocorreram há milhões de anos, afetaram o DNA destes indivíduos.

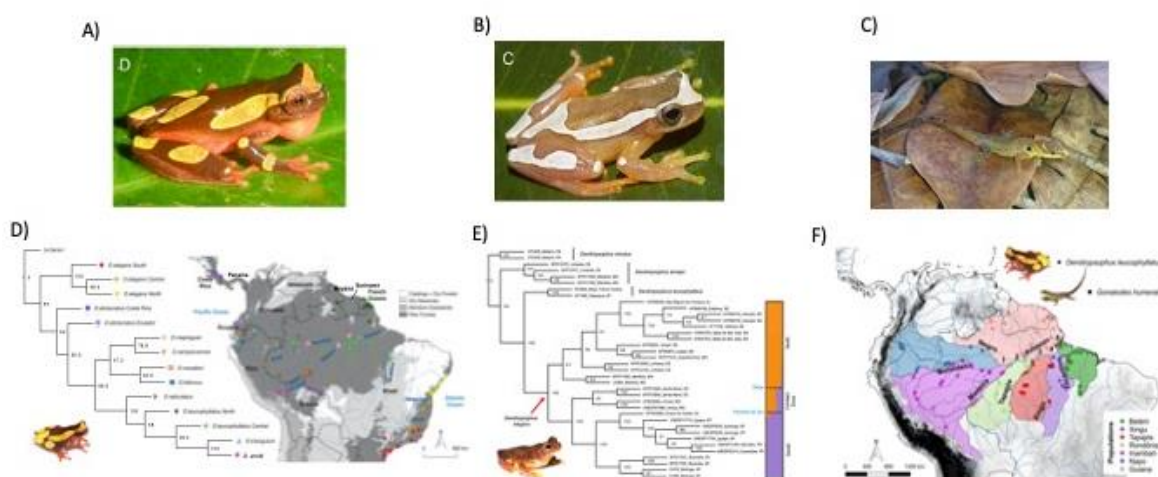
Como trabalhamos com escalas biológicas diferentes (população/espécies), contamos com metodologias adequadas para cada uma delas. Por exemplo, para estudos a nível de espécie utilizou-se análises de delimitação de espécies e investigamos suas relações filogenéticas e geográficas por meio de árvores evolutivas de genes e de espécies. Já para os estudos populacionais e comparativos populacionais, utilizamos testes baseados em modelos somados à análises de diferenciação genética entre as populações.

## 3. O que percebemos/observamos?

Por meio de abordagens analíticas modernas que levam em conta grandes conjuntos de dados em nível genômico (i.e., dezenas de milhares de SNPs) pudemos comprovar que a alta biodiversidade de espécies na região Neotropical não é resultado somente de um processo evolutivo e sim de uma interação de vários processos simultâneos ao longo de milhões de anos de história.

Com base nos principais resultados deste estudo, demonstramos a importância das flutuações climáticas nas mudanças da paisagem Neotropical e

suas relações com a diversificação dos organismos associados (Figura 1D). Outra alteração importante para a construção da biodiversidade da América do Sul foi o soerguimento da Cordilheira dos Andes. Além de estar relacionado com a possível interrupção de fluxo genético das espécies transandinas, este evento também promoveu transformações profundas na Amazônia, disponibilizando espaço e oportunidades ecológicas ao longo de gradientes ambientais que se desenvolveram ao longo de milhões de anos para que eventos de adaptação local e especiação acontecessem. Hipóteses que tratam de diferentes gradientes ambientais influenciando adaptações ecológicas das espécies ainda são pouco abordadas como processos relevantes para a diversificação da biota amazônica, então nossos resultados indicam possibilidades interessantes de pesquisas futuras (Figura 1D)<sup>6</sup>.



**Figura 1.** Resultados sumarizados. **A:** indivíduo adulto de *Dendropsophus leucophyllatus* (foto Pedro Peloso). **B:** indivíduo adulto de *Dendropsophus elegans* (foto Pedro Peloso). **C:** macho adulto de *Gonatodes humeralis* (foto Renata Pirani). **D:** Resultados do trabalho a nível de espécie: árvore evolutiva de espécies e possíveis novas linhagens de *D. leucophyllatus* e a relação entre elas (foto Santiago Ron), além do mapa de distribuição destas espécies na Amazônia e Mata Atlântica com os pontos de amostragem coloridos de acordo com cada um dos clados. **E:** Resultados do trabalho em nível populacional: árvore evolutiva com a relação entre os indivíduos de *D. elegans* (foto Rodrigo Tinoco) na Mata Atlântica, e a barra no canto direito representa a estrutura populacional registrada latitudinalmente em uma análise onde temos uma probabilidade maior dos indivíduos do norte da Mata Atlântica pertencerem a população laranja, e os indivíduos do sul à população roxa, com uma zona de contato entre elas. **F:** Resultados a nível comparativo: mapa de distribuição das amostras de *Gonatodes humeralis* (círculo) e *D. leucophyllatus* (estrela), as diferentes cores são as populações separadas pelos grandes rios e nomeadas de acordo com as Áreas de Endemismo propostas por<sup>7</sup> para a Amazônia (foto Rodrigo Tinoco (Iagarto) e Santiago Ron (Anfíbio)).

Por outro lado, embora a Mata Atlântica também apresente uma topologia complexa e sazonalidade de ambientes, o cenário encontrado para esse bioma é distinto, onde os processos de diversificação das espécies foram

mais recentes, durante o Pleistoceno, possivelmente relacionados com as mudanças de temperatura e precipitação durante o Último Máximo Glacial (~21 mil anos atrás). O isolamento das populações Norte e Sul de *D. elegans* em dois diferentes refúgios durante este período, pode ter causado diferenciação entre elas, resultando em uma zona de contato após uma recente migração populacional em consequência aos climas mais úmidos após o LGM (sigla em inglês) (Figura 1E).

Em se tratando de processos de diversificação os quais levam em consideração quebras vegetacionais na escala da bacia amazônica, os resultados comparados entre dois táxons de anfíbios e lagartos, indicaram suporte misto para a hipótese de que grandes rios amazônicos atuando como barreiras vicariantes (que fragmentaram a distribuição de uma espécie por alterações da paisagem) em processos de especiação (Figura 1F). Nossos resultados indicam que os grandes rios amazônicos, na verdade, possivelmente constituiriam barreiras físicas secundárias para as populações de anfíbios e lagartos analisadas, podendo atuar de formas mais dinâmicas e complexas do que se pensava anteriormente.

#### 4. Para que fazemos

De modo geral, este trabalho reforça a complexidade dos padrões de biodiversidade da região Neotropical. A partir da utilização de técnicas mais avançadas, pudemos acessar um grande volume de dados e assim obter respostas mais detalhadas sobre a história evolutiva dos grupos estudados, tanto em diferentes escalas temporais como espaciais (entre biomas e dentro dos biomas) e biológicas (níveis de espécies, população, e comparativos de diversidade).

Como perspectivas futuras, este trabalho levantou questões biológicas importantes e ainda pouco exploradas. Além do mais, tais resultados podem nos ajudar no reconhecimento de uma diversidade escondida e assim traçar planos de conservação que reconheçam a história evolutiva dos grupos taxonômicos associados a regiões Neotropicais megadiversas.

## Agradecimentos

Esse trabalho só foi possível com o apoio da Coordenação de Apoio à Formação de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq: Ciências Sem Fronteiras: 2014/22444-0, pelo projeto de pesquisa 400770/2014-8), Programa Universal e Bolsa de Produtividade em Pesquisas, e do programa L'Oréal-UNESCO Para Mulheres na Ciência, Society of Systematic Biology, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), Enhanced Engagement in Research (PEER) programa (AID-OAA-A-11-00012), Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, e à colaboração dos coautores dos estudos resultantes e a todos os curadores de coleções científicas nacionais e internacionais pelo material genético concedido.

## Referências

1. Ledo, R.M.D., Colli, G.R., 2017. The historical connections between the Amazon and the Atlantic Forest revisited. *Journal of Biogeography* Early View.
2. Rangel, T.F., Edwards, N.R., Holden, P.B., Diniz-Filho, J.A.F., Gosling, W.D., Coelho, M.T.P., Cassemiro, F.A.S., Rahbek, C., Colwell, R.K., 2018. Modeling the ecology and evolution of biodiversity: Biogeographical cradles, museums, and graves. *Science* 361.
3. Pirani, R.M., Werneck, F.P., Thomaz, A.T., Kenney, M.L., Sturaro, M.J., Avila-Pires, T.C.S., Peloso, P.L.V., Rodrigues, M.T., Knowles, L.L., 2019. Testing main Amazonian rivers as barriers across time and space within widespread taxa. *Journal of Biogeography*. 46, 2444–2456.
4. Haffer, J. 1974. *Avian speciation in Tropical South America*. Harvard University, Cambridge: Nuttall Ornithological Club.
5. Carnaval, A.C., Moritz, C., 2008. Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. *Journal of Biogeography* 35, 1187-1201.
6. Pirani, R.M., Peloso, P.L.V., Prado, J. R., Polo, E. M., Knowles, L.L., Ron, Rodrigues, M.T., S. R., Sturaro, M.J., Werneck, F.P., 2020. Diversification history of clown tree frogs in Neotropical rainforests (Anura, Hylidae, *Dendropsophus leucophyllatus* group). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 150: 106877.
7. Da Silva, J. M. C., Rylands, A. B., & da Fonseca, G. A. B. 2005. The Fate of the Amazonian Areas of Endemism. *Conservation Biology*, 19(3), 689-694. doi:10.1111/j.1523-1739.2005.00705.x

# AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE QUEIJO COALHO COMERCIALIZADO EM FEIRA DE MANAUS, AMAZONAS

DOI: 10.36599/itac-dna.0011

Gabriel José da Silva SERRA<sup>1</sup>; Caroline Sobrinho BARROS<sup>2</sup>; Gisele Macedo de SOUZA<sup>2</sup>;  
Hudson Batista da COSTA<sup>2</sup>; Ricardo Felipe CARAMÊS<sup>3</sup>

Autores correspondentes: [gabriell.serra@gmail.com](mailto:gabriell.serra@gmail.com); [rfscaramez@hotmail.com](mailto:rfscaramez@hotmail.com)

<sup>1</sup>Discente de mestrado PPG-GCBEV, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

<sup>2</sup>Discente. Faculdade Estácio do Amazonas da Fundação Estácio de Sá.

<sup>3</sup>Docente da Faculdade Estácio do Amazonas da Fundação Estácio de Sá.

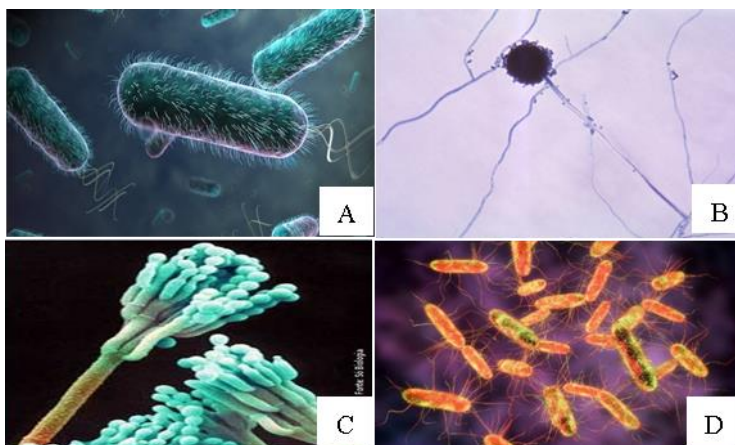
## 1. O que fazemos?

O queijo de coalho é um dos produtos típicos do Norte e Nordeste do Brasil, faz parte da alimentação diária da população que habita essas regiões. Pode ser utilizado como suplemento alimentar ou como iguaria e possui valores socioeconômicos e culturais relevantes. A comercialização do produto é realizada em supermercados e feiras livres. Normalmente quando o produtor ou intermediário chega ao ponto de venda não há necessidade de fiscalização e controle de qualidade prévia, portanto, é obrigatório o monitoramento sanitário pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Apesar da regulamentação Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) tratar sobre a identificação e qualidade do coalho, o leite utilizado deve ser esterilizado por métodos mecânicos apropriados, e pasteurizado ou por tratamento térmico equivalente ao leite cru.

Durante o processo de produção do queijo, pode ocorrer à contaminação por microrganismos, que é um dos fatores que determinam possíveis falhas de saneamento. Dentre esses organismos contaminantes, pode-se destacar a bactéria *Escherichia coli*, às do gênero *Salmonella* e fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (Figura 1).





**Figura 1:** Aspecto morfológico de alguns microrganismos causadores de doenças infecciosas observado em microscópio. A- *Escherichia coli*. Fonte: Profissão biotecnologia. B- *Aspergillus* sp. Fonte: Micologia. C- *Penicillium* sp. Fonte: Micologia D- *Salmonella* sp. Fonte: Micologia.

A *Escherichia coli* (Figura 1A) é uma bactéria pertencente à microbiota intestinal dos animais, incluso o homem, e estão localizadas no ceco e cólon<sup>1</sup>, além disso, há grande interação dessa bactéria com o hospedeiro<sup>2</sup>. A *E. coli* também pode provocar doenças, como infecções urinárias, diarreia e a colite hemorrágica e síndrome hemolítico-urêmica.

Os fungos do gênero *Aspergillus* (Figura 1B) apresentam mais de 200 espécies, mas apenas cerca de 20 têm sido encontradas como causa de doença<sup>3</sup>. A **aspergilose** é uma doença infecciosa causada pelo fungo *Aspergillus* sp., que acomete principalmente o pulmão. Normalmente, esta afecção é benigna, mas representa papel importante em infecções sistêmicas malignas, como é o caso dos pacientes com AIDS<sup>4</sup>. Os sintomas mais comuns dessa doença são asma, pneumonia, sinusite<sup>5</sup>.

Os fungos pertencentes ao gênero *Penicillium* (Figura 1C) têm sido utilizados como organismos modelo em alguns estudos básicos. Além disso, algumas pesquisas mostram seu grande potencial, podendo ser utilizado como controle biológico, secreção de metabólitos secundários, origem de novos fármacos de produtos industriais, entre outros. Porém, se ingerido por seres humanos acidentalmente, através de alimento contaminado<sup>6</sup>, pode acarretar doenças, como por exemplo: Meningite fúngica, Peniciliose, Candidíase etc.

No gênero *Salmonella* (Figura 1D), são encontradas duas espécies, *Salmonella bundii* e *Salmonella enterica*. Essas bactérias podem causar doenças em humanos e outros animais e são a principal causa de infecções de origem alimentar<sup>7</sup>. Dentre as doenças causadas por *Salmonella*, podemos

destacar a Salmonelose, que possui como principais sintomas dores abdominais, vômitos e diarreia<sup>8</sup>. A infecção ocorre principalmente através da ingestão de alimentos crus ou mal cozidos contaminados<sup>9</sup>.

O queijo de coalho é um produto que pode ser produzido manualmente, sendo assim, suscetível a contaminações por agentes patológicos, como é o caso dos microrganismos citados acima. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi realizar uma análise microbiológica do queijo coalho artesanal comercializado na feira da Manaus Moderna, em Manaus Amazonas, para verificar a possível presença de patógenos causadores de doenças que afetam a população.

## 2. Como fazemos?

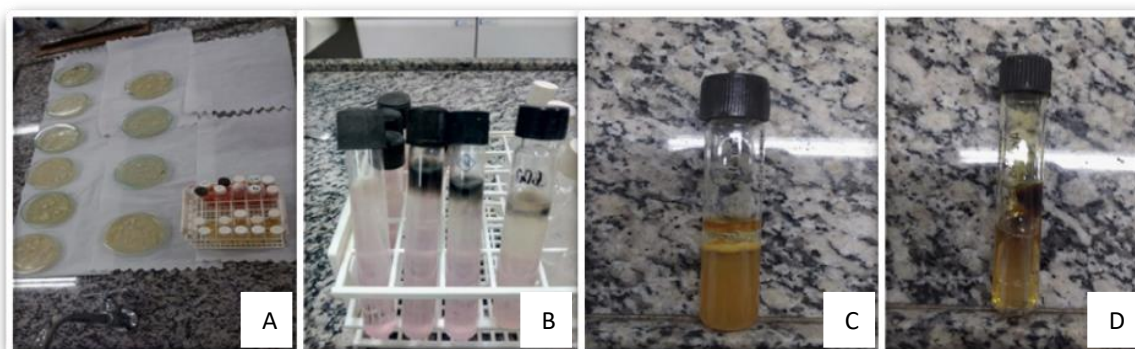
Foram coletadas 10 amostras de queijo coalho, provenientes de diferentes boxes da Feira da Manaus Moderna. As amostras foram armazenadas em bolsas térmicas e levadas para o laboratório de Micologia da Faculdade Estácio do Amazonas, onde foram realizadas análises para detectar a presença de coliformes fecais, *Salmonella* sp., *Escheria coli*, *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp.

As embalagens foram desinfetadas com álcool 70% e abertas com tesoura esterilizada. O queijo foi cortado em pequenos pedaços em uma placa de petri estéril, com auxílio de uma faca e colher esterilizadas. Essas amostras foram maceradas em cápsulas de porcelana com auxílio de pistilo para obter uma maior homogeneização. Retiraram-se 25 g de cada amostra que foram homogeneizadas por 2 minutos em 225 mL de água peptonada estéril. A segunda e a terceira série foram imersas em 9 mL de água peptonada e recebimento de 1 mL de diluições  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$ , respectivamente.

Para detectar a presença desses micro-organismos usamos algumas técnicas, dentre estas, a técnica de tubos múltiplos que é um método probabilístico. A partir daí, o número mais provável de bactérias no coliforme em 100 mL de água pode ser determinado. Também são utilizados meios de cultura, como: caldo Lactosado com verde brilhante, caldo EC (*E. coli*) e caldos seletivos Rappaport Vassiliadis (*Salmonella* sp.).

### 3. O que percebemos/observamos?

As análises microbiológicas revelaram a presença de bactérias e fungos nas amostras estudadas. Das dez amostras de queijo analisadas, em 100% destas foi confirmado o crescimento de *Salmonella* sp., presença de coliformes fecais, presença de *Escherichia coli* e a presença de fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp., o que indica a falta de um controle rígido de higiene dos manipuladores e o descaso com as Boas Prática de Manipulação (BPM) durante a preparação desses alimentos. Para ilustrar melhor a Figura 2 mostra nossos resultados obtidos durante o experimento citado anteriormente.



**Figura 2:** A – colônia de *Salmonella* sp. em placas de Petri; B – tubos com uma colônia de *E. coli*; C e D – colônias de *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp.

### 4. Para que fazemos?

A presença dos microrganismos encontrados no queijo coalho comercializado na feira da Manaus moderna em Manaus indicaram má qualidade do produto, tornando-os impróprios para consumo humano. Dessa forma, faz-se necessário aprimorar o processo de produção desses queijos artesanais, além de serem realizadas fiscalizações efetivas dos órgãos responsáveis para o fornecimento desse queijo aos consumidores, a fim de garantir produtos aptos para o consumo humano e que não representem risco à saúde.

## Agradecimentos

A Universidade Estácio de Sá pela estrutura para realização do projeto, em especial ao Dr. Ricardo Felipe Caramês pela orientação. Ao Programa de Pós- graduação Genética, Conservação e Biologia Evolutiva (PPG-GCBEv) pela oportunidade de divulgação do estudo.

## Referências

1. Croxen, M.A.; Finlay, B.B. 2010. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Review Microbiology*, 8:26-38.
2. Tenailon, O; Skurnik, D; Picard, B; Denamur, E. 2014. The population genética of com mensal *Escherichia coli*. *Nature Review Microbiology*, 8: 207-217.
3. Richardson, M.D; Warnock, DW. 2003. *Fungal Infection Diagnosis and Management*, 3th edition. Victoria, Blackwell Publishing Asia Pty Ltd.
4. Barnes, P.D.; Marr, K.A. 2006. Aspergillosis: spectrum of disease, diagnosis, and treatment. *Infect Dis Clin North Am.* 20(3):545-61.
5. Walsh, T.J.; Anaissie, E.J.; Denning, D.W.; Herbrecht, R.; Kontoyiannis, D.P.; Marr, K.A. et al. 2008. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*.
6. Domsch, K.H.; W. Gams, T.H. e Anderson. *Compêndio de fungos do solo. Academic press, London, UK.* P. 178, 1980.
7. Trabulsi, L.R.; Alterthum, L.F. 2004. *Microbiologia*. São Paulo: Atheneu.
8. Tortora, G.J.; Funke, B.R.; Case, C.L. 2005. *Microbiologia*. Porto Alegre: Artmed.
9. Franco, B.D.G.M.; Landgraf, M. 2004. *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo: Atheneu.

## CÓDIGO DE BARRAS DE DNA APLICADO AOS PEIXES ORNAMENTAIS DO GÊNERO *Hyphessobrycon*

DOI: 10.36599/itac-dna.0012

Francis Paola CASTRO PAZ<sup>1</sup>; Jacqueline da Silva BATISTA<sup>2</sup>; Jorge Ivan REBELO PORTO<sup>3</sup>

Autores correspondentes: [francispcpaz@gmail.com](mailto:francispcpaz@gmail.com); [jirporto@inpa.gov.br](mailto:jirporto@inpa.gov.br)

<sup>1</sup>Egressa do mestrado do PPG-GCBEv, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

<sup>2</sup>Docente do PPG-GCBEv, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

<sup>3</sup>Coordenação de Pesquisas-COPES, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

### 1. O que fazemos?

O gênero *Hyphessobrycon* (Família Characidae e Ordem Characiformes) é um grupo de peixes endêmico da região neotropical que ocorre desde o sul do México até o Rio de La Plata na Argentina. A maioria das espécies deste gênero ocorre na bacia amazônica<sup>1</sup>. Aproximadamente 1/3 delas é de interesse comercial no mercado de peixe ornamental, pois exibem uma ampla coloração que permite dividi-las em seis grupos<sup>2</sup>.

Embora se tenha proposto que *Hyphessobrycon* seja um grupo monofilético (conjunto de espécies que compartilham um ancestral comum) com base no padrão do colorido e no formato das nadadeiras dorsal e anal de machos, conhecido como “*rosy tetra clade*” ou clado dos tetras rosados<sup>3</sup>, ainda há incerteza quanto a filogenia desse gênero e alguns pesquisadores são unânimes em relatar que os caracteres propostos são insuficientes para suportar a sua monofilia<sup>4</sup>.

Um fragmento de 650 pares de bases (pb) do gene Citocromo c Oxidase Subunidade I (COI) do genoma mitocondrial foi eleito para ser o código de barras de DNA<sup>5</sup>. Nele existem duas principais suposições: a monofilia recíproca das espécies e a divergência intraespecífica menor de que a divergência interspecífica<sup>6</sup>. Essa metodologia é utilizada como auxílio na identificação taxonômica para aumentar a confiabilidade da identificação, o que é importante para melhor conhecer a biodiversidade amazônica. Por isso, este trabalho objetivou realizar a identificação genética das espécies de *Hyphessobrycon* que ocorrem na bacia amazônica Brasileira mediante o uso do código de barras de DNA.

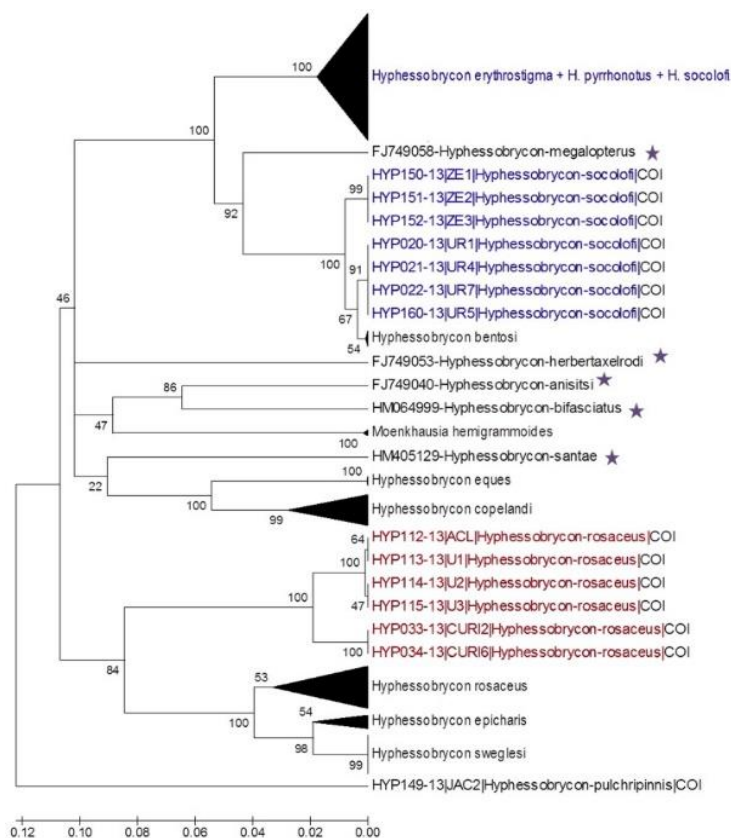
## 2. Como fazemos?

Um total de 155 exemplares foram coletados pertencentes a sete espécies de *Hyphessobrycon* no Rio Negro (*H. bentosi*, *H. copelandi*, *H. epicharis*, *H. pyrrhonotus*, *H. rosaceus*, *H. socolofi* e *H. sweglesi*) e quatro no rio Amazonas (*H. copelandi*, *H. eque*, *H. erythrostigma* e *H. pulchripinnis*). Após identificação taxonômica, os exemplares foram fotografados, o tecido muscular foi retirado e então depositados na Coleção de peixes do INPA. Depois foi realizada extração do DNA do tecido muscular de cada indivíduo<sup>7</sup>. Os fragmentos do gene COI foram amplificados usando os *primers* LCO1490 e HCO2198<sup>8</sup> por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Os produtos de PCR foram purificados e posteriormente a sequência de DNA obtida com o auxílio do Sequenciador de DNA ABI 3130xL (ThermoFisher).

As análises das sequências de DNA foram realizadas com os programas BioEdit (edição) e Clustal W (alinhamento). Posteriormente foi realizada a tradução das sequências de COI em aminoácidos. As sequências foram alinhadas usando a ferramenta BOLD systems v3.0 (<http://v3.boldsystems.org>) e confirmadas no BLAST e no BOLD systems. As análises de distância intra e interespecífica (dentro e entre as espécies, respectivamente) foi calculada com “*Distance Summary*” implementado pelo BOLD systems v3.0. A construção da árvore filogenética foi realizada com ajuda do programa MEGA versão 5<sup>9</sup>. As sequências *H. pulchripinnis* e *Moenkhausia hemigrammoides* foram incluídas como grupo externo para “*Rosy Tetra Clade*”. Todas as sequências obtidas foram depositadas no BOLD systems.

## 3. O que percebemos/observamos?

Foram obtidas 158 sequências de DNA que não apresentaram inserção, deleção ou stop códon. Contudo, a árvore NJ mostrou que a maioria das espécies formaram grupos monofiléticos: *H. bentosi*, *H. copelandi*, *H. eques*, *H. epicharis*, *H. pulchripinnis*, *H. sweglesi*. No entanto, três espécies (*H. erythrostigma*, *H. pyrrhonotus*, *H. socolofi*) não puderam ser identificadas com precisão com o COI porque cada uma apresenta ausência de monofilia, e duas espécies (*H. rosaceus* e *H. socolofi*) podem possuir diversidade oculta porque eles consistiram em dois clados (Figura 1).



**Figura 1:** Arvore gerada com o método Neighbor-Joining (NJ) do COI. Espécies que não foram identificadas pelo código de barras de DNA tais como: 1) *Hyphessobrycon erythrosigma* + *H. pyrrhonotus* + *H. socolofi* (destacadas em azul) e 2) *H. rosaceus* (em destaque vermelho).

#### 4. Para que fazemos?

Nosso estudo trouxe uma importante contribuição para o conhecimento de que ainda existem gêneros de peixes com problemática taxonômica e de identificação, como no caso do gênero *Hyphessobrycon*, aliado ao fato de que os peixes desse grupo são considerados de importância econômica. Portanto, os resultados demonstraram uma eficácia parcial do DNA barcode em identificar as espécies de *Hyphessobrycon* pertencentes ao clado dos tetras rosados. A correta identificação das espécies é crucial para subsidiar planos de uso e conservação da diversidade genética associados às espécies de peixes ornamentais deste gênero.

## Agradecimentos

A pesquisa foi apoiada pelo CNPq, CAPES e FAPEAM. Agradecemos a ajuda na identificação das espécies ao Dr. Jansen Zuanon e Dr. Fernando R. Carvalho.

## Referências

1. Weitzman, S. H.; Fink, L. W. 1983. Relationships of the Neon Tetras, a group of South American freshwater fishes (Teleostei: Characidae), with comments on the phylogeny of New World Characiforms. *Bulletin of the museum of comparative zoology* 150: 339-395.
2. Géry, J. 1977. *Characoids of The World*. T. F. H. Publications. Neptune City. New Jersey. 672pp.
3. Weitzman, S. H.; Palmer, L. 1997. A new species of *Hyphessobrycon* (Teleostei: Characidae) from the Neblina region of Venezuela and Brazil, with comments on the putative "rosy tetra clade". *Ichthyological Exploration of Freshwaters*. 10: 1-43.
4. Weitzman, S. H.; L. R. Malabarba, 1998. Perspectives about the phylogeny and classification of the Characidae (Teleostei: Characiformes). p. 161-170 In: Malabarba. L. R.; Reis. R. E.; Vari. R. P.; Lucena. Z. M. S.; Lucena. C. A. S. (Eds.). *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Porto Alegre. Brasil.
5. Hebert, P. D. N.; Cywinska, A.; Ball, S. L.; deWaard, J. R. 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*. 270: 313-321.
6. Meyer. C. P.; Paulay. G. 2005. DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *PLoS Biology*. 3:e422.
7. Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Press. Cold Spring Harbor. NY-USA.
8. Folmer, O.; Black, M.; Hoeh, W.; Lutz, R.; Vrijenhoek, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3:294-299.
9. Tamura, K.; Peterson. D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M.; Kumar, S. 2011. Mega 5: Molecular Evolutionary Genetic Analysis Using Maximum Likelihood. Evolutionary Distance. and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*. 28:2731-2739.



## ABELHAS E FUNGOS PODEM VIVER JUNTOS?

DOI: 10.36599/itac-dna.0013

Michael Rubem Miranda TIAGO<sup>1</sup>; João Vicente Braga de SOUZA<sup>2</sup>;

Gislene Almeida Carvalho ZILSE<sup>3</sup>

Autores correspondentes: [michaelrubem@gmail.com](mailto:michaelrubem@gmail.com); [gislenezilse@gmail.com](mailto:gislenezilse@gmail.com)

<sup>1</sup>Discente de doutorado do PPG-GCBEv, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia- INPA

<sup>2</sup>Docente do PPG-GCBEv, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA; Coordenação de Sociedade, Ambiente e Saúde (COSAS), Laboratório de Micologia-INPA

<sup>3</sup>Docente do PPG-GCBEv, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA; Coordenação de Biodiversidade (COBIO); Grupo de Pesquisas em Abelhas (GPA), Laboratório de Genética de Abelhas-INPA

### 1. O que fazemos?

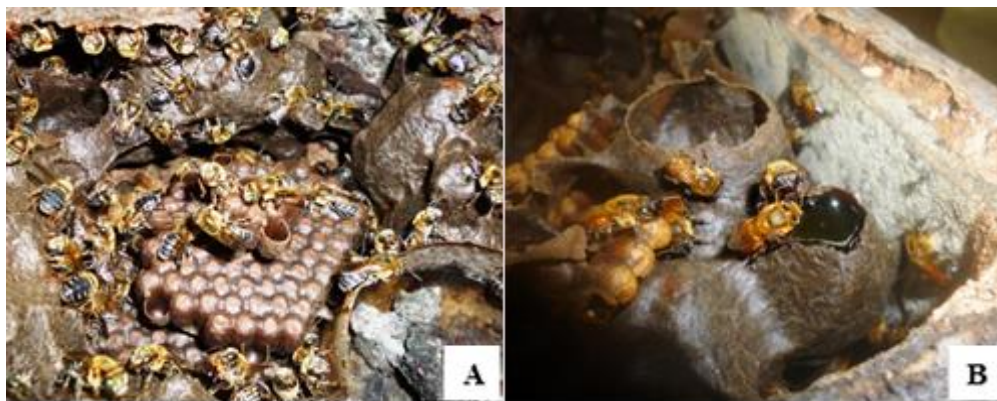
Conhecer a diversidade de seres vivos e investigar a relação entre eles é um desafiante e vasto campo de pesquisa que vem se descortinando há décadas. Tal desafio ganha proporções imensuráveis diante da imensidão da floresta amazônica onde habitam seres microscópicos (como os vírus, bactérias e fungos) que se relacionam, com os organismos invertebrados (insetos, vermes, etc) e vertebrados (mamíferos, aves, répteis, anfíbios e peixes) e com as plantas da floresta. As relações entre estes organismos apresentam complexidades diversas, simbióticas, muitas vezes mutualísticas ou mesmo parasitárias, que interferem seu modo de viver e sua sobrevivência.

Neste contexto, vislumbramos a possibilidade das abelhas estabelecerem alguma relação com os fungos. Acreditamos que as abelhas podem transportar esporos fúngicos para dentro das colmeias durante a atividade de coleta de pólen e néctar, os esporos seriam vetorizados para dentro das colmeias no corpo das abelhas ou no pólen coletado. Outra possibilidade seria os esporos fúngicos, que já estão presentes no ar atmosférico, também estariam presentes no ambiente interno das colmeias. Uma vez que esporos fúngicos são transportados pelo ar ou pelas abelhas para dentro das colmeias, questões intrigantes merecem atenção, como por exemplo, estes fungos oferecem algum risco às colmeias? Podem causar alguma doença as abelhas? Ou será que eles estariam ajudando de alguma forma na sobrevivência das abelhas?

Para respondermos essas questões é preciso entender sobre a vida das abelhas e suas necessidades. As abelhas são insetos fascinantes com importante papel econômico e ecológico. No mundo existem abelhas chamadas de “abelhas sem ferrão”, que vivem em sociedade organizando-se por sexo

machos e fêmeas, dentre as quais distinguem-se as castas rainhas e operárias. Dentro desse grupo de abelhas encontramos o gênero *Melipona* com 244 espécies no Brasil e destas 116 podem ser encontradas no Amazonas<sup>1</sup>. São elas de grande importância para a floresta amazônica porque realizam a polinização de muitas espécies de plantas além de serem ótimas produtoras de mel e pólen. No Estado do Amazonas duas espécies do gênero *Melipona* se destacam na produção de mel: a jupará (*Melipona interrupta*) e a jandaíra ou urucu-boca-de-renda (*Melipona seminigra*) (Figura 1). Por serem espécies autóctones da Amazônia, teriam elas relações específicas com os fungos amazônicos?

Os fungos são seres heterotróficos e estão presentes em muitos habitats, podem ser filamentosos ou leveduras. Alguns fungos se especializaram num modo de vida compartilhada com outros seres vivos e, atualmente, foram encontradas espécies de fungos em vida compartilhada com algumas espécies de abelhas sem ferrão. Estes específicos fungos que vivem em simbiose com estas abelhas não oferecem nenhum risco a elas e acredita-se que estão ajudando as abelhas em seu desenvolvimento e defesa. Em 2015, por exemplo, o fungo *Monascus* sp. foi isolado da abelha sem ferrão *Scaptotrigona depilis* na qual os pesquisadores descobriram que suas larvas comem o fungo durante o processo de desenvolvimento, sendo úteis para nutrição e defesa pois o fungo produz substâncias antimicrobianas<sup>2</sup>. Posteriormente, em 2018, a levedura *Zygosaccharomyces* sp. foi isolada do alimento das larvas desta mesma espécie de abelha o que levou a descoberta de que a levedura produz substâncias necessárias no processo de desenvolvimento<sup>3</sup>. Estas descobertas nos motivaram ainda mais a investigar a diversidade de fungos associados a colmeias de abelhas amazônicas *Melipona interrupta* e *M. seminigra* e suas potenciais relações.



**Figura 1.** A- Colmeia de *M. interrupta*; B – Colmeia de *Melipona seminigra*. (Fonte: Tiago, MRM)

## 2. Como fazemos?

Isolamos e identificamos os fungos presentes nas colmeias de *Melipona interrupta* e *M. seminigra*. Para identificarmos os fungos associadas às abelhas, isolamos os fungos do ar interno das colmeias assim como presentes dentro das células de cria das abelhas (Figura 2). Colocamos placas dentro das colmeias contendo um meio de cultura para que as células dos fungos se aderissem e se desenvolvessem alimentando-se do meio de cultura. Assim os fungos que cresceram foram posteriormente isolados individualmente. Os discos de cria onde se desenvolvem as abelhas foram abertos e após identificarmos a casta (operária ou rainha), realizamos a lavagem da célula de cria e usamos a água dessa lavagem para isolar os fungos presentes dentro das células de cada casta, por meio de técnicas de cultivo de fungos em laboratório.



**Figura 2.** A- Placa para coleta de fungos do ar de dentro das colmeias; B – Discos de cria com as abelhas em fase de pupa nas células de cria (Fonte: Tiago, MRM).

A identificação dos fungos isolados ocorreu por meio das características morfológicas dos fungos, textura de suas colônias, coloração e estrutura celular

dos fungos que foram observados ao microscópio óptico. Além disso, também usamos técnicas de genética molecular para ajudar na identificação dos fungos por meio do seu DNA.

### 3. O que percebemos/observamos?

Descobrimos a presença de fungos filamentosos e leveduras dentro das colmeias das abelhas estudadas. A diversidade de fungos isolados é correspondente à disponibilidade da microbiota de fungos do ambiente amazônico, sendo que os principais fungos filamentosos isolados foram dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Cladosporium*, e das leveduras o principal gênero identificado foi *Candida*, estes gêneros também foram isolados em outros estudos semelhantes<sup>4,5</sup>. Além disso, isolamos e identificamos o fungo *Monascus ruber* o qual já foi observado previamente em colmeias de abelhas *Scaptotrigona depilis*, realçando a possibilidade de que este fungo também tenha alguma relação de mutualismo com *M. interrupta* e *M. seminigra*<sup>2</sup>.

É importante destacar que o gênero *Monascus* é amplamente utilizado na produção de corantes para a culinária, sendo muito comum em produtos orientais. É um fungo com potencial biotecnológico para produção de corantes e por isso encontrar fontes naturais onde possa ser isolado é bastante relevante e promissor.

### 4. Para que fazemos?

Conseguimos observar que existem fungos que estão presentes dentro das colmeias das abelhas, que estes não oferecem risco à colmeia, mas vivem em equilíbrio com as abelhas. Futuras pesquisas responderão se deste grupo de fungos presentes nas colmeias existe alguma espécie de fungo com relação de mutualismo mais específica com as abelhas *Melipona interrupta* ou *Melipona seminigra*. As descobertas encontradas ajudarão as futuras pesquisas a esclarecer como funciona a relação entre fungos e abelhas, e como isso pode ser útil para a criação de abelhas e para sua conservação, lembrando que a preservação das abelhas é de muita importância por questões ecológicas e econômicas, pois um manejo cada vez mais ajustado a biologia dessas abelhas é essencial. Nossos achados abrem

uma linha de investigação sólida sobre o potencial biotecnológico dos fungos associados às colmeias de abelhas sem ferrão amazônicas, que podem efetivamente contribuir para a bioeconomia amazônica.

### Agradecimentos

O primeiro autor recebeu bolsa de mestrado da CAPES. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, e com apoio do Governo do Estado do Amazonas, Secretaria de Estado de Desenvolvimento Econômico, Ciência, Tecnologia e Inovação (SEDECTI), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) – POSGRAD.

### Referências

1. Pedro, S.R.M. 2014. The stingless bee fauna in Brazil (Hymenoptera: Apidae). *Sociobiology* 61: 348–354.
2. Menezes, C.; Vollet-neto, A.; Marsaioli, A.J.; Fontoura, I.C.; Luchessi, A.D.; Lucia, V.; et al. 2015. A Brazilian Social Bee Must Cultivate Fungus to Survive. *Current Biology* 25: 1–5.
3. Paludo, C.R.; Menezes, C.; Silva-junior, E.A.; Vollet-neto, A.; Andrade-dominguez, A.; Pishchany, G.; et al. 2018. Stingless Bee Larvae Require Fungal Steroid to Pupate. *Scientific Reports* 8: 1–10.
4. Rosa, C.A.; Lachance, M.A.; Silva, J.O.C.; Teixeira, A.C.P.; Marini, M.M.; Antonini, Y.; et al. 2003. Yeast communities associated with stingless bees. *FEMS Yeast Research* 4: 271–275.
5. Ferraz, R.E.; Lima, P.M.; Pereira, D.S.; Freitas, C.C.O.; Feijó, F.M.C. 2008. Microbiota Fúngica de *Melipona subnitida* Ducke (Hymenoptera: Apidae). *Neotropical Entomology* 345–346p.

## POR ONDE A PIRAMUTABA MIGRA E POR QUE CONSERVAR ESSE RECURSO PESQUEIRO?

DOI: 10.36599/itac-dna.0014

Kyara Martins FORMIGA<sup>1</sup>; Jacqueline da Silva BATISTA<sup>2</sup>;

José Antônio ALVES-GOMES<sup>2</sup>

Autores correspondentes: [formiga@inpa.gov.br](mailto:formiga@inpa.gov.br); [puraque@inpa.gov.br](mailto:puraque@inpa.gov.br)

<sup>1</sup>Discente de doutorado do PPG-GCBEv, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia- INPA

<sup>2</sup>Docente do PPG-GCBEv, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA

### 1. O que fazemos?

Os peixes na Amazônia possuem uma grande variedade e, de modo geral, estão divididos em dois tipos: os que possuem escamas e os que tem o corpo coberto por placas ósseas ou couro liso. A piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*) faz parte do grupo dos peixes lisos ou de couro (Figura 1) (Ordem Siluriformes). Sendo também conhecida como um dos bagres migradores pois nasce, cresce e se reproduz em áreas geográficas distintas, desde o grande estuário do rio Amazonas até as cabeceiras do Solimões/Amazonas, e seus afluentes de água branca<sup>1,2</sup>.



**Figura 1** – Exemplar de piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*) (Fonte: Acervo Projeto Pirada).

Ao longo do sistema Estuário-Amazonas-Solimões (EAS), esta espécie é capturada desde Belém, na boca do rio Amazonas, até a cidade Iquitos, aproximadamente 5500 quilômetros a Oeste, próximo aos Andes peruanos. A piramutaba está entre os peixes mais pescados da Amazônia sendo muito importante para a economia local, regional, nacional e internacional. São cerca de 30 mil toneladas comercializadas por ano, na região amazônica.<sup>3,4</sup>

Este bagre é importante não só para garantir o equilíbrio necessário da natureza, em conjunto com vários outros peixes, como também de fundamental

importância para a alimentação, como fonte de nutrientes necessários à boa saúde das populações humanas, e economicamente como garantia de geração de emprego e renda. Por isso é fundamental conservar a existência da piramutaba em seu ambiente natural, contribuindo não somente com dinheiro no “bolso” dos envolvidos na pesca, mas também garantir o peixe no “prato” do povo e de preferência com a farinha do Uarini, não é mesmo? Para isso, muitas informações sobre este peixe são necessárias para sugerirmos ações e medidas mais adequadas a serem executadas e cumpridas (às quais chamamos de manejo) por todos os envolvidos e beneficiados com a pesca.

Estudos realizados a partir do DNA são fundamentais para compreender melhor o ciclo de vida da piramutaba na Amazônia. O DNA contém informações que podem revelar se indivíduos de uma determinada espécie compõem uma única população geneticamente homogênea. Nesse sentido é de fundamental importância o estudo da genética, juntamente com os demais estudos dessa espécie de peixe. Assim, nosso trabalho teve como objetivo delimitar o nível de variação genética da piramutaba ao longo dos rios da Amazônia.

## **2. Como fazemos?**

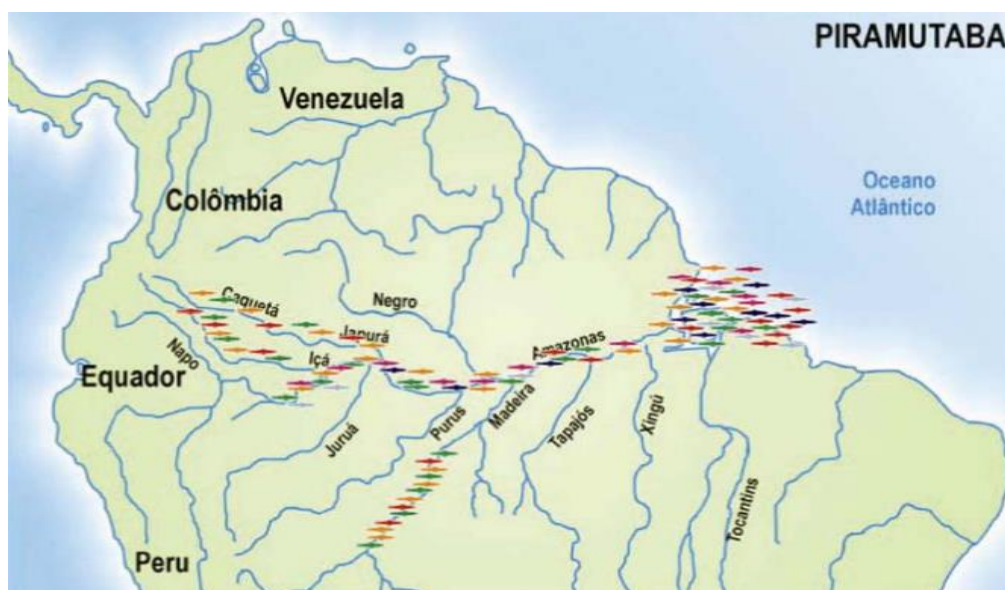
Amostras de tecido muscular (em torno de 30 amostras/local) de piramutaba foram coletadas em portos de comercialização de pesca em cinco municípios situados no Sistema Solimões-Amazonas (Belém/PA, Santarém/PA, Manaus/AM, Tefé/AM e Tabatinga/AM), e em afluentes como os rios Madeira (Porto Velho/RO), Içá (Ipiranga/AM) e Japurá (Vila Bittencourt/AM), todos no Brasil. O DNA foi extraído, conforme o protocolo desenvolvido especificamente para amostras de tecido muscular. Em seguida foi realizada a amplificação (PCR) de um fragmento do DNA mitocondrial denominado região controle. O produto da PCR foi purificado para se retirar elementos que pudessem interferir na leitura do DNA na ocasião em que a sequência nucleotídica da região controle de cada indivíduo foi gerada, para posterior análise em programas de bioinformática.

## **3. O que percebemos/observamos?**

Nosso estudo revelou informações interessantes sobre o seu ciclo de vida. Até mesmo confirmando algumas informações já existentes. No mapa (Figura

2), cada cor (haplótipos) representa um grupo de indivíduos iguais geneticamente.

Depois de nascidas nos afluentes, muitas piramutabas vão para o rio Solimões e descem migrando rumo ao estuário em Belém, onde todas elas se reúnem formando um grande grupo e como ainda são muito pequenas, se alimentam de pequenos animais (pequenos crustáceos e insetos) por um certo tempo. Depois começam a subir o rio Solimões, passando por Santarém, Manaus, Tefé, Alto Solimões até a região do Peru perto das cordilheiras dos Andes, podendo adentrar os tributários que ficam neste caminho. Nesse trajeto de volta, elas se alimentam e crescem até estarem prontas para reproduzir (Figura 2). Com o estudo do DNA, verificou-se que a piramutaba é composta por uma única população com características genéticas muito próximas.



**Figura 2** – Representação e distribuição dos indivíduos de piramutaba ao longo da calha do rio Solimões/Amazonas e seus afluentes Madeira, Içá e Japurá (Fonte: Batista et al. 2005<sup>5</sup>).

Com os dados obtidos podemos sugerir medidas e ações de manejo diferentes entre o Estuário e o Alto Solimões para a pesca da piramutaba; e ações semelhantes nos demais locais da calha do rio Solimões. Além disso, as medidas de manejo para a piramutaba nos afluentes, devem ser diferentes das aplicadas nos locais da calha do Solimões/Amazonas, em função dos afluentes Içá, Japurá e Madeira serem os locais de desova e assim contribuir com uma boa parcela para o grupo a ser formado que migra rumo ao estuário amazônico.



Assim como vários outros bagres migradores na Amazônia, a situação atual do estoque da piramutaba requer uma ação conjunta, política e técnico-científica através de uma abordagem multidisciplinar e transfronteiriça.

Várias questões desafiadoras precisam ser consideradas como o crescente esforço para captura de peixes; a falta de controle sobre o tamanho e a quantidade de peixes capturados; o uso descontrolado da terra e o desmatamento em várias Bacias e Sub-bacias da Amazônia resultando na deterioração do habitat, especialmente das áreas de desova; e a construção de grandes barragens para geração de eletricidade em rios importantes que ameaçam as rotas de migração e o acesso aos habitats de desova. No entanto, a sustentabilidade das populações de peixes e a cadeia econômica que eles sustentam, especialmente através das fronteiras internacionais, continuam a depender de avaliações populacionais precisas, incluindo seus parâmetros genéticos e conhecimento detalhado de seu comportamento e ecologia<sup>6,7</sup>.

#### **4. Para que fazemos?**

Para um peixe migrador como a piramutaba, tanto a atividade pesqueira quanto a ecologia da espécie mudam de uma região para outra. Assim, para viabilizar uma série de medidas políticas que proporcionem a gestão e conservação efetiva desse recurso, é imprescindível uma série de ações bem coordenadas entre os países envolvidos. Nossos resultados oferecem subsídios para os tomadores de decisão elaborarem e executar essas ações.

Assim, em futuras políticas de manejo da piramutaba deve-se considerá-la como uma única população no canal principal e, mesmo que as piramutabas do rio Solimões/amazonas e dos afluentes possam compor um único estoque genético, sugerimos medidas de manejo para a piramutaba nos afluentes, diferentes das aplicadas nos locais da calha do Solimões/Amazonas, em função dos afluentes Içá, Japurá e Madeira serem os locais de desova e assim contribuírem com uma boa parcela para o grupo a ser formado na calha que migra rumo ao estuário amazônico.

## Agradecimentos

Agradecemos ao CNPq/Projeto Genoma Nacional (480183/00-7), IBAMA/PROVÁRZEA, Fundação Internacional para a Ciência – IFS, FAPEAM e Programa Bolsas Funbio - Programa Conservando o Futuro.

## Referências

1. Barthem, R.B.; Goulding, M. 1997. *Os bagres balizadores: Ecologia, Migração e Conservação de peixes amazônicos* Sociedade Civil Mamirauá MCT-CNPq. Brasília. 140 p.
2. Barthem, R.B.; Goulding, M. 2007. *Um Ecossistema inesperado: A Amazônia revelada pela pesca*. Brasília. 241 p.
3. Alonso, J.C.; Pirker, L.E.M. 2005. Dinâmica populacional e estado atual da exploração de piramutaba e de dourada. In: Fabr e, N.N.; Barthem, R.B., (Eds.), *O manejo da pesca dos grandes bagres migradores: piramutaba e dourada no eixo Solimões-Amazonas*. IBAMA/Pro Várzea, Cole o Estudos Estratégicos. Manaus. p. 21-28.
4. Klautau, A.G.C.D.M.; Cordeiro, A.P.B.; Cintra, I.H.A.; Silva, L.E.O. da; Bastos, C.E.M.C.; Carvalho, H.R.L.; et al. 2016. Analysis of the industrial fishing of piramutaba catfish, *Brachyplatystoma vaillantii* (Valenciennes 1840), in two estuarine areas of the brazilian Amazon. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences* 11: 143–150.
5. Batista, J. da S.; Formiga-Aquino, K.; Farias, I.P.; Alves-Gomes, J.A.; Ruffino, M.L. 2005. Variabilidade genética da dourada e da piramutaba na bacia Amazônica. In: Fabr e, N.N.; Barthem, R.B. (Eds.), *O Manejo Da Pesca Dos Grandes Bagres Migradores: Piramutaba e Dourada No Eixo Solimões-Amazonas*, Edi o ProV rzea/Ibama, Manaus, Brazil, p.15–19.
6. Forsberg, B.R.; Melack, J.M.; Dunne, T.; Barthem, R.B.; Goulding, M.; Paiva, R.C.D.; et al. 2017. The potential impact of new Andean dams on Amazon fluvial ecosystems. *PLoS ONE* 12: e0182254.
7. Pelicice, F.M.; Pompeu, P.S.; Agostinho, A.A. 2015. Large reservoirs as ecological barriers to downstream movements of Neotropical migratory fish. *Fish and Fisheries* 16: 697–715.

# SENSIBILIZAR PARA CONSERVAR: IMPORTÂNCIA DO MÉTODO DIDÁTICO LÚDICO PARA O ENSINO DE EDUCAÇÃO AMBIENTAL

DOI: 10.36599/itac-dna.0015

Ana Caroline Viana da SILVA<sup>1</sup>; Aldalúcia Macedo dos Santos GOMES<sup>2</sup>; Jacqueline da Silva BATISTA<sup>3</sup>; Kyara Martins FORMIGA<sup>4</sup>

Autores correspondentes: [ana.line14.ac@gmail.com](mailto:ana.line14.ac@gmail.com); [formiga@inpa.gov.br](mailto:formiga@inpa.gov.br)

<sup>1</sup>Discente de mestrado do PPG-GCBEv, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

<sup>2</sup>Orientadora Docente, Escola Superior Batista do Amazonas – ESBAM

<sup>3</sup>Docente do PPG-GCBEv, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

<sup>4</sup>Discente de doutorado do PPG-GCBEv, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

## 1. O que fazemos?

A Biologia é uma área do conhecimento extremamente importante, pois trata sobre os aspectos da vida e suas interações. A Educação Ambiental (EA) é uma das suas vertentes, e na escola, infelizmente, os assuntos dessa área muitas vezes não são abordados de forma fácil, de maneira que o estudante tende a absorver tudo de forma rápida e às vezes mecânica, e nem sempre entende a importância de se compreender o ambiente que o cerca. A EA foi criada para trazer ao conhecimento da sociedade os riscos e as implicações negativas que a falta de cuidado com o ambiente pode trazer para o homem e para a diversidade biológica.

O Brasil participou de todos os eventos realizados em prol do meio ambiente e decretou leis ambientais que regulamentam como a EA deve ser trabalhada nas escolas e pelos governos. A lei Nº 9.795 de 27 de abril de 1999 se refere a política ambiental e em seu artigo segundo, sobre a Política Nacional de Educação Ambiental, confirma que "A educação ambiental é um componente essencial e permanente da educação nacional, devendo estar presente, de forma articulada, em todos os níveis e modalidades do processo educativo, em caráter formal e não-formal<sup>1</sup>. Desta forma é possível não somente inculcar e moldar hábitos em crianças, jovens e adultos, mas também auxiliar na concepção de respeito em relação ao ambiente, uma vez que fazem parte deste, levando essa educação a ser trabalhada não só no âmbito escolar, mas também pela mídia e pelas famílias em seus lares.

## 2. Como fazemos?

O objetivo principal foi utilizar um jogo didático para ministrar conceitos relacionados à EA aos estudantes. Foi selecionada uma escola pública na cidade de Manaus (AM) para aplicá-lo. Duas turmas do ensino médio (Turma A e Turma B, que correspondem respectivamente ao 2º e 3º ano), foram selecionadas aleatoriamente para o desenvolvimento de uma oficina educativa que incluía uma palestra ministrada em linguagem acessível e na qual conceitos referente à EA e outras informações importantes estavam inseridas, posteriormente foi aplicado o jogo didático interativo PIRADADOS (Figura 1)<sup>2</sup>, (PIRADA – nome do Projeto e DADOS – resultados obtidos no Projeto), desenvolvido pelo projeto PIRADA (PIRA referente aos peixes PIRAmutaba, PIRAíba e ADA de dourADA), do INPA. Utilizar essa abordagem didática nos permitiu trazer algo novo para o dia a dia acadêmico dos estudantes.

O jogo é formado por elementos que incluem um tabuleiro e peças como peões, dados, etc., há cartas com questões que precisam ser respondidas para que os jogadores possam avançar no mapa, e para que os jogadores tenham conhecimento para aplicar ao jogo, uma palestra é apresentada aos estudantes antes disso.

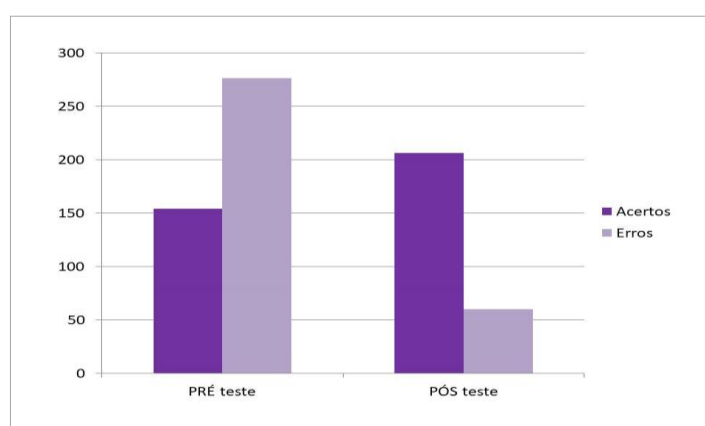


Figura 1. Elementos que compõem o jogo de tabuleiro didático interativo PIRADADOS.

Os estudantes responderam a um questionário antes da palestra, necessário para avaliar o que eles sabiam sobre os assuntos abordados durante a palestra e a aplicação do jogo. Posteriormente eles responderam o mesmo questionário, assim, conseguimos comparar o resultado dos testes.

### 3. O que percebemos/observamos?

Observamos que utilizar o jogo didático melhorou o entendimento dos estudantes quanto aos assuntos abordados. As colunas em roxo (Figura 2) correspondem aos acertos dos questionários das turmas A e B, e as colunas em lilás, aos erros. Percebe-se claramente que os estudantes conseguiram absorver os conceitos apresentados, desenvolvendo o senso crítico.



**Figura 2.** Compilado dos dados de acerto e erro avaliados no PRÉ e PÓS testes. Eixo X apresenta o resultado dos testes das turmas A e B, e o eixo Y a porcentagem dos valores do gráfico.

### 4. Para que fazemos?

Esse trabalho foi desenvolvido para demonstrar que a Biologia pode ser explicada de forma mais divertida, uma vez que houve aumento no número de acertos das questões aos estudantes após o término das atividades da oficina. A EA é muito importante e projetos que desenvolvem metodologias diferenciadas merecem ser propagados.

Se a juventude entender melhor o seu papel como agente de mudança no mundo, o futuro das próximas gerações poderá ser melhor. E ao meio ambiente será dada a chance de se recuperar dos danos sofridos ao longo dos anos,

contribuindo para que haja uma exploração consciente e sustentável de recursos, visando a conservação das espécies e da natureza.

### **Agradecimentos**

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) – POSGRAD. Ao Programa de Pós- graduação Genética, Conservação e Biologia Evolutiva (PPG-GCBEv).

### **Referências**

1. BRASIL. *Constituição da República Federativa do Brasil*, Artigo 225 de 1999. Disponível em <[https://www.senado.leg.br/atividade/const/con1988/con1988\\_06.06.2017/art\\_225\\_.asp](https://www.senado.leg.br/atividade/const/con1988/con1988_06.06.2017/art_225_.asp)> Acesso em: 20 de outubro de 2018.
2. Formiga, K.M.; Batista, J.D.S.; Vasquez, C.A.S.; Aguiar, I.M. A.; Marão, S.T.; Batista, A.C.P.; Rodrigues, F. D.C.; Medeiros, C. B.D.; Bertuchivogt, N.A.; Menezes, L. B.et al. 2007. Jogo didático interativo Piradados: diversão e aprendizagem da genética e ecologia dos grandes bagres migradores da Amazônia. In: *53º Congresso Brasileiro de Genética*, Águas de Lindoia, SP.

## QUEM FREQUENTA O ENCONTRO DAS ÁGUAS? DETECTANDO VERTEBRADOS AQUÁTICOS E TERRESTRES

DOI: 10.36599/itac-dna.0016

Larissa Matos BATISTA; Carolina Sousa de SÁ-LEITÃO<sup>2</sup>;

Vera Maria Fonseca de ALMEIDA-VAL<sup>3</sup>

Autores correspondentes: [larimatosbatista@gmail.com](mailto:larimatosbatista@gmail.com); [veraval30@gmail.com](mailto:veraval30@gmail.com)

<sup>1</sup>Egressa de mestrado do PPG-GCBEV, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

<sup>2</sup>Egressa de doutorado do PPG-GCBEV, Colaboradora no Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

<sup>3</sup>Docente do PPG-GCBEV, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

### 1. O que fazemos?

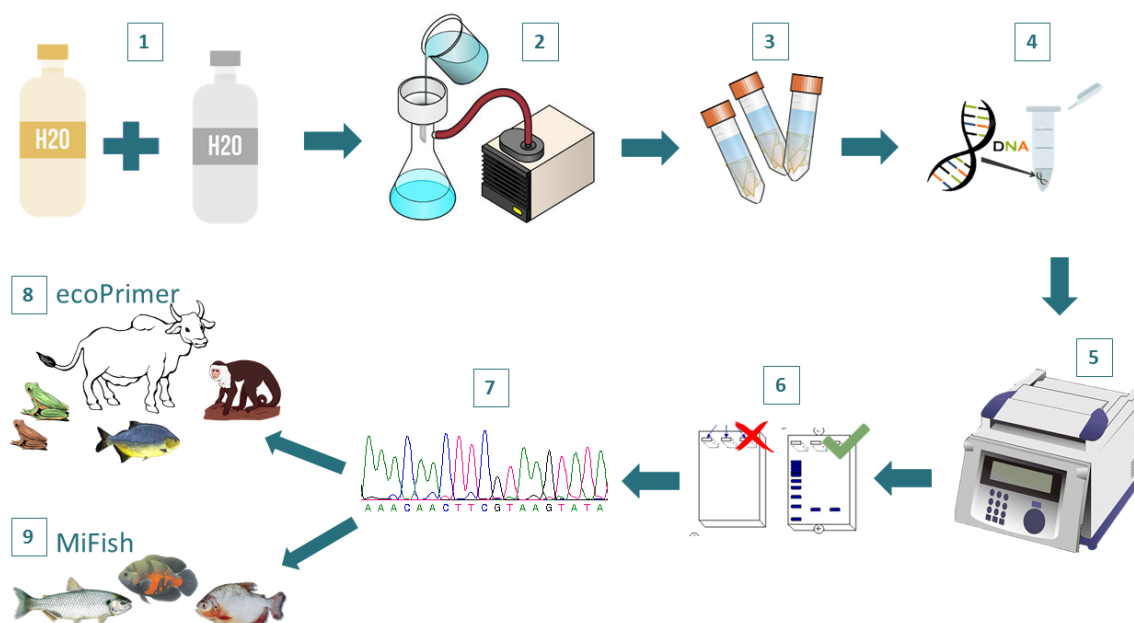
A bacia amazônica é considerada o local com mais alta biodiversidade tanto aquática como terrestre. Sua grande extensão, porém, é uma das causas da necessidade de informações contínuas sobre a diversidade nela existente. O estudo contínuo desta diversidade permanece sendo realizado apenas para algumas espécies e ambientes. Dessa forma, torna-se difícil o entendimento do impacto que as alterações ambientais causam nos organismos; tanto as causadas pelo homem como aquelas de ordem natural.

Existe uma metodologia que vem sendo empregada para identificação de várias espécies a partir de amostras de DNA presentes no solo, água, ar ou gelo<sup>1</sup>, denominada DNA ambiental (eDNA em inglês). O eDNA detecta qualquer forma de material genético que vem dos organismos presentes no local de coleta, a partir da descamação da pele, escamas, saliva, secreção, muco, ovos, fezes, urina, sangue, raiz, folhas, frutos, pólen, organelas e corpos em decomposição<sup>2</sup>. Portanto, nosso objetivo foi detectar o eDNA de vertebrados aquáticos e terrestres em dois tipos de água da região amazônica (preta e branca).

### 2. Como fazemos?

Utilizamos a metodologia do eDNA para detectar espécies de vertebrados a partir de amostras de água do rio Negro (água preta) e do rio Solimões (água branca) (Figura 1). As amostras de água foram filtradas utilizando filtros de fibra de vidro (tamanho do poro de 0,7 µm e 47 mm de diâmetro) e uma bomba

peristáltica acoplada ao sistema de filtração. Para a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizou-se cinco pares de *primers* desenhados para vertebrados terrestres (EcoPrimer), sendo que dois amplificam a região 12S rRNA e três da região 16S rRNA do DNA mitocondrial<sup>3</sup> e um par de *primers* desenhado para peixes na região 12S rRNA (MiFish)<sup>4</sup>.



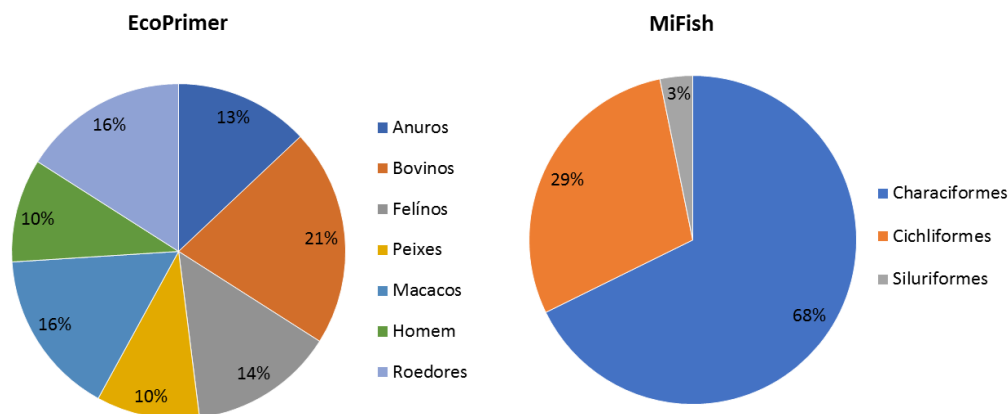
**Figura 1:** Fluxo de trabalho com o DNA ambiental. (1) Coleta de água branca e preta (analisadas separadamente); (2) Filtração da água; (3) Armazenamento de cada filtro; (4) Extração de eDNA dos filtros; (5) Termociclador para aumentar a quantidade de cópias de DNA-alvo (6) Eletroforese em gel para visualização das cópias de DNA-alvo obtidas na etapa 5; (7) Sequenciamento de Sanger para obtenção das seqüências de DNA-alvo; (8) Detecção das espécies de vertebrados terrestres com *primers* EcoPrimer e; (9) de peixes com *primers* MiFish. **Fonte:** Imagens retiradas separadamente do Google Imagens.

O sequenciamento foi realizado em um equipamento ABI-3130 pelo método de Sanger. As seqüências obtidas foram editadas e montadas no software BioEdit. A seguir realizamos a comparação com BLASTn no banco de dados NCBI.

### 3. O que percebemos/observamos?

A comparação com o banco de dados NCBI possibilitou a identificação de diferentes grupos de organismos aquáticos e terrestres nas amostras de água dos rios da Amazônia (Figura 2).





**Figura 2:** Porcentagem geral dos organismos aquáticos e terrestres encontrados em ambas as águas (branca e preta) a partir de amostras de DNA ambiental.

A presença de DNA de vertebrados terrestres nas amostras de água foi um resultado relevante. Mesmo que os vertebrados terrestres não vivam no ambiente aquático, é possível coletar e identificar o eDNA de tais organismos na água dos rios, uma vez que, ao utilizar os corpos d'água para seus afazeres e necessidades durante a vida, deixam seu DNA no ambiente aquático. Isso possibilita que a técnica eDNA consiga identificar diferentes espécies, de diferentes habitats, em um único evento de amostragem<sup>5</sup>.

Em uma pequena amostra de água, existem várias moléculas de eDNA através das quais é possível identificar uma espécie em risco de extinção, uma espécie invasora que impacta as populações naturais, patógenos diversos, incluindo os que ocorrem em criação de peixes, larvas de vetores de doenças como a dengue, febre amarela, malária, dentre outros. Ou seja, podemos utilizar esta metodologia em pesquisas ecológicas, biológicas, ambientais e de conservação. A detecção de uma espécie alvo ou da diversidade de peixes, por exemplo, pode ser obtida rapidamente e com o mínimo de invasão aos ambientes naturais, pois evita o sacrifício dos indivíduos que seriam amostrados, além de diminuir o esforço de coleta que geralmente envolve o uso de vários apetrechos de pesca e demanda muitas horas de trabalho de campo.

#### 4. Para que fazemos?

A principal contribuição deste trabalho foi a aplicação do método de eDNA em corpos de água da bacia amazônica como ferramenta na identificação dos vertebrados aquáticos e terrestres. Os dados obtidos servirão como base para

futuros estudos de distribuição e monitoramento das espécies que habitam os corpos d'água amazônicos.

### Agradecimentos

A CAPES, CNPq, FAPEAM e ao projeto ADAPTA (Adaptações da Biota Aquática da Amazônia) pelo apoio financeiro para o desenvolvimento do projeto.

### Referências

1. Barnes, M. A., & Turner, C. R. (2016). The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. *Conservation Genetics*, 17(1), 1–17. <https://doi.org/10.1007/s10592-015-0775-4>
2. Taberlet, P., Coissac, E., Pompanon, F., Brochmann, C., & Willerslev, E. (2012). Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Molecular Ecology*, 21(8), 2045–2050. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05470.x>
3. Riaz, T., Shehzad, W., Viari, A., Pompanon, F., Taberlet, P., & Coissac, E. (2011). EcoPrimers: Inference of new DNA barcode markers from whole genome sequence analysis. *Nucleic Acids Research*, 39(21), 1–11. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr732>
4. Miya, M., Sato, Y., Fukunaga, T., Sado, T., Poulsen, J. Y., Sato, K., Iwasaki, W. (2015). MiFish , a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes : detection of more than 230 subtropical marine species. *Royal Society Open Science* 2: 150088. <http://dx.doi.org/10.1098/rsos.150088>
5. Ruppert, K. M., Kline, R. J., & Rahman, M. S. (2019). Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA. *Global Ecology and Conservation*, 17, e00547. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2019.e00547>

# O QUE OLHOS NÃO VEEM, O DNA EXPLICA: DIVERSIDADE CRÍPTICA DO CALANGO-LISO

DOI: 10.36599/itac-dna.0017

Erik L. CHOUERI<sup>1</sup>; Adriana V. CASTRO<sup>2</sup>; Rafael N. LEITE<sup>3</sup>; Fernanda P. WERNECK<sup>3</sup>

Autores correspondentes: [chouerik@gmail.com](mailto:chouerik@gmail.com); [fewerneck@gmail.com](mailto:fewerneck@gmail.com)

<sup>1</sup>Discente de doutorado do PPG-GCBEV, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

<sup>2</sup>Egressa do Programa Institucional de Iniciação Científica, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

<sup>3</sup>Docente do PPG-GCBEV, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

## 1. O que fazemos?

A diversidade biológica está distribuída em vários níveis (genética, taxonômica, ecossistêmica), sendo que o Brasil é considerado o primeiro dentre os 17 países megadiversos que concentram alta biodiversidade e espécies exclusivas. Quando pensamos em uma espécie, é comum imaginarmos indivíduos com formas e cores únicas, diferenciando-se assim dos indivíduos de outras espécies. Apesar de geralmente isso ocorrer, alguns organismos fisicamente idênticos (ou muito semelhantes) podem, na verdade, tratar-se de espécies distintas. Essas **espécies crípticas** apresentam particularidades marcantes em seu DNA a tal ponto de serem consideradas diferentes, embora tal distinção não seja refletida visualmente em sua morfologia.

Esse é o caso do lagarto *Copeoglossum nigropunctatum* (Figura 1A), membro da família Scincidae, popularmente conhecido como calango-liso. Essa espécie é amplamente distribuída pela Amazônia, estendendo-se também para os biomas Cerrado e Mata Atlântica<sup>1</sup>. Ao longo dessa vasta distribuição, um estudo prévio identificou que *C. nigropunctatum* é composta por três grupos evolutivos (**clados**) distintos que apresentam singularidades genéticas<sup>1</sup>, porém sem variações morfológicas substanciais. Tais grupos foram considerados como espécies crípticas distribuídas nos setores oriental, ocidental e meridional da distribuição de *C. nigropunctatum*.

Apesar de relevante, o estudo citado anteriormente não contou com uma densa amostragem na Amazônia central, região onde podem ocorrer outras unidades evolutivas (**linhagens**) distintas destes lagartos. Dessa forma, o objetivo de nosso trabalho foi investigar mais a fundo a diversidade de *C. nigropunctatum*, visando compreender as distribuições geográficas das espécies

crípticas e linhagens adicionando amostras coletadas em localidades inéditas da Amazônia Central.

## 2. Como fazemos?

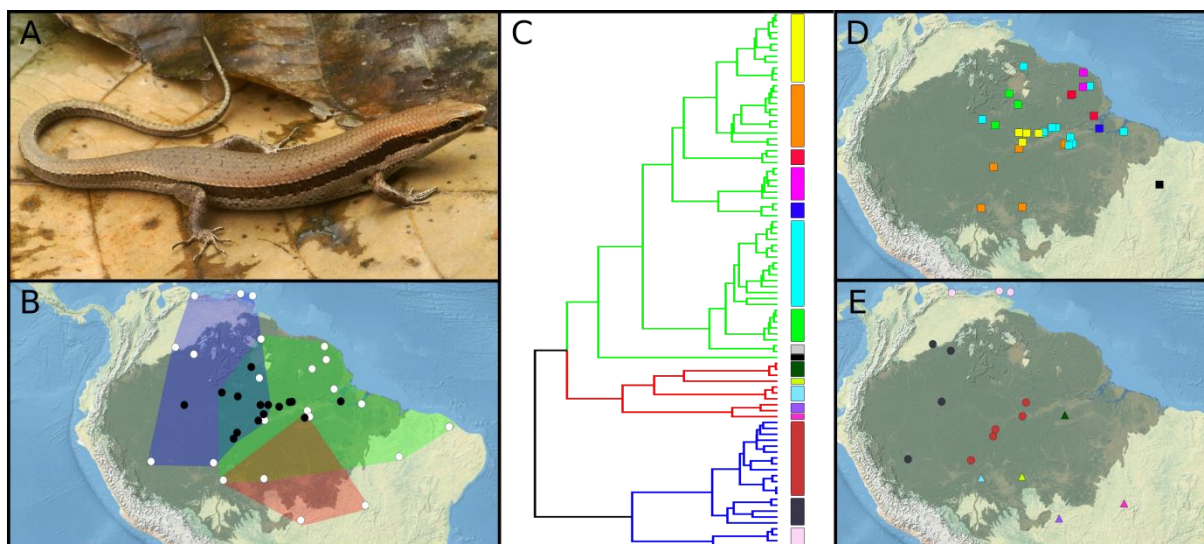
O DNA mitocondrial é uma ótima ferramenta para estudos da biodiversidade pois apresenta diversas características que permitem acessarmos a história evolutiva relacionada às espécies ou linhagens<sup>2</sup>. Sabendo disso, selecionamos o gene mitocondrial Citocromo-B (*Cyt-b*) para as investigações filogeográficas do lagarto *C. nigropunctatum*.

Utilizamos sequências de DNA obtidas em outros estudos e disponibilizadas na plataforma online do GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Além disso, complementamos a amostragem com tecidos depositados nas Coleções Científicas do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (Figura 1B). O material inédito foi sequenciado no Laboratório Temático de Biologia Molecular (LTBM) do INPA.

Utilizamos as sequências de *Cytb-b* para inferir árvores filogenéticas, abordagem que nos revela relações de ancestralidade dos organismos e sua diversidade evolutiva. Também executamos análises de delimitação de linhagens para identificarmos grupos de indivíduos dentro de cada espécie que possivelmente seguem trajetórias evolutivas independentes.

## 3. O que percebemos/observamos?

Nossos dados apontaram que o complexo de espécies crípticas *C. nigropunctatum* é monofilético, sendo, portanto, originado de um ancestral comum. Também identificamos as três espécies crípticas propostas previamente, indicadas como os clados “oriental”, “meridional” e “ocidental”. Dentro dessas três espécies candidatas, foram ainda encontradas novas linhagens distintas (Figura 1C).



**Figura 1.** Resultados sumarizados. **A:** indivíduo adulto de *Copeoglossum nigropunctatum* (foto de Laurie J. Vitt). **B:** localidades amostradas no presente estudo. Pontos pretos correspondem às amostras inéditas do nosso trabalho e os brancos, sequências já publicadas. Polígonos coloridos representam as distribuições das espécies crípticas ocidental, meridional e oriental, correspondendo respectivamente às cores azul, vermelha e verde. **C:** árvore filogenética das relações evolutivas de *C. nigropunctatum*. Cores das linhas (ramos) representam as espécies crípticas do complexo, seguido o mesmo código de cores da figura B. Barras coloridas indicam as diferentes linhagens delimitadas. **D:** pontos de ocorrência das linhagens delimitadas para o clado oriental. **E:** pontos de ocorrência das linhagens delimitadas para os clados ocidental (círculos) e meridional (triângulos). Código de cores das figuras D e E referem-se às barras coloridas da imagem C.

A inclusão de amostras da Amazônia Central apontou essa região como uma área de contato, onde a distribuição geográfica do clado oriental é sobreposta com os clados ocidental e meridional. Por outro lado, não encontramos evidência de sobreposição espacial entre o clado ocidental e meridional (Figura 1B), sendo este um interessante padrão a ser investigado em estudos futuros.

As linhagens delimitadas para o clado oriental de *C. nigropunctatum* (Figuras 1C e D) apresentaram sobreposição no norte da Amazônia, enquanto a região sul da bacia parece ser ocupada apenas por uma linhagem. O clado meridional representou linhagens geograficamente esparsas e distintas (Figura 1C e E), podendo o padrão ser consequência de baixa amostragem na região de transição para o Cerrado, outro bioma de ocorrência do complexo de espécies e onde novos dados precisam ser gerados. Por fim, três linhagens distintas foram identificadas ocupando os extremos leste, oeste e norte da distribuição do clado ocidental (Figuras 1C e E).

#### 4. Para que fazemos?

As linhagens e relações evolutivas descobertas nesse trabalho fazem parte de uma investigação em andamento em que identificaremos áreas de endemismo filogeográfico para pequenos vertebrados terrestres (lagartos, marsupiais e roedores) na bacia amazônica. Regiões de endemismo filogeográfico apresentam a ocorrência sobreposta de diversas linhagens, servindo como evidência de que essas passaram por eventos evolutivos similares<sup>3</sup>. Com base nesses padrões podemos investigar quais foram os possíveis processos geológicos, ecológicos ou climáticos que promoveram a diferenciação e acúmulo espacial da diversidade genética desses organismos. Áreas com alto endemismo filogeográfico também são relevantes para a conservação da biodiversidade, visto que linhagens diversificadas podem apresentar características genéticas únicas importantes para o futuro e manutenção das espécies frente a cenários de alterações ambientais<sup>4</sup>.

#### Agradecimentos

Esse trabalho foi possível graças ao apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) através dos programas POSGRAD, Institucional de Iniciação Científica do INPA (edital n. 001/2018), Universal/Amazonas e Primeiros Projetos, da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) através do Programa Institucional de Doutorado Sanduíche no Exterior (processo n. 88881.361877/2019-01), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico Tecnológico (CNPq) pelo Programa Universal e Bolsa de Produtividade em Pesquisas, e do programa L'Oréal-UNESCO Para Mulheres na Ciência. À Dra. Ana Carolina Carnaval e da *City University of New York*. Agradecemos aos técnicos e curadores das Coleções Científicas e laboratórios utilizados e ao Dr. Laurie J. Vitt, pela fotografia utilizada na Figura 1A.

## Referências

1. Miralles, A.; Carranza, S. 2009. Systematics and biogeography of the Neotropical genus *Mabuya*, with special emphasis on the Amazonian skink *Mabuya nigropunctata* (Reptilia, Scincidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 54: 857–869.
2. Avise, J.C. 2000. *Phylogeography: The history and formation of species*. Cambridge: Harvard University Press.
3. Carnaval, A.C.; Waltari, E.; Rodrigues, M.T.; Rosauer, D.F.; VanDerWal, J.; Damasceno, R.; et al. 2014. Prediction of phylogeographic endemism in an environmentally complex biome. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 281: 20141461.
4. Rosauer, D.F.; Blom, M.P.K.; Bourke, G.; Catalano, S.; Donnellan, S.; Gillespie, G.; et al. 2016. Phylogeography, hotspots and conservation priorities: an example from the Top End of Australia. *Biological Conservation* 204: 83–93.

# IMPACTO DA IGREJA SOBRE O APRENDIZADO DA EVOLUÇÃO HUMANA NA ESCOLA

DOI: 10.36599/itac-dna.0018

Gildean Macedo do NASCIMENTO<sup>1</sup>; Ingrety Lorrana Alves da SILVA<sup>1</sup>; Jayane Sousa SANTOS<sup>1</sup>; Mark Henrique Santana SILVA<sup>1</sup>; Victória Letícia Ribeiro de OLIVEIRA<sup>1</sup>; Jacqueline da Silva BATISTA<sup>2</sup>; Renato Corrêia LIMA<sup>3</sup>

Autores correspondentes: [gil.gmn11@gmail.com](mailto:gil.gmn11@gmail.com); [renatocorreia.lima@hotmail.com](mailto:renatocorreia.lima@hotmail.com)

<sup>1</sup>Discente de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Região Tocantina do Maranhão – UEMASul

<sup>2</sup>Docente do PPG-GCBEV, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

<sup>3</sup>Discente de doutorado do PPG-GCBEV, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

## 1. O que fazemos?

O conteúdo de Evolução Humana é essencial para a compreensão da nossa existência e para o entendimento da complexa estruturação social que temos atualmente. Em tempos remotos, os mistérios relacionados ao ser humano eram explicados por meio de histórias e sem nenhum respaldo científico. Entretanto, hoje compartilhamos de diversas informações embasadas em estudos e evidências, que demonstram o caminho evolutivo percorrido pelo homem<sup>1</sup>.

Embora seja indispensável para compressão do homem atual, o ensino da Evolução Humana em biologia evolutiva ainda é algo desafiador, pois é visto como contrário aos princípios religiosos que permeiam a teoria criacionista<sup>2</sup>. Dentre os principais motivos que dificultam a aceitação ou compreensão deste tema, estão as concepções que os próprios estudantes já trazem consigo, bem como a compreensão da evolução como sinônimo de progresso e melhoria, a visão antropocêntrica sobre os processos evolutivos e a presença da concepção criacionista, a qual nega os preceitos científicos e aceita somente a Criação (no contexto bíblico) como teoria que explica a origem da vida e evolução das espécies<sup>3</sup>.

Antes da utilização de qualquer abordagem pedagógica é importante ter noção da percepção dos estudantes sobre o tema a ser trabalhado, pois, estudos dessa natureza baseiam-se na interpretação que o indivíduo faz diante dos acontecimentos da realidade. Percepção essa que é peculiar, cada pessoa percebe um objeto ou uma situação de acordo com os aspectos que têm especial



relevância para si própria<sup>4</sup>. Desse modo, o presente estudo visou avaliar a percepção de estudantes do ensino médio sobre a temática “Evolução Humana”.

## 2. Como fazemos?

O presente trabalho ocorreu no Centro de Ensino Dorgival Pinheiro de Sousa, localizado na cidade de Imperatriz/Maranhão, em dezembro de 2019, com estudantes de 1º e 2º ano do ensino médio da rede pública de ensino, turno vespertino, quantificados respectivamente em 20 e 22 estudantes. Aplicamos um questionário com três perguntas com o intuito de identificar as concepções e conhecimentos prévios apresentados pelos estudantes relacionados ao assunto, além de identificar possíveis influências religiosas em sua compreensão sobre a origem do homem.

## 3. O que percebemos/observamos?

As perguntas e as porcentagens das respostas que visaram verificar a percepção dos estudantes sobre evolução humana podem ser observadas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Resultados sobre a percepção de estudantes do ensino médio de turmas de 1º e 2º ano sobre Evolução Humana.

QUESTÕES	RESPOSTAS	
	1º ANO	2º ANO
1 Qual das teorias você acredita que explica a Origem Humana?		
a) Criacionismo	73%	85%
b) Evolucionismo	27%	15%
2 Em sua opinião, qual das alternativas abaixo expressa corretamente o conceito de Evolução Humana?		
a) A Evolução Humana é o conjunto de processos que moldaram o <i>Homo sapiens</i> ao longo do tempo, demonstrando o grau de parentesco e as modificações que os diferenciam dos demais hominídeos.	64%	15%
b) A Evolução Humana é a transformação do homem a partir do macaco.	18%	10%
c) Não há Evolução Humana, pois acredito que o homem é fruto da obra da criação divina (Deus).	18%	75%
3 Como você adquiriu o seu conhecimento sobre a origem do homem?		
a) Escola	59%	40%
b) Igreja	32%	50%
c) Outros	09%	10%

Fonte: Autoria própria.

A turma (2º ano), na qual metade (50%) da amostragem dos estudantes adquiriram prioritariamente o conhecimento sobre a origem do homem na igreja (pergunta 3), foi a mesma em que 75% dos entrevistados disseram não haver evolução na espécie humana, por acreditarem ser o homem fruto da criação divina (pergunta 2); e 85% consideram o criacionismo como melhor explicação para origem humana (pergunta 1). O que indica uma relação entre a fonte do conhecimento (escola ou igreja) e a resistência/aceitação de concepções evolucionistas.

Por outro lado, na turma de 1º ano, na qual mais da metade dos estudantes entrevistados (59%) disseram ter adquirido o conhecimento sobre a origem do homem na escola (pergunta 3), 64% entendem a evolução humana de acordo com os preceitos científicos (opção A, pergunta 2). Mesmo assim, essa turma ainda tem uma alta porcentagem de estudantes cuja crença está baseada no criacionismo (73%, pergunta 1).

Houve uma certa relação entre onde (se na igreja ou na escola) se aprende as afirmações relacionadas à origem do homem e o nível de resistência aos preceitos científicos, de maneira que quanto mais envolvidos estão os estudantes com crenças religiosas, maiores são as dificuldades encontradas para a concepção das teorias científicas<sup>5,6</sup>.

Em linhas gerais, mesmo passados 161 anos da publicação do livro “A Origem das Espécies” de Charles Darwin, a adesão dos estudantes entrevistados no presente trabalho ao criacionismo ainda configura a maioria. Isto pode indicar que o conhecimento científico, e suas premissas, precisam ser abordados de forma que o estudante seja levado a refletir, questionar e a buscar explicações baseadas na ciência de maneira a construir os impactos esperados. Esta seria uma provável explicação do que possa ter ocorrido com a turma do 1º ano, cujas respostas da maioria dos estudantes estiveram de acordo com os achados científicos para pergunta 2. É importante que tal senso crítico seja desenvolvido desde os primeiros anos da educação básica na forma de alfabetização e letramento científico<sup>7</sup>.

Desse modo, é importante que temas como a **Evolução Humana** sejam trabalhados em sala de aula com estratégias diferenciadas e de forma imparcial para que os estudantes consigam entender que as explicações científicas

surgem a partir de inúmeras evidências e que por isso são sustentadas pela ciência.

#### 4. Para que fazemos?

Existe uma forte adesão ao criacionismo pelos estudantes da escola estudada e isso pode ter impacto negativo na aprendizagem relacionada a biologia evolutiva que pode se estender além da espécie humana. Encoraja-se, portanto, que a escola promova metodologias de ensino alternativas para abordar o tema Evolução Humana.

#### Agradecimentos

À UEMASul da qual parte dos autores são discentes. À FAPEMA pelo apoio ao projeto e à FAPEAM/POSGRAD pela concessão da bolsa de nível doutorado. Ao PPG-GCBEv e ao INPA pela formação.

#### Referências

1. Moura, J.C.; Silva-Santana, C. 2012. A evolução humana sob a óptica do professor do ensino médio. *Rev Metáfora Educ*, 13: 93–108.
2. Araújo, B.O.P. de; Neves, B.P. das; Correia, A.F.G.; Campos, C.R.P. 2017. Uma sequência didática para aprender Evolução Humana: conhecendo origens e superando preconceitos. *Anais do XI Encontro Nacional de Pesquisa em Educação em Ciências*. Florianópolis, pp. 1–8.
3. Koga, L.V. 2014. Ensinando Evolução Biológica: desafios e possíveis soluções. *Os desafios da Esc pública Parana na Perspect do Profr PDE Produções Didático-Pedagógicas*.
4. Faria, F.L.; Freitas-Reis, I. A 2016. percepção de professores e alunos do ensino médio sobre a atividade estudo de caso. *Ciência Educ*. 22: 319–333. doi:10.1590/1516-731320160020004
5. Oliveira, G.D.S. 2015. Darwin na Escola: Relato de Uma Experiência de Divulgação Científica. *Rev Cult e Extensão USP*, 12: 57. doi:10.11606/issn.2316-9060.v12isupl.p57-71
6. Oliveira, G. da S.; Bizzo, N. 2011. Aceitação da evolução biológica: atitudes de estudantes do ensino médio de duas regiões brasileiras. *Rev Bras Pesqui em Educ em Ciências*, 11: 57–79.
7. Chassot, A. 2003. Alfabetização científica: uma possibilidade para a inclusão social. *Rev Bras Educ*. 22: 157–158.

# “SHOW DA EVOLUÇÃO”: UM JOGO LÚDICO PARA ENSINAR BIOLOGIA EVOLUTIVA

DOI: 10.36599/itac-dna.0019

Adrielle de Jesus Machado SANTOS<sup>1</sup>; Wanderson Lima CUNHA<sup>1</sup>; Gabriel Guzzard Santos da CRUZ<sup>1</sup>; Luiz Fernando Lima CARVALHO<sup>1</sup>; Jacqueline da Silva BATISTA<sup>2</sup>;  
Renato Corrêia LIMA<sup>3</sup>

Autores correspondentes: [adriellesantosmj@gmail.com](mailto:adriellesantosmj@gmail.com); [renatocorreia.lima@hotmail.com](mailto:renatocorreia.lima@hotmail.com)

<sup>1</sup>Discente de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Região Tocantina do Maranhão – UEMASUL

<sup>2</sup>Docente do PPG-GCBEv, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

<sup>3</sup>Discente de doutorado do PPG-GCBEv, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

## 1. O que fazemos?

Crenças e concepções religiosas podem dificultar e impactar o aprendizado de evolução orgânica por estudantes do ensino médio<sup>1</sup>. Para driblar essa dificuldade, atividades lúdicas que integrem a biologia evolutiva são boas alternativas, uma vez que possibilitam uma melhor compreensão do enredo evolutivo<sup>2</sup>, bem como favorecem aulas mais dinâmicas, importantes para estimular o interesse, a concentração, fixação de conteúdos e a motivação dos estudantes<sup>3</sup>.

Além disso, os jogos lúdicos reforçam a aprendizagem dos discentes por favorecerem a relação teórica e prática, sobretudo em relação à compreensão dos distintos processos que comprovam a evolução, que, por conta da complexidade dos conteúdos, podem desestimular os estudantes, o que resulta no conhecimento evolutivo superficial e, muitas vezes, equivocado<sup>4</sup>. Diante do exposto, objetivamos potencializar a aprendizagem em relação às evidências evolutivas por meio da elaboração e aplicação de um jogo didático e lúdico, entre estudantes do ensino médio da rede pública de ensino.

## 2. Como fazemos?

### 2.1 – Elaboração do Jogo

Um Jogo didático intitulado “**Show da Evolução**” foi elaborado e composto por uma roleta, confeccionada com material acessível e de baixo custo, tais como placa de poliestireno, cartolinas, EVA, palito de churrasco de oito centímetros e duas tampas de garrafas pet (Figura 1). Três temas relacionados à biologia evolutiva: fósseis, embriologia e anatomia comparada e

estudos moleculares, foram impressos e posicionados na roleta. Uma relação com perguntas sobre os referidos temas foi elaborada e disponibilizada no Jogo, além do recurso “Socorro”, que consiste em três ajudas: (I) perguntar ao professor que estivesse em sala, (II) ter 30 segundos para pesquisar na internet ou (III) pedir auxílio dos demais componentes do grupo. Dessa maneira, cada grupo/jogador recebe três ajudas, podendo usar cada uma somente uma vez, em questões diferentes, ao longo da partida.

A cada questão respondida corretamente, o integrante ganha uma peça de três quebra-cabeças distintos (um por grupo), de forma que, o grupo com maior número de acertos detém o maior número de peças. Tais quebra-cabeças expunham distintos fósseis e um breve comentário sobre cada um. O grupo que completou o quebra-cabeça, ou chegou mais perto disso, venceu o jogo.



**Figura 1:** Roleta utilizada para escolha dos temas no jogo “Show da Evolução” proposto para estudantes do ensino médio da rede pública do Maranhão.

## 2.2 – Aplicação do Jogo

O presente trabalho foi realizado em uma Escola da rede pública de ensino do Estado do Maranhão, o Centro de Ensino Dorgival Pinheiro de Sousa, em novembro de 2019. Primeiramente, foi ministrada uma aula expositiva de 20 minutos com o tema “Evidências Evolutivas” utilizando literatura especializada<sup>4</sup> com foco nos três métodos de estudo e suas respectivas questões contextualizadas e abordadas no Jogo. Logo após, foi aplicado o jogo didático.

Para a execução de tal atividade lúdica, dividimos a turma em três grupos que tiveram seus respectivos representantes, responsáveis por

responder as perguntas. Estes foram submetidos a questões relacionadas aos três temas expostos durante a aula. Para dar dinâmica, os temas de cada pergunta eram sorteados através do giro da roleta realizado pelo representante na sua devida vez. Quando não conseguia responder as questões por conta própria, o representante poderia utilizar o recurso “Socorro”.

À medida que os representantes foram respondendo as questões, foram substituídos por outros integrantes, de forma que cada representante só participasse uma vez, exceto no momento que o recurso “Socorro” foi utilizado, quando ele poderia também ser consultado no Socorro III. Isso permitiu o envolvimento dinâmico de um maior número de estudantes na atividade lúdica e didática.

Para avaliar a assimilação do assunto com essa metodologia e fazer uma breve validação do jogo, 14 estudantes foram aleatoriamente escolhidos e responderam três questões de múltipla escolha relacionadas ao tema abordado. As mesmas questões foram aplicadas antes e depois da atividade lúdica. As perguntas e respostas foram baseadas em literatura especializada<sup>5</sup>.

### **3. O que percebemos/observamos?**

Por meio da aula expositiva aliada ao jogo “Show da Evolução”, ocorreu aumento na porcentagem de acertos nas questões analisadas (Tabela 1). A pergunta cujo aumento de acertos foi maior está relacionada à definição de fósseis, conceito chave para o entendimento de evolução biológica. Isso mostra que a atividade lúdica realizada foi crucial para a assimilação do conteúdo. O que provavelmente possa ser explicado pela maior aprendizagem com abordagens interativas do que em aulas tradicionais<sup>2</sup>, pois as metodologias ativas têm o poder de motivar o estudante<sup>3</sup>.

**Tabela 1.** Porcentagem de acertos das questões respondidas pelos estudantes, antes (A) e depois (D) da atividade lúdica.

Nº	Questões	% de acertos	
		Antes	Depois
1	Como se determina a idade de um fóssil?	42,85	64,28
2	É chamado de fóssil*?	21,42	92,85
3	O que é a embriologia comparada?	0	50

\*Como as questões eram de múltipla escolha, uma delas correspondia ao conceito de fóssil.

Fonte: Autoria própria.

O jogo didático interativo “**Show da Evolução**” demonstrou ser uma ferramenta didática interessante para apresentar o conteúdo relacionado a biologia evolutiva e ajudar na etapa de assimilação. Utilizar metodologias lúdicas para o ensino de evolução orgânica na educação básica é muito importante porque podem ajudar na superação das dificuldades/resistências apresentadas pelos estudantes em relação a esse tema devido a crenças pré-estabelecidas<sup>1</sup>.

#### 4. Para que fazemos?

O presente trabalho apresentou uma abordagem alternativa para expor evidências da teoria da evolução orgânica, tema fundamental para o aprendizado de biologia e conseqüentemente de ciências. Essa proposta visou facilitar a apresentação e assimilação do conteúdo didático e poderá ser adaptada e utilizada por professores da educação básica para o ensino de evolução.

#### Agradecimentos

À UEMASul da qual parte dos autores são discentes. À FAPEMA pelo apoio ao projeto à FAPEAM/POSGRAD pela concessão da bolsa de nível doutorado. Ao PPG-GCBEv e ao INPA pela formação.

#### Referências

- Oliveira, G.D.S. 2015. Darwin na Escola: Relato de Uma Experiência de Divulgação Científica. *Rev Cult e Extensão USP*. 12: 57. doi:10.11606/issn.2316-9060.v12isupl.p57-71
- Jorge, V.L.; Guedes, A.G.; Fontoura, M.T.S.; Pereira, R.M. de M. 2009. Biologia Limitada: Um Jogo Interativo Para Alunos Do Terceiro Ano Do Ensino Médio Limited Biology: an Interactive Game for Biology Teaching in Senior Year of High School. *Encontro Nacional de Pesquisa em Educação em Ciências*. Florianópolis.

3. Kember, D.; Ho, A.; Hong, C. 2010. Characterising a teaching and learning environment capable of motivating student learning. *Learn Environ Res.*, 13: 43–57. doi:10.1007/s10984-009-9065-8.
4. Sepúlveda, C.; El-Hani, C.N. 2009. Ensino de Evolução: uma experiência na formação inicial de professores de Biologia. In: TEIXEIRA PMM, RAZERA JCC, editors. *Ensino de Ciências: pesquisas e pontos em discussão*. Campinas: Komedi.
5. Futuyma, D.J. 2009. *Biologia Evolutiva*. 3rd ed. Ribeirão Preto: FUNPEC.
6. Crouch, C.H.; Mazur, E. 2001. Peer Instruction: Ten years of experience and results. *Am J Phys.* 69: 970–977. doi:10.1119/1.1374249



## GLOSSÁRIO

**Adulticida:** agente químico capaz de exterminar mosquitos já em fase adulta.

**Anatomia comparada:** estudo das semelhanças e diferenças entre estruturas anatômicas de duas ou mais espécies para determinar seu grau de parentesco.

**Antitumoral:** aquilo que impede o desenvolvimento de tumores.

**Antropocentrismo:** Ideologia que coloca o homem como um ser superior a todos os outros, sendo ele o centro do universo.

**Antropofilia:** em biologia, diz-se de indivíduos hematófagos que tem preferência por seres humanos.

**Arbovírus:** Vírus que se instalam em hospedeiros artrópodes.

**Árvores filogenéticas:** representação gráfica, em forma de árvore, que apresenta as relações evolutivas entre várias espécies que possam ter um ancestral comum.

**Atividades biológicas:** benéficos ou adversos de uma substância química sobre os seres vivos.

**Basidiomas:** estrutura multicelular, característica dos fungos basidiomicetos, dentro da qual se formam os basídios.

**Bioinformática:** campo interdisciplinar que corresponde à aplicação de técnicas da informática, no sentido de análise da informação, nas áreas de estudo da biologia.

**Biotecnológico:** área de estudo e desenvolvimento de seres modificados em laboratório com o intuito de promover o aprimoramento de técnicas em vários setores da sociedade.

**Cadinho:** recipiente em forma de pote, normalmente com características refratárias, resistente a temperaturas elevadas, no qual são fundidos materiais a altas temperaturas.

**Centrômero:** é a região mais condensada do cromossomo, normalmente localizada no meio dessa estrutura, onde as cromátides-irmãs encontram-se ligadas.

**Citogenotóxicos:** capacidade de alguns agentes químicos de danificar uma célula e a informação genética no interior dela, causando mutações ou induzindo modificações na sequência nucleotídica ou da estrutura em dupla hélice do DNA de um organismo vivo.

**Clados:** clado ou ramo é um grupo de organismos originados de um único ancestral comum exclusivo.

**Clonagem:** processo de reprodução assexuada que resulta na obtenção de cópias geneticamente idênticas ao ser vivo que deu origem.

**Código de barras de DNA:** são sequências curtas de DNA, amplificadas por PCR e sequenciadas, que podem ser utilizadas na distinção e identificação de espécies.

**Cromátides:** filamentos de DNA condensado, que forma uma das duas partes do cromossomo, chamadas cromátides.

**Culicidae:** família de insetos habitualmente chamados de muriçoca, mosquitos ou pernilongos.

**Custo efetivo:** em biologia, diz-se do gasto sobre uma determinada atividade biológica, por exemplo, na produção de filhotes.

**Dilapiol:** composto químico orgânico, encontrado no óleo essencial extraído de uma variedade de plantas, incluindo a *Piper aduncum*.

**Diptera:** ordem de animais com duas asas, pertencente à classe dos insetos, incluindo moscas, mosquitos, varejeiras, pernilongos, borrachudos e mutucas.

**DNA barcode:** sequências curtas de DNA, com cerca de 500 a 800 pares de bases nitrogenadas, utilizadas na distinção e identificação de espécies.

**DNA mitocondrial:** material genético presente nas mitocôndrias celulares, passado maioritariamente de mãe para filhos.

**Eletroforese em gel de agarose:** técnica usada em laboratórios para separar fragmentos de DNA, de acordo com seu tamanho.

**Elipsoidal:** que tem a forma de elipse, ou seja, em forma cônica.

**Embriologia:** estudo de todo o processo de desenvolvimento dos embriões, da fecundação à formação dos seres vivos.

**Endêmico:** espécie, organismo ou população de organismo nativo de, ou restrito a determinada região geográfica.

**Endofagia:** *endo* = dentro, *fagia* = alimentar, diz-se do indivíduo que se alimenta dentro de alguma coisa, por exemplo o hábito que os flebotomíneos têm de alimentar-se dentro de domicílios.

**Engenharia genética:** uso de técnicas de manipulação e recombinação dos genes, através de um conjunto de conhecimentos científicos (genética, biologia molecular, bioquímica, entre outros), que reformulam, reconstituem, reproduzem e até criam seres vivos.

**Espécies crípticas:** espécies idênticas na aparência morfológicas, mas que revelam diferenças fisiológicas, genéticas e comportamentais quando estudadas mais detalhadamente.

**Esporos:** Unidades de reprodução de plantas, algas, bactérias, fungos e alguns animais.

**Estudos moleculares:** campo de estudo das interações bioquímicas celulares envolvidas na duplicação do material genético e na síntese protéica, está intimamente ligada à genética e à bioquímica.

**Estudos taxonômicos integrativos:** estudos que utilizam conhecimentos de genética, juntamente com métodos de identificação tradicionais para se obter melhores estudos de classificação e identificação de espécies.

**Etanol:** também chamado álcool etílico ou álcool, é uma substância orgânica obtida da fermentação de açúcares, hidratação do etileno ou redução de acetaldeído, encontrado em bebidas como cerveja, vinho e aguardente, bem como na indústria de perfumaria e como combustível de motores.

**Eucarioto:** ser unicelular ou pluricelular que possui uma membrana nuclear, além de organelas citoplasmáticas.

**Evolução:** processo de variação e adaptação de populações ao longo do tempo, podendo inclusive provocar o surgimento de novas espécies a partir de uma preexistente.

**Fago lambda:** DNA de bactéria de peso molecular conhecido, usado para quantificar o DNA de amostras com peso molecular não conhecido.

**Filogenia molecular:** também conhecida como filogenética molecular, é um ramo da ciência que analisa as diferenças moleculares hereditárias, principalmente nas sequências de DNA, para obter informações sobre as relações evolutivas entre os organismos.

**Fluxo genético:** Movimento dos genes de uma população de indivíduos para outra.

**Fósseis:** restos ou vestígios de animais, plantas ou outros seres vivos preservados em rochas, como moldes do corpo ou partes deste, rastros e pegadas.

**GenBank:** banco de dados de Nucleotídeos, localizado no National Institutes of Health (NIH), armazenando informação sobre sequências nucleodídicas de aproximadamente 260.000 espécies.

**Gene:** segmento de uma molécula de DNA (ácido desoxirribonucleico), responsável pelas características herdadas geneticamente.

**Genotóxico:** capacidade de alguns agentes químicos de danificar o material genético da célula, induzindo modificações no DNA de um organismo vivo, podendo causar mutações.

**Grupo monofilético:** aquele que inclui o ancestral comum mais recente do grupo e todos os descendentes desse ancestral.

**Heterotróficos:** ser vivo que não possui capacidade de produzir seu alimento a partir da fixação de dióxido de carbono e por isso se alimenta a partir dos outros compostos inorgânicos ou orgânicos.

**Hifas:** filamentos de células que formam o micélio dos fungos.

**Isodilapiol:** composto químico semissintético, produzido a partir do dilapiol, substância majoritária presente no óleo essencial de plantas, como a *Piper aduncum*.

**Larvicida:** aquele capaz de matar larvas de insetos.

**Levedura:** fungos unicelulares microscópicos fermentadores.

**Marcador biológico:** componentes celulares, estruturais e bioquímicos, que podem definir alterações celulares e moleculares.

**Microbiota:** microorganismos que habitam num ecossistema.

**Nerolidol:** também conhecido como peruviol e penetrol, é um álcool sesquiterpeno de ocorrência natural encontrado nos óleos essenciais de muitos tipos de plantas e flores.

**Neuroblastos:** células embrionárias, produzidas durante a gestação de um futuro indivíduo, antes da formação do tecido nervoso.

**Nucleotídicas:** blocos construtores dos ácidos nucleicos, o DNA e o RNA.

**Ovicida:** substância capaz de matar ovos ou óvulos.

**Oviposição:** ato de expelir os ovos realizado por fêmeas de animais invertebrados.

**Ovitampa:** armadilhas que simulam o ambiente perfeito para a procriação do mosquito *Aedes aegypti*, onde um vaso de planta preto é preenchido com água, que fica parada, atraindo o mosquito.

**Parasitose:** doença causada por parasita.

**Patógeno:** organismo capaz de produzir doenças infecciosas aos seus hospedeiros

**Perídio:** parede externa ou membrana que envolve os esporos no corpo de frutificação de certos fungos.

**Plasmídeos:** moléculas circulares de DNA, presentes principalmente em bactérias.

**Plasmódio:** protozoário parasita unicelular, que infecta os eritrócitos, causando a malária.

**Pólen:** pequenos grãos, normalmente amarelos, que se formam nos sacos polínicos das plantas com flores e que asseguram a fecundação.

**Politênicos:** grandes cromossomos que foram desenvolvidos a partir de padrão de cromossomos e são comumente encontradas nas glândulas salivares de insetos dípteros.

**Precipitado:** em biologia, diz-se da substância que se separa de uma solução, formando uma fase sólida.

**Protocolos:** características do que segue normas rígidas de procedimentos biológicos.

**Sequenciamento de DNA:** processo de determinação da sequência de bases nucleotídicas (As, Ts, Cs e Gs) em um segmento de DNA.

**Serapilheira:** camada formada pela deposição dos restos de plantas (folhas, ramos) e acúmulo de material orgânico vivo em diferentes estágios de decomposição que reveste superficialmente o solo ou o sedimento aquático.

**Simbiose:** associação a longo prazo entre dois organismos de espécies diferentes seja essa relação benéfica para ambos os indivíduos envolvidos ou não.

**Sistêmicos:** o mesmo que generalizados, metódicos, organizados, sistemáticos.

**SNPs:** Polimorfismo de nucleotídeo único ou polimorfismo de nucleotídeo simples (em inglês *single nucleotide polymorphism*; SNP).

**Sorotipo:** grupo de microrganismos inter-relacionados, caracterizados por antígenos em comum.

**Táxons:** unidade taxonômica, associada a um sistema de classificação científica, pode indicar um reino, género ou uma espécie.

**Termotolerante:** microrganismos que toleram temperaturas acima de 40°C e reproduzem-se nessa temperatura em menos de 24 horas.

**Tripanocida:** Que mata protozoários tripanossomos.

**Vetor:** ser vivo com capacidade para transmitir parasitas, bactérias ou vírus a outro ser ou organismo.

## Sobre os organizadores

### Junielson Soares da Silva



Mestre e doutorando da Pós-graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva (PPG-GCBEv), pelo Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), vinculado aos Laboratórios de Malária e Dengue do INPA e Laboratório de Pesquisas em Genética Toxicológica (Lapgenic) da UFPI. É membro discente do Conselho do Programa do PPG-GCBEv. Desenvolve pesquisas voltadas ao controle populacional de mosquitos vetores de arboviroses (*Aedes aegypti* e *Ae. albopictus*). Licenciado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Piauí, onde participou do Pibid. Especialista em Saúde Pública, e em Educação Ambiental pelo Instituto Superior de Educação São Judas Tadeu-ISESJT. Editor chefe da Journal of Education, Science and Health -JESH. Tem experiência em Ensino de Ciências da Natureza, Formação de Professores e BNCC.



### Renato Corrêa Lima



Doutorando em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva, pelo Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA. Mestre em Biodiversidade, Ambiente e Saúde e Licenciado em Ciências Biológicas, ambos pela Universidade Estadual do Maranhão (UEMA). Experiência em Genética Animal para a identificação e conservação de peixes. Foi professor substituto na Universidade Estadual da Região Tocantina do Maranhão (UEMASUL). É professor da Secretaria de Educação do Governo do Estado do Maranhão (SEDUC/MA).



### Simone Cardoso Soares



Doutoranda em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva pelo INPA. Mestre em Ciências Médicas pela Universidade de São Paulo/FMRP. Graduada em Biologia pela Universidade Federal do Pará. Especialização em Perícia Criminal e Segurança Pública. É professora da Universidade do Estado do Amazonas - Escola Superior de Saúde e Perita Criminal do Estado do Amazonas. Atuou como professora na Universidade Federal do Pará e Universidade de São Paulo. Tem experiência na área de Genética com ênfase em Citogenética, Biologia Molecular, Evolução, Imunologia e Hematologia, atuando principalmente nos seguintes temas: alterações cromossômicas, polimorfismo e distúrbios genéticos. Experiência em Ciências Forenses com ênfase em Genética Forense, Local de Crime. Líder de grupo de pesquisa em genética Humana e Clínica. Líder de grupo de Pesquisa em Ciências Forenses. Foi membro do conselho Editorial

da Editora da Universidade do Estado do Amazonas. É membro da Comissão de Avaliação de Projetos de Extensão da Universidade do Estado do Amazonas. Atua como avaliadora de artigos da Revista Brasileira de Criminalística.



### Jacqueline da Silva Batista



Tecnologista Sênior do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), atuando em Pesquisa, gestão e formação de recursos humanos nos níveis de graduação e pós-graduação. Atualmente é Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva - GCBEV/INPA, Conceito 4 CAPES, sendo Presidente do Conselho e da Comissão de Bolsas do referido Programa. Atua como docente credenciada nos Programas de Pós-graduação GCBEV/INPA (mestrado e doutorado) e Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia - MBT/UEA (mestrado). Atua como Gestora do Laboratório Temático de Biologia Molecular - LTBM/INPA. É vice-curadora da Coleção de Recursos Genéticos do INPA. Tem experiência na coordenação e participação de projetos de pesquisa financiados por agências como FAPEAM, CNPq, FINEP, CAPES e outras. Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Amazonas (UFAM), mestrado em Biologia de Água Doce e Pesca Interior (BADPI/INPA), doutorado em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva (GCBEV/INPA) e pós-doutorado pela UNESP/Botucatu. Atua nas áreas de Genética e biologia molecular animal, com ênfase em Peixes, Genética ambiental e popularização da ciência, atuando principalmente nos seguintes temas: Genética de populações e da conservação Animal, DNA ambiental e difusão da popularização da ciência. É membro das Sociedades Brasileiras: de Genética (SBG), de Ictiologia (SBI) e para o Progresso da Ciência (SBPC). É Conselheira suplente e membro da comissão de transparência do Conselho Regional de Biologia 6ª Região. Thomson Reuters/Web of Science Researcher ID: AAD-4349-2020. Atua no departamento de PD&I e como sócia minoritária da empresa de base tecnológica Oranian Biotecnologia (ORANBIOTEC) CNPJ 37.896.698/001-85, incubada pela Incubadora de Empresa do INPA.



### Kyara Martins Formiga



Bióloga formada pela UFAM. Mestre em Biologia de Água Doce e Pesca Interior – PPG BADPI pelo Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA. Tecnologista do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA. Atua como pesquisadora integrante do Grupo de Pesquisas em Biologia Evolutiva de Peixes Eletrosensitivos, realizando estudos de genética populacional dos bagres migradores da Amazônia, além de coordenar e executar atividades de divulgação e popularização da ciência realizadas em escolas de ensino fundamental e médio em vários municípios da Amazônia. Atualmente discente de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva – PPG CBEV/INPA, tendo como objetivo principal estimar a variabilidade genética do bagre *Brachyplatystoma vaillantii*, com marcadores moleculares e o uso da

metodologia do DNA ambiental, para a melhor compreensão do ciclo de vida da piramutaba na Amazônia.





## Organização



## Financiamento e apoio

