



# Estudo de aplicabilidade do eDNA como ferramenta para licenciamento ambiental

Henrique Bomfim Pinheiro

Monografia em Engenharia de Bioprocessos

Orientadores:

Prof. Daniel Weingart Barreto

Prof. Mauro de Freitas Rebelo

Junho de 2021

**ESTUDO DE APLICABILIDADE DO eDNA COMO  
FERRAMENTA PARA LICENCIAMENTO AMBIENTAL**

***Henrique Bomfim Pinheiro***

Monografia submetida ao Corpo Docente da Escola de Química, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Engenheiro de Bioprocessos

Aprovado por:

---

Bettina Susanne Hoffmann, D. Sc.

---

Fábio Sendim Manoel, M. Sc.

---

Ivaldo Itabaiana Jr., D. Sc.

Orientado por:

---

Daniel Weingart Barreto, D. Sc.

---

Mauro de Freitas Rebelo, D. Sc.

Rio de Janeiro, RJ - Brasil

Junho de 2021

Pinheiro, Henrique Bomfim.

Estudo de aplicabilidade do eDNA como ferramenta para licenciamento ambiental/  
Henrique Bomfim Pinheiro. Rio de Janeiro. UFRJ/EQ. 2021.

x, 35 p.; il.

(Monografia) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2021.

Orientadores: Daniel Weingart Barreto e Mauro de Freitas Rebelo.

1. DNA ambiental. 2. Licenciamento. 3. Biodiversidade. 4. Monografia (Graduação - UFRJ/EQ). 5. Daniel Weingart Barreto e Mauro de Freitas Rebelo.

I. Estudo de aplicabilidade do eDNA como ferramenta para licenciamento ambiental

À minha mãe, que anos atrás topou a loucura de me deixar ir sozinho para outro estado fazer faculdade, e não está mais aqui para presenciar essa reta final.  
Nada teria sido possível sem você. Obrigado.

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer à minha família, por todo o apoio ao longo desses anos morando longe.

Aos meus orientadores. Ao Prof. Daniel pela paciência e ajuda com a elaboração deste trabalho. Ao Prof. Mauro pelos anos de ensinamentos.

Aos meus amigos do Rio, em especial João Belorio e sua família, que me adotaram ao longo da faculdade, Raianne Vasconcellos e Manuela Temtemples pela parceria.

Aos meus amigos de Manaus por nunca saírem da minha vida.

Aos meus amigos e colegas no BioMA e na Bio Bureau, pelos anos de trabalho juntos, toda a ajuda e os ocasionais puxões de orelha. Milica, Juliana, Nemanja, Yasmin, Danielle, André, Fábio, Luana, João, Adriana e todos os que passaram pelo nosso time até hoje, obrigado.

Resumo de Monografia apresentada à Escola de Química como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Engenheiro de Bioprocessos

## **ESTUDO DE APLICABILIDADE DO eDNA COMO FERRAMENTA PARA LICENCIAMENTO AMBIENTAL**

Henrique Bomfim Pinheiro (bomfimhenrique@gmail.com)

Junho, 2021

Orientadores: Prof. Daniel Weingart Barreto  
Prof. Mauro de Freitas Rebelo

Desde a década de 1980 a legislação brasileira tenta criar mecanismos para reconhecer e evitar riscos à biodiversidade. Agências ambientais como o Ibama exigem estudos de impacto ambiental como condicionante para conceder licenças de instalação e operação a empreendimentos que representem risco à fauna e à flora. A metodologia usada hoje para elaborar inventários da biodiversidade em estudos de impacto ambiental é a taxonomia morfológica, baseada na identificação de espécies por características físicas.

Este estudo teve como objetivo avaliar a aplicabilidade de DNA ambiental (“eDNA”) e suas ferramentas acessórias no processo de licenciamento ambiental em comparação à taxonomia morfológica, com foco em ambientes aquáticos.

O eDNA é o conjunto de fragmentos de material genético de diferentes espécies, presentes no ambiente de forma livre. Essa tecnologia usa amostras de água ou sedimento ao invés da coleta de espécimes, identificando espécies presentes através de sequências de marcadores genéticos específicos para cada uma. Esse método é auxiliado pela existência de bancos de dados públicos, como o *Barcode of Life Database*, onde são depositadas as sequências obtidas pela comunidade científica, e sistemas para estruturação de informações sobre as mesmas.

Atualmente existem empresas oferecendo inventários de biodiversidade por eDNA de forma comercial no mundo, enquanto outras desenvolvem pesquisas financiadas pelo setor público ou privado para o estudo de eDNA como ferramenta para caracterizar a biodiversidade, buscando sanar as limitações técnicas existentes.

No Brasil, as regulamentações existentes não estimulam o uso de alternativas à taxonomia tradicional, enquanto normativas estrangeiras, sancionadas por órgãos governamentais, descrevem formas de usar a tecnologia de eDNA para estudo da fauna e flora. O uso dessas normativas como referência poderia possibilitar a elaboração de uma versão brasileira, formando a base legal para a utilização ampla do eDNA como ferramenta para o licenciamento ambiental, enquanto a taxonomia tradicional continuaria sendo necessária para a descoberta e descrição de novas espécies.

# ÍNDICE

<b>1. Introdução</b>	<b>11</b>
<b>2. Objetivos</b>	<b>12</b>
2.1 Objetivos gerais	12
2.1.1 Objetivos específicos	12
<b>3. Revisão bibliográfica</b>	<b>13</b>
3.1 Monitoramento da biodiversidade: histórico e características	13
3.2 DNA ambiental	15
3.2.1 Amostragem em campo	16
3.2.1.1 Filtração	16
3.3 Metabarcoding	19
3.4 Recursos adicionais para o uso do eDNA	21
3.4.1 Bancos de dados de marcadores genéticos	21
3.4.2 MIMARKS	22
3.5 A viabilidade de análise de DNA em larga escala	23
<b>4. O mercado de eDNA</b>	<b>24</b>
<b>5. Impasses regulatórios</b>	<b>27</b>
<b>6. Limitações técnicas</b>	<b>28</b>
6.1 Estudo de populações	28
6.2 Otimização amostral	29
<b>7. Conclusões</b>	<b>30</b>
<b>8. Referências</b>	<b>31</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 3.1</b> Conjunto de equipamentos para filtração de amostras em campo	17
<b>Figura 3.2</b> Acondicionamento da membrana utilizada para retenção de eDNA	17
<b>Figura 3.3</b> Dois modelos de filtros Sterivex	18
<b>Figura 3.4</b> Filtração de amostra de água por filtro Sterivex com auxílio de seringa	18
<b>Figura 3.5</b> Amostragem com garrafa de Van Dorn	19
<b>Figura 3.6</b> Etapas do desenvolvimento do <i>metabarcoding</i>	20
<b>Figura 3.7</b> Evolução do custo de sequenciamento por megabase de DNA ao longo dos anos	23
<b>Figura 4.1</b> Distribuição mundial de empresas trabalhando com eDNA, em porcentagem	26



## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 3.1</b> Lista de verificação para registro de sequências segundo o MIMARKS	22
<b>Tabela 4.1</b> Empresas oferecendo serviços de eDNA	24

## LISTA DE SIGLAS

- ANP** - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
- bp** - *base pairs*, pares de bases
- BOLD** - *Barcode of Life Data Systems*
- CBOL** - *Consortium for the Barcode of Life*
- COI** - Gene específico da subunidade I da citocromo oxidase c
- CRO** - *Contract Research Organization*
- Conama** - Conselho Nacional do Meio Ambiente
- DDBJ** - *DNA Data Bank of Japan*
- DNA** - Ácido desoxirribonucleico
- eDNA** - *Environmental DNA*, DNA ambiental
- EIA** - Estudo de impacto ambiental
- ENA** - *European Nucleotide Archive*
- EUWFD** - *European Union Water Framework Directive*
- GBIF** - *Global Biodiversity Information Facility*
- GSC** - *Genomic Standards Consortium*
- Ibama** - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
- ICMBio** - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
- INSDC** - *International Nucleotide Sequence Database Collaboration*
- Mb** - Megabase, 1 milhão de pares de bases
- MIGS** - *Minimum information about a genome sequence*
- MIMARKS** - *Minimum information about a marker gene sequence*
- MIMS** - *Minimum information about metagenome sequence*
- NCBI** - *National Center for Biotechnology Information*
- NGS** - *Next Generation Sequencing*, sequenciamento de próxima geração
- NHGRI** - *National Human Genome Research Institute*
- PCR** - Reação em cadeia da polimerase
- qPCR** - PCR quantitativo
- RNA** - Ácido ribonucleico
- Sisbio** - Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
- SisGen** - Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
- USDA** - *United States Department of Agriculture*
- UTO** - Unidade taxonômica operacional

## 1. Introdução

Estudos de Impacto Ambiental (EIAs) são uma exigência legal para o processo de licenciamento de empreendimentos em diversos ramos, como a construção de oleodutos e gasodutos, extração de combustível fóssil e usinas de geração de eletricidade, dentre outros (Resolução Conama n. 001, de 23 de janeiro de 1986). Órgãos ambientais como Conama e Ibama entendem que empreendimentos com potencial risco de impacto ambiental à sua região, devido às atividades exercidas pelos mesmos, devem apresentar estudos de impacto para obtenção do devido licenciamento. Uma parte primordial desses estudos é o diagnóstico ambiental, que engloba a identificação da fauna e flora locais. Essas obrigações devem ser cumpridas por métodos reconhecidos e seus resultados, validados pelos órgãos competentes. No entanto, o esforço necessário e limitações técnicas existentes vêm prejudicando a qualidade desse trabalho e o resultado de licenciamentos.

Para o estudo da biodiversidade do local de interesse, a abordagem utilizada tradicionalmente é a taxonomia morfológica, onde os espécimes são coletados ou fotografados para identificar as espécies por características físicas (Decreto nº 4.339, de 22 de agosto de 2002). Essa metodologia apresenta limitações que impactam a qualidade e velocidade de realização de estudos, como uma alta taxa de erro humano, dificuldades na detecção desses erros e a necessidade de captura de espécimes para que seja feita a identificação (HAASE et al., 2010). Como alternativa, este trabalho propõe o uso de análises de *environmental DNA* (eDNA) ou DNA ambiental em português, que consiste em identificar as espécies a partir do conjunto de fragmentos de material genético que seres vivos deixam no ambiente por onde passaram.

Por sua atuação no mar, empresas petroleiras são potenciais interessadas da tecnologia do eDNA e serão utilizadas ao longo deste trabalho para ilustrar oportunidades e limitações dessa tecnologia. Já houve casos no Brasil em que licenças ambientais foram negadas devido a levantamentos da biodiversidade incompletos (Ibama, 2018). O eDNA pode se apresentar como uma tecnologia alternativa para auxiliar na obtenção de licenças para esse segmento.

Neste trabalho, serão apresentadas as bases do licenciamento ambiental, mais especificamente ao que diz respeito à identificação e monitoramento da fauna aquática em regiões de interesse e o estudo de impacto ambiental para empreendimentos nesse ambiente. Serão abordados o método utilizado atualmente para se obter inventários da biodiversidade aquática, as metodologias de eDNA mais relevantes atualmente, o mercado mundial existente, limitações e desafios da utilização dessa tecnologia e regulamentações já existentes em outros países, que podem ser utilizadas como embasamento para estabelecer uma diretiva brasileira.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivos gerais**

Avaliar a aplicabilidade do DNA ambiental no estabelecimento de inventários da biodiversidade aquática e monitoramento de espécies para fins de licenciamento ambiental.

#### **2.1.1 Objetivos específicos**

- Comparar o eDNA à taxonomia morfológica tradicional quanto à sua aplicação no estudo da biodiversidade, definindo seus princípios metodológicos e limitações.
- Definir ferramentas acessórias necessárias à aplicação da tecnologia de DNA ambiental.
- Explorar o mercado mundial de serviços de eDNA, incluindo a elaboração de inventários da biodiversidade.
- Identificar impasses regulatórios para uso do eDNA em estudos de impacto ambiental no Brasil.

### **3. Revisão bibliográfica**

#### **3.1 Monitoramento da biodiversidade: histórico e características**

Em 1986, a legislação brasileira já apresentava uma preocupação com a biodiversidade e possíveis efeitos negativos que um desenvolvimento industrial desregulamentado poderia causar. Na resolução Conama nº 1 de 24 de janeiro de 1986, o artigo 6º estabelece exigências para estudos de impacto ambientais (EIAs), que deveriam desenvolver diagnósticos ambientais, na área de influência de um dado empreendimento em processo de licenciamento, do seu meio físico (recursos minerais, topografia, corpos d'água, regime hidrológico, etc.), do seu meio sócio-econômico (uso e ocupação do solo, uso da água e atividades econômicas da sociedade local) e do meio biológico, solicitando um estudo sobre a fauna e a flora. Esse diagnóstico do meio biológico precisaria, segundo a resolução, trazer atenção especial às espécies indicadoras da qualidade ambiental, de valor científico e econômico, raras e ameaçadas de extinção. Nesta mesma legislação era estabelecida a obrigatoriedade de elaborar programas de monitoramento para estes possíveis impactos.

Em 1990, o Decreto nº 99.274 regulamenta a execução da Política Nacional do Meio Ambiente, estabelecendo o papel do poder público no cumprimento de diversas diretrizes para proteção ambiental. Nela, coube ao Poder Público a fiscalização permanente de recursos ambientais, conciliando desenvolvimento econômico, o resguardo do meio ambiente e do equilíbrio ecológico.

Em 2002, o Decreto nº 4.339 dá início à implementação da Política Nacional da Biodiversidade. São princípios regentes dessa política: o valor intrínseco da diversidade biológica, independente do valor atual ou potencial para o homem, o direito de uma nação de explorar seus recursos, seguindo sua política de meio ambiente e desenvolvimento, sendo responsável pela conservação dos mesmos, o caráter essencial da manutenção da biodiversidade, dentre outros. O primeiro componente da Política Nacional da Biodiversidade listado é o conhecimento da biodiversidade, para a geração de informações que possibilitem o conhecimento sobre a fauna do país, a produção de inventários, a realização de pesquisas ecológicas e a realização de pesquisas sobre conhecimentos tradicionais. Além deste, outro componente é o monitoramento, avaliação, prevenção e mitigação de impactos sobre a diversidade, tendo como objetivo o aprimoramento de sistemas de monitoramento e acompanhamento de impactos sobre a biodiversidade.

Assim, o Brasil apresenta um histórico de preocupação com o conhecimento e preservação da fauna nativa.

Almeida (2017) publicou um estudo sobre problemas existentes em EIAs na percepção de analistas ambientais do Ibama. Nesse estudo, 53 analistas relataram suas experiências na avaliação de EIAs, indicando que uma das áreas mais deficitárias desses estudos é o diagnóstico ambiental. Uma preocupação específica sobre esse ponto é levantada quando o autor descreve o diagnóstico ambiental como uma etapa primordial para estruturar as etapas subsequentes de um EIA, logo,

insuficiências nesta etapa terão efeito direto sobre as outras. A segunda área apontada como mais problemática foi a análise do impacto ambiental em si, dentro da qual foram apontados problemas como deficiências na previsão e avaliação de impactos, má avaliação e minimização destes.

Atualmente, a amostragem de espécies que compõem a fauna aquática de um dado ambiente é realizada por diferentes técnicas, como o uso de diferentes artes de pesca, e.g., redes de arrasto, puçá e pesca elétrica. Por enquanto, o único método de identificação destas espécies, embasado pela legislação brasileira, é a taxonomia morfológica tradicional (Decreto nº 4.339, de 22 de agosto de 2002). Nessa metodologia, são empregados profissionais especializados na identificação de grupos taxonômicos específicos para analisar amostras coletadas no campo, sejam de organismos inteiros ou através de fotos, para classificar os espécimes encontrados de acordo com suas características morfológicas (número de patas, presença e número de antenas, cor, estrutura corporal, etc.). No entanto, vários dos atributos utilizados para diferenciação de espécies só se apresentam claramente em animais adultos. Outro fator desafiador é a escassez de taxonomistas capacitados para realizar a identificação precisa, de forma que o processo se torna demorado e atrasa o procedimento legal de licenciamento de um empreendimento. Um agravante para espécies raras, endêmicas ou ameaçadas de extinção é que esse método necessita da captura de espécimes para identificação e, pela Lei nº 11.794, todo animal utilizado em atividades de pesquisa deverá ser submetido a eutanásia.

Em estudos ambientais também existem limitações de esforço de uma equipe de pesquisa, da técnica de amostragem para a obtenção de indivíduos e da sua possível raridade ou dificuldade inerente de captura.

Um fator agravante do uso da taxonomia tradicional é a possibilidade sempre presente de erro humano. Em 2000, a União Europeia implementou a *European Union Water Framework Directive* (EUWFD), tornando obrigatório que todo corpo d'água superficial seja monitorado e manejado de forma a obter o *status* "saudável" de acordo com parâmetros estruturais, químicos e bióticos. Nesse âmbito, a metodologia para definir o parâmetro biótico da biodiversidade presente foi o monitoramento de macroinvertebrados bênticos, animais da macrofauna que vivem associados ao substrato. Ao auditar amostras do monitoramento quanto a ordenação e identificação de espécies em ambiente laboratorial, Haase e seus colaboradores (2010) concluíram que cerca de 33,3% de todos os espécimes e 20% de todos os táxons presentes não foram isolados por analistas credenciados.

No estudo de Haase (2010), dentre as espécies isoladas para a auditoria de identificação, o número de táxons registrados teve uma diferença de 33,8% entre os analistas credenciados e a equipe de auditoria. Foi teorizado que diferenças na identificação poderiam ter sido causadas por níveis variados de atenção a detalhes entre analistas, déficits em conhecimento taxonômico e até a uma noção subconsciente da diferença de dificuldade entre diferentes famílias e ordens, levando os analistas a dedicarem menos atenção a táxons "mais fáceis" de identificar. Outras circunstâncias que dificultam a obtenção de informações mais detalhadas pela taxonomia tradicional são o pequeno tamanho das espécies,

recursos limitados (i.e. tamanho e quantidade de amostras), espécimes danificados e existência de morfotipos, variações de características fenotípicas numa dada população.

Como exemplo do risco gerado por um inventário da biodiversidade incompleto, tanto para a biodiversidade quanto para empreendimentos, o Ibama negou em 2018 a licença ambiental requerida pela Total, empresa de exploração de petróleo atuante no Brasil, para a exploração de cinco blocos na Foz do Amazonas (Ibama, 2018). A preocupação do Ibama se dá pela detecção de recifes de corais na região, identificados após a submissão dos estudos de impacto e que seriam colocados em risco pela exploração (DE MAHIQUES et al., 2019). Em setembro de 2020, a Total anunciou ter chegado a um acordo para encerrar a sua participação nessa iniciativa (Total, 2020).

Pode-se estimar o valor dos barris de petróleo que deixaram de ser produzidos pela Total na Foz do Amazonas em apenas um ano de atraso da fase de exploração. Acredita-se que os blocos de exploração na Foz do Amazonas tenham potencial para produção de 15 bilhões de barris de petróleo e características semelhantes às do Campo de Jubileu, em Gana (Valor Econômico, 2016). A produção diária do Campo de Jubileu é de 84.700 barris de óleo, em média (DONKOR, 2020). Considerando um ano comercial de 360 dias, utilizando o preço médio do barril de petróleo Brent em 2013 (ano do leilão onde os direitos de exploração foram adquiridos) de US\$ 107,96 (O Globo, 2013) e uma produção diária média de 84.700 barris, a receita perdida pela empresa foi de cerca de US\$ 3,29 bilhões por ano.

Em outro caso, a BG Energy Holdings investiu aproximadamente R\$ 525 milhões, em 2013, para obter o direito de exploração de nove blocos na bacia de Barreirinhas, localizada numa porção da margem equatorial próxima ao estado do Maranhão. No entanto, até agosto de 2017, nenhum dos blocos licitados desde a 11ª rodada de leilões da ANP em 2013, incluindo os arrematados pela BG e pela Total, receberam o aval do Ibama para serem explorados (Valor, 2017).

### **3.2 DNA ambiental**

O DNA ambiental, ou eDNA, é o conjunto de fragmentos de material genético, intra ou extracelular, de diferentes espécies presentes no ambiente de forma livre, derivados de fragmentos de pele, muco, dejetos, pelos, dentre outros materiais biológicos (HARPER et al., 2018). Assim, eDNA está presente no solo, na água e no ar. Ao ser extraído de amostras ambientais, o eDNA pode ser amplificado por PCR (reação em cadeia da polimerase) e sequenciado. Após o sequenciamento, as sequências são comparadas com as presentes em bancos de dados para identificação.

Pela sua importância, a aplicação de PCR será explicada em mais detalhes posteriormente.

Na água, o eDNA se comporta de forma análoga ao material particulado em suspensão (WILCOX et al., 2016), podendo ser retido em sedimentos ou ser

carregado pela correnteza para longe da sua fonte. Dessa forma, a abordagem por DNA ambiental contorna uma das maiores limitações da metodologia de inventário atual: não há necessidade de se capturar um indivíduo, logo não é necessário causar estresse ou sacrificar o espécime para obtenção de material genético.

A identificação de espécies por eDNA também tem um custo-benefício melhor em situações onde a densidade populacional é baixa, seja pela área de estudo (e.g. mar aberto) ou pela população reduzida de uma espécie de interesse (SHELTON et al., 2019; *Canadian Standards Association*, 2019). Adicionalmente, o risco de erros de falso negativo é diminuído pela sensibilidade da etapa de PCR presente no fluxo de trabalho de DNA ambiental (PILLIOD et al., 2014).

A análise de eDNA, por sua vez, tem potencial ainda para elucidar a presença de espécies pequenas, raras ou elusivas (JACKSON et al., 2014).

### **3.2.1 Amostragem em campo**

Em 2018, como parte do projeto *Capacity Building at InBIO for Research and Innovation Using Environmental Metagenomics*, financiado pelo programa *Horizon 2020* da União Europeia, Egeter e seus colaboradores publicaram protocolos detalhados para a amostragem de água com foco na extração de eDNA. Esses protocolos representam os métodos mais utilizados em pesquisas científicas dessa área e serão descritos aqui para elucidar os aspectos operacionais da coleta de amostras.

#### **3.2.1.1 Filtração**

O método mais utilizado nas pesquisas de campo, a filtração consiste em coletar um volume definido de água e filtrá-lo por uma membrana que será preservada e utilizada posteriormente para extração de DNA (figura 3.1). Os equipamentos utilizados no campo precisam estar livres de material genético contaminante, podendo ser descontaminados com soluções diluídas de hipoclorito de sódio entre amostras, degradando resquícios de DNA que possam estar presentes, ou serem materiais descartáveis de uso único.

As membranas comumente utilizadas tem um tamanho de poro variando entre 0,22  $\mu\text{m}$  e 1,50  $\mu\text{m}$  (KUMAR; EBLE; GAITHER, 2020). Dependendo das condições do ambiente que está sendo estudado, como concentração de material particulado e matéria orgânica, pode-se escolher entre usar um filtro com poro menor e filtrar um volume menor, visando reter todo o DNA presente nessa amostra, ou optar por um poro maior e a filtração de volumes maiores. Na segunda alternativa, o DNA da amostra não seria esgotado por completo, mas o volume maior compensaria as perdas e possibilitaria uma operação sem complicações com entupimento.

Para fins de preservação, pode-se utilizar soluções tampão que retardem a degradação de DNA em temperatura ambiente como, por exemplo, a solução Longmire (KUMAR; EBLE; GAITHER, 2020). Isso é feito deixando a membrana submersa na solução.



FIGURA 3.1 – CONJUNTO DE EQUIPAMENTOS PARA FILTRAÇÃO DE AMOSTRAS EM CAMPO  
1)Funil de filtração; 2)Mangueira de silicone; 3)Motor para bomba peristáltica; 4)Cabeçote para bomba peristáltica; 5)Frasco para coleta de filtrado



Fonte: Laramie et al., 2012

Após a filtração, as membranas utilizadas devem ser embaladas individualmente (figura 3.2) para transporte em frascos livres de contaminantes.

FIGURA 3.2 – ACONDICIONAMENTO DA MEMBRANA UTILIZADA PARA RETENÇÃO DE eDNA



Fonte: Adaptado de Laramie et al., 2012

Como alternativa a funis de filtração, existem os filtros Sterivex (Merck-Millipore, figura 3.3). Sterivex são filtros de uso único, vendidos em embalagens individuais, estéreis, que capturam o DNA filtrado da água na

membrana interior. Eles podem ser utilizados com um sistema de bomba peristáltica semelhante ao mostrado anteriormente ou com a utilização de uma seringa para forçar a passagem da água pela membrana (figura 3.4). Filtros Sterivex também diminuem o risco de contaminação da amostra após sua coleta, visto que a membrana em que o DNA fica retido é contida na cápsula até precisar ser manipulada em laboratório.

FIGURA 3.3 – DOIS MODELOS DE FILTRO STERIVEX



Fonte: Merck-Millipore

FIGURA 3.4 – FILTRAÇÃO DE AMOSTRA DE ÁGUA POR FILTRO STERIVEX COM AUXÍLIO DE SERINGA



Fonte: o autor (2020).

Para a coleta de amostras próximo à superfície, uma amostragem manual com a utilização de garrafas apropriadamente descontaminadas pode ser utilizada. Para amostragens em profundidade, uma alternativa é a utilização de garrafas de Van Dorn ou semelhantes (figura 3.5). Estes aparatos são submersos abertos e, ao chegarem à profundidade desejada, são fechados com o uso de um peso e um sistema de acionamento por molas. Com uma garrafa de Van Dorn é possível isolar amostras de profundidades específicas e trazê-las à superfície para filtração.

FIGURA 3.5 – AMOSTRAGEM COM GARRAFA DE VAN DORN



Fonte: O autor (2020)

### 3.3 *Metabarcoding*

De forma geral, as duas abordagens de biologia molecular utilizadas para a análise de eDNA são o *metabarcoding* e o qPCR, ou PCR quantitativo em tempo real (HARPER et al., 2018). No entanto, a qPCR é uma abordagem mais direcionada à detecção de uma única espécie, sendo inadequada para um levantamento amplo de espécies numa região. Para inventários da biodiversidade, a metodologia de *metabarcoding* demonstra ser a ferramenta mais apropriada.

Stein et al. (2014) define *barcoding* como uma metodologia de identificação de espécies em diferentes níveis taxonômicos baseado em pequenas sequências de DNA de um locus (porção específica do genoma) padronizado. As sequências desses marcadores genéticos são obtidas de exemplares das espécies de interesse, de forma a criar um banco de dados de referência, com as sequências características de cada espécie aliadas à sua identificação taxonômica. O *metabarcoding* é a aplicação da metodologia de *barcoding* focada em amostras ambientais de composição desconhecida.

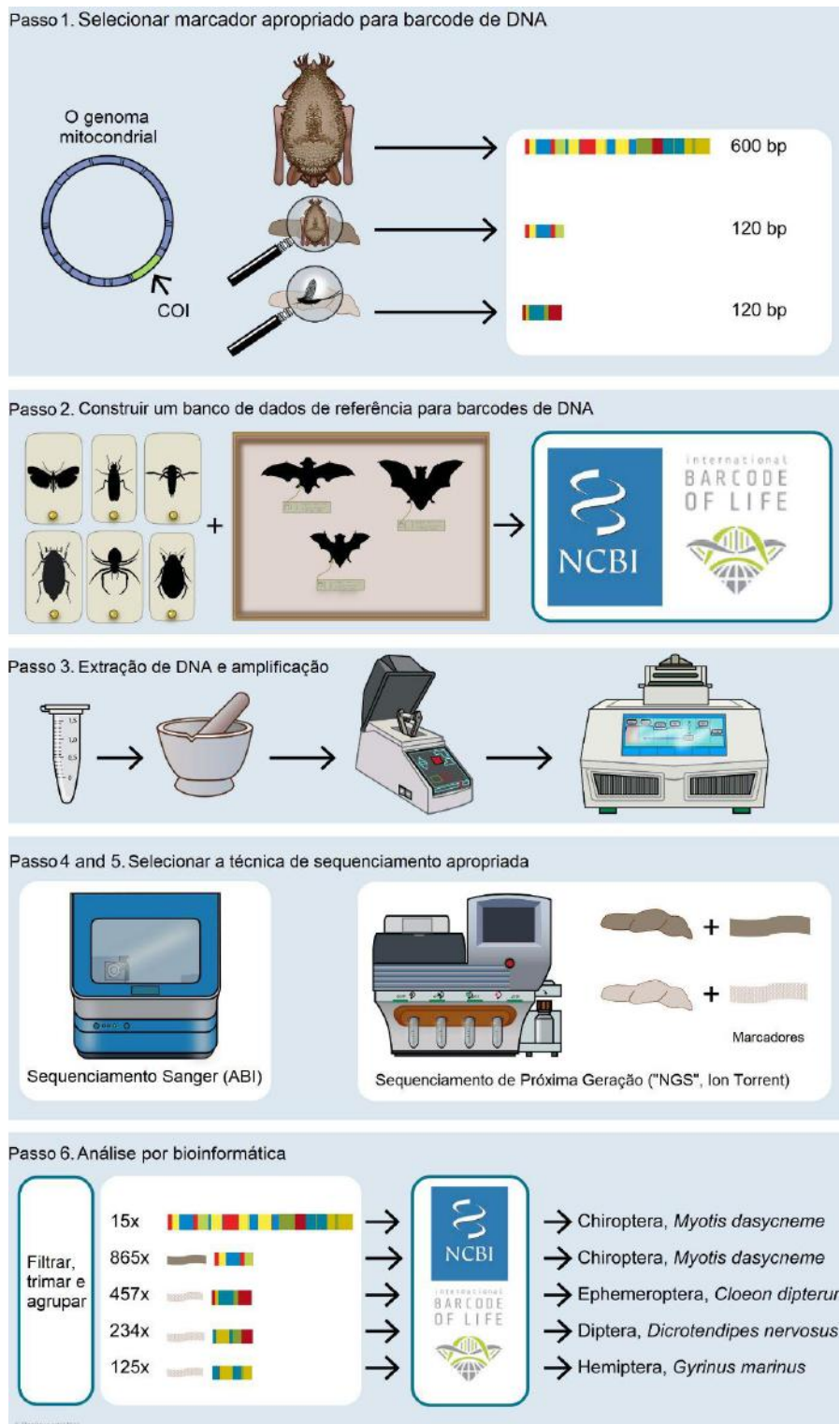
Para a análise de *metabarcoding* são coletadas as amostras ambientais, tais como água ou solo, das quais o eDNA será extraído. Após a extração do DNA presente nessas amostras, o marcador genético alvo é amplificado, sendo copiado várias vezes ao longo da reação de PCR, utilizando *primers* universais (BREED et al., 2019), pequenas sequências de DNA em fita única, desenhadas e sintetizadas para se hibridizarem à região alvo do DNA. Essa sequência amplificada é então chamada de *amplicon* e suas sequências são comparadas às sequências de referência, cuja espécie de origem é conhecida (figura 3.6). Para casos em que não existem sequências correspondentes, o DNA obtido do ambiente é atribuído a uma unidade taxonômica operacional (“UTO”) e identificado até o táxon mais próximo da



espécie possível. UTOs podem então ser reanalisadas no futuro à luz de novos dados, numa espécie de amostragem retroativa.

FIGURA 3.6 – ETAPAS DO DESENVOLVIMENTO DO *METABARCODING*

- 1) Seleção de um marcador genético para estudo; 2) Construção de banco de dados de referência;
- 3) Extração e amplificação de DNA de amostras ambientais;
- 4) Seleção da tecnologia de sequenciamento adequada;
- 5) Sequenciamento do DNA obtido;
- 6) Bioinformática para comparação de seqüências encontradas com bancos de dados disponíveis.



Fonte: Adaptado de Haarsma, Siepel e Gravendee, 2016

Atualmente, o gene mitocondrial da subunidade I da citocromo oxidase c (“COI”) é um dos mais utilizados para identificação de espécies e, devido à importância atribuída a ele, foi criado o *Barcode of Life Data Systems* (“BOLD”, RATNASINGHAM; HEBERT, 2007), um banco de dados público dedicado principalmente a sequências de COI. Esse gene foi apelidado de “código de barras da vida” devido à sua variabilidade entre espécies e, ao mesmo tempo, consistência dentro de uma mesma espécie, permitindo uma identificação de indivíduos e diferenciação entre espécies de forma confiável.

Diferentes pesquisas sugerem que, para uma caracterização completa da fauna, utilizar apenas um marcador genético pode ser insuficiente. Enquanto o COI é aceito como um marcador universal, os RNAs ribossomais mitocondriais 16S e 12S podem ser utilizados para obter resultados complementares e aumentar o nível de confiabilidade (CAWTHORN; STEINMAN; WITTHUHN, 2012).

### **3.4 Recursos adicionais para o uso do eDNA**

#### **3.4.1 Bancos de dados de marcadores genéticos**

O BOLD é uma plataforma criada para centralizar informações pertinentes ao barcoding de DNA e ao gene COI. O esforço para a construção desse banco de dados teve início em 2004 com o *Consortium for the Barcode of Life* (“CBOL”), que se expandiu ao longo dos anos com o objetivo de construir uma biblioteca de barcodes para todas as formas de vida eucariontes.

Parte do trabalho realizado dentro do BOLD é voltado para o reforço de padrões de qualidade para as sequências depositadas. Em parceria com o NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), que mantém o GenBank, outro banco de dados público para sequências de genes, e o GBIF (*Global Biodiversity Information Facility*), com informações diversas sobre taxonomia e ocorrência de espécies, foram estabelecidas diretrizes para que sequências depositadas tenham o status de *barcode*: serem derivadas de uma única região, atenderem a padrões de qualidade específicos e terem sido obtidas de espécimes cuja identificação taxonômica possa ser revisada, isto é, existe um espécime preservado em uma coleção biológica reconhecida. Esse último ponto faz parte da caracterização de um espécime amostral como “espécime voucher”, um indivíduo de referência cuja classificação taxonômica foi realizada por um profissional qualificado.

Para serem considerados *barcodes*, os registros depositados precisam apresentar, pelo menos, o nome da espécie, o número de catálogo e coleção onde o espécime voucher está preservado, o nome, data e coordenadas do local de coleta, nome do responsável pela identificação da espécie, uma sequência de pelo menos 500 bp do gene COI, os primers utilizados para gerar o *amplicon* referente ao gene e quaisquer arquivos auxiliares à sua identificação.

Além do BOLD, existem outros bancos de dados que armazenam sequências genéticas, como o INSDC (*International Nucleotide Sequence Database Collaboration*, COCHRANE et al., 2016) que agrupa o GenBank, pertencente ao

NCBI, o ENA (*European Nucleotide Archive*, LEINONEN et al., 2011) e o DDBJ Center (*DNA Data Bank of Japan*, MASHIMA et al., 2017).

### 3.4.2 MIMARKS

Em 2011, Yilmaz e colaboradores publicaram o padrão MIMARKS (*Minimum information about a marker gene sequence*), uma lista de informações mínimas que devem ser reportadas de acordo com o GSC (*Genomic Standards Consortium*) para reportar sequências genéticas de marcadores moleculares no meio científico.

Foi notado que muitas vezes as informações depositadas em bancos de dados com as sequências de genes não eram adequadas para possibilitar uma busca eficiente nesses bancos. A falta de informações ocorre por não existir um consenso de exigências entre diferentes bancos de dados. Existiu anteriormente o padrão MIGS (*minimum information about a genome sequence*) e MIMS (*minimum information about metagenome sequence*). O MIMARKS foi desenvolvido como um aprimoramento desses dois sistemas, incluindo informações, observações e medições dos habitats onde amostras foram coletadas e descrições padronizadas de aspectos ambientais para gerar informações mais consistentes.

A lista de verificação para registro de sequências, estendida pelo MIMARKS, compreende os seguintes aspectos:

Tabela 3.1: Lista de verificação para registro de sequências segundo o MIMARKS

Investigativos	A sequência foi submetida ao International Nucleotide Sequence Database Collaboration? O registro se refere a um espécime ou a um levantamento Qual o nome do projeto em que a sequência existe
Ambientais	Latitude e longitude do local de coleta Profundidade Elevação País, região ou mar Data Bioma Tipo de local (porto, lago, rio, etc.) Material coletado
Pacotes ambientais	A amostra veio do ar, água, estava associada a outro organismo, biofilme, sedimento, esgoto, etc.
Sequência de nucleotídeos	Referência à publicação em revista científica
Sequenciamento	Gene ou região de gene sequenciado Método de sequenciamento

Fonte: Adaptado de Yilmaz et al. (2011)

### 3.5 A viabilidade de análise de DNA em larga escala

Em 2019, Breed e colaboradores fizeram uma revisão bibliográfica sobre o potencial da genômica como ferramenta para restaurar ecossistemas e a biodiversidade, tanto terrestre quanto aquática. Um dos fatores identificados para a oportunidade que ferramentas genômicas apresentam foi o seu barateamento ao longo dos anos. O *National Human Genome Research Institute* (NHGRI) mantém um histórico dos custos médios para sequenciamento de DNA e sua evolução ao longo dos anos e os disponibiliza para uso acadêmico. Segundo dados do NHGRI, o custo por genoma humano sequenciado, em valores aproximados, caiu de US\$ 100 Bi, em 2000, para US\$ 1000,00 em 2020. Em uma medida mais generalista, o custo de sequenciamento de 1 Megabase (Mb), ou seja, 1 milhão de pares de bases, com uma probabilidade de erro de 1%, é US\$ 0,01 atualmente, frente a US\$ 10.000,00 há 21 anos atrás (figura 3.7). Parte disso se deve a avanços nas tecnologias utilizadas para sequenciamento. Hoje, a principal metodologia utilizada para sequenciamento de grandes volumes de DNA é o sequenciamento de próxima geração ou NGS (*Next Generation Sequencing*) em plataformas comerciais como Illumina, uma empresa que desenvolve e vende sequenciadores.

A queda de custo apresentada no gráfico entre 2007 e 2008 marca uma transição de tecnologias, da metodologia de sequenciamento Sanger, para a NGS.

FIGURA 3.7 – EVOLUÇÃO DO CUSTO DE SEQUENCIAMENTO POR MEGABASE DE DNA AO LONGO DOS ANOS



Fonte: Adaptado de Watterstrand, 2020

#### 4. O mercado de eDNA

Através de buscas nas plataformas Crunchbase e ResearchGate, foi possível levantar um número de empresas internacionais oferecendo comercialmente a análise de eDNA como serviço para gerar conhecimento sobre a biodiversidade. Delas, uma porção significativa é atrelada a centros de pesquisa e universidades (tabela 4.1). Isso fornece indícios de uma necessidade e perspectiva para essa ferramenta atualmente: a proximidade a pesquisadores, acompanhando e desenvolvendo a tecnologia para sanar questões técnicas e aprimorar metodologias. Atualmente, há um maior número de empresas oferecendo serviços de DNA ambiental no Reino Unido, Estados Unidos, Canadá e Austrália (figura 4.1). Dentre as empresas que oferecem serviços de eDNA, destacou-se as que oferecem explicitamente o serviço de levantamento da biodiversidade por eDNA.

Tabela 4.1 – Empresas oferecendo serviços de eDNA

(continua)

Empresa	Comercializa levantamento da biodiversidade?	País	Parcerias significativas	Início de atividades
Advanced Identification Methods	Não	Alemanha	N/A	2016
Tropwater	Não	Austrália	Center for Tropical Water and Aquatic Ecosystem Research, Universidade James Cook	N/A
EnviroDNA	Sim	Austrália	N/A	2011
eDNA Frontiers	Não	Austrália	Universidade de Curtin	N/A
Sinsoma	Sim	Áustria	Universidade de Innsbruck	N/A
E-biom	Não	Bélgica	Universidade de Namur	N/A
Bio Bureau Biotecnologia	Não	Brasil	Universidade Federal do Rio de Janeiro	2009
EcoMol Consultoria	Não	Brasil	Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - Universidade de São Paulo	2012
Precision Biomonitoring	Sim	Canadá	Universidade de Guelph	2016
eDNAtec	Sim	Canadá	Centre for Environmental Genomics Applications (CEGA)	N/A
Bureau Veritas Laboratories	Não	Canadá	N/A	1828
EcoHydros	Sim	Espanha	N/A	2009

Fonte: elaborada pelo autor



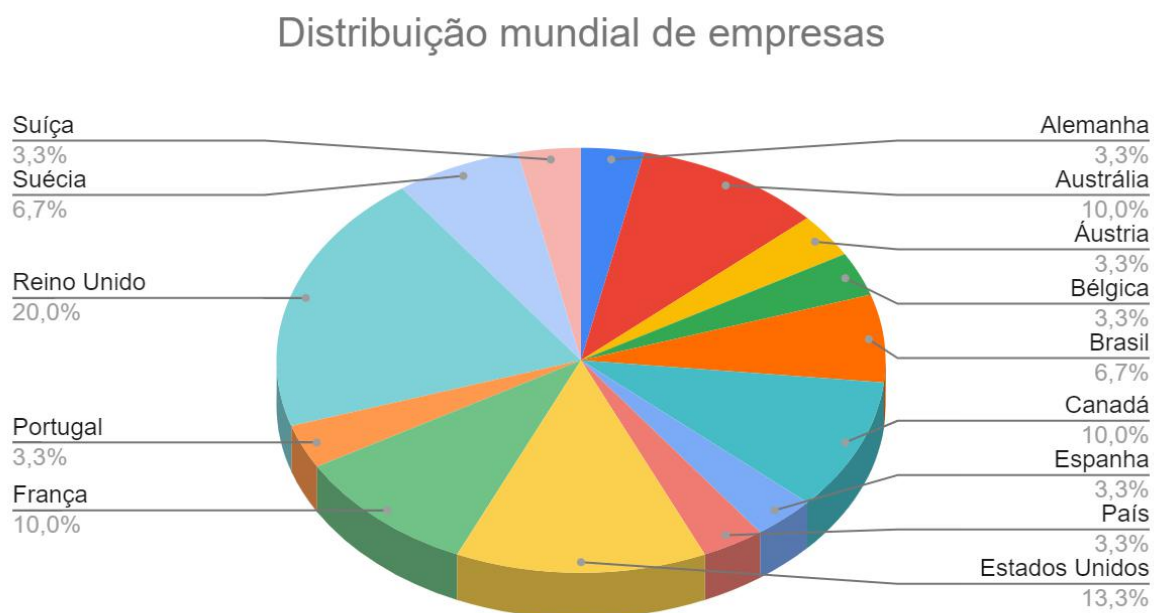
Tabela 4.1 – Empresas oferecendo serviços de eDNA

(conclusão)

Empresa	Comercializa levantamento da biodiversidade?	País	Parcerias significativas	Início de atividades
Genidaqs	Não	Estados Unidos	Cramer Fish Sciences	2009
Jonah Ventures	Não	Estados Unidos	N/A	2013
Battelle	Sim	Estados Unidos	N/A	1929
Pisces Molecular	Sim	Estados Unidos	N/A	N/A
Microbia Environment	Não	França	N/A	2013
Spygen	Sim	França	Universidade Savoie Mont Blanc	2011
Argaly	Não	França	N/A	2017
Stab Vida	Não	Portugal	N/A	2001
Adas	Não	Reino Unido	N/A	1971
Applied Genomics	Sim	Reino Unido	Brixham Environmental Laboratory	2014
Nature Metrics	Sim	Reino Unido	N/A	2014
Fera Science	Não	Reino Unido	N/A	1914
Noahgene	Sim	Reino Unido	N/A	N/A
Crestwood Environmental	Não	Reino Unido	N/A	1994
eDNA Solutions	Sim	Suécia	N/A	2016
AquaBiota	Não	Suécia	Norwegian Institute of Water Research (NIVA)	2006
ID-Gene	Sim	Suíça	Universidade de Genebra	2014

Fonte: elaborada pelo autor

FIGURA 4.1 – DISTRIBUIÇÃO MUNDIAL DE EMPRESAS TRABALHANDO COM eDNA, EM PORCENTAGEM



Fonte: o autor (2021)

Dentre as empresas que não oferecem comercialmente o serviço de inventário da biodiversidade estão as que realizam serviços de extração, sequenciamento e amplificação focado em eDNA e outras que desenvolvem e comercializam kits comerciais para amostragem e processamento de amostras no campo e no laboratório. Um terceiro caso, onde se incluem as brasileiras Bio Bureau e EcoMol, é a atuação como CROs (*Contract Research Organizations*), empresas que focam no desenvolvimento de projetos de pesquisa alinhados aos interesses dos seus clientes, moldando seus projetos à necessidade e orçamento da empresa contratante.

Algumas empresas encontradas podem chamar atenção pelo ano de início de atividades. Empresas como a Bureau Veritas, Battelle, Adas, Fera Science e Crestwood Environmental eram empresas já estabelecidas em outros ramos, que migraram ou cresceram a ponto de incluir a análise de eDNA no seu portfólio de serviços. Como exemplo interessante, a Battelle foi criada inicialmente para atuar na indústria do aço e cresceu como uma empresa de tecnologia de ponta, tendo iniciativas na indústria farmacêutica, de energia, agrícola, óleo e gás e outras.

Dentre os clientes atendidos e divulgados nos sites das empresas que oferecem o levantamento da biodiversidade como serviço existem consultorias como a AECOM e Stantec, cujo depoimento está presente no site da Precision Biomonitoring. A AECOM citada anteriormente já atua no ramo de consultoria ambiental no Brasil desde 1998, inclusive com clientes no setor de óleo e gás.

Pelo fato de muitas dessas empresas serem afiliadas ou parceiras de universidades, também é comum a presença de organizações ambientais dentre os

seus parceiros. A eDNAtec, por exemplo, realiza projetos em parceria com o Departamento de Pescaria e Oceanos (*Department of Fisheries and Oceans*) do Canadá.

## 5. Impasses regulatórios

Como mencionado anteriormente, a taxonomia morfológica tradicional é a única metodologia para identificação de espécimes embasada pela legislação brasileira, mais especificamente no Decreto nº 4.339, de 22 de agosto de 2002 que dispõe sobre a Política Nacional de Biodiversidade. Essa limitação parece se dar mais pela falta de menção a alternativas do que propriamente uma vantagem tecnológica desse método. Sendo um decreto de 2002, tecnologias de DNA como o *metabarcoding*, que podem constituir a chamada “taxonomia molecular”, ainda eram algo distante da realidade.

Na cartilha de Monitoramento *in situ* da biodiversidade (2013) do ICMBio, já são levantados problemas dessa limitação, como a necessidade de profissionais altamente especializados para classificação de espécimes ao nível de espécie (Pereira et al., 2013), levando à procura de indicadores biológicos que permitam uma classificação mais ágil, até por uma população leiga. No entanto, isso se aplica a espécies com características claramente distintas, como pássaros e mamíferos. No caso de peixes em estágio larval ou macroinvertebrados, essa abordagem perde a praticidade. O Programa Monitora do ICMBio, formalizado em 2017 pela Instrução Normativa ICMBio nº 03, continua a iniciativa de monitoramento da biodiversidade, mas ainda apresenta as mesmas limitações e abordagens para resolução.

É claro que existem instituições brasileiras interessadas em gerar conhecimento sobre a biodiversidade e promover a sua conservação. O que parece afetar a aplicação de técnicas mais modernas para esse fim é a falta de bases regulatórias para corroborar o uso de novas tecnologias, em especial a taxonomia molecular. Por outro lado, outros países já utilizam metodologias de eDNA e têm orientações publicadas para seu uso adequado, assim podem servir como modelo para uma modernização das normativas brasileiras.

Em 2016, o departamento de agricultura dos Estados Unidos (*United States Department of Agriculture*, “USDA”) publicou um protocolo de coleta de eDNA em rios (CARIM et al., 2016). O protocolo estadunidense apresenta orientações operacionais para coleta e filtração de amostras no campo, fornecendo um *checklist* detalhado de materiais que compõem o “kit de amostragem para DNA ambiental” aprovado.

No Canadá, a província de British Columbia publicou em 2017 uma segunda versão do protocolo aprovado para realizações de inventários de espécies aquáticas em ecossistemas de água doce (*BC Ministry of Environment*, 2017). Semelhante a uma instrução normativa, esse documento dá orientações para todos os aspectos que permeiam um estudo da biodiversidade por eDNA: a escolha de locais de amostragem, da época do ano mais apropriada dado o ciclo reprodutivo das espécies de interesse, ajuste do esforço amostral, utilização de triplicatas, etc. A

publicação também fornece protocolos padronizados e detalhados para coletas de tecido para *barcoding*, coleta de água em campo, filtração das amostras de água, preservação e transporte de amostras, contando com listas de equipamentos necessários, até mesmo como reportar as atividades realizadas.

Na União Europeia, em 2018 foram publicados protocolos detalhados tanto para a coleta e preservação de amostras de eDNA, quanto para sua análise (EGETER et al., 2018; PAUPÉRIO et al., 2018), sendo elaborados como entregável de um projeto de pesquisa financiado pelo programa *Horizon 2020*. Seguindo a mesma linha de ação das instruções governamentais anteriores, esta expandiu ainda mais as orientações para a coleta de diversos tipos de materiais, não só amostras de água, e apresenta protocolos alternativos a serem considerados a depender das condições ambientais. Para amostras de água, por exemplo, a instrução europeia descreve variações do método de coleta de água para fonte com maior ou menor turbidez e presença de matéria orgânica particulada (EGETER et al., 2018).

Uma normativa brasileira poderia ser elaborada a partir de um trabalho de curadoria e adaptação com base nas orientações já existentes mundialmente. Essa normativa abriria as portas para a exploração do uso de eDNA como ferramenta de apoio à elaboração de EIAs e à geração de conhecimento para órgãos como o ICMBio. O ponto de atenção necessário seria a integração dessa ferramenta à Lei nº 13.123, de 20 de maio de 2015, que dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético brasileiro, tornando obrigatório o cadastro de atividades e resultados obtidos no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen).

Por outro lado, seria possível promover um ganho quase imediato de eficiência na solicitação de autorizações para realização de estudos. A coleta e transporte de espécimes da fauna silvestre nativa, a coleta de amostras biológicas e captura de animais silvestres, dentre outras atividades para fins científicos, requer uma autorização concedida através do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (Sisbio), regulamentado pela Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014. Pela norma vigente, a análise para concessão dessa autorização pode levar até 45 dias úteis. No entanto, segundo a 4ª edição do Manual do Usuário do Sisbio (ICMBio, 2015), é descrito que coletas de água não dependem de autorização do ICMBio, apresentando uma oportunidade para a utilização do eDNA.

## **6. Limitações técnicas**

### **6.1 Estudo de populações**

Uma área de estudo onde permanecem lacunas de conhecimento do eDNA é no estudo de populações, isto é, na estimativa de abundância de espécies, biomassa e caracterização de populações.

Para medidas de abundância e biomassa, não existe ainda um fator de proporcionalidade entre o DNA capturado no ambiente e o número ou massa de

indivíduos presentes efetivamente (SHELTON et al., 2019), de forma a obter uma correlação direta ou uma curva de calibração. Sigsgaard (2017) define essa questão de forma mais quantitativa, nomeando como desafio a falta de conhecimento exato do número de indivíduos que seriam a fonte do eDNA coletado no ambiente. Já Shelton e colaboradores (2017) sugerem que se possa usar uma probabilidade de captura como esse fator de proporcionalidade, advindo de estudos mais tradicionais como o monitoramento por rede de captura. O fator comum dessas duas abordagens é a necessidade de um esforço de detecção por outros meios, uma forma de contabilizar indivíduos de interesse para fazer essa correlação.

Muitos estudos (SHELTON et al., 2019; SALES et al., 2020; MACHLER et al., 2019; CIVADE et al., 2016; PONT et al., 2018) tentam comparar a capacidade de detecção de espécies do eDNA com outras metodologias e classificam-no como bem-sucedido caso os resultados obtidos sejam semelhantes. Dependendo do interesse do grupo de pesquisa, podem ser utilizadas redes, pesca tradicional ou pesca elétrica. Shelton (2019) levanta o ponto de que essa comparação direta é irreal num estudo mais amplo, uma vez que há uma grande variabilidade do comportamento de espécies e isso pode significar que essas metodologias de referência também não retratam fielmente a distribuição dos organismos.

Outra complicação de amostragens de indivíduos se apresenta em estudos de genética de populações, dificultados pelo grande esforço amostral necessário. Isso se deve à necessidade de obter amostras de tecido para extração de DNA e estudo da frequência de haplótipos que definam uma população (SIGSAARD et al., 2017), exacerbado no caso de espécies raras, ameaçadas de extinção ou que se apresentem com baixa densidade populacional no habitat de interesse. No entanto, essa aplicação tem mais apelo científico do que prático para levantamentos da biodiversidade, onde o interesse principal é o conhecimento das espécies no ambiente.

## **6.2 Otimização amostral**

O eDNA em suspensão na água pode ser arrastado por longas distâncias, possibilitando a detecção de espécies ou populações não nativas (SIGSAARD et al., 2017). Em sistemas regionais, como redes de rios, o conhecimento do perfil hidrodinâmico da região daria informações úteis para elaborar um desenho amostral compreensivo, que possibilite realizar a regressão geográfica do ponto de detecção do eDNA até sua origem (CARRARO et al., 2020).

Outra informação importante mencionada por Carraro para a otimização de estratégias de amostragem seria a taxa de decaimento do DNA no ambiente em questão. Essa taxa pode ser afetada por fatores como temperatura, incidência de luz e pH da água (ROBSON et al., 2016, COLLINS et al., 2018) e seria utilizada para estimar a distância percorrida até que a degradação impossibilite a sua identificação. A determinação dessa taxa, no entanto, depende de experimentos específicos para cada habitat distinto e, com possíveis variações locais num sistema complexo como uma bacia hidrográfica, continuaria sendo uma estimativa, não uma constante.

Aprofundando mais o estudo da dispersão do eDNA, existem trabalhos embasando que o DNA em suspensão se comporta de forma semelhante à matéria orgânica particulada fina (WILCOX et al., 2016; HARRISON et al., 2019). Com base nessa aproximação, trabalhos como de Shogren e colaboradores (2017) exploram como acontece a dispersão do material genético na água e como isso afeta sua retenção e detecção após processos de retenção no sedimento, transporte por arrasto com a água e ressuspensão de sedimentos a jusante em condições simuladas. Dada a complexidade desses fenômenos, um ponto em comum levantado é a necessidade de avaliar o esforço amostral, sem que se chegue a uma conclusão de qual é o esforço suficiente.

## 7. Conclusões

Com as informações que foram levantadas, pode-se reconhecer que a taxonomia morfológica, amplamente empregada atualmente na elaboração de inventários da biodiversidade, apresenta deficiências que podem colocar em risco tanto possíveis empreendimentos quanto espécies locais, endêmicas e ameaçadas. Enquanto isso, a metodologia de *metabarcoding* e emprego do eDNA possibilita a diminuição de erros como falsos-negativos e a reanálise de amostras utilizando novas informações, até mesmo anos depois.

O uso de DNA ambiental também apresenta limitações. Para a identificação de uma espécie pelo seu marcador genético, esta precisa ter sido capturada, identificada por um taxonomista qualificado e a sequência de nucleotídeos desse marcador precisa ter sido depositada em um banco de dados adequadamente. Logo, a taxonomia tradicional está longe de ser extinta. Enquanto houver espécies sem marcadores descritos e espécies ainda não descobertas, a taxonomia morfológica continuará sendo necessária. No entanto, com o crescimento de bancos de dados de informações genéticas como BOLD e GenBank, essa necessidade começará a se limitar à descrição de novas espécies, deixando de lado os inventários da biodiversidade.

Outra limitação significativa do DNA ambiental é a otimização amostral. Pelo seu comportamento pouco previsível na coluna d'água, o monitoramento de espécies numa região torna-se complicado pela dispersão do DNA na água. No entanto, em inventários da biodiversidade, o interesse principal não é necessariamente identificar a origem do material genético, mas um levantamento das espécies presentes. Dessa forma, o efeito da dispersão do DNA pode ser mitigado com estratégias de amostragens adequadas, podendo variar o número de amostras para se chegar ao nível de detalhamento necessário.

Levantamentos de biodiversidade por eDNA mostraram-se um tópico importante na literatura científica, com muitas das publicações encontradas explorando diferentes aspectos e diferentes ambientes. Ao mesmo tempo, o surgimento de empresas que oferecem esse levantamento comercialmente em vários países leva a crer que há um movimento mundial direcionado à utilização dessa tecnologia.

O uso de DNA ambiental para gerar informações sobre a biodiversidade parece estar em expansão no meio acadêmico. Enquanto isso, governos ainda demoram a tomar conhecimento dessa tecnologia e os benefícios que ela pode trazer como ferramenta para gerar informações sobre a fauna e flora.

O reconhecimento da validade dessa ferramenta para EIAs no Brasil, pelas agências regulatórias brasileiras, ainda é necessário para o seu uso. Para tal, sugere-se a divulgação do conhecimento existente, utilizando a literatura científica atual e em desenvolvimento, e a utilização das normas técnicas internacionais como base para a elaboração de uma normativa brasileira. Essa comunicação com órgãos ambientais pode possibilitar a utilização do eDNA como ferramenta para inventários da biodiversidade no futuro próximo. Enquanto isso, o esforço para esse objetivo recai sobre os grupos de pesquisa e instituições que já atuam no país.

## 8. Referências

AECOM. Home Brazil. Disponível em: <<https://aecom.com/br/>>. Acesso em: 11 jun. 2021.

ALMEIDA, A. N. Problemas nos Estudos de Impacto Ambiental - EIAs conforme a percepção dos analistas ambientais do Ibama. VIII Congresso Brasileiro de Gestão Ambiental. Mato Grosso do Sul, nov. 2017.

BRASIL. Decreto nº 4.339, de 22 de agosto de 2002. Institui princípios e diretrizes para a implementação da Política Nacional da Biodiversidade. Diário Oficial da União. Seção 1. 23/08/2002. P. 2. Imprensa Nacional.

BRASIL. Decreto nº 99.274, de 6 de junho de 1990. Regulamenta a Lei nº 6.902, de 27 de abril de 1981, e a Lei nº 6.938, de 31 de agosto de 1981, que dispõem, respectivamente, sobre a criação de Estações Ecológicas e Áreas de Proteção Ambiental e sobre a Política Nacional do Meio Ambiente, e dá outras providências. Lex: Coleção de Leis do Brasil, p. 2128 v. 4, 1990.

BRASIL. Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. Diário Oficial da União. Seção 1. 09/10/2008. P. 1. Imprensa Nacional

BRASIL. Lei nº 13.123, de 20 de maio de 2015. Regulamenta o inciso II do § 1º e o § 4º do art. 225 da Constituição Federal, o Artigo 1, a alínea j do Artigo 8, a alínea c do Artigo 10, o Artigo 15 e os §§ 3º e 4º do Artigo 16 da Convenção sobre Diversidade Biológica, promulgada pelo Decreto nº 2.519, de 16 de março de 1998; dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético, sobre a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado e sobre a repartição de benefícios para conservação e uso sustentável da biodiversidade; revoga a Medida Provisória nº 2.186-16, de 23 de agosto de 2001; e dá outras providências. Diário Oficial da União. 21/05;2015. p. 1. Imprensa Nacional

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. CONAMA nº 001, de 23 de janeiro de 1986

Total Energies. Brazil: Total Exits the Foz Do Amazonas Basin, 2020. Disponível em: <<https://www.total.com/media/news/news/brazil-total-exits-foz-do-amazonas-basin>>. Acesso em: 20 abril. 2021.

BREED, M. F. et al. The potential of genomics for restoring ecosystems and biodiversity. *Nature Reviews Genetics*, v. 20, n. 10, p. 615–628, out. 2019.

British Columbia Ministry of Environment. Environmental DNA protocol for freshwater aquatic ecosystems, version 2.2. Nov. 2017. Disponível em: <<https://www.hemmera.com/wp-content/uploads/2018/08/171115-eDNA-protocol-V2.2.pdf>> . Acesso em 10 maio. 2021.

CARRARO, L.; STAUFFER, J. B.; ALTERMATT, F. How to design optimal eDNA sampling strategies for biomonitoring in river networks. *Environmental DNA*, v. 3, n. 1, p. 157–172, jan. 2021.

CANADIAN STANDARDS ASSOCIATION. Standards Research: Environmental DNA Standardization needs for fish and wildlife population assessments and Monitoring. Junho, 2019. Disponível em: <https://www.csagroup.org/wp-content/uploads/CSA-Group-Research-Environmental-DNA.pdf>. Acesso em: 15 mai. 2021

CARIM, K. J. et al. A protocol for collecting environmental DNA samples from streams. Gen. Tech. Rep. RMRS-GTR-355. Fort Collins, CO: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station. 18 p. 2016.

CAWTHORN, D.-M.; STEINMAN, H. A.; WITTHUHN, R. C. Evaluation of the 16S and 12S rRNA genes as universal markers for the identification of commercial fish species in South Africa. *Gene*, v. 491, n. 1, p. 40–48, jan. 2012.

CIVADE, R. et al. Spatial Representativeness of Environmental DNA Metabarcoding Signal for Fish Biodiversity Assessment in a Natural Freshwater System. *PLOS ONE*, v. 11, n. 6, p. e0157366, 30 jun. 2016.

COCHRANE, G. et al. The International Nucleotide Sequence Database Collaboration. *Nucleic Acids Research*, v. 44, n. D1, p. D48–D50, 4 jan. 2016.

COLLINS, R. A. et al. Persistence of environmental DNA in marine systems. *Communications Biology*, v. 1, n. 1, p. 185, dez. 2018.

DE MAHIQUES, M. M. et al. Insights on the evolution of the living Great Amazon Reef System, equatorial West Atlantic. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 13699, 23 set. 2019.



DNA Sequencing Costs: Data. Disponível em: <<https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/DNA-Sequencing-Costs-Data>>. Acesso em: 19 fev. 2021.

DONKOR, J. Ghana: Jubilee Field Oil Production Reaches 300 Million Barrels. Disponível em: <<https://allafrica.com/stories/202010080328.html>>. Acesso em: 1 jun. 2021.

eDNAtec: Our Partners. Disponível em: <<https://ednatec.com/discover/our-partners/>>. Acesso em: 11 jun. 2021.

EGETER, B. et al. Deliverable 4.3 (D4.3): Protocol for field collection and preservation of eDNA samples, EnvMetaGen project (Grant Agreement No 668981). 5 set. 2018.

HAARSMA, A.; SIEPEL, H.; GRAVENDEEL, B. Added value of metabarcoding combined with microscopy for evolutionary studies of mammals. *Zoologica Scripta*, v. 45, n. S1, p. 37–49, out. 2016.

HAASE, P. et al. First audit of macroinvertebrate samples from an EU Water Framework Directive monitoring program: human error greatly lowers precision of assessment results. *Journal of the North American Benthological Society*, v. 29, n. 4, p. 1279–1291, dez. 2010.

HARRISON, J. B.; SUNDAY, J. M.; ROGERS, S. M. Predicting the fate of eDNA in the environment and implications for studying biodiversity. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 286, n. 1915, p. 20191409, 20 nov. 2019.

HARPER, L. R. et al. Needle in a haystack? A comparison of eDNA metabarcoding and targeted qPCR for detection of the great crested newt ( *Triturus cristatus* ). *Ecology and Evolution*, v. 8, n. 12, p. 6330–6341, jun. 2018.

Ibama indefere licença ambiental para perfuração marítima na Foz do Amazonas, 2018. Disponível em: <[https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/notas/copy\\_of\\_notas/ibama-indefere-licenca-ambiental-para-perfuracao-maritima-na-foz-do-amazonas](https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/notas/copy_of_notas/ibama-indefere-licenca-ambiental-para-perfuracao-maritima-na-foz-do-amazonas)>. Acesso em: 05 maio. 2021.

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio. Sistema de autorização e informação em biodiversidade - SisBio: Manual do Usuário. 4ª Edição, ago. 2015

JACKSON, J. K. et al. Cryptic biodiversity in streams: a comparison of macroinvertebrate communities based on morphological and DNA barcode identifications. *Freshwater Science*, v. 33, n. 1, p. 312–324, mar. 2014.

KUMAR, G.; EBLE, J. E.; GAITHER, M. R. A practical guide to sample preservation and pre-PCR processing of aquatic environmental DNA. *Molecular Ecology Resources*, v. 20, n. 1, p. 29–39, jan. 2020.

LARAMIE, M. B. et al. Environmental DNA Sampling Protocol - Filtering Water to Capture DNA from Aquatic Organisms. *In: Geological Survey Techniques and Methods*, vol. 2. cap. A13, 15 p. 2015

LEINONEN, R. et al. The European Nucleotide Archive. *Nucleic Acids Research*, v. 39, n. Database, p. D28–D31, 1 jan. 2011.

MÄCHLER, E. et al. Assessing different components of diversity across a river network using eDNA. *Environmental DNA*, v. 1, n. 3, p. 290–301, set. 2019.

MASHIMA, J. et al. DNA Data Bank of Japan. *Nucleic Acids Research*, v. 45, n. D1, p. D25–D31, 4 jan. 2017.

Merck-Millipore. Dispositivo de filtração operado com bomba ou seringa, com respiro na parte superior. Sterivex. Disponível em: <[https://www.merckmillipore.com/BR/pt/product/Sterivex-GV-Pressure-Filter-Unit,MM\\_NF-SVGV010RS](https://www.merckmillipore.com/BR/pt/product/Sterivex-GV-Pressure-Filter-Unit,MM_NF-SVGV010RS)> . Acesso em 28 maio. 2021.

O Globo. Brent termina 2013 quase estável e nos EUA, petróleo avança 7% no ano. Disponível em: <<https://oglobo.globo.com/economia/brent-termina-2013-quase-estavel-nos-eua-petroleo-avanca-7-no-ano-7731119>>. Acesso em: 1 jun. 2021.

PAUPÉRIO, J. et al. Deliverable 4.4 (D4.4): Protocol for next-gen analysis of eDNA samples, EnMetaGen project (Grant Agreement No 668981). 5 set. 2018.

PEREIRA, R.C. et al. Monitoramento *in situ* da biodiversidade: Proposta para um Sistema Brasileiro de Monitoramento da Biodiversidade. Brasília/DF: ICMBio, 2013

PILLIOD, D. S. et al. Factors influencing detection of eDNA from a stream-dwelling amphibian. *Molecular Ecology Resources*, v. 14, n. 1, p. 109–116, jan. 2014.

Precision Biomonitoring Inc. Disponível em: <<https://precisionbiomonitoring.com/>>. Acesso em: 11 jun. 2021.

RATNASINGHAM, S.; HEBERT, P. D. N. Bold: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular Ecology Notes*, v. 7, n. 3, p. 355–364, 2007.

ROBSON, H. L. A. et al. Fine-tuning for the tropics: application of eDNA technology for invasive fish detection in tropical freshwater ecosystems. *Molecular Ecology Resources*, v. 16, n. 4, p. 922–932, jul. 2016.

SALES, N. G. et al. Assessing the potential of environmental DNA metabarcoding for monitoring Neotropical mammals: a case study in the Amazon and Atlantic Forest, Brazil. *Mammal Review*, v. 50, n. 3, p. 221–225, jul. 2020.

SHELTON, A. O. et al. Environmental DNA provides quantitative estimates of a threatened salmon species. *Biological Conservation*, v. 237, p. 383–391, set. 2019.

SHOGREN, A. J. et al. Controls on eDNA movement in streams: Transport, Retention, and Resuspension. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 5065, dez. 2017.

SIGSGAARD, E. E. et al. Population characteristics of a large whale shark aggregation inferred from seawater environmental DNA. *Nature Ecology & Evolution*, v. 1, n. 1, p. 0004, jan. 2017a.

STEIN, E. D. et al. Does DNA barcoding improve performance of traditional stream bioassessment metrics? *Freshwater Science*, v. 33, n. 1, p. 302–311, mar. 2014.

Valor Econômico. Nova frente de exploração de petróleo no país ameaça o litoral da Amazônia. Disponível em:

<<https://valor.globo.com/brasil/coluna/nova-frente-de-exploracao-de-petroleo-no-pais-ameaca-o-litoral-da-amazonia.ghtml>>. Acesso em: 1 jun. 2021.

Valor Econômico. Atraso na licença ambiental pode afetar resultado de leilão da ANP. Disponível em:

<<https://valor.globo.com/brasil/noticia/2017/08/01/atraso-na-licenca-ambiental-pode-afetar-resultado-de-leilao-da-anp.ghtml>>. Acesso em: 1 jun. 2021.

WATTERSTRAND, K. A. DNA Sequencing Costs: Data. Disponível em: <<https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/DNA-Sequencing-Costs-Data>>. Acesso em: 15 mar. 2021.

WILCOX, T. M. et al. Understanding environmental DNA detection probabilities: A case study using a stream-dwelling char *Salvelinus fontinalis*. *Biological Conservation*, v. 194, p. 209–216, fev. 2016.

YILMAZ, P. et al. Minimum information about a marker gene sequence (MIMARKS) and minimum information about any (x) sequence (MIxS) specifications. *Nature Biotechnology*, v. 29, n. 5, p. 415–420, maio 2011.