UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

“Avaliação da biodiversidade da ictiofauna em ecossistemas estuarinos do litoral de São Paulo utilizando DNA ambiental e RNA ambiental *metabarcoding* como biomarcadores”

NATASCHA MOZANER NITZSCHE

Botucatu - SP

Novembro 2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

“Avaliação da biodiversidade da ictiofauna em ecossistemas estuarinos do litoral de São Paulo utilizando técnica de DNA ambiental e RNA ambiental *metabarcoding* como biomarcadores”

Candidata: Natascha Mozaner Nitzsche
Orientador: Danillo Pinhal

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências de Botucatu (IBB - UNESP), para a Defesa de Mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Genética.

Botucatu - SP
Novembro 2024

N733a

Nitzsche, Natascha Mozaner
Avaliação da biodiversidade da ictiofauna em ecossistemas estuarinos do litoral de São Paulo utilizando DNA ambiental e RNA ambiental metabarcoding como biomarcadores / Natascha Mozaner Nitzsche. -- Botucatu, 2025
63 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu
Orientador: Danillo Pinhal

1. eDNA. 2. eRNA. 3. Conservação. 4. Estuários. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Dados fornecidos pelo autor(a).

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Botucatu

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Avaliação da biodiversidade da ictiofauna em ecossistemas estuarinos do litoral de São Paulo utilizando DNA ambiental e RNA ambiental metabarcoding como biomarcadores

AUTORA: NATASCHA MOZANER NITZSCHE
ORIENTADOR: DANILLO PINHAL

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciências Biológicas (Genética), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. DANILLO PINHAL (Participaçao Presencial)
Departamento de Ciencias Quimicas e Biologicas / Instituto de Biociencias de Botucatu UNESP

Profa. Dra. VANESSA PAES DA CRUZ (Participaçao Presencial)
Departamento de Biologia Estrutural e Funcional / Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP

Prof. Dr. RODRIGO RODRIGUES DOMINGUES (Participaçao Virtual)
Departamento de Ciências Biológicas e Ambientais / Universidade Estadual Paulista – UNESP, Câmpus do Litoral Paulista

Botucatu, 29 de novembro de 2024

gov.br Documento assinado digitalmente
FLAVIA DANIELI MARTINS GODINHO
Data: 04/12/2024 08:14:23-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

FLÁVIA DANIELI MARTINS GODINHO
Assistente Técnico Administrativo I da Seção Técnica de Pós-Graduação
Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP

“The mistery of life isn’t a problem to solve,
but a reality to experience.”
(Frank Hebert, Dune)

Agradecimentos:

Agradeço aos meus pais, Thomas e Cristina, que me motivam a ser bióloga desde que eu era uma criança curiosa apaixonada por bichos, por todo o apoio ao longo dessa jornada e por sempre incentivarem o conhecimento.

Aos meus queridos amigos de São Carlos, com quem cresci e me fizeram ser quem sou hoje. Os "microbios", pelas longas noites de conversas e jogos. Ao Rafinha pelos risos, desabafos e devaneios aleatórios. Agradeço as "aujuvis" por todas as noites do pijama, histórias do diário, peças de teatro memoráveis e por sempre estarem presentes. A Júlia pelo senso de humor, a Vivian por topo o apoio e a bia por tudo que ela já me ensinou.

Aos meus parceiros de laboratório, pessoas incríveis e que também tenho o prazer de chamar de amigos, Luri, Bia, Talita e Arthuro. Agradeço a Luri por compartilhar o dia-a-dia comigo, seja enchendo ponteiras no lab ou cozinhando um macarrão. Por ter sempre palavras de consolo ou uma companhia quando preciso, contando um causo ou trocando desabafos. Obrigada por me ajudar a ter lucidez em vários momentos. A Bia, por sempre ter sido minha inspiração no lab e que me acolheu antes de eu aprender a segurar uma pipeta. Gratidão por tudo que eu aprendi com você e por todas as conversas de cultura pop e conselhos sinceros. Ao Arthuro, que me acompanhou em viagens lendárias, compartilhou perrengues acadêmicos e segurou as pontas em dias que achei que iria surtar. A Talita, por todos os momentos em que tornou tudo mais leve, pelas companhias de um cafezinho da tarde e por toda a paciência comigo ao longo desses anos no laboratório.

Aos queridos Letícia e Partoba, com quem partilhei muitas histórias no icônico F14. Obrigada por dividirem lar comigo, vocês me enchem de orgulho nos caminhos que seguiram.

Ao meu namorado Garboso, pelo carinho, por ter me apoiado e acreditado em mim, por ser meu parceiro de risadas, pelas trilhas sonoras impecáveis cozinhando comidas gostosas e falando groselha. Obrigada por fazer parte da minha vida.

Aos meus queridos amigos de Botucatu que passaram por muita coisa comigo. Ao Pedro por todo o carinho, as curiosidades botânicas, as informações naruteiras e por ser um ótimo ouvinte. Ao Gabs por todos os conselhos, pela paciência e parceria. A Renata pelo senso de humor, pela sensatez e pelas jogadas sagazes de RPG.

Agradeço a todos os colegas de departamento que já me ajudaram com conselhos, reagentes ou dicas de experimentos. Ao Leo, por tudo que ele me ensinou sobre sequenciamento Illumina e por todo o suporte durante essa saga.

Agradeço ao meu orientador, Danillo Pinhal, por ter me recebido no laboratório, apoiado minhas ideias e por todo o suporte nos projetos. Por todas as aventuras em campo e por toda a orientação ao longo desses anos de LGEM.

Agradeço ao Prof. Dr. Marcos Nogueira (IBB-Unesp) e ao mestrando Esteban Nogueira (IB-USP) por colaborarem com esse projeto, pelos equipamentos e por todo o auxílio com as coletas e dados ambientais.

Agradeço ao Prof. Dr. Heron Hilário (PUC-Minas) por todo o suporte com as análises bioinformáticas e os dados de sequenciamento.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Genética, aos professores e funcionários do Departamento de Ciências Químicas e Biológicas e a CAPES pelo financiamento do meu projeto.

Obrigada a todos que contribuíram de alguma forma com o meu trabalho e com a minha formação.

“Everything I learned in my life, I learned because I decided to try something new.”

(David Lynch)

Resumo

A avaliação da distribuição e abundância das espécies é imprescindível para estudos sobre a biodiversidade e para o desenvolvimento de políticas voltadas para sua conservação, especialmente em ambientes vulneráveis como os estuários. Nesse contexto, o DNA ambiental (eDNA) e o RNA ambiental (eRNA) metabarcoding surgem como técnicas não-invasivas para o levantamento de espécies, a partir de ácidos nucleicos isolados de amostras ambientais. O presente trabalho se propõe a avaliar a aplicabilidade de eDNA e eRNA em estudos metabarcoding para o levantamento de espécies de peixes em duas regiões de estuário do litoral norte paulista, do rio Escuro (Ubatuba) e do rio Juqueriquerê (Caraguatatuba). Coletamos amostras de água a partir de um gradiente de salinidade em três porções de cada estuário nos meses de agosto de 2023 (inverno) e fevereiro de 2024 (verão), filtrando parte do conteúdo para eRNA e parte para eDNA. Para obtenção dos ácidos nucleicos, DNA e RNA, todo o material passou por etapas de extração de material genético, purificação, amplificação do gene de rRNA 12S e posteriormente encaminhados para sequenciamento Illumina. Obtivemos sucesso de sequenciamento de 18 amostras, sendo 10 do rio Juqueriquerê (eDNA) e 8 do rio Escuro (eDNA e eRNA), com a identificação total de 93 espécies considerando ambos os rios, incluindo peixes, mamíferos, anfíbios e aves. A partir dos principais parâmetros de diversidade avaliados, o rio Escuro apresentou uma maior abundância de espécies quando comparado ao rio Juqueriquerê, com informações principalmente fornecidas pelos dados de eDNA. No rio Juqueriquerê também houve a identificação de espécies invasoras como a tilápia-do-nilo e o bagre-africano. A partir de nossas análises, constatamos que o eRNA e o eDNA tem potencial de serem amplamente utilizados como ferramentas para o monitoramento de fauna, e o uso combinado de métodos, incluindo os tradicionais, diminui as limitações de cada técnica e representam de forma acurada a composição de espécies, principalmente com eRNA e sua detecção de organismos ativos, representando um retrato fiel da fauna viva em determinado espaço-tempo.

Abstract

The assessment of species distribution and abundance is essential for studies on biodiversity and for the development of policies aimed at its conservation, especially in vulnerable environments such as estuaries. In this context, environmental DNA (eDNA) and environmental RNA (eRNA) metabarcoding emerge as non-invasive techniques for species survey, from nucleic acids isolated from environmental samples. The present work aims to evaluate the applicability of eDNA and eRNA in metabarcoding studies for the survey of fish species in two estuary regions of the northern coast of São Paulo, the Escuro River (Ubatuba) and the Juqueriquerê River (Caraguatatuba). We collected water samples from a salinity gradient in three portions of each estuary in the months of August 2023 (winter) and February 2024 (summer), filtering part of the content for eRNA and part for eDNA. To obtain nucleic acids, DNA and RNA, all the material underwent genetic material extraction, purification, amplification of the 12S rRNA gene and was subsequently sent for Illumina sequencing. We successfully sequenced 18 samples, 10 from the Juqueriquerê River (eDNA) and 8 from the Escuro River (eDNA and eRNA), with the total identification of 93 species considering both rivers, including fish, mammals, amphibians and birds. Based on the main diversity parameters evaluated, the Escuro River presented a greater abundance of species when compared to the Juqueriquerê River, with information mainly provided by eDNA data. Invasive species such as Nile tilapia and African catfish were also identified in the Juqueriquerê River. From our analyses, we found that eRNA and eDNA have the potential to be widely used as tools for fauna monitoring, and the combined use of methods, including traditional ones, reduces the limitations of each technique and accurately represents the composition of species, especially with eRNA and its detection of active organisms, representing a faithful portrait of the living fauna in a given space-time.

Sumário

1. Introdução 1
1.1 Conservação da biodiversidade: os ecossistemas estuarinos 1
1.2 Os estuários no Brasil 1
1.3 A genética como ferramenta para levantamento de fauna de peixes em ecossistemas estuarinos 4
1.4 O DNA ambiental (eDNA) *metabarcoding* como estratégia de acesso à biodiversidade para a conservação 7
1.5 O recente destaque para o RNA ambiental (eRNA) e suas aplicações 10
1.6 Uso do eDNA e eRNA para análises em ecossistemas estuarinos 13
2. Objetivo geral 15
2.1 Objetivos específicos 15
3. Material e métodos 15
3.1 Área de amostragem 15
3.2 Coleta de amostras eDNA e eRNA 18
3.2.1 Coletas de inverno (agosto de 2023) 18
3.2.2 Coletas de verão (fevereiro de 2024) 21
3.3 Fluxograma metodológico 23
3.4 Filtração e preservação das amostras 24
3.4.1 Filtração de amostras de eRNA 24
3.4.2 Filtração de amostras de eDNA 25
3.5 Extração e síntese de cDNA 27
3.5.1 Extração de DNA - membranas de nitrocelulose 27
3.5.2 Extração de eDNA - filtros *Sterivex*™ 28
3.5.3 Extração de eRNA - filtros Sterivex™ 28
3.5.4 Tratamento de DNAse e síntese de cDNA 28
3.6 Amplificações por PCR 29
3.7 Sequenciamento de Nova Geração Illumina e análise de dados 31
4. Resultados e Discussão 33
4.1 Volume filtrado das amostras 33
4.2 Concentração de ácidos nucleicos 37
4.3 Amplificação do gene 12S e análise de integridade 40
4.4 Análise dos dados de Sequenciamento de Nova Geração 44
5. Conclusão 53
6. Referências 54

1. Introdução

1.1 Conservação da biodiversidade: os ecossistemas estuarinos

Os estuários brasileiros são ecossistemas costeiros de extrema relevância ecológica e econômica, funcionando como áreas de transição entre ambientes terrestres e marinhos e abrigando elevada biodiversidade. Esses ambientes servem como berçários para diversas espécies de peixes, crustáceos e moluscos, desempenhando papéis essenciais na manutenção das cadeias alimentares e nos estoques pesqueiros (Levin *et al.*, 2001; Zainal Abidin *et al.*, 2022). Estudos de levantamento de fauna em estuários são cruciais para documentar a diversidade local, identificar espécies ameaçadas e monitorar a saúde ambiental, já que esses ecossistemas estão entre os mais vulneráveis à poluição, à expansão urbana e às mudanças climáticas.

Fairbridge (1980) define e classifica um estuário como sendo "uma reentrância de mar em um vale fluvial que se estende até ao limite da propagação da maré dinâmica, sendo divisível em três setores: a) o baixo estuário, ou zona marítima, com ligação aberta com o mar; b) o estuário médio, onde ocorre mistura intensa de água doce e salgada; e c) o estuário superior ou fluviomarítimo, com água doce, mas sujeito à influência da maré dinâmica" (Fairbridge, 1980; Silva, 2000). Os estuários de forma geral funcionam como zonas de transição críticas entre a terra, o mar e os ambientes de água doce, onde gradientes de salinidade são estabelecidos ao longo de uma zona de mistura, formando *habitats* entremarés que influenciam a produtividade e biodiversidade dos locais que são diretamente afetados pela intensidade e fluxo das marés (Fairbridge, 1980; Nixon, 1988; Perillo, 1995; Lessa *et al.*, 2018). Os *habitats* entre marés podem ser ecossistemas com vegetação, como os manguezais, sapais ("*salt marshes*"), tapetes de algas ("*seagrass beds"*), ou ecossistemas sem vegetação, como os lodaçais ("*mudflats*") e as praias arenosas, podendo abranger várias formas de relevo, desde baías costeiras, entradas de lagoas ou canais distributivos em um delta de rio (Nixon, 1988; Levin *et al.*, 2001, Lessa *et al*., 2018).

1.2 Os estuários no Brasil

No Brasil, a grande maioria dos rios mais importantes ao longo da costa brasileira desaguam no mar, criando grandes regiões de estuário. O país possui cerca de 41 grandes estuários (com mais de 40km²) e diversos estuários menores, distribuídos de norte a sul do país

e com diversidade de condições climáticas, geológicas, biológicas e oceanográficas (Dillenburg and Hesp, 2009; Lessa *et al.*, 2018). Muitos deles são associados a manguezais, ecossistemas caracterizados principalmente pela grande variabilidade na salinidade e instabilidade de fatores ambientais como maré e clima, que desempenham funções ecológicas essenciais ao proteger e fornecer estabilidade para a costa, funcionar como berçário para muitas espécies, melhorar a qualidade de água, fornecer recursos pesqueiros e servir de *habitat* e alimento para animais migratórios e residentes (Levin *et al.*, 2001; Zainal Abidin *et al.*, 2022). As variadas e extremas condições abióticas desses ambientes levam a diferentes respostas comportamentais e fisiológicas de cada espécie aquática que habita as zonas estuarinas, impactando na distribuição, abundância e composições de peixes (Akin *et al.*, 2005; Barletta *et al.*, 2008; Contente, Stefanoni and Spach, 2011). Os estuários representam um alto valor econômico e social, com muitas comunidades apresentando uma dependência tradicional desses ambientes para sua subsistência, considerando que boa parte da produção de alimento marinho está direta ou indiretamente relacionada aos estuários por meio das redes de interações ecológicas (Souza *et al.*, 2018; Vasconcelos Filho, Maia *and* Salles, 2019).

No litoral do estado de São Paulo, os sistemas estuarinos e seus arredores incluem várias áreas legalmente protegidas e é onde estão os maiores remanescentes de Mata Atlântica no Brasil (Galindo-Leal, de Gusmão Cãmara and Sayre, 2003). A Reserva da Biosfera da Mata Atlântica é considerada Patrimônio Nacional pela Constituição Federal (art. 255) e um bioma ameaçado de extinção, incluindo pela degradação de córregos e rios naturais, o que afeta muitas espécies de peixes de água doce e ambientes estuarinos (Barrella *et al.*, 2014). Também está entre as regiões do planeta de maior prioridade para a conservação da biodiversidade, sendo um dos "hotspots", com grande riqueza de espécies, muitas endêmicas e ameaçadas (Galindo-Leal, de Gusmão Cãmara and Sayre, 2003). A Serra do Mar, no litoral norte do estado, é praticamente toda coberto por Mata Atlântica, embora a ocupação humana tenha degradado 90% de sua área (Malabarba, 2006; Joly *et al.*, 2010). O estado abriga cerca de 393 espécies de peixes de água doce e 594 espécies de peixes marinhos (Galindo-Leal, de Gusmão Cãmara and Sayre, 2003; Oyakawa and Menezes, 2011); mas ainda assim, há lacunas de levantamento de espécies em áreas pouco exploradas, como muitas regiões do litoral de costões e fundos rochosos. Além disso, há uma constante necessidade do monitoramento da diversidade e abundância de espécies, que podem sofrer mudanças por fatores como a introdução de espécies exóticas, modificações no ambiente e outros impactos antropogênicos, principalmente na Mata Atlântica,

considerando a alta taxa de especiação e o alto grau de endemismo das comunidades de peixes, que as torna ainda mais vulneráveis (Menezes, 2011; Gonçalves *et al.*, 2017).

O Brasil possui um sistema complexo de gestão de meio ambiente, com instituições responsáveis pelas normas legais em diferentes esferas que monitoram o uso dos recursos naturais no país, com aparatos legais criados diante de diferentes necessidades e prioridades nos diversos ambientes políticos, sociais e econômicos (Borges, De Rezende and Pereira, 2009; Sánchez, 2013; Fernandes, 2017). Isso reflete a criação de diversos programas e planos, e.g.: Plano de Ação para Implementação da Política Nacional da Biodiversidade (PAN-Bio) e Plano Estratégico Nacional de Áreas Protegidas (MMA, 2006; Aguiar, Amaro *and* Araújo, 2018). Além disso, desde 1996, o Brasil participa do tratado da Convenção de RAMSAR, uma cooperação entre países com o objetivo de promover a conservação e o uso racional de áreas úmidas no mundo, sendo os estuários considerados áreas úmidas costeiras de importância internacional (MMA, 2006; Aguiar, Amaro *and* Araújo, 2018). No país, destaca-se também o Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira (SiBBr), segmento brasileiro vinculado ao *Global Biodiversity Facility (GBIF),* desenvolvido para integrar e disseminar dados de biodiversidade coletados por diversas instituições do Brasil (Gadelha *et al.*, 2014). Recentemente, no fim de 2022, foi desenvolvido a partir do Projeto Conexão Mata Atlântica, que integra diversos órgãos públicos e privados para o monitoramento e conservação da Mata Atlântica, um levantamento intensivo de dados obtidos a partir de DNA ambiental *metabarcoding* de solo e água, de diversas localidades da região sudeste do Brasil, com mais de 180 localidades nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais, totalizando mais de 1000 extrações de eDNA para caracterização da riqueza de espécies em uma abordagem (sibbr.gov.br).

Embora a legislação ambiental brasileira seja considerada uma das mais avançadas do mundo, a implementação de algumas políticas específicas e a fiscalização ainda é motivo de controvérsias (Silveira *et al.*, 2010). Os autores alertam que a maioria dos projetos de espacialização de Área de Preservação Permanente (APP) priorizam espaços de interesse como sistemas fluviais de bacias hidrográficas, nascentes e áreas de encostas, e são encontrados em menor quantidade trabalhos que visam delimitar as áreas de preservação permanente nas zonas costeiras, com menor produção ainda de trabalhos voltados para os ambientes estuarinos. Além disso, de acordo com o painel de gestão atualizado em 2021, 69% das ações do PAN Manguezais, focados na proteção desse ecossistema em estuários, encontram-se inconcluídas,

sendo 45% iniciadas e não concluídas no período previsto e 24% não iniciadas ou não concluídas (ICMBIO, 2015).

Desde 1980, a ocupação das zonas costeiras aumentou drasticamente como resultado de planos do governo brasileiro para o desenvolvimento do turismo costeiro, que estimulou a construção de rodovias para que proporcionassem fácil acesso à região litorânea (Leão and Dominguez, 2000). O aumento do estresse provocado pela alta ocupação populacional contribui para o processo de degradação e desflorestação dos ambientes de manguezal, como o desvio de fluxos de água doce, a ameaça à qualidade da água causada por poluentes e nutrientes, bem como a conversão em atividades de desenvolvimento como agricultura, turismo, aquicultura (principalmente carcinicultura e coleta de mariscos), extração de sal e infraestruturas (Leão and Dominguez, 2000; Magris and Barreto, 2010).

Muitos estuários são impactados por insumos antropogênicos substanciais de nutrientes, que refletem diretamente na ocupação do ambiente pelos organismos da região ao estimular a produção de fitoplâncton, a disponibilidade de nutrientes e ter efeitos de fluxo nos processos biogeoquímicos e nas cadeias alimentares (Lotze *et al.*, 2006; Burford *et al.*, 2008; Bernardino *et al.*, 2019). Os estuários e zonas costeiras sempre tiveram destaque na história como pontos focais de assentamento humano e de intenso uso de recursos marinhos, principalmente por proporcionarem zonas de abrigo à navegação, favorecendo a criação de zonas portuárias. A transformação de habitat e a poluição ao longo do tempo provocaram degradação estuarina e perda de biodiversidade, muitas vezes suprimindo a resiliência ecológica de uma região (Jackson *et al.*, 2001; Lotze *et al.*, 2005).

1.3 A genética como ferramenta para levantamento de fauna de peixes em ecossistemas estuarinos

A avaliação da distribuição e abundância das espécies é imprescindível para os estudos sobre a biodiversidade e para o desenvolvimento de políticas voltadas para sua conservação (Ficetola *et al.*, 2008). O monitoramento frequente de espécies a partir dos levantamentos ou inventários faunísticos permite avaliar impactos negativos importantes à biodiversidade, os quais, em sua absoluta maioria, são decorrentes de atividades antrópicas. A própria introdução de espécies invasoras, que por vezes leva à extinção de espécies nativas e constitui-se em uma das principais ameaças à biodiversidade e ao funcionamento do ecossistema (Rahel, 2002; Alcaraz *et al.*, 2005), poderia ser mitigada pelo monitoramento da fauna de forma sistematizada.

Recentemente, destacam-se discussões sobre metas e caminhos para a conservação e o uso sustentável da biodiversidade, como a nova abordagem sendo negociada no âmbito da Convenção das Nações Unidas sobre Diversidade Biológica (CDB), denominada de "nova estrutura de biodiversidade global pós-2020". Essa estrutura define direcionamentos para a próxima década e faz parte do plano de conservação mais amplamente endossado, já desenvolvido e adotado pelos governos (Rogalla von Bieberstein *et al.*, 2019; Budd *et al.*, 2023).

Dentre as seções descritas no documento, destaca-se a atual preocupação de implementar a informação genética como ferramenta para a conservação biológica. Preservar a diversidade genética é considerada uma meta prioritária para assegurar ações de gestão urgentes capazes de deter a extinção induzida por ações antrópicas. Medidas visando a recuperação e conservação de espécies, em particular espécies ameaçadas, poderiam se beneficiar da implementação do uso da informação genética de forma rotineira na tomada de decisões. Ademais, o uso das ferramentas genéticas para identificação molecular demonstra uma alta capacidade de contribuir para a conservação de espécies *in situ* e *ex situ,* sendo amplamente utilizadas no Brasil para o monitoramento de fauna (Camacho-Oliveira *et al.*, 2020; Falkowski, 2020)

Estas poderiam, assim, fomentar a manutenção e/ou restauração da diversidade genética dentro e entre populações tanto de espécies nativas, quanto de espécies selvagens e domesticadas, de modo a manter seu potencial adaptativo (Secretariat of the CDB, 2022). Além disso, tanto os planos anteriores quanto os emergentes da CDB, ressaltam explicitamente metas relacionadas ao aumento de áreas protegidas e outras medidas eficazes de conservação baseadas em áreas, denominadas OECMs (*Other effective area-based conservation measures* ou outras medidas de conservação baseadas em área). Isso demonstra que gradativamente há um apelo cada vez maior para a conservação de áreas e ecossistemas, e crescente alerta quanto à necessidade de ampliação do monitoramento da biodiversidade, incluindo a implementação de coleta de dados mais abrangente acerca da biodiversidade espacial e temporal (Oliveira and Irving, 2011; Maxwell *et al.*, 2020).

Sustentar ecossistemas saudáveis requer o monitoramento frequente de componentes bióticos e abióticos como um todo para detectar degradação ambiental ou perda de diversidade ao longo de mudanças temporais. Este aspecto é considerado uma prioridade, particularmente em ecossistemas estuarinos (Pikitch *et al.*, 2014; Long *et al.*, 2017; DiBattista *et al.*, 2020).

Considerando essa prioridade, os ainda relativamente escassos recursos financeiros disponíveis para pesquisa em ecossistemas estuarinos devem ser otimizados, especialmente em países em desenvolvimento considerados megadiversos, como o caso do Brasil, priorizando-se o investimento em programas que combinem pesquisa em biodiversidade, capacitação de pessoal e impacto em políticas públicas (Joly *et al.*, 2010; Oliveira and Irving, 2011; Maxwell *et al.*, 2020).

Diferentes métodos de levantamento de fauna são empregados para caracterização da composição faunística de um local. Frequentemente em ambientes aquáticos, métodos de captura como a pesca com anzol, redes de arrasto, tarrafa ou armadilhas (e.g covos, manzuás e potes) são implementados para coleta dos indivíduos e caracterização da fauna local (Priede and Merrett, 1996). Tais métodos podem também ser associados com outras técnicas complementares para enriquecimento de dados, como as câmeras-*trap* com isca utilizadas principalmente em espécies de peixes de águas profundas, embora sejam limitadas como indicadoras de abundância (Priede and Merrett, 1996; Contente and Rossi-Wongtschowski, 2018).

Para a identificação das espécies em um levantamento, comumente a partir da sistemática clássica, utiliza-se a identificação morfológica, o que pode ser um obstáculo no caso de espécies crípticas, espécies com diferenças morfológicas em determinadas fases de vida, ou no caso da presença de variações fenotípicas intraespecíficas a partir de influências ambientais, podendo levar a um erro de identificação precisa (Tresbach *et al.*, 2015; Almerón-Souza *et al.*, 2018). No caso de peixes, a identificação morfológica pode ser um desafio em se tratando de ovos, alevinos e até adultos, e a correta identificação é importante para a tomada de ações conservacionistas. Igualmente, inventários da fauna são também de grande interesse econômico para a identificação de fraude alimentar e autenticação de produtos no comércio de frutos-do-mar (Holmes, Steinke and Ward, 2009; Tresbach *et al.*, 2015; Velasco *et al.*, 2021).

Nesse cenário, métodos de identificação molecular vem sendo cada vez mais aprimorados para fornecer uma boa margem de confiança ao viabilizar procedimentos com o uso de quantidades diminutas de material biológico (Barreto *et al.*, 2017; Hobbs *et al.*, 2019). Essencialmente, as pesquisas têm se valido da alta sensibilidade e eficiência crescente das técnicas moleculares para a discriminação de espécies a partir da análise de regiões do DNA nuclear e mitocondrial ou na associação de ambas (Pank *et al.*, 2001; Abercrombie *et al.*, 2005;

Pinhal *et al.*, 2008, 2012; Feitosa *et al.*, 2018), e mais recentemente pela análise do RNA (Miyata *et al.*, 2021; Veilleux, Misutka and Glover, 2021; Yates, Derry and Cristescu, 2021).

1.4 O DNA ambiental (eDNA) *metabarcoding* como estratégia de acesso à biodiversidade para a conservação

Seja por identificação molecular ou morfológica, uma problemática comumente enfrentada durante os levantamentos de fauna, é a necessidade de amostragem do animal ou de partes dele, incluindo tecidos (geralmente difíceis de obter ou obtidos de forma invasiva), requerendo a captura do organismo. Enquanto usualmente no ambiente terrestre as técnicas de levantamento podem recorrer com maior frequência aos métodos não invasivos, como registros de bioacústica, registros fotográficos (câmeras-*trap*) ou por métodos indiretos, como a busca por vestígios, as técnicas de levantamento de ictiofauna em ambiente marinho se dão principalmente por métodos de captura de organismos (Radinger *et al.*, 2019; Prosekov *et al.*, 2020). Além disso, muitos trabalhos de levantamento se concentram apenas na análise de uma única espécie ou grupo (Kelly *et al.*,2014; Miyata *et al.*, 2021). Nesse contexto, a análise do DNA ambiental (eDNA) surge como uma técnica que se propõe a contornar esses entraves, sendo um marcador indireto para o monitoramento da biodiversidade, com potencial de fornecer informações relevantes sobre determinado ecossistema sem a necessidade de captura de espécimes.

O termo eDNA refere-se ao material genético (DNA genômico) de diversos organismos presentes em uma amostra ambiental, sendo proveniente de células microbianas inteiras ou de organismos multicelulares por meio de resíduos metabólicos, tecidos danificados ou células da pele descamadas que são liberados no ambiente (Kelly *et al.*, 2014). Sendo assim, o eDNA genômico é proveniente de fontes tanto intracelulares, incluindo células vivas e organismos multicelulares vivos, quanto extracelulares, resultantes da morte celular com subsequente destruição de estruturas celulares que podem ser degradadas através de processos físicos, químicos ou biológicos (Taberlet *et al.*, 2018). A partir de amostras ambientais de solo, sedimentos, água, fezes ou materiais resultantes da filtragem do ar, da água ou de sedimentos, é possível isolar eDNA com o objetivo de obter informações taxonômicas valiosas para um determinado ecossistema (Taberlet *et al.*, 2018).

Especialmente em ambiente costeiro marinho, técnicas de não-captura para inventário da biodiversidade como a análise do eDNA se tornam particularmente úteis para grandes massas de água onde as técnicas de captura são muitas vezes difíceis de aplicar ou são ineficientes

(Radinger *et al*., 2019). O eDNA começou a ser estudado a partir da década de 90, com um estudo pioneiro anos antes em 1987 relatando um protocolo de extração para eDNA encontrado em sedimentos (Ogram *et al.*, 1987). A partir de amostras coletadas em fundos de pântano e de águas salobras da Flórida (EUA), Ogram e colaboradores desenvolveram um novo método para o isolamento de DNA intracelular e extracelular a partir de diversos tipos de sedimentos. Poucos anos depois, Giovannoni e colaboradores analisaram a diversidade do gene 16S rRNA em amostras de bacterioplâncton no mar dos Sargaços do Atlântico Norte, utilizando pela primeira vez a PCR associada ao eDNA para uma técnica *metabarcoding*, caracterizando a estrutura de uma comunidade de bacterioplânctons. O estudo destaca a importância desta ferramenta para avaliações de diversidade genética e identificação de espécies que constituem uma comunidade (Giovannoni *et al.*, 1990). Na época, os trabalhos se baseavam na clonagem por vetores para isolar fragmentos únicos de DNA antes da etapa de sequenciamento Sanger, em um procedimento custoso e demorado (Taberlet *et al.*, 2018).

Posteriormente, no início dos anos 2000, ganha destaque o DNA *metabarcoding*, que consiste no uso combinado de códigos de barra universais de DNA nuclear ou mitocondrial (DNA *barcode*) e sequenciamento em larga escala (Ambardar *et al.*, 2016; Ruppert, Kline and Rahman, 2019; Adamo *et al.*, 2020; Othman *et al.*, 2023) para identificar e classificar organismos, permitindo a análise simultânea de múltiplas sequências e produzindo grandes quantidades de dados sobre a biodiversidade, em menos tempo, com bom custo-benefício (Coissac, Riaz and Puillandre, 2012). Diversas plataformas se consolidaram no mercado, como *Ion Torrent*, *Illumina* e *Roche*, e tornaram o *metabarcoding* a partir de NGS uma abordagem padrão para caracterização de comunidades de ácidos nucleicos extraídos diretamente das amostras ambientais, sendo amplamente utilizado para avaliar a biodiversidade e como ela é impactada por distúrbios antropogênicos e outros fatores ambientais (Ruppert, Kline and Rahman, 2019).Em 2003, foi publicado o primeiro artigo de *metabarcoding* de eDNA com foco em macroorganismos, onde os autores demonstraram a possibilidade de recuperar o DNA de animais da megafauna (mamute, bisão, cavalo) e de plantas antigas do *permafrost* a partir de sedimentos de cavernas (Willerslev *et al.*, 2003).

As abordagens *metabarcoding* com eDNA, no entanto, enfrentam também alguns desafios e obstáculos. Sendo um DNA presente no ambiente proveniente de um número desconhecido de indivíduos e espécies, a distinção entre organismos individuais e a estimativa de parâmetros genéticos populacionais clássicos pode ser comprometida pela amostragem, banco de dados, e outros fatores de viés amostral (Mulero *et al.*, 2021). Ferramentas padrão

para gerar dados genéticos populacionais com alta sensibilidade e especificidade necessárias para isolar marcadores de espécies únicas de uma mistura complexa de vários táxons pode ser um desafio, não só para selecionar determinados grupos alvos de um grande número de organismos, como para encontrar sequências de referência descritas nos bancos de dados que reflitam a biodiversidade de um determinado local (Barnes and Turner, 2016).

A confiabilidade e a resolução das inferências de pesquisas de eDNA também dependem da capacidade de detectar a presença de uma espécie ou de fornecer uma representação precisa de uma comunidade em um ponto específico no tempo. Fatores de confusão tais como a duração das moléculas de eDNA no ambiente, a densidade de organismos (que caso seja baixa pode não ser detectado), ou o transporte de material genético proveniente de outra área conectada (detecção de um falso positivo), podem gerar viéses de amostragem e comprometer uma análise precisa (Collins *et al.*, 2018; Seymour *et al.*, 2018). A comparação da sequência de um organismo não identificado com sequências conhecidas é limitada ao conteúdo disponível nos bancos de dados. Assim, o uso do DNA barcoding é promissor para a identificação de organismos em clados taxonomicamente bem compreendidos e amplamente amostrados.

No entanto, as abordagens de eDNA enfrentam taxas de erro consideráveis na delimitação de espécies intimamente relacionadas em grupos pouco estudados taxonomicamente (Meyer e Paulay, 2005). Um banco de dados de referência e biomarcadores específicos são fatores importantes para avaliações de biodiversidade baseadas em DNA em escala de ecorregião (como eDNA), e podem se tornar um fator limitante em se tratando de uma ictiofauna neotropical megadiversa de países como o Brasil (Milan *et al.*, 2020).

Ainda assim, uma das características mais admiráveis do eDNA é seu potencial como uma ferramenta rápida e, em muitos casos, econômica para a área da conservação, seja em abordagens de detecção de uma única espécie ou múltiplos táxons. A identificação de espécies únicas pode ser utilizada para a detecção precoce de espécies invasoras e o monitoramento de espécies raras/difíceis de detectar, seja em qualquer estágio da vida, estação, e por meio da amostragem de diversos tipos de substratos (Jerde *et al.*, 2011; Dejean *et al.*, 2012; Mahon *et al.*, 2013; Bohmann *et al.*, 2014).

Nesse contexto, o eDNA possui grande potencial de fornecer uma estimativa mais veloz e completa da diversidade de um ecossistema aquático por meio de uma detecção altamente eficiente em comparação a outros métodos tradicionais (Seymour *et al.*, 2021). Considerando as espécies de difícil detecção, principalmente durante determinados períodos de tempo ou

estágios de desenvolvimento, cada vez mais as técnicas de detecção de material genético a partir do ambiente se tornam uma prioridade (Ficetola *et al.*, 2008). No caso de espécies ameaçadas de extinção, o uso de métodos não invasivos de detecção de ocorrência pode ser priorizado visando minimizar a interferência antrópica.

Considerando que a gestão de estoques genéticos, seja voltada à conservação ou ao manejo sustentável das populações de peixes e outros recursos aquáticos, cada vez mais transita de uma abordagem focada em espécies individuais para uma abordagem ecossistêmica, a amplitude proporcionada pelo uso do eDNA *metabarcoding* se sobressai, e as análises da macrofauna e meiofauna de ambientes aquáticos a partir das análises de água têm ganhado destaque ao longo do tempo (Evans *et al.*, 2016; Shaw *et al.*, 2016; Valentini *et al.*, 2016; Collins *et al.*, 2019; Miya, Gotoh and Sado, 2020; Miya, 2022).

Especialmente no Brasil, os estudos com eDNA *metabarcoding* avançaram em diferentes regiões do país nos últimos anos. Em áreas de floresta amazônica, Bredin et al. (2022), estimaram a diversidade de procariotos e eucariotos a partir de amostras de solo em um gradiente de inundação na Amazônia, utilizando sequências dos genes 16S e 18S. A amostragem considerou as regiões florestais que são periodicamente inundadas por rios transbordantes, o que impacta diretamente a biota a partir das variações ambientais provocadas pelas inundações, destacando o potencial de eDNA em avaliar a biota sob diferentes condições ambientais (Bredin et al., 2022). Sales et al. (2020), também atuaram em regiões de alta biodiversidade, a Amazônia e a Mata Atlântica, detectando a comunidade de mamíferos de ambos os locais a partir de amostras de água e solo, utilizando o gene mitocondrial 12S (Sales et al., 2020). Em áreas costeiras, visando o biomonitoramento marinho, Lines et al. (2023), investigaram o potencial de eDNA no monitoramento de longo prazo de vertebrados marinhos, selecionando áreas de amostragem ao redor das fozes de oito sistemas fluviais na costa sudeste do país, impactadas pela falha da barragem de Mariana em 2015 e o despejo de rejeitos. A partir dos genes mitocondriais 16S rRNA e COI, foram detectados peixes e mamíferos marinhos, destacando também a importância da coleta de amostras ambientais para melhor compreensão dos impactos de atividades antropogênicas (Lines et al., 2023).

1.5 O recente destaque para o RNA ambiental (eRNA) e suas aplicações

Mais recentemente, a comunidade acadêmica discute o possível uso e potencial do RNA ambiental (eRNA). Em análises iniciais visando obter RNA do ambiente com pureza e livre de contaminação, Burgmann e colaboradores desenvolveram um método molecular que permitiu

a análise da expressão do mRNA do gene marcador nifH, utilizado para a identificação de bactérias do solo fixadoras de nitrogênio. Com o trabalho, foi possível criar um protocolo para extração de RNA de amostras de solo, que se mostrou uma ferramenta eficiente para estudar a regulação específica da expressão gênica diretamente no ambiente do solo (Bürgmann *et al.*, 2003). Posteriormente, outros trabalhos se desenvolveram em estudos da ecologia microbiana, avaliando diferentes estruturas de RNA (*riboswitches, sRNAs, etc)* em solo, água e outros ambientes (Wellington, Berry and Krsek, 2003; Kazanov, Vitreschak and Gelfand, 2007; Shi, Tyson and Delong, 2009).

Apesar dos avanços, o uso de eRNA, especialmente para a identificação de espécies, ainda é recente e permanece pouco explorado, e alguns estudos permanecem cautelosos devido às observações prévias que indicam o RNA *in vitro* como menos estável que o DNA. No entanto, estudos recentes com invertebrados marinhos demonstraram a capacidade de se detectar eRNA em amostras de água até 13 horas após coleta, enquanto o eDNA persistiu por até 94 horas, um período superior como esperado (Wood *et al.*, 2020). Outros estudos avançaram no uso do eRNA e verificaram que este pode ser detectado a partir de diferentes tipos de RNA no ambiente, como demonstrado pela análise de miRNAs (Ikert *et al.*, 2021), RNA ribossômico (Marshall, Vanderploeg and Chaganti, 2021; Miyata *et al.*, 2021) e RNAs mensageiros (Wood *et al.*, 2020; Marshall, Vanderploeg and Chaganti, 2021; Tsuri *et al.*, 2021).

Em relação aos macroorganismos, ainda são poucos os estudos com eRNA e os mecanismos de produção, persistência e transporte permanecem pouco esclarecidos, havendo, portanto, uma lacuna no conhecimento a ser explorada. Estudos foram desenvolvidos previamente para análise de taxas de decaimento e persistência do eRNA em comparação a eDNA, utilizando poliquetas e mexilhões de água doce (Wood *et al.*, 2020; Marshall, Vanderploeg and Chaganti, 2021). Notadamente, Wood e colaboradores observaram que o RNA ambiental persistiu por mais tempo no ambiente após a remoção do organismo do que o esperado e as constantes das taxas de decaimento para eDNA e eRNA não apresentaram diferença significativa, apontando para um futuro promissor do eRNA em pesquisas de biodiversidade. Igualmente, Marshal e colaboradores demonstraram que, assim como o eDNA, as taxas de eliminação e degradação de eRNA apresentam uma associação positiva com a abundância ou biomassa do organismo, e que de forma geral os genes nucleares (rRNA 18S) apresentaram um decaimento mais acelerado do que genes mitocondriais (16S e COI), sugerindo uma estabilidade maior do material genômico mitocôndrial frente ao nuclear (Marshall, Vanderploeg and Chaganti, 2021). Por sua vez, Laroche e colaboradores utilizaram

a combinação eDNA/eRNA *metabarcoding* para avaliar alterações em comunidades bentônicas de bactérias, foraminíferos e outros eucariotos (invertebrados marinhos) a partir de amostras de sedimento em locais de perfuração e produção de petróleo e gás. A comparação entre a detecção de táxons por localidade permitiu mensurar os impactos provocados pelas estações de petróleo, visto que táxons específicos as condições dos locais, como bactérias degradadoras de hidrocarbonetos foram detectados próximos a estações petrolíferas (Laroche *et al.*, 2018).

Outros estudos *metabarcoding* comparativos entre eDNA e eRNA foram conduzidos em algas, artrópodes e peixes a partir de amostras de água de rios do Japão, demonstrando seu potencial para o biomonitoramento e avaliação da qualidade da água (Miyata *et al.*, 2021, 2022).

Cabe destacar que diversos fatores ainda não totalmente elucidados podem ser importantes para determinar a abundância, persistência e detectabilidade do eRNA, incluindo a estrutura molecular, mecanismo de transporte (livre, protegido por associação com células ou outras partículas, transportado por vesículas extracelulares ou proteínas de capsídeo), interações com o ambiente (e.g.: pH, temperatura, salinidade) e a atividade microbiana e enzimática envolvida na decomposição e degradação das moléculas de eRNA (Cristescu, 2019; Jo *et al.*, 2022).

Uma limitação comumente enfrentada pelos estudos que utilizam a análise de eDNA, e que se busca solucionar com a implementação do eRNA, é a incidência de falsos positivos em análises de comunidade (espécie alvo está presente, mas seu DNA não é registrado) e falsos negativos (espécie alvo está ausente mas seu DNA é registrado) (Cristescu and Hebert, 2018; Miyata *et al.*, 2021). No caso, um resultado positivo pode não significar necessariamente que a espécie esteja presente no ambiente, visto que o eDNA pode ter sido transportado de um local a outro, preservado após a morte de um animal ou pelo movimento de eDNA de sedimentos mais profundos para camadas superficiais de sedimentos ou coluna d'água (Roussel *et al.*, 2015; Cristescu, 2019). Nesse contexto, o eRNA apresenta uma vantagem, considerando que o RNA se degrada mais rapidamente após a morte celular, diminuindo as chances de transporte e consequentemente de falsos positivos (Marshall *et al.*, 2021). A partir de tais limitações do DNA, Miyata e colaboradores demonstraram que análises *metabarcoding* utilizando eRNA tem potencial de serem mais precisas que eDNA em alguns contextos. Embora a sensibilidade do eRNA tenha sido equivalente à do eDNA, sua preditividade positiva foi superior à do eDNA. Além disso, apenas o eRNA permitiu distinguir os peixes de água salgada ou salobra, com

resultado falso positivo em um corpo de água doce, possivelmente por contaminação de águas residuais domésticas contendo cadáveres, partes do corpo ou fezes de aves (Miyata *et al.*, 2021). No caso, uma molécula como o RNA com uma rotatividade mais rápida, poderia resolver alguns problemas inerentes aos estudos de *metabarcoding* utilizando DNA, uma vez que marcadores baseados em eRNA podem ser melhores indicadores de conjuntos bióticos vivos que estão intimamente associados ao local de amostragem (Cristescu, 2019).

Como exemplo, Brandt et al. (2020), em ambiente marinho de profundidade, utilizaram análise do eRNA *metabarcoding* e não somente recuperaram padrões espaciais semelhantes aos do eDNA coextraído, como também obtiveram estimativas de riqueza de espécies significativamente mais altas (Brandt *et al.*, 2020). Outras pesquisas recentes suportam o eRNA como ferramenta de análise *metabarcoding* em água salgada. Greco et al. (2022) descreveram o uso de eDNA e eRNA na avaliação do impacto de poluição marinha a partir de análises comparativas na diversidade de foraminíferos que revelaram que o *metabarcoding* baseado em eRNA pode avaliar melhor a resposta à exposição a metais pesados na presença de concentrações sutis do poluente. Além disso, os resultados sugerem que, para liberar todo o potencial de avaliação de ecossistemas, eDNA e eRNA devem ser estudados em paralelo nos levantamentos rotineiros de ecossistemas, e avaliadas as taxas de degradação de ambos os biomarcadores, mitigando assim potenciais falsos positivos (Marshall, Vanderploeg and Chaganti, 2021).

1.6 Uso do eDNA e eRNA para análises em ecossistemas estuarinos

Estudos recentes já foram realizados em ambientes estuarinos utilizando eDNA, como por exemplo, para o monitoramento biológico de ecossistemas aquáticos, ou para evidenciar impactos antrópicos por poluentes diversos, a partir de análises de água, solo ou sedimentos (Turner, Uy and Everhart, 2015; Stoeckle, Soboleva and Charlop-Powers, 2017; Bernardino *et al.*, 2019; Polanco F. *et al.*, 2021; Zainal Abidin *et al.*, 2022). Os estuários representam um desafio para os estudos com eDNA por possuírem uma hidrologia variada cuja dinâmica das marés pode levar a uma turbidez elevada e variável, com mais frequência do que ambientes marinhos e doces, e dificultar a filtragem de grandes volumes de água pela obstrução por partículas ou mesmo inibir a obtenção de *amplicons* por PCR (Matheson *et al.*, 2010; Nagarajan *et al.*, 2022). No entanto, o problema pode ser contornado na medida em que filtros de poros maiores podem ser utilizados e diferentes volumes de água filtrados (Mächler *et al.*, 2016).

Além disso, é possível o uso de *kits* de extração que incluem remoção de inibidores pré- ou pós-extração (Nagarajan *et al.*, 2022).

O primeiro estudo com a análise eRNA *metabarcoding* em estuários foi desenvolvido recentemente por Giroux e colaboradores em 2022, demonstrando que avaliar o eRNA é uma estratégia eficiente e vantajosa em estudos voltados à análise da biodiversidade de uma comunidade. Este foi o primeiro estudo a demonstrar diferenças na detecção de espécies entre eRNA e eDNA, e defendeu o uso de eRNA como um provedor mais abrangente de informações sobre organismos vivos para abordagens *metabarcoding* (Giroux *et al.*, 2022).

O uso combinado de eDNA e eRNA em ambientes estuarinos pode ser vantajoso para detectar táxons raros ou de difícil detecção que não são facilmente encontrados por métodos tradicionais (Stoeckle, Soboleva and Charlop-Powers, 2017). Além disso, está estratégia permite a identificação de espécies em ambientes de difícil acesso aos métodos tradicionais e de forma não invasiva, um fator importante considerando que zonas de estuário funcionam como áreas de reprodução de muitas espécies, inclusive ameaçadas de extinção. Tais fatores sugerem que o eDNA combinado ao eRNA pode facilitar o mapeamento geográfico e temporal das populações de peixes marinhos a um custo relativamente baixo (Stoeckle, Soboleva and Charlop-Powers, 2017; Zainal Abidin *et al.*, 2022).

Diversos biomarcadores têm sido utilizados em estudos de inventário da fauna pela estratégia do eDNA e eRNA *metabarcoding.* Embora o gene mitocondrial citocromo oxidase 1 (COX1) seja o marcador mais frequente e com banco de dados mais extenso para metazoários, sua escolha revelou um baixo desempenho como região alvo de DNA ambiental para grupos de vertebrados, principalmente peixes (Polanco et al., 2021; Collins et al., 2019; Munaut, Van Hove and Moretti, 2011). Para este biodiverso grupo de organismos aquáticos o RNA ribossomal 12S do DNA mitocondrial (12S rRNA ou simplesmente 12S) mostrou um maior desempenho na discriminação entre organismos (Miyata et al., 2021; Miya et al., 2015). De fato, alguns autores demonstraram que, embora o uso de COI tenha proporcionado detecções mais amplas em todos os táxons quando comparado ao 12S, a extensa maioria das leituras (96,1%) foram atribuídas a táxons que não eram peixes. Logo, a baixa especificidade do COI para peixes em comparação ao 12S leva a uma amplificação não específica de DNA procariótico e eucariótico, criando um "ruído" de amplificações e tornando o COI uma opção secundária para o estudo de táxons de peixes em amostras de material genético ambiental (Gillet et al., 2018). Acredita-se também que o rRNA seja menos suscetível à degradação em comparação ao

mRNA devido à sua estabilidade estrutural, sendo usualmente preferível em análises de eRNA (Sidova et al., 2015; Marshall, Vanderploeg and Chaganti, 2021).

Muitos fatores podem influenciar a abundância de espécies de peixes em um determinado ambiente, sendo um dos impactos mais relevantes o lançamento de efluentes urbanos, o que justifica a extrema importância em se avaliar os padrões de comunidades de peixes ao longo de uma região de estuário, bem como os fatores ambientais que os modulam, influenciados pela ocupação urbana (Bertora *et al.*, 2022). Os ecossistemas de água doce sofrem constantemente alterações decorrentes da modificação de paisagens naturais e intensificação do uso da terra pela ocupação urbana, que frequentemente desempenha efeitos negativos na qualidade da água e nas alterações na estrutura do habitat fluvial, condições ribeirinhas, cobertura de macrófitas, e composição de substrato (Walsh *et al.*, 2005; Albert, Tagliacollo *and* Dagosta, 2020).

O presente trabalho pretende explorar a aplicação de eDNA e eRNA no levantamento da biodiversidade de espécies de peixes em ecossistemas estuarinos da Mata Atlântica paulista, com nível de antropização contrastante.

2. Objetivo geral

Avaliar a aplicabilidade das técnicas de DNA ambiental_e RNA ambiental em estudos *metabarcoding* para o levantamento de espécies de peixes em duas regiões estuarinas do estado de São Paulo (Caraguatatuba-SP e Ubatuba-SP).

2.1 Objetivos específicos

- Otimizar a aplicação de técnicas moleculares baseadas em eDNA e eRNA como biomarcadores para a conservação de espécies neotropicais;
- Contribuir para a implementação do uso de eDNA e eRNA na rotina de estudos de inventário da fauna no Brasil;
- Fomentar e subsidiar a tomada de decisões por órgãos ambientais, fornecendo informações baseadas em dados moleculares integrados obtidos por meio de eDNA e eRNA.

3. Material e métodos

3.1 Área de amostragem

As amostras de eDNA e eRNA *metabarcoding* foram coletadas em dois períodos do ano, nos dias 2 e 3 de agosto de 2023 (inverno) e 26 a 29 de fevereiro de 2024 (verão), nas cidades de Ubatuba - SP e Caraguatatuba - SP, respectivamente. Duas regiões de estuário foram selecionadas em cada uma das localidades, o estuário do rio Juqueriquerê em Caraguatatuba - SP (23°42'11"S 45°26'10"W) e a região de estuário do rio Escuro, na Praia Dura de Ubatuba – SP (23°29'24"S 45°09'57"W). Inicialmente, pensando na viabilidade da comparação de uma região menos antropizada (rio Escuro), com uma região mais antropizada (rio Juqueriquerê), selecionamos áreas com diferentes níveis de ocupação humana ao redor.

O rio Juqueriquerê é um extenso rio navegável localizado no bairro Porto Novo de Caraguatatuba, região sul do município, e possui 13 km e 600 metros de extensão. O rio nasce na Serra do Mar e desemboca na praia do Porto Novo, tendo atualmente como principais afluentes os rios Claro, Camburú e o Bela Cachoeira (Lúcia *et al.*, 2005). A cobertura vegetal predominante na Serra do Mar é a Mata Atlântica, e na região costeira também são encontradas as coberturas vegetais de planície, entre elas, a restinga, o manguezal e a várzea. De acordo com a classificação climática de Köepen, a região possui um clima tropical chuvoso, sem estação seca definida, com chuvas mais intensas no verão e temperatura média de 21,2ºC, entre a máxima de 26,8ºC e a mínima de 21,2ºC (Caraguatatuba, 2013; Boulomytis, Zuffo and Gireli, 2017). O rio Juqueriquerê é o maior rio navegável do litoral norte de São Paulo e sua zona estuarina é de 4,0 km, apresentando um regime de micro-marés semidiurnas (Rodrigues, Silva and Bernardes, 2013). A Bacia Hidrográfica do Rio Juqueriquerê é caracterizada pelo seu potencial turístico e por problemas ambientais relacionados à especulação imobiliária, ocupação antrópica e parcelamento irregular de solo (Lúcia *et al.*, 2005; Boulomytis, Zuffo and Gireli, 2017). A Bacia também abriga a maior população dentre as da região e apresentou um crescimento populacional explosivo nos últimos anos (Boulomytis, Zuffo and Gireli, 2017). Os impactos como o lançamento inadequado de esgoto e de resíduos sólidos, dragagem, retirada de areia, erosão, chorume, queimadas, ocupação irregular das áreas de preservação, além de contaminações a partir da lavagem de embarcações pelas marinas, contribuem para prejudicar a qualidade do rio e influencia diretamente a praia do Porto e sua vida aquática pela ocupação antrópica (Favoretti and Batalla, 2017). Devido à ocupação urbana intensa nos arredores do rio Juqueriquerê, assim como evidência de despejo de esgoto doméstico, o estuário da região foi considerado prioritário pela equipe para avaliação dos impactos antrópicos (**Figura 1**).

Atualmente, o rio Juqueriquerê se encontra em obra para o enrocamento do rio, iniciada em 2020, com o intuito de facilitar a navegação e o sistema de drenagem, sendo a segunda

maior construção de molhes do país (Prefeitura de Caraguatatuba, 2023). As coletas na porção de mar do Juqueriquerê foram realizadas seguindo o trajeto de colocação e assentamento das pedras, em cerca de 1.000m de extensão para dentro do mar.



Figura 1: Presença de esgoto doméstico no rio Juqueriquerê e obra de enrocamento da foz do rio.

O rio Escuro se localiza no município de Ubatuba, que possui 80% de seu território localizado no Parque Estadual da Serra do Mar, com predomínio da vegetação de Mata Atlântica em bom estado de conservação (**Figura 2**). O clima é caracterizado como tropical litorâneo úmido com temperatura média anual de 21°C, com a média máxima chegando a 27°C e a média mínima a 15°C. Na região de Ubatuba há o predomínio das chuvas orográficas de pequena intensidade e longa duração, sendo janeiro, março e dezembro (período de verão) os meses mais úmidos, e de maio a setembro os meses com as menores médias pluviométricas (inverno) (Sant and Nato, 1990; Rodrigues, Silva and Bernardes, 2013; Alves *et al.*, 2022). A região estuarina dessa localidade é formada principalmente por manguezal, no encontro dos rios Escuro e Cajarana. O mangue de praia apresenta vegetação rasteira, raízes expostas e alta salinidade, e o mangue de terra firme pertence ao rio Escuro, com vegetação de bromélias e líquens e predomínio do mangue vermelho (Payes *et al.*, 2005). Na região de Ubatuba, a zona estuarina da praia Dura apresenta a área mais significativa de manguezal ao longo do município, sendo parte das zonas estuarinas que se encontram mais distantes das áreas urbanizadas, e, portanto, apresentando um bom grau de conservação com baixo impacto antrópico (Vasconcellos and Sanches, 2009).



Figura 2: Fotos da região estuarina do rio Escuro

3.2 Coleta de amostras eDNA e eRNA

3.2.1 Coletas de inverno (agosto de 2023)

A delimitação da área de coleta das amostras de água ambiental no mês de agosto foi estabelecida pela seleção de pontos ao longo de um transecto de gradiente de salinidade. Selecionamos 15 pontos ao longo do rio Escuro a partir da foz do estuário: 5 na região de foz, onde há predomínio de água do mar, 5 da região intermediária onde há mistura de água doce e salgada e 5 na região do rio, onde há predomínio de água doce (**Figura 3**). No rio Juqueriquerê, selecionamos 12 localidades, com 4 pontos em cada porção do estuário, a partir de pontos de acesso ao longo do rio (**Figuras 4 e 5**). Todas as amostras foram duplicadas para abranger ambas as análises ambientais e posterior comparação entre as metodologias de eDNA e eRNA, totalizando 54L de água. Do total de 30L de água provenientes do rio Escuro, 15L foram encaminhados para análises de eDNA e 15L para análises de eRNA, enquanto dos 24L de água coletados do rio Juqueriquerê, 12L foram destinados para análise de eDNA e 12L para o eRNA.



Figura 3: Pontos de coleta selecionados no rio Escuro.Os pontos em amarelo (RE M) indicam a porção mar do estuário, os pontos em vermelho (RE T) indicam a porção de transição entre mar e rio e os pontos em azul (RE R) indicam a porção onde prevalece água doce do rio.

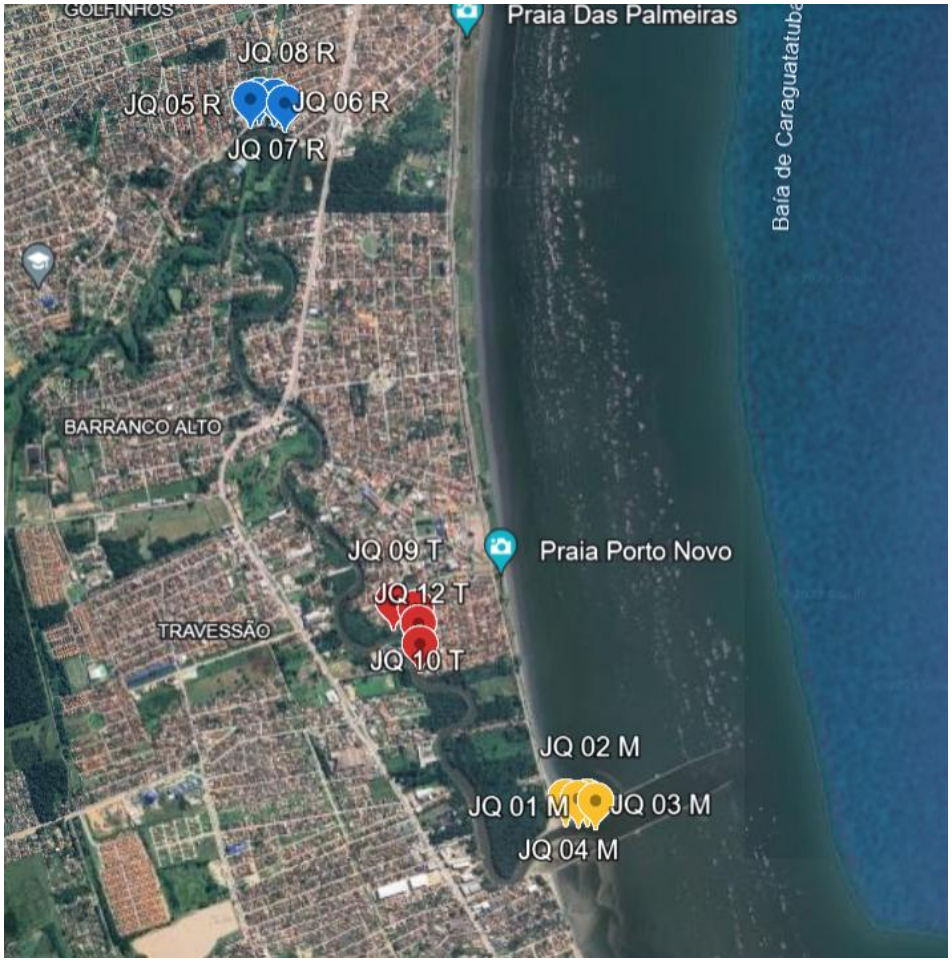


Figura 4: Pontos de coleta selecionados no rio Juqueriquerê. Os pontos em amarelo (JQ M) indicam a porção mar do estuário, os pontos em vermelho (JQ T) indicam a porção de transição entre mar e rio e os pontos em azul (JQ R) indicam a porção onde prevalece água doce do rio.

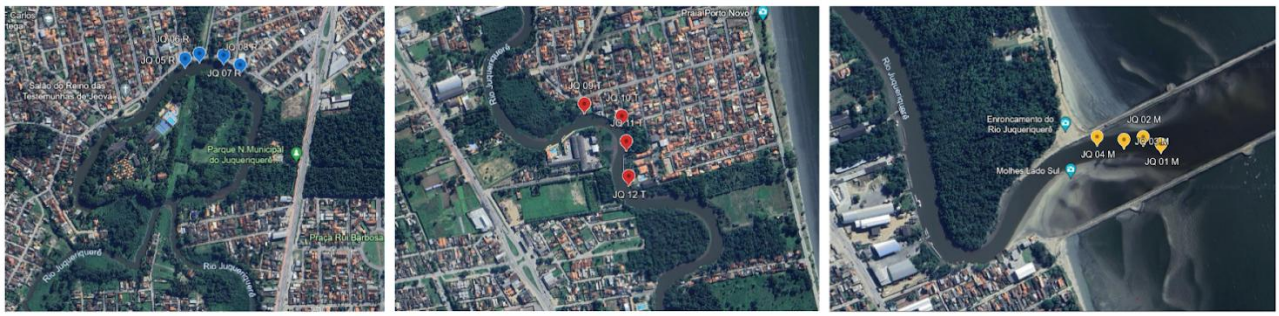


Figura 5: Pontos de coleta no rio Juqueriquerê por porção de amostragem. A esquerda a porção "Rio", no centro a porção "Transição" e a direita a porção "mar"

Para a coleta de amostras de água utilizamos garrafas plásticas de 1L, caixas de isopor e *cooler* plástico com gelo para armazenamento do conteúdo até a filtração. As garrafas e caixas foram devidamente esterilizadas por 3 lavagens utilizando (I) mistura de água sanitária e água destilada a 10%, (II) álcool 70º e (III) álcool 100º. As garrafas também foram submetidas a luz

ultravioleta em cabine de fluxo laminar para garantir total eliminação de DNA contaminante (**Figura 6**).



Figura 6: Processo de esterilização das garrafas utilizadas para coleta de água.

Utilizando as garrafas, coletamos água a uma profundidade aproximada de 1m em cada ponto de amostragem, seguindo metodologia previamente descrita (Zainal Abidin *et al*, 2022). Priorizamos a coleta de amostras em sentido contrário à correnteza buscando evitar a contaminação por material genético do próprio coletor. Algumas amostras em locais de difícil acesso foram coletadas com o auxílio de corda e balde de *Inox* esterilizado. Todos os equipamentos de amostragem foram devidamente higienizados com solução de água sanitária comercial a 10% (~ 7,4% de hipoclorito de sódio), enxaguados com água destilada corrente e posteriormente com etanol a 70% para minimizar a contaminação cruzada e exógena. Paramentação, incluindo máscaras e luvas descartáveis, foram utilizadas durante todo o procedimento, e substituídas a cada investida em novo local de amostragem. Todas as amostras de água foram acondicionadas e imediatamente armazenadas em gelo para transporte.

3.2.2 Coletas de verão (fevereiro de 2024)

As coletas do mês de fevereiro seguiram os mesmos procedimentos estabelecidos previamente, com a alteração de alguns pontos. Para o rio Escuro, novos pontos acima do rio foram estabelecidos para a porção “rio”, visando aumentar a área de amostragem e obter uma

porção característica com salinidades nulas (**Figura 7**). Para o rio Juqueriquerê, novos pontos da porção "transição" foram selecionados para abranger uma região maior de transição de salinidade, assim como os pontos de "mar", que foram afastados da costa e da região de molhe, visando evitar o trecho de obras e possível excesso de resíduos (**Figura 8**).



Figura 7: Pontos de coleta selecionados no rio Escuro no período do verão. Os pontos em amarelo (RE M V) indicam a porção mar do estuário, os pontos em vermelho (RE T V) indicam a porção de transição entre mar e rio e os pontos em azul (RE R V) indicam a porção de água doce do rio.

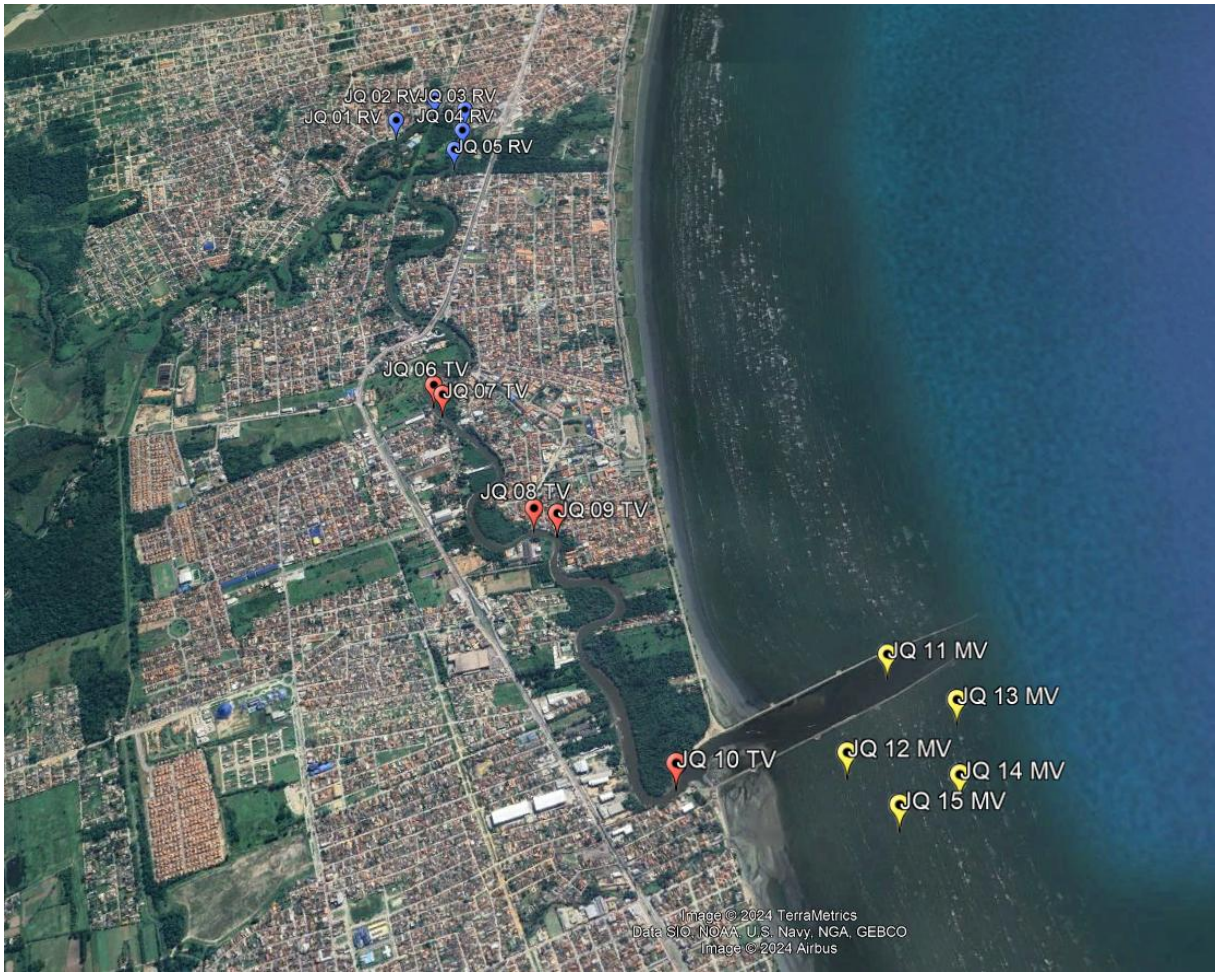


Figura 8: Pontos de coleta selecionados no rio Juqueriquerê no período do verão. Os pontos em amarelo (JQ M V) indicam a porção mar do estuário, os pontos em vermelho (JQ T V) indicam a porção de transição entre mar e rio e os pontos em azul (JQ R V) indicam a porção de água doce do rio.

3.3 Fluxograma metodológico

Após as coletas, as amostras foram direcionadas para processos de filtragem e extração de material genético. A **Figura 9** detalha as etapas envolvidas a partir da coleta até a análise de dados de eDNA e eRNA.

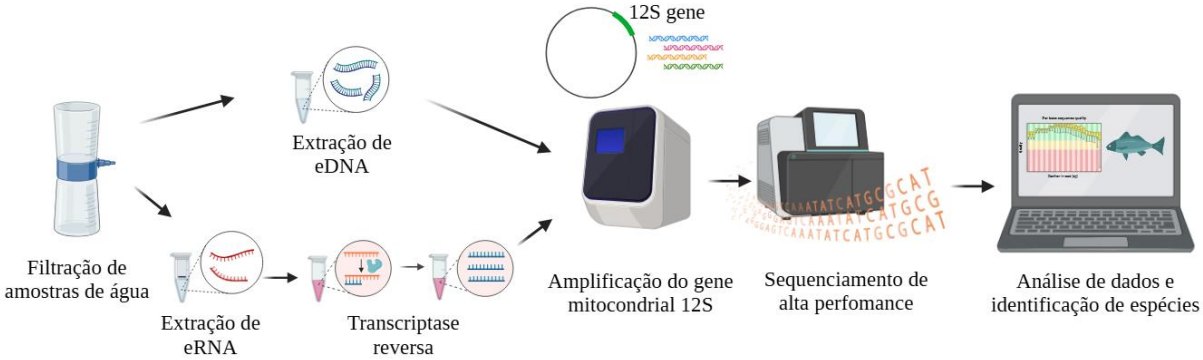


Figura 9: Fluxograma detalhando as etapas do projeto após as coletas: filtração das amostras de água, extração de eDNA e eRNA, amplificação do gene alvo, Sequenciamento de Nova Geração (NGS) e análise dos dados obtidos.

3.4 Filtração e preservação das amostras

3.4.1 Filtração de amostras de eRNA

Todas as amostras de água destinadas às análises de eRNA, tanto no período de inverno quanto no período do verão, foram processadas utilizando filtros *Sterivex*™ (poro 0.22 µm; Millipore, USA). Considerando a relativa baixa estabilidade do RNA e visando otimizar o tempo de filtração, optamos por realizar as filtragens ainda em campo. Isso é possível graças à conformação hermeticamente fechada dos filtros *Sterivex*™, cujo membrana de nitrocelulose interna permanece abrigada em contêiner de vidro e protegida de contaminação externa. Seringas descartáveis do tipo *luer lock* de 50ml foram acopladas aos filtros e com a pressão do êmbolo o volume de água da garrafa foi transpassado por cada unidade (**Figura 10**). Após a filtragem, os filtros foram preenchidos com 700 µl de *RNA/DNA Shield*™ (*Zymo Research Corp.*, Freiburg, Alemanha) e ambas as extremidades seladas com parafilme (Miyata et al., 2022; Trivedi et al., 2018). Todos os filtros foram armazenados individualmente em sacos tipo *Ziplock* ou tubos *falcon* estéreis contendo esferas de sílica, e foram posteriormente armazenadas em *coolers* até a extração de RNA.



Figura 10: Processo de filtragem em campo de amostras de água com filtros *Sterivex™* (poro 0.22 μm; *Millipore, USA).*

Devido às limitações de horário e condições climáticas, as amostras do rio Juqueriquerê de eRNA do período de verão foram filtradas em laboratório, no Centro de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo (CEBIMAR – USP), em São Sebastião, SP. As amostras de água foram armazenadas em garrafas extras que foram levadas para campo e armazenadas no gelo até ambiente adequado.

3.4.2 Filtração de amostras de eDNA

Nas coletas de inverno e verão, as garrafas contendo amostras de eDNA do rio Escuro foram filtradas em cabine de fluxo laminar devidamente esterilizada, existente no laboratório da base de Ubatuba do Instituto Oceanográfico da USP (IO-USP). No inverno, filtramos o conteúdo das garrafas utilizando membranas de nitrocelulose de 47mm de diâmetro (poro 0.22μm no período de inverno e poro 0,45μm no verão; *Millipore, USA*) ligadas a um sistema de filtração acoplado à bomba à vácuo. O conteúdo de 1L de cada garrafa foi transpassado pelas membranas no sistema, e após cada processo de filtração as vidrarias passaram por uma nova esterilização em mistura de água destilada e água sanitária 10% para evitar a contaminação de DNA proveniente de outras amostras ou de ambiente externo.

Durante as coletas do verão, visando otimizar a velocidade de filtração e minimizar os efeitos de lentidão causada por entupimento dos filtros por sedimentos, optamos por realizar a filtração à vácuo utilizando membranas de nitrocelulose de poro 0.45μm (*Millipore, USA*). Ainda assim, devido às dificuldades encontradas na filtração das amostras, possivelmente pela presença de altos níveis de sedimentação por se tratar da época de chuvas, dividimos o processo de filtração em duas etapas, utilizando dois filtros de nitrocelulose e passando 250ml de água por cada unidade.

Após a filtração, recolhemos os filtros com o auxílio de pinças, dobramos e envolvemos em papel moeda e os depositamos individualmente em sacos plásticos tipo *zip lock* contendo *beads* de sílica (**Figura 11**). Todos os materiais foram previamente esterilizados e expostos a luz ultravioleta. Nas coletas desse período, também nos atentamos em incluir amostras de controle negativo (amostras “branco”), filtrando água ultrapura.



Figura 11: *zip locks* esterilizados contendo *beads* de sílica.

Devido a uma limitação na quantidade de filtros de membrana de nitrocelulose durante as coletas de inverno, as amostras desse período provenientes do rio Juqueriquerê (JQ01 a JQ12) junto com 4 amostras do rio Escuro (Re10, Re11, Re15 e Re16) foram filtradas com unidades de filtros *Sterivex*™ (poro 0.22 µm; *Millipore, USA*) e preservadas em *RNA/DNA Shield*™ (*Zymo Research Corp.*, Freiburg, Alemanha). O processo de armazenamento das amostras foi o mesmo das demais. Os *zip locks* e tubos *falcon* contendo os filtros foram mantidos em *cooler* com gelo até o transporte para o Laboratório Genômica e Evolução Molecular (LGEM), onde permaneceram em *freezer* a -20ºC até o momento das extrações de material genético.

No período de verão, as amostras coletadas do rio Juqueriquerê de fevereiro de 2024, foram levadas até a sede do Centro de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo (CEBIMAR/USP) localizada em São Sebastião - SP, com laboratórios de estrutura disponível para minimizar contaminação e manter temperaturas baixas, mais adequadas para evitar degradação do material genético (**Figura 12**). Assim como as amostras de verão do rio Escuro, dividimos a filtração em duas membranas.



Figura 12: processo de filtração das amostras utilizando bomba à vácuo.

3.5 Extração e síntese de cDNA

3.5.1 Extração de DNA - membranas de nitrocelulose

Após retirar as membranas de nitrocelulose do armazenamento, realizamos a extração de eDNA. Retiramos cada membrana do *zip lock* e inserimos em um tubo *Eppendorf* de 1,5ml com o auxílio de uma tesoura e pinça devidamente esterilizadas. Todo o procedimento foi realizado em cabine de fluxo lateral com equipamentos esterilizados após o manuseio de cada amostra, a fim de evitar contaminação. Cada membrana foi cuidadosamente cortada e macerada com o uso de uma tesoura e posteriormente adicionamos 80ul de proteinase K e 750ul de *lysis buffer* (*Kit NucleoSpin® Tissue, Macherey Nagel, USA*). Encaminhamos as amostras para banho seco onde permaneceram a 56ºC *overnight*. Realizamos as demais etapas do processo de extração de acordo com o protocolo do *Kit NucleoSpin® Tissue* (*Macherey Nagel, USA).*

No caso das amostras do período de verão, após o processo final de extração, juntamos o volume filtrado das amostras duplicadas pelo uso de dois filtros. O DNA total extraído foi

medido diretamente por fluorometria (*Qubit™ 1X dsDNA High Sensitivity (HS), Life Technologies*, EUA).

3.5.2 Extração de eDNA - filtros *Sterivex™*

Para a extração de eDNA dos filtros *Sterivex™*, dispusemos cada filtro verticalmente, com a extremidade maior voltada para baixo e apoiada sob um tubo *Eppendorf* de 1,5 ml. Ambos foram alojados nessa conformação dentro de um tubo *falcon* 50ml, garantindo a estabilidade da posição do filtro. Os tubos *falcon* foram encaminhados para centrífuga por 1 min a 1500g, fazendo o conteúdo de *RNA/DNA Shield* retido no tubo se concentrar no tubo *Eppendorf*. Posteriormente, adicionamos 180 ul de *lysis buffer* e 25ul de proteinase K *(Kit NucleoSpin® Tissue, Macherey Nagel, USA*) e deixamos as amostras *overnight* em banho seco a 56ºC. Realizamos as demais etapas do processo de extração de acordo com o protocolo do *Kit NucleoSpin® Tissue (Macherey Nagel, USA)*. O DNA total extraído foi medido diretamente por fluorometria (*Qubit™ 1X dsDNA High Sensitivity (HS), Life Technologies*, EUA) e a pureza determinada pelos parâmetros de absorbância em *NanoDrop® ND-1000 (Thermo Scientific).*

3.5.3 Extração de eRNA - filtros Sterivex™

Seguimos o mesmo procedimento realizado para eDNA para a retirada do conteúdo de *RNA/DNA Shield* dos filtros *Sterivex™*. Posteriormente, adicionamos 750ul de *lysis buffer* (*Quick-RNA™ Miniprep Kit, Zymo Research)* seguindo a proporção 1:1 proposta pelo protocolo do fabricante, a partir da quantidade utilizada de *RNA/DNA Shield.* No caso das amostras extraídas utilizando o *kit RNA Clean & Concentrator™-5 (Zymo Research)*, adicionamos 1 volume de etanol (95-100%) de acordo com a proporção 1:1 proposta pelo protocolo do fabricante, a partir da quantidade utilizada de *RNA/DNA Shield.* Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o protocolo. O volume final da reação para ambos os *kits* foi padronizado a 40ul. O RNA total extraído foi medido diretamente por fluorometria (*Qubit™ RNA High Sensitivity (HS), Life Technologies*, EUA) e a pureza determinada pelos parâmetros de absorbância em *NanoDrop® ND-1000 (Thermo Scientific).*

3.5.4 Tratamento de DNAse e síntese de cDNA

Após a extração de RNA, as amostras foram encaminhadas para tratamento de DNAse, removendo possíveis resquícios de contaminação de DNA. Utilizamos o *Kit Turbo DNA-free kit (Thermo Fisher)* seguindo protocolo do fabricante. Considerando o volume final da reação a 50 ul e a consequente diluição do RNA total, submetemos nossas amostras a um concentrador a vácuo, diluindo em volume final o necessário para as futuras reações de cDNA (13µl). Para a criação de biblioteca de cDNA, realizamos as reações de transcrição reversa utilizando o *kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (*Applied Biosystems,* EUA). Algumas amostras foram medidas diretamente por fluorometria, para um cálculo de quantificação aproximada para as futuras reações (*Qubit™ 1X dsDNA High Sensitivity (HS), Life Technologies,* EUA).

3.6 Amplificações por PCR

As amostras de cDNA e DNA foram todas submetidas a amplificação via PCR. Os amplicons alvo foram gerados a partir do gene ribossomal(rRNA) 12S do DNA mitocondrial. Os primers universais foram primeiramente projetados para eDNA a partir do gene 12S rRNA e foram denominados MiFish- U-F/R (U, F e R representam respectivamente universal, forward e reverse). Recentemente, os primeirs universais de peixe, MiFish-U e E, se destacam em diferentes trabalhos de identificação *metabarcoding* de peixes (Miya et al., 2015 e Miyata et al., 2021).

Os primers selecionados alvejam aproximadamente 170 pares de bases na região no início do gene rRNA 12S, que contém variabilidade suficiente para permitir a identificação de peixes ao nível de família, gênero e espécie, com exceção de alguns gêneros estreitamente relacionados (Polanco F. et al., 2021). O MiFish-E-F/R foi desenhado visando abranger as variações de sequência presente nos elasmobrânquios (**Tabela 1**).

Para a preparação da biblioteca de amplicons, seguimos a abordagem baseada em PCR em duas etapas, conforme descrito na biblioteca de sequenciamento metagenômico Illumina 16S (Illumina, Inc., San Diego, CA, EUA), já utilizada em protocolos de eDNA para 12S (Evans et al., 2017; Bevilaqua et al., 2020; Kumar et al., 2022) (**Figura 13**). O protocolo Illumina inclui sequências de adaptadores que devem ser anexadas às sequências de pares de primers específicos do locus para a região alvo e com compatibilidade com os índex. Idealmente, nossa construção de bibliotecas visa apenas a uma região hipervariável do MiFish de peixes, com a presença de primers e sequências adaptadoras em ambas as extremidades. No entanto, muitas vezes sequências não-alvo de organismos que não são peixes podem ser amplificadas. Para evitar essas falhas, seguimos o recomendado por protocolos de

eDNA, de purificação dos primeiros produtos de PCR para eliminar primers redundantes e dímeros, quantificar e padronizar a concentração dos produtos. Garantimos a integridade pós 2ª PCR a partir do *BioAnalyzer* e *TapeStation* (Agilent Technologies, Inc., San Diego, CA, EUA) (Miya *et al.*, 2015; Miya, Gotoh and Sado, 2020).

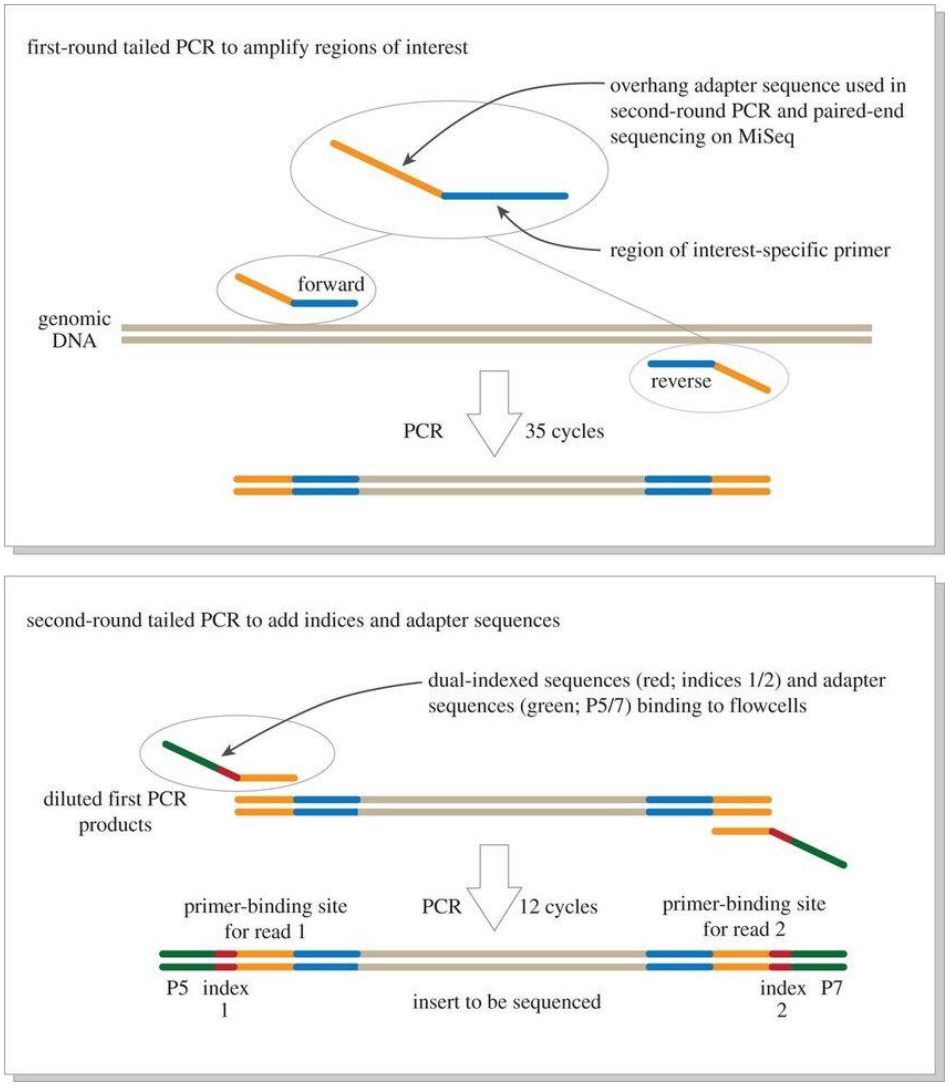


Figura 13: Esquema representativo da PCR em duas etapas. Retirado de Miya et al., 2015

Tabela 1: Sequência de cada primer descrito, com os adaptadores destacados em negrito.

Nome do primer	Sequência
MiFish U F	**5' - TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG**GTCGGTAAAACTCGTGCCAGC - 3'
MiFish U R	**5' - GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG**CATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTC - 3'
MiFish E F	**5' - TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG**RGTTGGTAAATCTCGTGCCAGC - 3'
MiFish E R	**5' - GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG**GCATAGTGGGGTATCTAATCCTAGTTTG - 3'

Realizamos experimentos iniciais para a padronização das reações, utilizando os primers MiFish sem a presença de adaptadores, com o kit Invitrogen™ *Platinum*™ *Taq* DNA Polimerase. Após os testes com gradiente de temperatura de anelamento para as amostras ambientais, constatamos a temperatura mais adequada como sendo de 53,8ºC. As reações foram feitas de acordo com o protocolo do fabricante e com as devidas adaptações de otimização nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 2 min, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 s, anelamento a 53,8 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 30 s, com uma extensão final a 72 °C por 5 min. Após finalizados os testes iniciais, realizamos as reações de PCR utilizando os primers com presença de adaptadores e a DNA polimerase de alta fidelidade NEBNext® Q5® Hot Start HiFi PCR Master Mix, adaptado as condições ao protocolo do fabricante nas seguintes condições: desnaturação inicial a 98 °C por 30 s, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 98 °C por 10 s e anelamento a 53,8 °C por 30 s, com extensão final a 65 °C por 5 min. Padronizamos o volume total da reação em 25µl, sendo 12,5ul de NEBNext® Q5® Hot Start HiFi PCR Master Mix, 1,25µl de cada primer (10µM) e 7,5µl de DNA. As amostras foram visualizadas em gel de agarose e purificadas utilizando as *beads* metálicas AMPure XP Bead-Based Reagent, seguindo o protocolo do fabricante e baseando-se no já estabelecido pela biblioteca de sequenciamento metagenômico Illumina 16S (Illumina, Inc., San Diego, CA, EUA). Após a purificação, os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 1% e as amostras íntegras foram encaminhadas para a segunda etapa de indexação. Utilizamos o kit Illumina DNA/RNA UD Indexes Set A para identificação de cada amostra correspondente a seu determinado ponto. A reação de indexação também foi realizada utilizando NEBNext® Q5® Hot Start HiFi PCR Master Mix, nas seguintes condições sugeridas em protocolo e otimizadas em laboratório: desnaturação inicial a 98ºC por 30s, seguida por 14 ciclos de desnaturação a 98ºC por 10s, anelamento a 53,8ºC e extensão a 65ºC, com uma extensão final a 65ºC por 5 minutos. As reações da segunda etapa foram padronizadas em 50µl de volume total, sendo 5µl provenientes da reação inicial, 25 µl de NEBNext® Q5® Hot Start HiFi PCR Master Mix, 10µl de água ultrapura e 10µl de Primers Index. As amostras foram visualizadas em gel de agarose 1% e purificadas novamente utilizando as *beads* metálicas AMPure XP Bead-Based Reagent.

3.7 Sequenciamento de Nova Geração Illumina e análise de dados

Após etapa de purificação e indexação, as amostras foram encaminhadas para análise de integridade e tamanhos de fragmentos amplificados no Bioanalyzer System 2100, seguindo

o protocolo Agilent High Sensitivity DNA Kit Quick Start Guide. Devido ao limite de amostras por chip no equipamento, algumas amostras individuais foram lidas utilizando o Agilent mod. Tapestation 4150. As amostras também foram quantificadas separadamente em Qubit (ng/µl) e preparadas para o Sequenciamento de Nova Geração (NGS). Para o sequenciamento *Illumina paired-end* (sequenciamento de ambas as extremidades do amplicon), utilizamos o kit micro V2 300 ciclos, seguindo o protocolo de preparação de biblioteca do 16S, fornecido pela Illumina.

A partir da determinação do tamanho da biblioteca em pares de base, fizemos a conversão de cada amostra em ng/µl para nM, a partir da seguinte fórmula, utilizada pelos protocolos Illumina: $\frac{(\text{concentration in ng/µl})}{(660\ \text{g/mol} \times \text{average library size in bp})} \times 10^6 = \text{concentration in nM}$.

Preparamos um pool unindo as 20 amostras individualmente indexadas, com diluições sucessivas em low trisTE e quantificações em Qubit a cada etapa, por fim padronizando em uma concentração final de 4 nM. As amostras posteriormente foram desnaturadas utilizando uma diluição fresca de hidróxido de sódio (0,2 N de NaOH) e diluídas com tampão de hibridização (HT1). A etapa também incluiu a adição da diluição restante de NaOH ao PhiX, como um controle interno de sequenciamento ideal das bibliotecas, monitorando a qualidade da execução da reação, incluindo a geração de cluster, sequenciamento e alinhamento.

O DNA desnaturado e o PhiX foram posteriormente diluídos em HT1 na concentração desejada de 10pM e preparados para inserção no cartucho Illumina e no MiSeq (M02158).

Ao final do sequenciamento, as amostras contendo as sequências *pair-end* brutas obtidas (*raw reads)* tiveram remoção de bases indeterminadas e filtragem de qualidade (Q-scores ≥ 30). Apenas as leituras contendo primers e adaptadores correspondentes foram direcionadas para correção de erros e análises posteriores de leitura utilizando o Pipeline DADA2.

Todas as identificações foram feitas utilizando BLAST, disponível na plataforma *NCBI* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov), a partir do banco de dados disponível em *NCBI nucleotide* e *NCBI taxonomy*. Considerando que em poucas amostras foi possível de se unirem as sequências por sobreposição (*merge*) em sequências únicas (ASVs), como usualmente são agrupados os resultados, acrescentamos também as análises concatenadas, associando as sequências obtidas sem pareamento (*concat*).

As identificações e classificações taxonômicas posteriores foram feitas utilizando os bancos do *NCBI nucleotide* e *NCBI taxonomy*, comparando as sequências obtidas com as disponíveis nos bancos de dados das plataformas. A identificação foi feita a partir de um cálculo arbitrário considerando valores de 0 a 100 (BLASTn pseudo-core, resultante da multiplicação da identidade (*1_identity* ~ semelhança) e cobertura (*1_qcovhsp* ~ quanto da ASV está representada na referência). Valores iguais a 100 indicam ASVs totalmente representadas e idênticas à referência presente no banco de dados e indicando alta confiabilidade. Quanto menor o valor, menor será o rank taxonômico atribuído à ASV, Quando = 100, a ASV está totalmente representada e é idêntica à referência do banco, sendo assim altamente confiável. Quanto menor, menos derivado será o rank taxonômico atribuído automaticamente à ASV (`BLASTn pseudo-score` >= 98 ~ "Species", `BLASTn pseudo-score` >= 95 & `BLASTn pseudo-score` < 98 ~ "Genus", `BLASTn pseudo-score` >= 90 & `BLASTn pseudo-score` < 95 ~ "Family", `BLASTn pseudo-score` >= 80 & `BLASTn pseudo-score` < 90 ~ "Order", `BLASTn pseudo-score` >= 60 & `BLASTn pseudo-score` < 80 ~ "Class"). Também inferimos a abundância de *reads* correspondente a cada espécie presente por amostra, e a partir do levantamento de espécies, utilizamos o RStudio para representamos graficamente os principais índices de diversidade alfa (Chao1, Shannon, Simpson), utilizando o pacote *Phyloseq* (McMurdie and Holmes, 2015; Kandlikar *et al.*, 2018), onde a partir da abundância, são calculados valores índeces para cada amostra, com médias e outliers que permitem compar as médias entre os rios e compreender a homogeneidade de amostras. A diversidade alfa, frequentemente expressa como a riqueza de espécies, representa a diversidade de espécies dentro de uma área, considerando a distribuição do número de indivíduos por espécie, nos permitindo comparar o rio Juquriquerê e o rio Escuro pelo número de espécies (Sanches *et al.*, 2012; Magurran, 2021).

4. Resultados e Discussão

4.1 Volume filtrado das amostras

Devido a presença excessiva de sedimentos não foi possível a filtração do volume total de água, como inicialmente planejado.

No inverno, para o rio Juquriquerê a quantidade de água filtrada para eRNA variou de 170ml a 550ml, enquanto para o rio Escuro, onde houve menor presença de sedimentos, o filtrado variou de 500ml a 750ml (**Tabela 2)**. No verão, encontramos maior dificuldade de

filtração, e a quantidade de água filtrada para eRNA no rio Juquriquerê variou de 150ml a 350ml, enquanto para o rio Escuro variou de 350ml a 850ml (**Tabela 3**).

No inverno, as amostras de eDNA do rio Escuro tiveram volume filtrado de 500ml para as amostras utilizando *Sterivex*™ e 1L para amostras utilizando membranas de nitrocelulose (**Tabela 4**). As amostras de eDNA do rio Juquriquerê filtradas com *Sterivex*™ variaram de volume de 170ml a 550ml (**Tabela 5)**. As amostras do verão de eDNA foram todas padronizadas para ambos os rios, em 500ml dividido em dois filtros de nitrocelulose, devido a dificuldade de filtração, assim como as amostras "branco" de controle negativo.

Tabela 2: Volume em ml filtrado, referente as amostras de eRNA em cada porção do rio no período de inverno. "JQ" representado em azul, indica as amostras do rio Juquriquerê. "RE", representado em vermelho, indica as amostras do rio Escuro. Todas as amostras foram filtradas utilizando *Sterivex*™.

Inverno – eRNA

Amostras eRNA	Porção do rio	Volume (ml)
JQ 05 R	Rio	170
JQ 06 R	Rio	200
JQ 07 R	Rio	220
JQ 08 R	Rio	200
JQ 09 T	Transição	400
JQ 10 T	Transição	400
JQ 11 T	Transição	400
JQ 12 T	Transição	450
JQ 01 M	Mar	400
JQ 02 M	Mar	450
JQ 03 M	Mar	550
JQ 04 M	Mar	500

Amostras eRNA	Porção do rio	Volume (ml)
RE 01 R	Rio	600
RE 02 R	Rio	500
RE 03 R	Rio	500
RE 04 R	Rio	700
RE 05 R	Rio	650
RE 06 T	Transição	650
R 07 T	Transição	750
RE 08 T	Transição	550
RE 09 T	Transição	550
RE 10 T	Transição	750
RE 11 M	Mar	750
RE 12 M	Mar	600
RE 13 M	Mar	550
RE 14 M	Mar	650
RE 15 M	Mar	650

Tabela 3: Volume em ml filtrado, referente as amostras de eRNA em cada porção do rio no período de verão. "JQ" representado em azul, indica as amostras do rio Juquriquerê. "RE", representado em vermelho, indica as amostras do rio Escuro. Todas as amostras foram filtradas utilizando *Sterivex*™.

Verão - eRNA

Amostras eRNA	Porção do rio	Volume (ml)
JQ 01 RV	Rio	150
JQ 02 RV	Rio	150
JQ 03 RV	Rio	175
JQ 04 RV	Rio	150

Amostras eRNA	Porção do rio	Volume (ml)
RE 01 RV	Rio	450
RE 02 RV	Rio	500
RE 03 RV	Rio	550
RE 04 RV	Rio	550

JQ 05 RV	Rio	150
JQ 06 TV	Transição	200
JQ 07 TV	Transição	220
JQ 08 TV	Transição	200
JQ 09 TV	Transição	150
JQ 10 TV	Transição	170
JQ 11 MV	Mar	190
JQ 12 MV	Mar	350
JQ 13 MV	Mar	180
JQ 14 MV	Mar	170
JQ 15 MV	Mar	300
Branco	-	500

RE 05 RV	Rio	500
RE 06 TV	Transição	450
R 07 TV	Transição	350
RE 08 TV	Transição	450
RE 09 TV	Transição	550
RE 10 TV	Transição	550
RE 11 MV	Mar	850
RE 12 MV	Mar	850
RE 13 MV	Mar	750
RE 14 MV	Mar	850
RE 15 MV	Mar	850
Branco	-	500

Tabela 4: Volume em ml filtrado, referente as amostras de eDNA em cada porção do rio no período de verão. "RE", representado em vermelho, indica as amostras do rio Escuro. A amostra 6 foi descartada durante as coletas devido a um erro de amostragem.

Inverno - eDNA

Amostras eDNA	Porção do rio	Tipo de filtro	Volume (ml)
RE 01 R	Rio	Nitrocelulose	1000
RE 02 R	Rio	Nitrocelulose	1000
RE 03 R	Rio	Nitrocelulose	1000
RE 04 R	Rio	Nitrocelulose	1000
RE 05 R	Rio	Nitrocelulose	1000
RE 07 T	Transição	Nitrocelulose	1000
RE 08 T	Transição	Nitrocelulose	1000
RE 09 T	Transição	Nitrocelulose	1000
RE 10 T	Transição	*Sterivex*™	500
RE 11 T	Transição	*Sterivex*™	500
RE 12 M	Mar	Nitrocelulose	1000
RE 13 M	Mar	Nitrocelulose	1000
RE 14 M	Mar	Nitrocelulose	1000
RE 15 M	Mar	*Sterivex*™	500
RE 16 M	Mar	*Sterivex*™	500

Tabela 5: Volume em ml filtrado, referente as amostras de eDNA em cada porção do rio no período de inverno. "JQ", representado em azul, indica as amostras do rio Juqueriquerê.

Inverno - eDNA

Amostras eDNA	Porção do rio	Volume (ml)
JQ 01 M	Rio	170
JQ 02 M	Rio	170
JQ 03 M	Rio	200

JQ 04 M	Rio	200
JQ 05 R	Transição	450
JQ 06 R	Transição	450
JQ 07 R	Transição	400
JQ 08 R	Transição	500
JQ 09 T	Mar	420
JQ 10 T	Mar	450
JQ 11 T	Mar	550
JQ 12 T	Mar	500

Devido ao tempo de amostragem e filtragem das amostras da água, fatores como a movimentação da maré se tornaram de difícil controle para padronização das coletas, não só em relação aos fatores abióticos como alterações na salinidade, como pelo próprio transporte de eDNA. De fato, ambientes estuarinos com grande influência dos movimentos de corpos de água doce e marinhos adjacentes podem frequentemente transportar eDNA de espécies não existentes para o estuário nas diferentes porções de amostragem, uma limitação necessária de ser considerada ao avaliarmos a diversidade de comunidades de peixe em gradientes espaciais heterogêneos como os estuários e manguezais (Seymour *et al.*, 2021).

Para a escolha da membrana, nos baseamos em estudos anteriores que demonstraram que tamanhos de poros de 0,45 μm e 0,22 μm retêm melhor partículas que se ligam a moléculas de eDNA de peixes quando comparados a poros maiores, por exemplo de 1,2 μm. No caso de poros pequenos de 0,22μm, no entanto, há maior propensão a entupimento em águas turvas ou com altos níveis de material particulado suspenso (Turner et al., 2014; Miya et al., 2016; Capo et al., 2020; Takahashi et al., 2023). Visando otimizar a velocidade de filtração e minimizar os efeitos de lentidão da filtração causada por entupimento dos filtros por sedimentos, quando realizamos as coletas de verão optamos por realizar a filtração à vácuo utilizando membranas de nitrocelulose de poro 0.45 μm (Millipore, USA), considerando possibilidade de encontrarmos maiores níveis ainda de sedimentação e partículas suspensas pelo período intenso de chuvas. Ainda assim, encontramos problemas para a passagem do volume padrão proposto inicialmente, de 1L. Li et. al. (2018), em um trabalho de avaliação de eficiência e precisão de técnica de filtração para levantamento de uma comunidade de peixes, discorrem que, apesar de os filtros de 0,45 μm apresentarem um melhor desempenho em termos de rendimento total de DNA e probabilidade de detecção de espécies, o desempenho μm foi apenas marginalmente melhor do que o dos filtros de 0,8 μm, enquanto o tempo de filtragem foi significativamente maior (Li et al., 2018). Neste caso, sendo um ambiente de lagoa turva e eutrófica com alta

densidade de peixes, o filtro de 0,8 µm se mostrou um tamanho de poro ideal, podendo ser uma opção viável também em trabalhos futuros de estuários com alta sedimentação.

Em um trabalho de Mächer e colaboradores, não foi encontrada relação positiva entre a quantidade de água filtrada e a taxa de detecção de espécies, as quais puderam ser detectadas sob uma variada faixa de volumes de água filtrada (0,25 a 2L), no entanto é recomendado pelo menos a filtração de 1L de água para reduzir a incerteza nas detecções de espécies (Mächler *et al.*, 2016). Ainda assim, encontramos mais dificuldade no processo de filtragem das coletas de verão do que nas coletas de inverno, provavelmente devido ao mês de fevereiro ser de um período intenso de chuvas, contribuindo para o acúmulo de sedimentos e movimentação da água.

4.2 Concentração de ácidos nucleicos

Após a extração de eRNA, as amostras foram quantificadas. As amostras do período de inverno seguem representadas na **Tabela 6**, e as amostras do período de verão na **Tabela 7**.

Após processo de extração e quantificação das amostras de eDNA do período do inverno, comparamos os níveis de concentração por técnica de filtração (*Sterivex*™ x Membrana de nitrocelulose). Os resultados do inverno foram compilados na **Tabela 8**, e os resultados do verão na **Tabela 9.**

Tabela 6: Concentração em ng/µl das amostras extraídas de eRNA do período de inverno. "JQ", representado em azul, indica as amostras do rio Juqueriquerê e "RE" em vermelho, as amostras do rio Escuro. "R", "T" e "M" correspondem respectivamente as porções "rio", "transição" e "mar".

Inverno - eRNA

Amostras eRNA	C (ng/µl)
JQ 05 R	65
JQ 06 R	58
JQ 07 R	224
JQ 08 R	88,1
JQ 09 R	46,5
JQ 10 T	51,8
JQ 11 T	43,9
JQ 12 T	72,9
JQ 01 M	14,4
JQ 02 M	12
JQ 03 M	7,98
JQ 04 M	7,11

Amostras eRNA	C (ng/µl)
RE 01 R	10,3
RE 02 R	12
RE 03 R	13,4
RE 04 R	38,4
RE 05 R	28,9
RE 06 T	25
R 07 T	34,3
RE 08 T	24,4
RE 09 T	26
RE 10 T	31
RE 11 M	20,3
RE 12 M	28,4

RE 13 M	24,9
RE 14 M	26,6
RE 15 M	25,7

Tabela 7: Concentração em ng/µl das amostras extraídas de eRNA do período de verão. “JQ”, representado em azul, indica as amostras do rio Juquiriquerê e “RE” em vermelho, as amostras do rio Escuro. “R”, “T” e “M” representam, respectivamente, Rio, Transição e Mar.

Verão - eRNA

Amostras eRNA	C (ng/µl)
JQ 01 R	42
JQ 02 R	32,8
JQ 03 R	37,3
JQ 04 R	24,7
JQ 05 R	26,1
JQ 06 T	33,8
JQ 07 T	24,8
JQ 08 T	29,5
JQ 09 T	20,4
JQ 10 T	34
JQ 11 M	41,6
JQ 12 M	98,7
JQ 13 M	47,2
JQ 14 M	32,6
JQ 15 M	19,4
Branco	Out of range (<0,05)

Amostras eRNA	C (ng/µl)
RE 01 R	27,1
RE 02 R	15,5
RE 03 R	12,8
RE 04 R	17,9
RE 05 R	12,5
RE 06 T	16
R 07 T	16,2
RE 08 T	23,5
RE 09 T	26,9
RE 10 T	33,4
RE 11 M	70,6
RE 12 M	46,6
RE 13 M	70,3
RE 14 M	75,7
RE 15 M	77,3
Branco	Out of range (<0,05)

Tabela 8: Concentração em ng/µl das amostras extraídas de eDNA do período de inverno. “JQ”, representado em azul, indica as amostras do rio Juquiriquerê e “RE” em vermelho, as amostras do rio Escuro. “R”, “T” e “M” representam, respectivamente, Rio, Transição e Mar.

Inverno - eDNA

Amostras eDNA	Filtro	C (ng/µl)
JQ 05 R	*Sterivex*™	4,59
JQ 06 R	*Sterivex*™	5,29
JQ 07 R	*Sterivex*™	9,70
JQ 08 R	*Sterivex*™	4,07
JQ 09 T	*Sterivex*™	4,77
JQ 10 T	*Sterivex*™	5,63
JQ 11 T	*Sterivex*™	3,91
JQ 12 T	*Sterivex*™	4,59

Amostras eDNA	Filtro	C (ng/µl)
RE 01 R	Nitrocelulose	0,749
RE 02 R	Nitrocelulose	0,959
RE 03 R	Nitrocelulose	0,714
RE 04 R	Nitrocelulose	0,615
RE 05 R	Nitrocelulose	3,94
RE 07 T	Nitrocelulose	0,717
RE 08 T	Nitrocelulose	1,12
RE 09 T	Nitrocelulose	0,553

JQ 01 M	*Sterivex*™	6,22
JQ 02 M	*Sterivex*™	3,80
JQ 03 M	*Sterivex*™	4,60
JQ 04 M	*Sterivex*™	4,90

RE 10 T	*Sterivex*™	3,11
RE 11 T	*Sterivex*™	4,2
RE 12 M	Nitrocelulose	1,32
RE 13 M	Nitrocelulose	1,74
RE 14 M	Nitrocelulose	1,56
RE 15 M	*Sterivex*™	3,74
RE 16 M	*Sterivex*™	5,10

Tabela 9: Concentração em ng/µl das amostras extraídas de eDNA do período de verão. "JQ", representado em azul, indica as amostras do rio Juqueriquerê e "RE" em vermelho, as amostras do rio Escuro. "R", "T" e "M" representam, respectivamente, Rio, Transição e Mar.

Verão – eDNA

Amostras eDNA	C (ng/µl)
JQ 01 R	Out of range (<0,05)
JQ 02 R	0,061
JQ 03 R	0,051
JQ 04 R	Out of range (<0,05)
JQ 05 R	0,083
JQ 06 T	0,577
JQ 07 T	0,476
JQ 08 T	0,259
JQ 09 T	0,258
JQ 10 T	0,184
JQ 11 M	0,457
JQ 12 M	2,99
JQ 13 M	0,223
JQ 14 M	0,472
JQ 15 M	0,427
Branco	0,061

Amostras eDNA	C (ng/µl)
RE 01 R	4,97
RE 02 R	3,56
RE 03 R	5,69
RE 04 R	1,82
RE 05 R	3,24
RE 06 T	2,16
R 07 T	2,68
RE 08 T	2,83
RE 09 T	1,3
RE 10 T	1,82
RE 11 M	2,75
RE 12 M	4,83
RE 13 M	0,214
RE 14 M	0,271
RE 15 M	0,366
Branco	0,168

Observamos que as amostras de eDNA extraídas em Ubatuba utilizando filtros *Sterivex*™ apresentaram maiores valores de concentração de eDNA total, mesmo com volume inferior de água filtrada quando comparado com o volume total filtrado à vácuo (1L), contrastando com o que observamos nos testes piloto de padronização em laboratório, em que as amostras utilizando diferentes tipos de filtro apresentaram concentrações similares.

Em relação à comparação eRNA/eDNA, embora a diluição de eDNA após o processo de extração tenha sido em maior volume final (100µl) em comparação com eRNA (40µl), a concentração de eRNA se mostrou consideravelmente superior. Após o processo de DNAse e

cDNA, algumas amostras de eRNA foram novamente quantificadas e também apresentaram valores satisfatórios de concentração (3.88-14.6 ng/µl). Realizamos também a concentração a vácuo das amostras extraídas de eDNA, otimizando o uso de menor quantidade de eDNA para a PCR.

As amostras de eDNA do Juqueriquerê do período de verão apresentaram valores baixos de concentração quando comparado as amostras do rio Escuro e as demais amostras de inverno, e foram reconcentradas. Ainda assim, as amostras JQ 01 RV, JQ 04 RV, JQ 05 RV e JQ 10 VT não obtiveram valores satisfatórios de concentração e pureza para as próximas etapas de experimento.

As demais amostras apresentaram concentração suficiente e pureza satisfatória para permitir prosseguir com as próximas etapas (Spens *et al.*, 2017; Majaneva *et al.*, 2018).

4.3 Amplificação do gene 12S e análise de integridade

Após sucessivas amplificações, obtivemos sucesso na amplificação de 20 amostras utilizando a *Taq Platinum,* com valores adequados de concentração e pureza e visualizadas em gel de agarose ao longo do processo (**Figura 14**). Todas as amostras amplificadas foram referentes a coleta nos meses de inverno, sendo 12 amostras de eDNA do rio Juqueriquerê, 3 amostras de eDNA do rio Escuro e 5 amostras de eRNA do rio Escuro (**Tabela 10).** Após nova amplificação com enzima de alta fidelidade e purificação com AMPure, assim como no processo de indexação, visualizamos novamente os produtos em gel de agarose (**Figura 15**), constatando integridade suficiente para prosseguir para as próximas etapas.

Tabela 10: Amostras com sucesso de amplificação e suas respectivas concentrações após a PCR. As amostras "JQ" em azul são referentes ao Juqueriquerê e as amostras "RE", em vermelho, ao rio Escuro.

Amostra	Origem	Concentração (ng/ul)
JQ01	eDNA	78,5
JQ02	eDNA	74,6
JQ03	eDNA	76,3
JQ04	eDNA	103
JQ05	eDNA	97,1
JQ06	eDNA	100
JQ07	eDNA	106
JQ08	eDNA	83,3
JQ09	eDNA	65,4
JQ10	eDNA	76,7

JQ11	eDNA	69,8
JQ12	eDNA	71,3
RE10	eDNA	62,1
RE15	eDNA	58,1
RE16	eDNA	64,3
RE02	eRNA	75,7
RE03	eRNA	67
RE04	eRNA	72,9
RE05	eRNA	72,1
RE06	eRNA	73,1

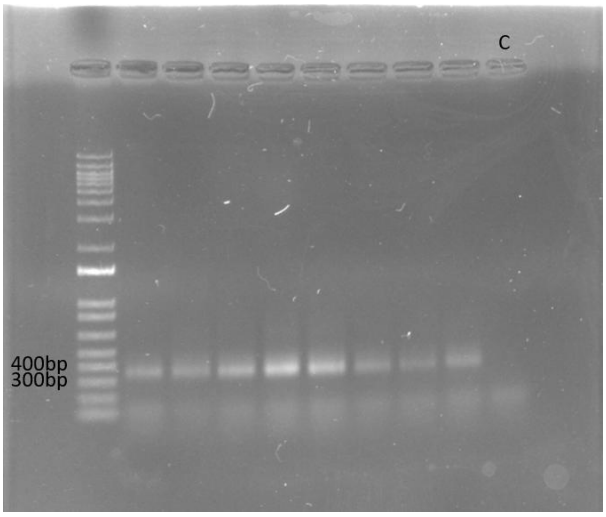


Figura 14: Primeiras amplificações do gene 12S demonstrando o tamanho de fragmento antes da segunda PCR. Imagem feita antes dos processos de purificação. Utilizamos 1Kb Plus DNA Ladder e colocamos amostra em branco em todas as amplificações como grupo controle.

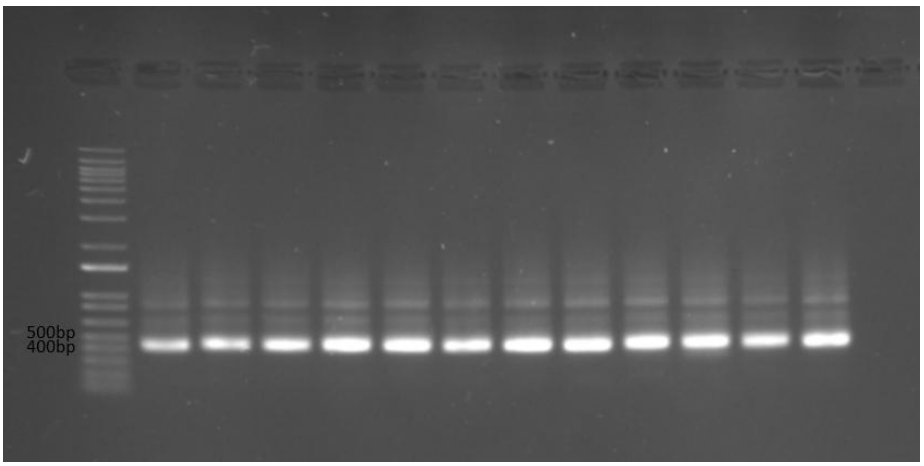


Figura 15: Gel de agarose após segunda PCR do gene 12S utilizando enzima de alta fidelidade e purificação com *beads*. Utilizamos 1Kb Plus DNA Ladder.

A partir dos resultados das amplificações, notamos que apenas as amostras do período de inverno obtiveram sucesso de amplificação, e nenhuma amostra do período de verão pôde ser visualizada em gel de agarose. Considerando fatores ambientais como determinantes na disponibilidade, abundância e degradação de nucleotídeos em amostras ambientais, a partir da literatura pressupomos que o período intenso de chuvas de verão possivelmente contribuiu para o aumento do volume de água e diluição do material genético, além de as altas temperaturas, que possivelmente influenciaram na aceleração da degradação do DNA, mesmo com o nosso controle de temperatura (Barnes *et al.*, 2014; Collins *et al.*, 2018).

As amostras de eDNA foram amplificadas com sucesso apenas com o uso de filtros do tipo *Sterivex,* que foram utilizados durante a primeira coleta da equipe no período de inverno. No caso de eRNA, apenas 5 amostras referentes ao rio Escuro da porção "rio" do período de inverno obtiveram sucesso de amplificação.

Notamos posteriormente, que após a primeira PCR utilizando *Taq Platinum*, os fragmentos de MiFish apresentaram tamanho esperado para a seleção de espécies alvo de peixes, próximo aos 300pb (Miya, Gotoh and Sado, 2020). No entanto, após padronizarmos as amostras íntegras com a enzima de alta fidelidade e realizarmos a segunda etapa da PCR, observamos os fragmentos com tamanho maior do que o esperado.

Acreditamos que para um melhor sucesso no sequenciamento de *amplicons* alvo, devemos posteriormente direcionar nossos experimentos para isolar o tamanho dos produtos da 2ª PCR em torno de 370 pb, usando eletroforese em gel com maior porcentagem de agarose e maior tempo de corrida, para melhor separação das bandas e remoção de bandas extras que ultrapassem os 400pb. Essas bandas podem ser indicativas de excesso de produtos não-alvo, considerando que em torno de 440 pb usualmente são *amplicons* do gene 12S rRNA de microrganismo, ou seja, causando um excesso de bactérias em nossas amostras (Gold *et al.*, 2020; Miya, Gotoh and Sado, 2020). Especialmente, esse cuidado pode ser necessário considerando que bandas extras são mais proeminentes e suscetíveis em águas sujeitas a efeitos antropogênicos, como estuários e corpos d'água próximos de grandes cidades, como no caso de nossas amostras do rio Juquiriquerê (Miya, Gotoh and Sado, 2020).

De fato, a partir dos resultados obtidos no *BioAnalyzer* e *TapeStation* (Agilent Technologies, Inc., San Diego, CA, EUA), constatamos tamanhos variados de fragmentos

amplificados, com picos de leitura por amostra variando de 300 até 470pb, podendo ser proveniente de contaminações (**Figuras 16, 17 e 18**).

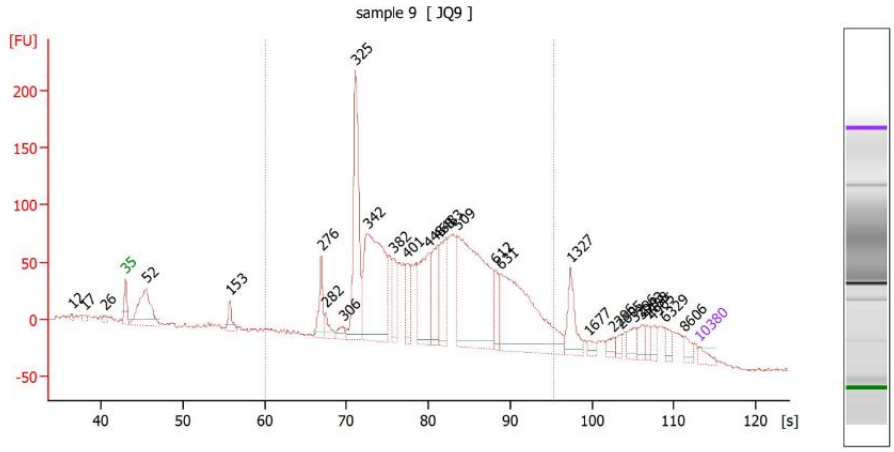


Figura 16: Resultado da amostra JQ09 obtido no *BioAnalyzer,* indicando a intensidade por tamanho do fragmento.

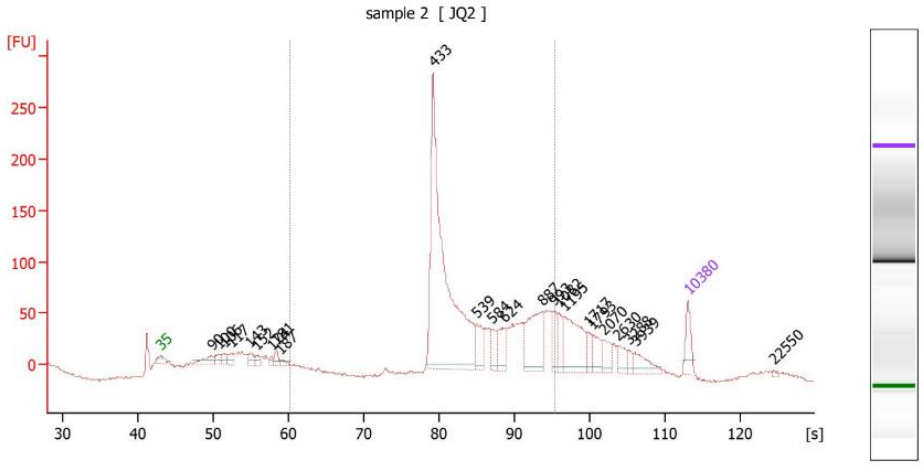


Figura 17: Resultado da amostra JQ12 obtido no *BioAnalyzer,* indicando a intensidade por tamanho do fragmento.

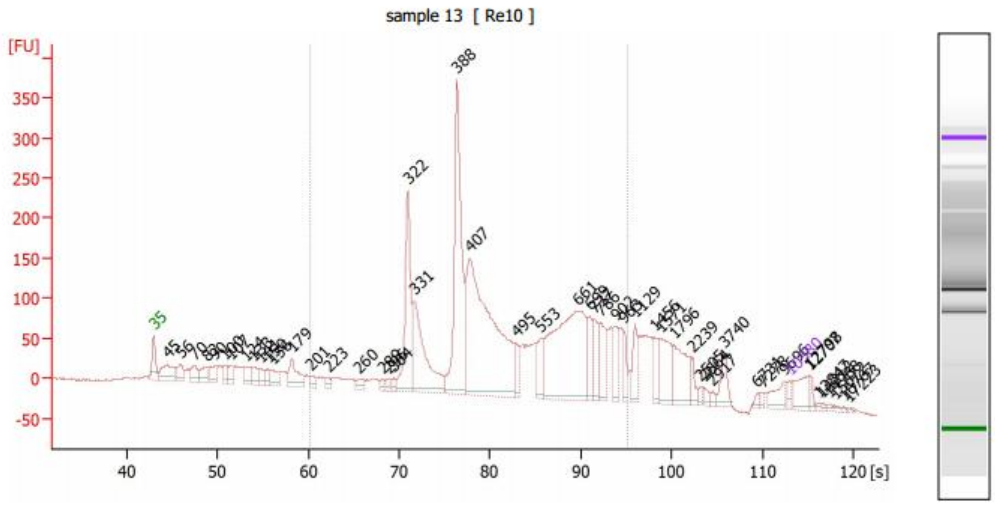


Figura 18: Resultado da amostra RE10 obtido no *BioAnalyzer,* indicando a intensidade por tamanho do fragmento.

4.4 Análise dos dados de Sequenciamento de Nova Geração

Obtivemos sucesso de sequenciamento em 18 amostras, sendo destas, 10 amostras de eDNA do rio Juqueriquerê (4 amostras da porção "mar", 4 amostras da porção "rio" e 2 amostras da porção "transição"), 5 amostras de eRNA do rio Escuro (todas referentes a porção "rio") e 3 amostras de eDNA do rio Escuro (1 amostra da porção "transição" e 2 amostras da porção "mar").

O processamento eficaz das amostras de Sequenciamento de Nova Geração é imprescindível para análises bem avaliadas dos conjuntos de dados obtidos. Comumente, as análises de sequências de baseiam em OTUs, onde as leituras obtidas das amostras ambientais a partir do sequenciamento são agrupadas em unidades taxonômicas operacionais (OTUs), usadas para classificar grupos intimamente relacionados, como uma aproximação bioinformática de uma espécie (Schloss and Westcott, 2011; Tikhonov, Leach and Wingreen, 2015; Forster *et al.*, 2019). As OTUs, no entanto, podem apresentar limitações se tratando de representar a real diversidade biológica. Dados de sequenciamento de alto rendimento naturalmente podem incluir sequências errôneas que diferem das sequências biológicas verdadeiras por uma ou algumas bases em posições aleatórias, geralmente causadas pela incorporação de bases incorretas pela DNA polimerase durante a amplificação e/ou sequenciamento de eDNA pelo MiSeq (Miya, Gotoh and Sado, 2020). Porém, além dos erros de sequenciamento e a própria variabilidade intraespecífica, que podem acabar por extrapolar o número de OTUs sem aumentar a capacidade de recuperar espécies, os agrupamentos

imprecisos de sequências são a maior causa da superestimação da real biodiversidade, ou até da subestimação, quando sequências de espécies diferentes são agrupadas em uma mesma OTU (Grattepanche *et al.*, 2014; Flynn *et al.*, 2015; Forster *et al.*, 2019). Sendo assim, há uma constante busca por agrupamentos eficazes e precisos de sequências obtidas para fornecer estimativas mais realistas da riqueza e diversidade de espécies das amostras analisadas.

Considerando tais problemáticas e a quantidade considerável de amplificações de DNAs não-alvo que obtivemos - possivelmente decorrentes de problemas com a temperatura ideal de anelamento nas PCRs que acabaram por favorecer a amplificação de bactérias ambientais - buscamos também uma abordagem favorável em reduzir ruídos. A estratégia utilizada nos permitiu inferir através de uma avaliação baseada em modelo estatístico de dados de NGS, quais diferenças de base da sequência representam variantes biológicas verdadeiras e quais representam erros de sequenciamento (Callahan, McMurdie and Holmes, 2017; Forster *et al.*, 2019). Utilizamos o Pipeline DADA2, apresentado por Callahan e colaboradores, com potencial de identificar variantes reais e produzir poucas sequências superestimadas falsas, trabalhando com variantes de sequência de amplicon (ASVs) para modelar e corrigir os erros de amplicons sequenciados pela Illumina (Callahan *et al.*, 2016; Nearing *et al.*, 2018; Miya, Gotoh and Sado, 2020; Minamoto *et al.*, 2021).

A partir do número total de ASVs, inferimos a quantidade referente a cada porcentagem de identificação por BLASTn, sendo a grande maioria identificada em uma porcentagem de 100% e permitindo chegarmos em nível de identificação de espécie (**Figura 19**).

A abundância relativa de cada espécie por amostra nos permite visualizar a representatividade de cada táxon em porcentagem para cada um dos pontos amostrados (**Figura 20**).

Considerando os peixes (Actinopterygii), pudemos também representar a riqueza de gêneros por amostra e comparar a diversidade de informações fornecidas por cada porção do estuário em cada rio, demonstrando maior riqueza na porção “rio” do rio Escuro e na porção “transição” do rio Juquiriquerê (**figura 21**).

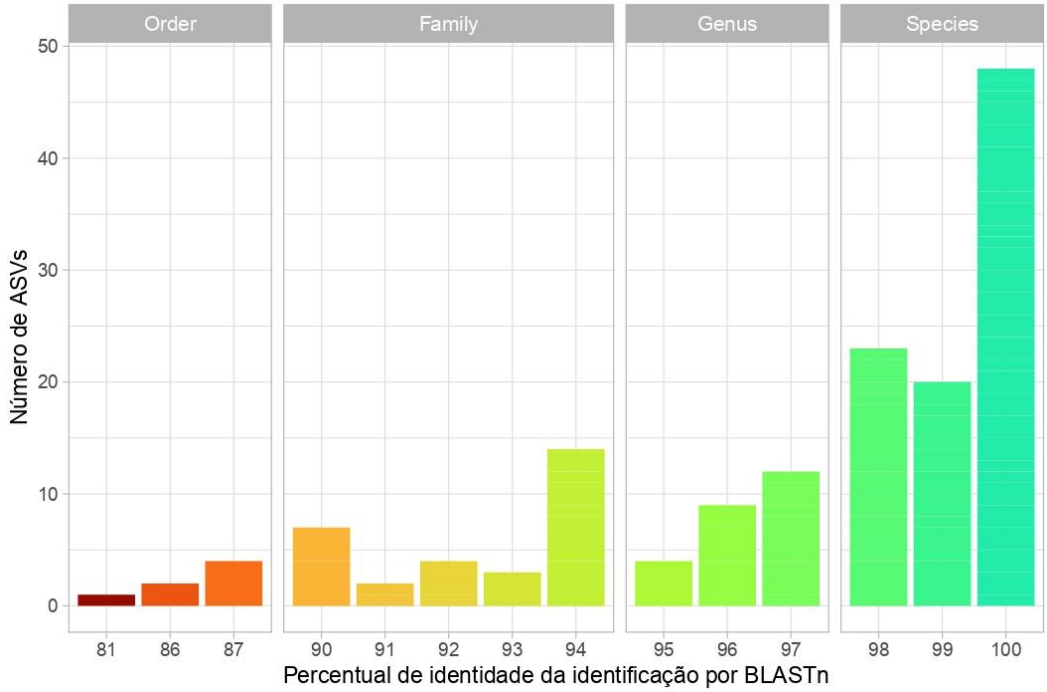


Figura 19: Número de ASVs e o respectivo porcentual de identidade de identificação por BLASTn.

LGC − eDNA_estuarios_UNESP − 2024−10−18

Abundância relativa de cada identificação obtida por BLASTn
IDs com BLASTn pseudo−score >= 80% e RRA >= 0.05%

Identification / Min BLASTn pseudo−score / Max BLASTn pseudo−score	JQ01	JQ02	JQ03	JQ04	JQ05	JQ06	JQ07	JQ08	JQ10	JQ12	RE02	RE03	RE04	RE05	RE06	RE10	RE15	RE16			
Menidia beryllina || 86.58 || 87.50										4.8 5.6			0.5 0.5		1.3 1.6	80.4 82.5			Atherinopsidae	Atheriniformes	Actinopteri
Tylosurus crocodilus || 97.41 || 99.40																	1.9 1.9				
Strongylura timucu || 98.18 || 98.22												0.3 0.3	4.5 4.5		1.9 1.9				Belonidae	Beloniformes	Actinopteri
Strongylura marina || 97.04 || 97.04																		9			
Hyporhamphus limbatus || 90.05 || 90.91																		10 9	Hemiramphidae	Beloniformes	Actinopteri
Salariopsis fluviatilis || 80.29 || 80.29										0.4 0.4									Blenniidae	Blenniiformes	Actinopteri
Trachinotus falcatus || 100.0 || 100.0				4.2 4.2														13.5 12.3			
Caranx latus || 100.0 || 100.0			5.8 5.7								0.9 0.9		0.3 0.3						Carangidae	Carangiformes	Actinopteri
Caranx hippos || 100.0 || 100.0														2.6 2.6							
Psalidodon aff. || 97.80 || 97.83				1.9 1.6					0.3 0.3	0.4 0.5	5.8 5.7	7 7.2	2.5 2.5								
Mimagoniates barberi || 97.04 || 97.11											1 1	0.7 0.7	0.5 0.5						Characidae	Characiformes	Actinopteri
Characidium sp. || 96.36 || 96.45											1.7 1.7	0.3 0.3							Crenuchidae	Characiformes	Actinopteri
Hoplias malabaricus || 100.0 || 100.0											4.6 4.7	14.1 15.2	2.9 2.9	4.4 4.3					Erythrinidae	Characiformes	Actinopteri
Prochilodus hartii || 100.0 || 100.0																		11.4 10.3	Prochilodontidae	Characiformes	Actinopteri
Oreochromis niloticus || 100.0 || 100.0							7.5 7.5		2.3 2.6												
Oreochromis aureus || 99.39 || 100.0			12.2 12.1							1.6 1.9									Cichlidae	Cichliformes	Actinopteri
Geophagus brasiliensis || 100.0 || 100.0		4.3 4.3						27.8 27.6	0.7 0.7	1.9 2.2		2.1 2			5.9 6.1					
Sardinella brasiliensis || 100.0 || 100.0									0.3 0.4	0.8 0.9									Clupeidae	Clupeiformes	Actinopteri
Anchoa tricolor || 100.0 || 100.0													0.8 0.8						Engraulidae	Clupeiformes	Actinopteri
Anchoa delicatissima || 98.26 || 98.26													0.4 0.4								
Pellona flavipinnis || 95.83 || 95.93									0.2 0.3	0.6 0.6									Pristigasteridae	Clupeiformes	Actinopteri
Danio rerio || 100.0 || 100.0					4.8 4.9														Danionidae	Cypriniformes	Actinopteri
Phalloceros uai || 92.28 || 97.81							5 5.2			0.8 1	1.3 1.3								Poeciliidae	Cyprinodontiformes	Actinopteri
Phalloceros elachistos || 93.50 || 93.63												0.4 0.4									
Ulaema lefroyi || 100.0 || 100.0													23.3 23.2		1 1						
Eugerres plumieri || 97.65 || 98.24							1.5 1.5			1.3 1.5	55.8 55.8	36.1 31.8	19.6 19.7	53.7 53.1	64.2 64.6	2.9 3		33.7 30.7	Gerreidae	Gerreiformes	Actinopteri
Eucinostomus sp. || 100.0 || 100.0													8.4 8.4								
Eucinostomus melanopterus || 100.0 || 100.0												0.3 0.3	7.1 7.2	6 5.9		0.8 0.8					
Eucinostomus gula || 94.15 || 94.15													0.7 0.8								
Eleotris amblyopsis || 92.22 || 92.81											0.3 0.3	0.3 0.3							Eleotridae	Gobiiformes	Actinopteri
Dormitator maculatus || 93.63 || 100.0					25.8 26.2	6.2 6.2		7.7 7.6	0.2 0.2		0.4 0.4	0.3 0.3	0.6 0.5								
Evorthodus lyricus || 97.55 || 98.20											0.3 0.3	0.4 0.4	1.2 1.3	7.9 7.9	2.5 2.5				Gobiidae	Gobiiformes	Actinopteri
Ctenogobius shufeldti || 94.51 || 94.64	7.9 8		10.3 10.2			32.3 32.3	24.4 24.5	39.7 39.5	0.6 0.6	1.6 1.8	4.7 4.7	6 6.4	2.9 2.9	1.4 1.4	2.5 2.7						
Ctenogobius boleosoma || 96.93 || 97.01												0.2	6.5 6.5		1.5 1.5						
Bathygobius soporator || 97.63 || 97.63											0.8 0.8	1.3 1.4	1.9 1.9	9.8 10.2							
Awaous banana || 98.77 || 98.80					17.7 18						0.7 0.7	1.8 1.9	0.3 0.3								
Gymnotus carapo || 91.00 || 91.00												0.4 0.4							Gymnotidae	Gymnotiformes	Actinopteri
Anisotremus virginicus || 100.0 || 100.0																2.7 1.9			Haemulidae	Lutjaniformes	Actinopteri
Rhomboplites aurorubens || 99.42 || 99.42									0.3 0.3										Lutjanidae	Lutjaniformes	Actinopteri
Mugil platanus || 97.40 || 100.0	55.6 55.1	67.4 67.3	20.5 21	29.8 30	9.7 9.8	24.6 24.6	14.2 14.2	10.5 11	42.5 45.9	58.1 51	6.6 6.6	10.1 10.7	4.1 4.1	2.3 2.4	9.1 9.6	5.5 5.5	31.5 31.5		Mugilidae	Mugiliformes	Actinopteri
Mugil curema || 97.41 || 100.0											1.8 1.8	0.2 0.3	4.9 5		3.4 3.5						
Centropomus undecimalis || 100.0 || 100.0						21.5 21.5		12 11.9			0.7 0.7	0.2 0.2							Centropomidae	order of Neopterygii	Actinopteri
Centropomus parallelus || 99.42 || 100.0												0.2 0.2		3.3 3.3	1.9 2.2						
Umbrina roncador || 95.78 || 95.88																	42.2 42.2		Sciaenidae	order of Neopterygii	Actinopteri
Stellifer lanceolatus || 96.57 || 97.04		4.6 4.6								0.7							8.6 8.6	13.1 11.9			
Micropogonias furnieri || 100.0 || 100.0	3.4 3.4								1.8 2	2.3 2.7	0.6 0.6		0.9 1								
Menticirrhus americanus || 99.40 || 99.40									1.1 1.2												
Cynoscion nothus || 97.02 || 97.02									0.4 0.4												
Cynoscion leiarchus || 100.0 || 100.0									2.3 2.5												
Trinectes maculatus || 98.25 || 98.28															0.9 0.9				Achiridae	Pleuronectiformes	Actinopteri
Citharichthys spilopterus || 90.30 || 90.53										1.1 1.3			0.4						Cyclopsettidae	Pleuronectiformes	Actinopteri
Salmo salar || 100.0 || 100.0										0.9 1									Salmonidae	Salmoniformes	Actinopteri
Pomatomus saltatrix || 100.0 || 100.0										1.2 1.4									Pomatomidae	Scombriformes	Actinopteri
Trichiurus lepturus || 99.39 || 99.41							1.2 1.2												Trichiuridae	Scombriformes	Actinopteri
Plicofollis nella || 86.17 || 87.93				12.1 11.7															Ariidae	Siluriformes	Actinopteri
Genidens barbus || 99.40 || 100.0	25.8 26.1	11.6 11.6		24 24.1			39.1 39		43.3 38.4	14.2 16.7											
Scleromystax barbatus || 98.80 || 98.83										0.5 0.6	2.4 2.4	2.5 2.7	1 1						Callichthyidae	Siluriformes	Actinopteri
PREDICTED: Clarias gariepinus || 100.0 || 100.0			34 33.8		11.3 9.8	12.3 12.3	2.3 2.4		1.3 1.4	1.8 2.4									Clariidae	Siluriformes	Actinopteri
Pimelodella sp. || 93.41 || 93.41										0.4									Heptapteridae	Siluriformes	Actinopteri
Imparfinis stictonotus || 90.06 || 90.29											1.2 1.2		0.4 0.4								
Imparfinis sp. || 91.23 || 91.23											0.5										
Imparfinis cochabambae || 91.81 || 92.00												0.6 0.6									
Chasmocranus sp. || 90.86 || 90.86											0.5										
Schizolecis guntheri || 93.66 || 94.19												3 3.1							Loricariidae	Siluriformes	Actinopteri
Parotocinclus maculicauda || 93.66 || 94.19											4.1 4.1	9.3 9.9	2.4 2.6								
Kronichthys heylandi || 96.47 || 96.55		5.2 5.2								0.9 1.1											
Hypostomus ancistroides || 100.0 || 100.0				5.8 5.9																	
Hemipsilichthys papillatus || 96.49 || 96.57		4.9 4.9																			
Rhamdia quelen || 98.24 || 98.28									0.1 0.1	1 1.1									Pimelodidae	Siluriformes	Actinopteri
Equetus lanceolatus || 94.51 || 94.64									1.1 1.2												
Trichomycterus jacupiranga || 99.42 || 100.0	4.5 4.5											0.2 0.2							Trichomycteridae	Siluriformes	Actinopteri
Pagrus pagrus || 100.0 || 100.0		1.2 1.2	5.1 5.1	5.8 5.9					0.1 0.1										Sparidae	Spariformes	Actinopteri
Diplodus holbrookii || 100.0 || 100.0										1 1.2											
Synbranchus marmoratus || 94.44 || 94.44											0.8 0.8								Synbranchidae	Synbranchiformes	Actinopteri
Balistes capriscus || 100.0 || 100.0				3.7 3.7															Balistidae	Tetraodontiformes	Actinopteri
Sphoeroides parvus || 96.51 || 96.51															0.8 0.8			17.6 16	Tetraodontidae	Tetraodontiformes	Actinopteri
Rhinella ornata || 100.0 || 100.0												0.1							Bufonidae	Anura	Amphibia
Hylodes asper || 100.0 || 100.0											0.2 0.2								Hylodidae	Anura	Amphibia
Cairina moschata || 100.0 || 100.0									0.1 0.1										Anatidae	Anseriformes	Aves
Gallus gallus || 100.0 || 100.0											0.3 0.4	0.1 0.1							Phasianidae	Galliformes	Aves
Laterallus melanophaius || 99.44 || 99.44									0.3 0.4										Rallidae	Gruiformes	Aves
Gallinula chloropus || 99.44 || 99.44									0.2 0.3												
Nycticorax nycticorax || 100.0 || 100.0											0.8 0.8	0.1 0.1							Ardeidae	Pelecaniformes	Aves
Podilymbus podiceps || 100.0 || 100.0												0.4 0.4							Podicipedidae	Podicipediformes	Aves
Phalacrocorax brasilianus || 100.0 || 100.0							1.8 1.8												Phalacrocoracidae	Suliformes	Aves
Rhizoprionodon longurio || 97.79 || 97.79										0.8 0.9									Carcharhinidae	Carcharhiniformes	Chondrichthyes
Prionace glauca || 100.0 || 100.0											0.3 0.3				1.1 1.1						
Bos taurus || 99.40 || 100.0	2.8 2.8			7.2 7.3	6.5 6.6				0.4 0.5	1.1 1.3									Bovidae	Artiodactyla	Mammalia
Sus scrofa || 100.0 || 100.0												0.1 0.1							Suidae	Artiodactyla	Mammalia
Canis lupus || 100.0 || 100.0						3.1 3.1		2.4 2.4	0.1 0.1										Canidae	Carnivora	Mammalia
Homo sapiens || 100.0 || 100.0		0.9 0.9	12.2 12.1	5.6 5.6	24.2 24.6		3 3			0.5 0.6	1 1	0.8 1.1	1.1 1.1	8.6 8.7	1.9	7.6 6.3	15.9 15.9	0.7 0.7	Hominidae	Primates	Mammalia
Peromyscus aztecus || 90.59 || 91.72											0.3 0.3	0.2 0.2							Cricetidae	Rodentia	Mammalia
Hydrochoerus hydrochaeris || 100.0 || 100.0												0.1 0.1							Hydrochaeridae	Rodentia	Mammalia

MiFish MiFishE

Pontos de coleta

Abundância relativa na amostra (%)

0.250 1.000 2.500 5.000 10.000 25.000 50.000

Figura 20: Abundância relativa da espécie em cada amostra, representada em porcentagem.

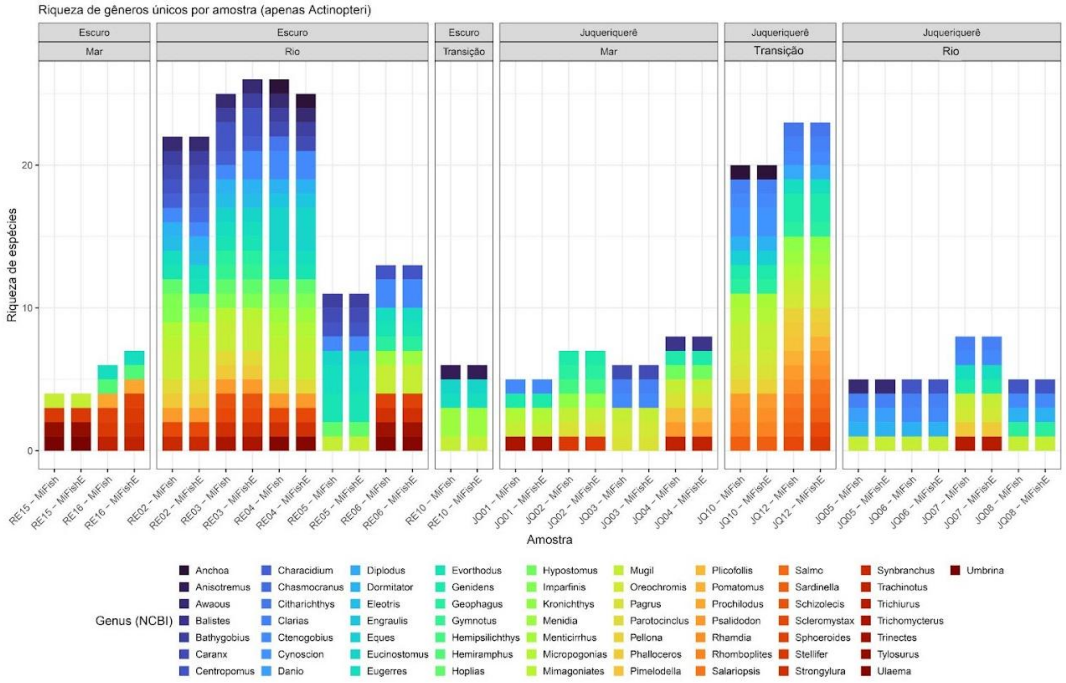


Figura 21: Riqueza de gêneros únicos de Actinopterigii por amostra.

Todas as amostras referentes ao rio Juqueriquerê apresentaram abundância considerável de tainha (*Mugil platanus*), variando de 9,7% de abundância relativa no ponto JQ5, até 67,4% de abundância relativa no ponto JQ2. As amostras do rio Escuro também identificaram a presença de tainha, embora em menor abundância, incluindo outra espécie do gênero *Mugil*, o parati (*Mugil curema*), com o ponto Re15 da porção "mar", apresentando 31,5% de abundância relativa. O resultado corrobora com o esperado, uma vez que a tainha é considerada uma das espécies pelágicas mais abundantes em regiões costeiras de água rasa e em estuários do estado de São Paulo, sendo um grande alvo da pesca, em especial a pesca artesanal no litoral do estado, com a maior parte das capturas ocorrendo nos meses de inverno (junho a agosto), coincidindo com o período de coleta das nossas amostras (Miranda and Carneiro, 2007).

As amostras JQ1, JQ2, JQ4, JQ7, JQ10 e JQ12 apresentaram grande abundância de bagre-branco (*Genidens barbus*), espécie também coletada por nossa equipe e por pescadores locais e identificada morfologicamente. O bagre-branco habita regiões estuarinas e rios,

principalmente em águas de fundo raso e lodoso, e no Brasil ocorre do estado da Bahia até o Rio Grande do Sul (Ribeiro, 2011; Avigliano, Velasco e Volpedo, 2015).

Diversas espécies não-alvo também foram identificadas, incluindo humanos e animais domésticos, resultado esperado principalmente no rio Juqueriquerê, com uma visível ocupação antrópica ao redor e habitações domésticas com criação de animais. Nas amostras do rio Juqueriquerê foram detectados humanos (*Homo sapiens*), gado (*Bos taurus*) e cães domésticos (*Canis lupus*). O rio Escuro apresentou, embora em baixa abundância, a presença de aves domésticas (*Gallus gallus*) e suínos (*Sus scrofa*), possivelmente devido a alguns raros assentamentos locais próximos ao rio, além também da abundância considerável de *Homo sapiens* na maioria das amostras, o que pode também ser proveniente de contaminação cruzada pela nossa equipe.

Possivelmente pela degradação de amostras ou pela ausência de sequências de referência nos bancos de dados, diversas espécies foram "erroneamente identificadas", apresentando porcentagens mais baixas de correspondência por BLASTn. O rio Juqueriquerê apresentou 0,8% de abundância relativa de tubarão-bico-fino-do-Pacífico (*Rhizoprionodon longurio),* uma espécie que não ocorre no Brasil. O score máximo de BLASTn, no entanto, foi de 97,79%, tornando possível extrapolarmos a identificação a nível de gênero, principalmente considerando a proximidade dos carcharinídeos do gênero *Rhizoprionodon* e a presença abundante de *Rhizoprionodon lalandii* na costa brasileira, com destaque para o litoral do estado de São Paulo, onde a espécie é o maior alvo de pesca dentre os tubarões para consumo de cação (Motta et al., 2005; Mendonça et al., 2009; Ussami, 2015). O mesmo ocorre com *Anchoa delicatissima*, uma espécie que ocorre na costa da Califórnia e foi identificada em uma das amostras de eRNA do rio Escuro. No entanto, avaliando o *score* máximo de identificação de 98,26%, pressupomos o erro de identificação causado pela presença de material genético degradado, principalmente considerando que nessa mesma amostra tivemos um *score* máximo de identificação de 100% de *Anchoa tricolor*, uma espécie de anchova que ocorre na costa brasileira.

Destacamos também a presença de duas espécies invasoras de tilápia, a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) e a tilápia-azul (*Oreochromis aureus*) no rio Juqueriquerê. Em uma conversa informal de nossa equipe com pescadores locais, já havíamos sido informados da frequente pesca de tilápia no local, fato posteriormente corroborado pelos nossos dados. Nos últimos anos, cresce a preocupação da expansão da ocupação da tilápia no Brasil, difundida

principalmente pela aquicultura. Sendo tipicamente de água-doce, recentemente os Tilapiine têm demonstrado potencial de se espalhar por ecossistemas marinhos, sendo notificados em água salobra e salina em diversas regiões do Brasil, incluindo o sudeste (Forneck et al., 2021; Franco et al., 2024). A situação levanta preocupações quanto ao licenciamento de projetos de aquicultura em rios e estuários, já que a tilápia pode afetar significativamente espécies nativas, incluindo o acará (*Geophagus brasiliensis*), outro ciclídeo bastante comum em regiões de rios e estuários, e também identificado em nossas amostras, tanto no rio Juqueriquerê quanto no rio Escuro. A preocupação a longo prazo é que com a sobreposição de nicho entre as duas espécies e uma tendência de comportamento agressivo da tilápia em comparação com o acará, haja uma redução da viabilidade populacional das espécies nativas e exclusão competitiva (Linde-Arias *et al.*, 2008; Sanches *et al.*, 2012). Além da tilápia, em 6 das 12 amostras do rio Juqueriquerê, detectamos a presença do bagre-africano (*Clarias gariepinus*), com alta abundância na amostra JQ03. O bagre-africano também é uma espécie invasora que se espalhou por diversos rios brasileiros e visado pela aquicultura, que além de excelente predador e competidor com espécies nativas por recursos, é um peixe com capacidade de ampla tolerância a ambientes antropizados, especialmente por condições fisiológicas associadas ao trato respiratório da espécie que permitem que consiga respirar em locais com baixa oxigenação e qualidade ruim da água (Moreira and Silva, 2023).

Comumente se tratando de eDNA, sabemos que a contaminação é um grande desafio, podendo ocorrer em todas as etapas dos protocolos de laboratório, incluindo coleta, extração, amplificação e construção de biblioteca de eDNA, e sendo as coletas em campo as etapas mais críticas de contaminação cruzada (Xing *et al.*, 2022). Todos os devidos cuidados foram tomados pela equipe durante as etapas de coleta e extração, incluindo esterilização de acordo com o descrito por protocolos e a adição de controle negativo. Ainda assim, a contaminação em ambiente de laboratório é altamente provável, especialmente com a alta frequência de PCR, com diversos trabalhos sugerindo a separação física de laboratórios designados apenas para experimentos de eDNA, com procedimentos rigorosos de descontaminação e que a separação de laboratórios pré e pós-PCR seja seguida para limitar a contaminação cruzada (Thomsen and Willerslev, 2015; Xing *et al.*, 2022). Considerando que todas as demais etapas foram realizadas em ambiente separado com capela de fluxo laminar, acreditamos que durante nossa etapa de PCRs tivemos a contaminação cruzada de duas das amostras. A amostra "JQ5", referente a porção "rio" do Juqueriquerê, apresentou 4,5% de abundância de *zebrafish* (*Danio rerio*), um modelo de pesquisa utilizado em nosso laboratório, com experimentos de coleta de tecido e

extração sendo realizados em nosso mesmo ambiente de trabalho, além de armazenamento em mesmo *freezer*. Ademais, a amostra "Re02" da porção "rio" do rio Escuro, apresentou a abundância relativa de 0,3% de tubarão-azul (*Prionace glauca*). Em se tratando de uma espécie pelágica de ocupação majoritariamente oceânica (Coelho *et al.*, 2018) e a natureza efêmera do eRNA, consideramos altamente provável a possibilidade de contaminação cruzada durante as PCRs das amostras de cDNA, especialmente pelo manuseio recente em laboratório de amostras de tubarão-azul.

Considerando coletas adjacentes por métodos tradicionais de levantamento (redes de espera, arrasto e picaré) realizadas em um trabalho paralelo de nosso laboratório, representamos em um diagrama de Venn a quantidade de espécies de Actinopterygii identificada por cada método de amostragem (filtramos as espécies considerando ID ≥ 98% e presença confirmada da espécie já descrita no Brasil) (**Figura 22**). Os peixes que foram identificados tanto utilizando eRNA quanto eDNA no rio Escuro foram as seguintes espécies: Mojarra-listrada (*Eugerres plumieri*), Guavina-do-Atlântico (*Dormitator maculatus*), Tainha (*Mugil platanus*), Robalo-branco (*Centropomus undecimalis*), Corvina (*Micropogonias furnieri*) e Coridora-bandata (*Scleromystax barbatus*). As espécies que foram identificadas a partir de eDNA e também tiveram exemplares coletados foram o bagre-branco (*Genidens barbus*), presente no rio Escuro e no rio Juqueriquerê e a pescada (*Cynoscion spp.*), presente somente nas amostras do rio Juqueriquerê. Por fim, as espécies que foram amostradas utilizando todos os três métodos foram: Carapau (*Caranx latus*), Acará (*Geophagus brasiliensis*), Carapicu (*Eucinostomus melanopterus*) e Parati (*Mugil curema*).

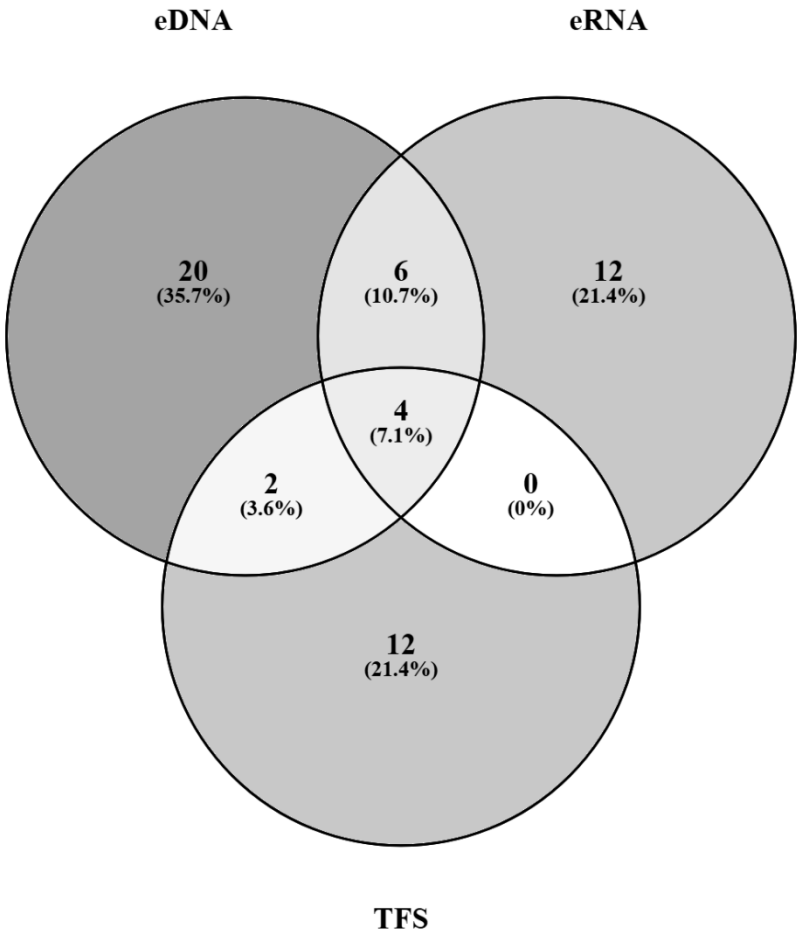


Figura 22: Diagrama de Venn representando o o número de espécies identificadas por cada uma das amostragens, eDNA, eRNA e a coleta por método tradicional de levantamento (Traditional Field Survey) e suas respectivas sobreposições de representação.

Por fim, os principais índices de diversidade referentes a ambos os rios, foram compilados nos gráficos *boxplots* abaixo (**Figura 23**). Considerando a média de espécies de cada rio, os valores mais altos de média observados referentes ao rio Escuro nos gráficos "*Observed*" "*Chao1*" e "*Shannon*", e o baixo valor observado em "*Simpson*", demonstra que em todos os parâmetros avaliados o rio Escuro apresentou uma maior diversidade de espécies em relação ao rio Juqueriquerê. Isso também demonstra um alto potencial do eRNA em fornecer dados de identificação de espécies, considerando também que a maior riqueza de espécies por porção de rio foi referente a porção "rio" do rio Escuro, justamente as amostras provenientes de eRNA.

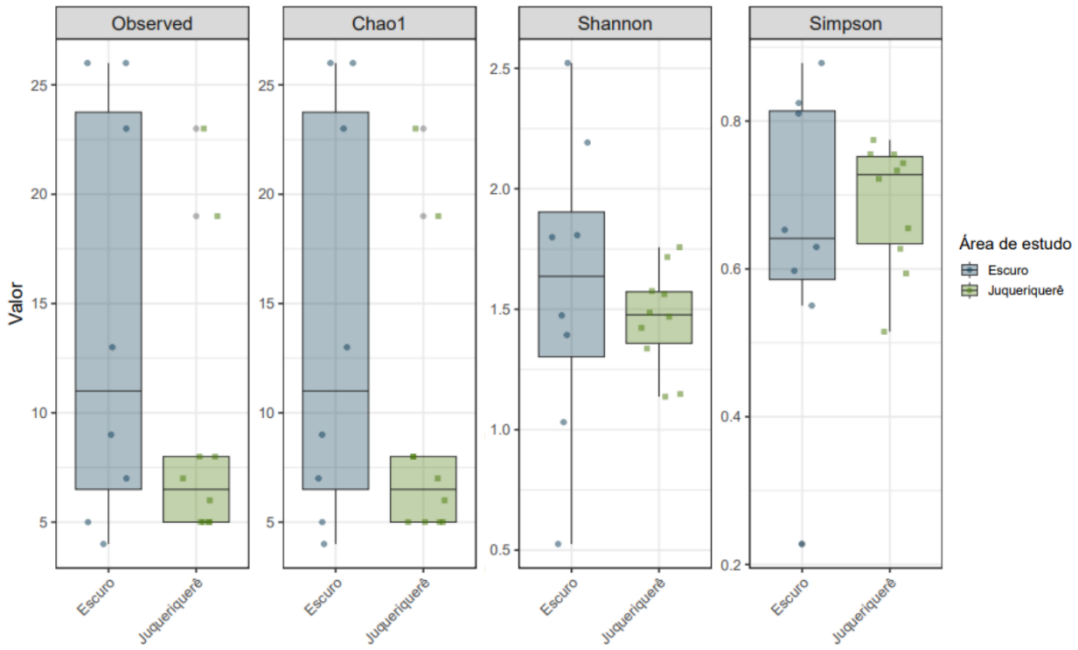


Figura 23: Cálculos de diversidade representando a comparação entre os rios Escuro e Juquiriquerê.

Embora as amostras com sucesso de amplificação não encerrem uma comparação definitiva entre as áreas, porções do rio e entre os métodos, principalmente devido à ausência de amostras sequenciadas de eRNA do rio Juquiriquerê e à baixa quantidade de amostras de eDNA do rio Escuro, as informações reunidas permitem um panorama geral da ictiofauna local. O estudo também nos permitiu demonstrar o potencial dos métodos utilizando eDNA e eRNA para identificação de espécies e para levantamentos de fauna, fornecendo informações inéditas sobre diversas espécies que seriam de difícil captura com as técnicas que utilizamos (picaré e arrasto). Nossas amostras provenientes de eRNA foram responsáveis por fornecer uma grande riqueza de espécies, constatando que o eRNA é suficientemente presente e persistente no ambiente para ser uma ferramenta de monitoramento, destacando seu potencial de ser associado ao eDNA e detectar organismos metabolicamente ativos (Yates et al., 2021; Stevens and Parsley, 2023). Acreditamos ser esta a primeira análise de eRNA bem-sucedida realizada por pesquisadores no país.

Ainda assim, destacamos a importância das técnicas tradicionais de levantamento, que nos forneceram informações sobre espécies que não foram detectadas pelas técnicas ambientais, sendo essenciais para confirmar a real ocorrência de uma espécie e esquivar-se da detecção de falsos positivos pelo eDNA, além de suprir a limitação enfrentada pelo uso do gene 12S em áreas megadiversas que possuem espécies não representadas em bancos de dados (Zainal Abidin *et al.*, 2022). Além disso, a extração de DNA dos tecidos provenientes das coletas de

peixes nos permitiu a obtenção de sequências 12S de referência que serão usadas para enriquecer os bancos de dados.

Parâmetros ambientais associados aos dados de eDNA também podem ser úteis na avaliação de níveis de antropização e sua relação com a abundância de espécies. Embora não tenhamos amostras suficientes para uma correlação estatística, visualmente constatamos uma maior riqueza de espécies no rio Escuro, menos eutrófico. O rio Juqueriquerê, além de menor abundância de espécies, também apresentou a detecção de tiápia-do-nilo e diversas detecções de espécies associadas a ambientes urbanizados, demonstrando que eDNA pode ser utilizado para a detecção precoce de espécies invasoras. Ainda assim, tal relação entre antropização e riqueza de espécies deve ser vista com cautela, considerando que nossas amostras de eRNA apresentaram um maior potencial de identificação de espécies e foram também o maior grupo sequenciado do rio Escuro. Adicionalmente os ambientes estuarinos avaliados, embora componentes da Mata Atlântica, poderiam naturalmente apresentar riqueza de espécies prévia diferenciada, independentemente da ação antrópica. Infelizmente não há registros de dados históricos pregressos sobre a biodiversidade que nos permitam tecer maiores comparações pregressas.

Por fim, o uso de técnicas de amostragem combinadas se mostra um retrato ideal, otimizando as desvantagens de cada técnica e permitindo um retrato mais exato da composição faunística local.

5. Conclusão

A partir de nossas análises, concluímos que o eRNA e o eDNA tem potencial de serem amplamente utilizados como ferramentas para o monitoramento de fauna. Embora apresentem suas desvantagens, como a necessidade de bancos de dados bem estabelecidos, os cuidados com a contaminação, a baixa estabilidade de eRNA e a limitação de eDNA em fornecer informações sobre populações e status de indivíduos dentro de uma população, ambos demonstraram ser eficientes em abordagens *metabarcoding*, sendo não-invasivos e permitindo uma grande detecção de espécies a partir de poucas amostras em pouco tempo.

Concluímos também que o uso combinado de métodos de levantamento faunístico diminui as limitações de cada técnica e representam de forma acurada a composição de espécies, principalmente com eRNA e sua detecção de organismos ativos, representando um retrato fiel da fauna viva em determinado espaço-tempo.

6. Referências

Adamo, M. *et al.* (2020) 'Metabarcoding on both environmental DNA and RNA highlights differences between fungal communities sampled in different habitats', *PLoS ONE*, 15(12 December). doi: 10.1371/journal.pone.0244682.

Aguiar, L. de S., Amaro, V. E. and Araújo, P. V. D. N. (2018) 'Half a century of the forest code and its consequences in areas of permanent preservation in the hyper-saline estuary in the Brazilian Semiarid', *Anuario do Instituto de Geociencias*, 41(2), pp. 191–210. doi: 10.11137/2018_2_191_210.

Akin, S. *et al.* (2005) 'Fish assemblage structure of Koycegiz Lagoon-Estuary, Turkey: Spatial and temporal distribution patterns in relation to environmental variation', *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 64(4). doi: 10.1016/j.ecss.2005.03.019.

Albert, J. S., Tagliacollo, V. A. and Dagosta, F. (2020) 'Diversification of Neotropical Freshwater Fishes', *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. doi: 10.1146/annurev-ecolsys-011620-031032.

Alcaraz, C., Vila-Gispert, A. and García-Berthou, E. (2005) 'Profiling invasive fish species: The importance of phylogeny and human use', *Diversity and Distributions*, 11(4). doi: 10.1111/j.1366-9516.2005.00170.

Almerón-Souza, F. *et al.* (2018) 'Molecular identification of shark meat from local markets in Southern Brazil based on DNA barcoding: Evidence for mislabeling and trade of endangered species', *Frontiers in Genetics*, 9(APR). doi: 10.3389/fgene.2018.00138.

Alves, H. *et al.* (2022) *Monitoramento da erosão hídrica no Brasil: dos métodos manuais aos digitais*.

Ambardar, S. *et al.* (2016) 'High Throughput Sequencing: An Overview of Sequencing Chemistry', *Indian Journal of Microbiology*. doi: 10.1007/s12088-016-0606-4.

APHA (2005) 'Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater', *Standard Methods*. doi: ISBN 9780875532356.

Avigliano, E., Velasco, G. and Volpedo, A. V. (2015) 'Assessing the use of two southwestern Atlantic estuaries by different life cycle stages of the anadromous catfish Genidens barbus (Lacépède, 1803) as revealed by Sr: Ca and Ba: Ca ratios in otoliths', *Journal of Applied Ichthyology*, 31(4). doi: 10.1111/jai.12766.

Barletta, M. *et al.* (2008) 'Factors affecting seasonal variations in demersal fish assemblages at an ecocline in a tropical-subtropical estuary', *Journal of Fish Biology*, 73(6). doi: 10.1111/j.1095-8649.2008.02005.

Barnes, M. A. *et al.* (2014) 'Environmental conditions influence eDNA persistence in aquatic systems', *Environmental Science and Technology*, 48(3). doi: 10.1021/es404734p.

Barnes, M. A. and Turner, C. R. (2016) 'The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics', *Conservation Genetics*. doi: 10.1007/s10592-015-0775-4.

Barrella, W. *et al.* (2014) 'Fishes of the southeastern Brazil Atlantic Forest', *Environmental Biology of Fishes*, 97(12). doi: 10.1007/s10641-014-0226-y.

Barreto, R. R. *et al.* (2017) 'Rethinking use and trade of pelagic sharks from Brazil', *Marine Policy*, 85. doi: 10.1016/j.marpol.2017.08.016.

Bernardino, A. F. *et al.* (2019) 'Chronic trace metals effects of mine tailings on estuarine assemblages revealed by environmental DNA', *PeerJ*, 2019(11). doi: 10.7717/peerj.8042.

Bertora, A. *et al.* (2022) 'Fish assemblage structure in a Neotropical urbanised prairie stream exposed to multiple natural and anthropic factors', *Ecology of Freshwater Fish*, 31(2). doi: 10.1111/eff.12625.

Bevilaqua, D. R. *et al.* (2020) 'FIRST ENVIRONMENTAL DNA (EDNA) RECORD OF CENTRAL AMAZON IN A FLOODPLAIN LAKE: EXTRACTION METHOD SELECTION AND VALIDATION / PRIMEIRO REGISTRO DE DNA AMBIENTAL (EDNA) DA AMAZÔNIA CENTRAL EM UM LAGO DE VÁRZEA:

SELEÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE EXTRAÇÃO', *Brazilian Journal of Development*, 6(11). doi: 10.34117/bjdv6n11-254.

Bohmann, K. *et al.* (2014) 'Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring', *Trends in Ecology and Evolution*. Elsevier Ltd, pp. 358–367. doi: 10.1016/j.tree.2014.04.003.

Borges, L. A. C., De Rezende, J. L. P. and Pereira, J. A. A. (2009) 'Evolução da legislação ambiental no Brasil', *Revista em Agronegocio e Meio Ambiente*.

Boulomytis, V. T. G., Zuffo, A. C. and Gireli, T. Z. (2017) 'Discretização espacial da bacia hidrográfica para análise da mudança do uso de solo em regiões costeiras', *Boletim de Ciencias Geodesicas*, 23(1), pp. 101–114. doi: 10.1590/S1982-21702017000100007.

Brandt, M. I. *et al.* (2020) 'An Assessment of Environmental Metabarcoding Protocols Aiming at Favoring Contemporary Biodiversity in Inventories of Deep-Sea Communities', *Frontiers in Marine Science*, 7. doi: 10.3389/fmars.2020.00234.

Bredin, Y. K. *et al.* (2022) 'Above- and below-ground biodiversity responses to the prolonged flood pulse in central-western Amazonia, Brazil', *Environmental DNA*, 4(3). doi: 10.1002/edn3.268

Budd, A. M. *et al.* (2023) 'Monitoring threatened species with environmental DNA and open ecological data: Local distribution and habitat preferences of scalloped hammerhead sharks (Sphyrna lewini)', *Biological Conservation*, 278. doi: 10.1016/j.biocon.2022.109881.

Burford, M. A. *et al.* (2008) 'Primary production and nutrients in a tropical macrotidal estuary, Darwin Harbour, Australia', *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 79(3). doi: 10.1016/j.ecss.2008.04.018.

Bürgmann, H. *et al.* (2003) 'mRNA extraction and reverse transcription-PCR protocol for detection of nifH gene expression by Azotobacter vinelandii in soil', *Applied and Environmental Microbiology*, 69(4). doi: 10.1128/AEM.69.4.1928-1935.2003.

Callahan, B. J. *et al.* (2016) 'DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data', *Nature Methods*, 13(7). doi: 10.1038/nmeth.3869.

Callahan, B. J., McMurdie, P. J. and Holmes, S. P. (2017) 'Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis', *ISME Journal*, 11(12). doi: 10.1038/ismej.2017.119.

Camacho-Oliveira, R. B. *et al.* (2020) 'DNA barcode reveals the illegal trade of rays commercialized in fishmongers in Brazil', *Forensic Science International: Synergy*, 2. doi: 10.1016/j.fsisyn.2020.02.002.

Capo, E. *et al.* (2020) 'Effects of filtration methods and water volume on the quantification of brown trout (Salmo trutta) and Arctic char (Salvelinus alpinus) eDNA concentrations via droplet digital PCR', *Environmental DNA*, 2(2). doi: 10.1002/edn3.52.

Caraguatatuba (2013) *Plano Municipal de Gestão Integrada de Resíduos Sólidos do Município de Caraguatatuba*.

Coelho, R. *et al.* (2018) 'Distribution patterns and population structure of the blue shark (Prionace glauca) in the Atlantic and Indian Oceans', *Fish and Fisheries*, 19(1). doi: 10.1111/faf.12238.

Coissac, E., Riaz, T. and Puillandre, N. (2012) 'Bioinformatic challenges for DNA metabarcoding of plants and animals', *Molecular Ecology*. doi: 10.1111/j.1365-294X.2012.05550

Collins, R. A. *et al.* (2019) 'Non-specific amplification compromises environmental DNA metabarcoding with COI', *Methods in Ecology and Evolution*, 10(11). doi: 10.1111/2041-210X.13276.

Collins, R. A. *et al.* (2018) 'Persistence of environmental DNA in marine systems', *Communications Biology*, 1(1). doi: 10.1038/s42003-018-0192-6.

Contente, R. F. and Rossi-Wongtschowski, C. L. del B. (2018) 'Comparing the use of beach seine and cast net at characterizing intertidal fish fauna structure of a subtropical bay', *Boletim do Instituto de Pesca*, 44(3). doi: 10.20950/1678-2305.2018.227.

Contente, R. F., Stefanoni, M. F. and Spach, H. L. (2011) 'Fish assemblage structure in an estuary of the Atlantic Forest biodiversity hotspot (southern Brazil)', *Ichthyological Research*, 58(1). doi: 10.1007/s10228-010-0192-0.

Cristescu, M. E. (2019) 'Can Environmental RNA Revolutionize Biodiversity Science?', *Trends in Ecology and Evolution*. doi: 10.1016/j.tree.2019.05.003.

Cristescu, M. E. and Hebert, P. D. N. (2018) 'Uses and misuses of environmental DNA in biodiversity science and conservation', *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. doi: 10.1146/annurev-ecolsys-110617-062306.

Dejean, T. *et al.* (2012) 'Improved detection of an alien invasive species through environmental DNA barcoding: The example of the American bullfrog Lithobates catesbeianus', *Journal of Applied Ecology*, 49(4). doi: 10.1111/j.1365-2664.2012.02171.

DiBattista, J. D. *et al.* (2020) 'Environmental DNA can act as a biodiversity barometer of anthropogenic pressures in coastal ecosystems', *Scientific Reports*, 10(1). doi: 10.1038/s41598-020-64858-9.

Dillenburg, S. R. and Hesp, P. a. (2009) *Geology and Geomorphology of Holocene Coastal Barriers of Brazil*, *Lecture Notes in Earth Sciences*.

Esteves, F. de A. (1988) *Fundamentos da Limnologia*, *Interciência, 2ª Ed., Rio de Janeiro; 1998*.

Evans, N. T. *et al.* (2016) 'Quantification of mesocosm fish and amphibian species diversity via environmental DNA metabarcoding', *Molecular Ecology Resources*, 16(1). doi: 10.1111/1755-0998.12433.

Evans, N. T. *et al.* (2017) 'Fish community assessment with eDNA metabarcoding: Effects of sampling design and bioinformatic filtering', *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 74(9). doi: 10.1139/cjfas-2016-0306.

Falkowski, M. de S. S. (2020) 'Elucidando a Identidade Das Girafas No Brasil: Uma Abordagem Molecular Multiloci Como Ferramenta Norteadora Para a Conservação Ex-Situ Das Espécies'.

Fairbridge, R. W. (1980) 'The Estuary: Its definition and geodynamic cycle', in *Chemistry and Biogeochemistry of estuaries*.

Favoretti, M. R. and Batalla, J. (2017) *Levantamento da avifauna no mangue do Rio Juqueriquerê, Caraguatatuba-SP*, *Batalla UNISANTA Bioscience*.

Feitosa, L. M. *et al.* (2018) 'DNA-based identification reveals illegal trade of threatened shark species in a global elasmobranch conservation hotspot', *Scientific Reports*, 8(1), pp. 1–11. doi: 10.1038/s41598-018-21683-5.

Fernandes, T. C. R. (2017) 'RELAÇÃO CUSTO/BENEFÍCIO DE MÉTODOS DE LEVANTAMENTO DE FAUNA SILVESTRE', *UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS CENTRO*, 549.

Ferreira Oliveira, S. *et al.* (2013) *AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CLOROFILA a E DO IET DURANTE O PERÍODO CHUVOSO NO RESERVATÓRIO DA USINA HIDRELÉTRICA BARRA DOS COQUEIROS-CAÇU GO*.

Ficetola, G. F. *et al.* (2008) 'Species detection using environmental DNA from water samples', *Biology Letters*, 4(4). doi: 10.1098/rsbl.2008.0118.

Flynn, J. M. *et al.* (2015) 'Toward accurate molecular identification of species in complex environmental samples: Testing the performance of sequence filtering and clustering methods', *Ecology and Evolution*, 5(11). doi: 10.1002/ece3.1497.

Forneck, S. C. *et al.* (2021) 'Aquaculture facilities drive the introduction and establishment of non-native Oreochromis niloticus populations in Neotropical streams', *Hydrobiologia*, 848(9). doi: 10.1007/s10750-020-04430-8.

Forster, D. *et al.* (2019) 'Improving eDNA-based protist diversity assessments using networks of amplicon sequence variants', *Environmental Microbiology*, 21(11). doi: 10.1111/1462-2920.14764.

Franco, A. C. S. *et al.* (2024) 'Tilapia venturing into high-salinity environments: A cause for concern?', *Aquatic Ecology*, 58(1). doi: 10.1007/s10452-023-10069-z.

Gadelha, L. M. R. *et al.* (2014) 'SiBBr : Uma Infraestrutura para Coleta , Integração e Análise de Dados sobre a Biodiversidade Brasileira', in *XXXIV Congresso da Sociedade Brasileira de Computação*. doi: 10.13140/2.1.3653.8246.

Galindo-Leal, C., de Gusmão Cãmara, I. and Sayre, D. (2003) 'The Atlantic Forest of South America: Biodiversity status, threats, and outlook', *Electronic Green Journal*. doi: 10.1007/s10980-005-1788-z.

Giovannoni, S. J. *et al.* (1990) 'Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton', *Nature*, 345(6270). doi: 10.1038/345060a0.

Giroux, M. S. *et al.* (2022) 'Environmental RNA as a Tool for Marine Community Biodiversity Assessments', *Scientific Reports*, 12(1). doi: 10.1038/s41598-022-22198-w.

Gold, Z. *et al.* (2020) 'FishCARD: Fish 12S California current specific reference database for enhanced metabarcoding efforts', *Authorea*.

Gonçalves, C. da S. *et al.* (2017) 'Identification key for fishes from coastal streams of the Atlantic forest of southeastern Brazil', *Biota Neotropica*, 17(4). doi: 10.1590/1676-0611-bn-2017-0377.

Grattepanche, J. D. *et al.* (2014) 'Diversity of diversity: Conceptual and methodological differences in biodiversity estimates of eukaryotic microbes as compared to bacteria', *Trends in Microbiology*. doi: 10.1016/j.tim.2014.04.006.

Hebert, P. D. N. *et al.* (2003) 'Biological identifications through DNA barcodes', *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270(1512). doi: 10.1098/rspb.2002.2218.

Hobbs, C. A. D. *et al.* (2019) 'Using DNA Barcoding to Investigate Patterns of Species Utilisation in UK Shark Products Reveals Threatened Species on Sale', *Scientific Reports*, 9(1). doi: 10.1038/s41598-018-38270-3.

Holmes, B. H., Steinke, D. and Ward, R. D. (2009) 'Identification of shark and ray fins using DNA barcoding', *Fisheries Research*, 95(2–3). doi: 10.1016/j.fishres.2008.09.036.

ICMBIO (2015) *Sumário Executivo do Plano de Ação Nacional para Conservação das Espécies Ameaçadas e de Importância Socioeconômica do Ecossistema Manguezal*.

Ikert, H. *et al.* (2021) 'High Throughput Sequencing of MicroRNA in Rainbow Trout Plasma, Mucus, and Surrounding Water Following Acute Stress', *Frontiers in Physiology*, 11. doi: 10.3389/fphys.2020.588313.

Jackson, J. B. C. *et al.* (2001) 'Historical overfishing and the recent collapse of coastal ecosystems', *Science*. doi: 10.1126/science.1059199.

Jerde, C. L. *et al.* (2011) '"Sight-unseen" detection of rare aquatic species using environmental DNA', *Conservation Letters*, 4(2). doi: 10.1111/j.1755-263X.2010.00158.

Jo, T. *et al.* (2022) 'Warm temperature and alkaline conditions accelerate environmental RNA degradation', *Environmental DNA*. doi: 10.1002/edn3.334.

Joly, C. A. *et al.* (2010) 'Biodiversity conservation research, training, and policy in são paulo', *Science*. doi: 10.1126/science.1188639.

Kandlikar, G. S. *et al.* (2018) 'Ranacapa: An R package and shiny web app to explore environmental DNA data with exploratory statistics and interactive visualizations .', *F1000Research*, 7. doi: 10.12688/f1000research.16680.1.

Kazanov, M. D., Vitreschak, A. G. and Gelfand, M. S. (2007) 'Abundance and functional diversity of riboswitches in microbial communities', *BMC Genomics*, 8. doi: 10.1186/1471-2164-8-347.

Kelly, R. P. *et al.* (2014) 'Harnessing DNA to improve environmental management', *Science*. doi: 10.1126/science.1251156.

Kumar, G. *et al.* (2022) 'One size does not fit all: Tuning eDNA protocols for high- and low-turbidity water sampling', *Environmental DNA*, 4(1). doi: 10.1002/edn3.235.

Laroche, O. *et al.* (2018) 'A cross-taxa study using environmental DNA/RNA metabarcoding to measure biological impacts of offshore oil and gas drilling and production operations', *Marine Pollution Bulletin*, 127. doi: 10.1016/j.marpolbul.2017.11.042.

Leão, Z. M. A. N. and Dominguez, J. M. L. (2000) 'Tropical coast of Brazil', *Marine Pollution Bulletin*. doi: 10.1016/S0025-326X(00)00105-3.

Lessa, G. C. *et al.* (2018) 'Brazilian Estuaries: A Geomorphologic and Oceanographic Perspective', in. doi: 10.1007/978-3-319-77779-5_1.

Levin, L. A. *et al.* (2001) 'The function of marine critical transition zones and the importance of sediment biodiversity', *Ecosystems*. doi: 10.1007/s10021-001-0021-4.

Li, J. *et al.* (2018) 'The effect of filtration method on the efficiency of environmental DNA capture and quantification via metabarcoding', *Molecular Ecology Resources*, 18(5). doi: 10.1111/1755-0998.12899.

Linde-Arias, A. R. *et al.* (2008) 'Invasive tilapia juveniles are associated with degraded river habitats', *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 18(6). doi: 10.1002/aqc.928.

Lines, R. *et al.* (2023) 'A large scale temporal and spatial environmental DNA biodiversity survey of marine vertebrates in Brazil following the Fundão tailings dam failure', *Marine Environmental Research*, 192. doi: 10.1016/j.marenvres.2023.106239.

Long, R. D., Charles, A. and Stephenson, R. L. (2017) 'Key principles of ecosystem-based management: the fishermen's perspective', *Fish and Fisheries*, 18(2). doi: 10.1111/faf.12175.

Lotze, H. K. *et al.* (2005) 'Human transformations of the Wadden Sea ecosystem through time: A synthesis', *Helgoland Marine Research*, 59(1), pp. 84–95. doi: 10.1007/s10152-004-0209-z.

Lotze, H. K. *et al.* (2006) 'Depletion degradation, and recovery potential of estuaries and coastal seas', *Science*, 312(5781). doi: 10.1126/science.1128035.

Lúcia, V. *et al.* (2005) *A história do Rio Juqueriquerê*.

Mächler, E. *et al.* (2016) 'Fishing in the Water: Effect of Sampled Water Volume on Environmental DNA-Based Detection of Macroinvertebrates', *Environmental Science and Technology*, 50(1). doi: 10.1021/acs.est.5b04188.

Mackinney, G. (1941) 'ABSORPTION OF LIGHT BY CHLOROPHYLL SOLUTIONS', *Journal of Biological Chemistry*, 140(2). doi: 10.1016/s0021-9258(18)51320-x.

Magris, R. A. and Barreto, R. (2010) 'Mapping and assessment of protection of mangrove habitats in Brazil', *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 5(4).

Magurran, A. E. (2021) 'Measuring biological diversity', *Current Biology*, 31(19). doi: 10.1016/j.cub.2021.07.049.

Malabarba, L. R. (2006) 'Peixes de Riachos da Mata Atlântica nas Unidades de Conservação do Vale do Rio Ribeira de Iguape no Estado de São Paulo', *Neotropical Ichthyology*, 4(3). doi: 10.1590/s1679-62252006000300012.

Mahon, A. R. *et al.* (2013) 'Validation of eDNA Surveillance Sensitivity for Detection of Asian Carps in Controlled and Field Experiments', *PLoS ONE*, 8(3). doi: 10.1371/journal.pone.0058316.

Majaneva, M. *et al.* (2018) 'Environmental DNA filtration techniques affect recovered biodiversity', *Scientific Reports*, 8(1). doi: 10.1038/s41598-018-23052-8.

Marins, R. V., Paula Filho, F. J. de and Rocha, C. A. S. (2007) 'Geoquímica de fósforo como indicadora da qualidade ambiental e dos processos estuarinos do Rio Jaguaribe - costa nordeste oriental brasileira', *Química Nova*, 30(5). doi: 10.1590/s0100-40422007000500029.

Marshall, N. T., Vanderploeg, H. A. and Chaganti, S. R. (2021) 'Environmental (e)RNA advances the reliability of eDNA by predicting its age', *Scientific Reports*, 11(1). doi: 10.1038/s41598-021-82205-4.

Matheson, C. D. *et al.* (2010) 'Assessing PCR inhibition from humic substances', *Open Enzyme Inhibition Journal*, 3(1). doi: 10.2174/1874940201003010038.

Maxwell, S. L. *et al.* (2020) 'Area-based conservation in the twenty-first century', *Nature*. Nature Research, pp. 217–227. doi: 10.1038/s41586-020-2773-z.

McMurdie, P. J. and Holmes, S. (2015) 'Shiny-phyloseq: Web application for interactive microbiome analysis with provenance tracking', *Bioinformatics*, 31(2). doi: 10.1093/bioinformatics/btu616.

Mendonça, F. F. *et al.* (2009) 'Populations analysis of the Brazilian sharpnose shark Rhizoprionodon lalandii (Chondrichthyes: Carcharhinidae) on the São Paulo coast, Southern Brazil: Inferences from mt DNA sequences', *Neotropical Ichthyology*, 7(2). doi: 10.1590/S1679-62252009000200012.

Menezes, N. A. (2011) 'Checklist dos peixes marinhos do Estado de São Paulo, Brasil', *Biota Neotropica*, 11(suppl 1). doi: 10.1590/s1676-06032011000500003.

Mercante, C. and Tucci-Moura, A. (1999) 'Comparação entre os índices de Carlson e de Carlson modificado aplicados a dois ambientes aquáticos subtropicais, São Paulo, SP', *Acta Limnologica Brasiliensia*, 11(1).

Meyer, C. P. and Paulay, G. (2005) 'DNA barcoding: Error rates based on comprehensive sampling', *PLoS Biology*, 3(12). doi: 10.1371/journal.pbio.0030422.

Milan, D. T. *et al.* (2020) 'New 12S metabarcoding primers for enhanced Neotropical freshwater fish biodiversity assessment', *Scientific Reports*, 10(1). doi: 10.1038/s41598-020-74902-3.

Minamoto, T. *et al.* (2021) 'An illustrated manual for environmental DNA research: Water sampling guidelines and experimental protocols', *Environmental DNA*. doi: 10.1002/edn3.121.

Miranda, L. V. and Carneiro, M. H. (2007) 'A pesca da tainha Mugil platanus(Perciformes: Mugilidae) desmbarcada no Estado de São Paulo subsídio ao ordenamento', *Série Relatórios Técnicos*, n.30, pp. 1–13.

Miya, M. *et al.* (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(7). doi: 10.1098/rsos.150088.

Miya, M. *et al.* (2016) 'Use of a filter cartridge for filtration of water samples and extraction of environmental DNA', *Journal of Visualized Experiments*, 2016(117). doi: 10.3791/54741.

Miya, M. (2022) 'Environmental DNA Metabarcoding: A Novel Method for Biodiversity Monitoring of Marine Fish Communities', *Annual Review of Marine Science*. doi: 10.1146/annurev-marine-041421-082251.

Miya, M., Gotoh, R. O. and Sado, T. (2020) 'MiFish metabarcoding: a high-throughput approach for simultaneous detection of multiple fish species from environmental DNA and other samples', *Fisheries Science*. doi: 10.1007/s12562-020-01461-x.

Miyata, K. *et al.* (2021) 'Fish environmental RNA enables precise ecological surveys with high positive predictivity', *Ecological Indicators*, 128. doi: 10.1016/j.ecolind.2021.107796.

Miyata, K. *et al.* (2022) 'Comparative environmental RNA and DNA metabarcoding analysis of river algae and arthropods for ecological surveys and water quality assessment', *Scientific Reports*, 12(1). doi: 10.1038/s41598-022-23888-1.

MMA (2006) 'Plano Estratégico Nacional de Áreas Protegidas - PNAP', pp. 1–44.

Moreira, E. A. and Silva, D. de P. (2023) 'A dozen fish: some exotic invasive species found in Brazilian waters

and their impacts', *Ciência Animal Brasileira*, 24. doi: 10.1590/1809-6891v24e-74647e.

Motta, F. S. *et al.* (2005) 'Size and sex compositions, length-weight relationship, and occurrence of the Brazilian sharpnose shark, Rhizoprionodon lalandii, caught by artisanal fishery from southeastern Brazil', *Fisheries Research*, 74(1–3). doi: 10.1016/j.fishres.2005.03.010.

Mulero, S. *et al.* (2021) 'Malacological survey in a bottle of water: A comparative study between manual sampling and environmental DNA metabarcoding approaches', *Global Ecology and Conservation*, 25. doi: 10.1016/j.gecco.2020.e01428.

Nagarajan, R. P. *et al.* (2022) 'Environmental DNA Methods for Ecological Monitoring and Biodiversity Assessment in Estuaries', *Estuaries and Coasts*. doi: 10.1007/s12237-022-01080-y.

Nearing, J. T. *et al.* (2018) 'Denoising the Denoisers: An independent evaluation of microbiome sequence error-correction approaches', *PeerJ*, 2018(8). doi: 10.7717/peerj.5364.

Nixon, S. W. (1988) 'Physical energy inputs and the comparative ecology of lake and marine ecosystems', *Limnology and Oceanography*, 33(4part2). doi: 10.4319/lo.1988.33.4part2.1005.

Ogram, A., Sayler, G. S. and Barkay, T. (1987) 'The extraction and purification of microbial DNA from sediments', *Journal of Microbiological Methods*, 7(2–3). doi: 10.1016/0167-7012(87)90025-X.

Oliveira, E. and Irving, M. de A. (2011) 'Convenção sobre Diversidade Biológica pós Nagoya: desafios para a mídia em um país de megadiversidade', *Razón y Palabra*, 75.

Othman, N. *et al.* (2023) 'A Review on Next-Generation Wildlife Monitoring using Environmental DNA (eDNA) Detection and Next-Generation Sequencing in Malaysia', *Sains Malaysiana*, 52(1). doi: 10.17576/jsm-2023-5201-02.

Oyakawa, O. T. and Menezes, N. A. (2011) 'Checklist dos peixes de água doce do Estado de São Paulo, Brasil', *Biota Neotropica*, 11(suppl 1). doi: 10.1590/s1676-06032011000500002.

Pank, M. *et al.* (2001) 'Rapid and simultaneous identification of body parts from the morphologically similar sharks Carcharhinus obscurus and Carcharhinus plumbeus (Carcharhinidae) using multiplex PCR', *Marine Biotechnology*, 3(3). doi: 10.1007/s101260000071.

Patricio De Andrade Júnior, F. *et al.* (2017) *AVALIAÇÃO DE ALGUNS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DE ÁGUAS SUBTERRÂNEAS E ÁGUAS DE ABASTECIMENTO CONSUMIDAS PELA POPULAÇÃO DE CUITÉ-PB*. Available at: www.conbracis.com.br.

Payes, A. C. *et al.* (2005) 'Distribuição de duas espécies de caranguejos no mangue do Rio Escuro (Ubatuba, SP)', pp. 1–14.

Pikitch, E. . *et al.* (2014) 'Ecosystem-Based Fishery Management', *Policy Forum*, 305, pp. 346–347.

Pinhal, D. *et al.* (2008) 'Discrimination of Shark species by simple PCR of 5S rDNA repeats', *Genetics and Molecular Biology*, 31(1 SUPPL. 1). doi: 10.1590/s1415-47572008000200033.

Pinto, C. S. R. M. and Mercante, C. T. J. (2003) 'Avaliação de variáveis limnológicas e suas relações com uma floração de Euglenaceae pigmentada em viveiro povoado com tilápia do Nilo (Oreochromis niloticus Linnaeus), São Paulo, Brasil', *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 25(2). doi: 10.4025/actascibiolsci.v25i2.2018.

Polanco F., A. *et al.* (2021) 'Comparing the performance of 12S mitochondrial primers for fish environmental DNA across ecosystems', *Environmental DNA*, 3(6). doi: 10.1002/edn3.232.

Priede, I. G. and Merrett, N. R. (1996) 'Estimation of abundance of abyssal demersal fishes; A comparison of data from trawls and baited cameras', in *Journal of Fish Biology*. doi: 10.1111/j.1095-8649.1996.tb06077.x.

Prosekov, A. *et al.* (2020) 'Methods for monitoring large terrestrial animals in the wild', *Forests*. doi: 10.3390/F11080808.

Radinger, J. *et al.* (2019) 'Effective monitoring of freshwater fish', *Fish and Fisheries*, 20(4), pp. 729–747. doi: 10.1111/faf.12373.

Rahel, F. J. (2002) 'Homogenization of freshwater faunas', *Annual Review of Ecology and Systematics*. doi: 10.1146/annurev.ecolsys.33.010802.150429.

Rebouças, V. T. *et al.* (2015) 'Tolerância de juvenis de tilápia do Nilo à acidez elevada da água de cultivo', *Acta Scientiarum - Animal Sciences*, 37(3).

Rhoades, J. D., Kandiah, A. and Mashali, A. M. (2012) 'The use of saline waters for crop production - FAO irrigation and drainage paper 48', *FAO Irrigation and Drainage Paper*.

Ribeiro, G. M., Maia, C. E. and Medeiros, J. F. de (2005) 'Uso da regressão linear para estimativa da relação entre a condutividade elétrica e a composição iônica da água de irrigação', *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 9(1). doi: 10.1590/s1415-43662005000100003.

Rodrigues, A. C., Silva, S. and Bernardes, M. E. C. (2013) *Comparação entre os índices de qualidade da água (IQA) dos estuários dos rios Itamambuca e Juqueriquerê-litoral norte de São Paulo-sob mesma sazonalidade*. Available at: https://www.researchgate.net/publication/301963962.

Rogalla von Bieberstein, K. *et al.* (2019) 'Improving collaboration in the implementation of global biodiversity conventions', *Conservation Biology*, 33(4). doi: 10.1111/cobi.13252.

Roussel, J. M. *et al.* (2015) 'The downside of eDNA as a survey tool in water bodies', *Journal of Applied Ecology*. doi: 10.1111/1365-2664.12428.

Ruppert, K. M., Kline, R. J. and 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*. doi: 10.1016/j.gecco.2019.e00547.

Rusydi, A. F. (2018) 'Correlation between conductivity and total dissolved solid in various type of water: A review', in *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. doi: 10.1088/1755-1315/118/1/012019.

Sales, N. G. *et al.* (2020) 'Assessing the potential of environmental DNA metabarcoding for monitoring Neotropical mammals: a case study in the Amazon and Atlantic Forest, Brazil', *Mammal Review*, 50(3). doi: 10.1111/mam.12183.

Sánchez, L. E. (2013) *Avaliação de Impacto Ambiental: Conceitos e Métodos*, *Oficina de Textos*.

Sanches, F. H. C. *et al.* (2012) 'Aggressiveness overcomes body-size effects in fights staged between invasive and native fish species with overlapping niches', *PLoS ONE*, 7(1). doi: 10.1371/journal.pone.0029746.

Sant, J. L. and Nato, A. (1990) *Ritmo climático e a gênese das chuvas na zona costeira do estado de São Paulo, Brasil*.

Seymour, M. *et al.* (2021) 'Environmental DNA provides higher resolution assessment of riverine biodiversity and ecosystem function via spatio-temporal nestedness and turnover partitioning', *Communications Biology*, 4(1). doi: 10.1038/s42003-021-02031-2.

Seymour, M. *et al.* (2018) 'Acidity promotes degradation of multi-species environmental DNA in lotic mesocosms', *Communications Biology*, 1(1). doi: 10.1038/s42003-017-0005-3.

Shaw, J. L. A. *et al.* (2016) 'Comparison of environmental DNA metabarcoding and conventional fish survey methods in a river system', *Biological Conservation*, 197. doi: 10.1016/j.biocon.2016.03.010.

Shi, Y., Tyson, G. W. and Delong, E. F. (2009) 'Metatranscriptomics reveals unique microbial small RNAs in the oceans water column', *Nature*, 459(7244). doi: 10.1038/nature08055.

Sibbr.gov.br/ Projeto Conexão Mata Atlântica | Levantamento intensivo da biodiversidade por sequenciamento de DNA Ambiental (eDNA). Version 1.0. No organisation. Metadata dataset. https://ipt.sibbr.gov.br/sibbr/resource?r=edna_conexao_mata_atlantica_01&v=1.0

Sidova, M. *et al.* (2015) 'Effects of post-mortem and physical degradation on RNA integrity and quality', *Biomolecular Detection and Quantification*, 5. doi: 10.1016/j.bdq.2015.08.002.

Silva, F. S. V. C. B. *et al.* (2010) 'Utilização de planejamento fatorial no preparo de amostras de detergente em pó para a determinação de fósforo por análise em fluxo', *Química Nova*, 33(5). doi: 10.1590/s0100-40422010000500035.

SILVA, M. (2000) 'Estuários - Critérios Para Uma Classificação Ambiental.', *Revista Brasileira de Recursos Hídricos*, 5(1). doi: 10.21168/rbrh.v5n1.p23-35.

Silveira, L. F. *et al.* (2010) 'Para que servem os inventários de fauna?', *Estudos Avancados*, 24(68). doi: 10.1590/s0103-40142010000100015.

Souza, C. A. *et al.* (2018) *Biodiversidade e conservação dos manguezais: importância bioecológica e econômica*. Unesp.

Stevens, J. D. and Parsley, M. B. (2023) 'Environmental RNA applications and their associated gene targets for management and conservation', *Environmental DNA*. doi: 10.1002/edn3.386.

Stoeckle, M. Y., Soboleva, L. and Charlop-Powers, Z. (2017) 'Aquatic environmental DNA detects seasonal fish abundance and habitat preference in an urban estuary', *PLoS ONE*, 12(4). doi: 10.1371/journal.pone.0175186.

Taberlet, P. *et al.* (2018) *Environmental DNA: For biodiversity research and monitoring*, *Environmental DNA: For Biodiversity Research and Monitoring*. doi: 10.1093/oso/9780198767220.001.0001.

Takahashi, M. *et al.* (2023) 'Aquatic environmental DNA: A review of the macro-organismal biomonitoring revolution', *Science of the Total Environment*. doi: 10.1016/j.scitotenv.2023.162322.

Thomsen, P. F. and Willerslev, E. (2015) 'Environmental DNA - An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity', *Biological Conservation*. doi: 10.1016/j.biocon.2014.11.019.

Tikhonov, M., Leach, R. W. and Wingreen, N. S. (2015) 'Interpreting 16S metagenomic data without clustering to achieve sub-OTU resolution', *ISME Journal*, 9(1). doi: 10.1038/ismej.2014.117.

Tresbach, R. H. *et al.* (2015) 'DNA Barcoding: Uma Ferramenta de Apoio Molecular para Identificação de Espécies de Peixes', *Scientia Agraria Paranaensis*, 14(2). doi: 10.18188/1983-1471/sap.v14n2p77-81.

Tsuri, K. *et al.* (2021) 'Messenger RNA typing of environmental RNA (eRNA): A case study on zebrafish tank water with perspectives for the future development of eRNA analysis on aquatic vertebrates', *Environmental DNA*. Blackwell Publishing Inc., pp. 14–21. doi: 10.1002/edn3.169.

Turner, C. R., Uy, K. L. and Everhart, R. C. (2015) 'Fish environmental DNA is more concentrated in aquatic sediments than surface water', *Biological Conservation*, 183. doi: 10.1016/j.biocon.2014.11.017.

Turner, C. R. *et al.* (2014) 'Particle size distribution and optimal capture of aqueous macrobial eDNA', *Methods in Ecology and Evolution*, 5(7). doi: 10.1111/2041-210X.12206.

Ussami, L. (2015) 'Identificação e estimativa pesqueira de tubarões na costa de São Paulo (Província Argentina) utilizando marcadores genéticos', *Aleph*.

Valderrama, J. C. (1981) 'The simultaneous analysis of total nitrogen and total phosphorus in natural waters', *Marine Chemistry*, 10(2). doi: 10.1016/0304-4203(81)90027-X.

Valentini, A. *et al.* (2016) 'Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding', *Molecular Ecology*, 25(4). doi: 10.1111/mec.13428.

Vasconcellos, A. N. and Sanches, F. (2009) 'Análise e espacialização dos manguezais no município de Ubatuba (SP) utilizando-se recursos do sensoriamento remoto', *Enciclopédia Biosfera*, 5, pp. 1–21. Available at: www.ambientebrasil.com.br.

Vasconcelos Filho, J. I. F. de, Maia, R. C. and Salles, R. (2019) 'DESEMPENHO DOS DIFERENTES MÉTODOS DE AMOSTRAGEM NA CARACTERIZAÇÃO DA ICTIOFAUNA ASSOCIADA AO MANGUEZAL DA PRAIA DE ARPOEIRAS EM ACARAÚ, CEARÁ', *Arquivos de Ciências do Mar*, 52(1). doi: 10.32360/acmar.v52i1.40386.

Veilleux, H. D., Misutka, M. D. and Glover, C. N. (2021) 'Environmental DNA and environmental RNA: Current and prospective applications for biological monitoring', *Science of the Total Environment*. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.146891.

Velasco, A. *et al.* (2021) 'A new rapid method for the authentication of common octopus (Octopus vulgaris) in seafood products using recombinase polymerase amplification (rpa) and lateral flow assay (lfa)', *Foods*, 10(8). doi: 10.3390/foods10081825.

Walsh, C. J. *et al.* (2005) 'The urban stream syndrome: Current knowledge and the search for a cure', in *Journal of the North American Benthological Society*. doi: 10.1899/04-028.1.

Wellington, E. M. H., Berry, A. and Krsek, M. (2003) 'Resolving functional diversity in relation to microbial community structure in soil: Exploiting genomics and stable isotope probing', *Current Opinion in Microbiology*. doi: 10.1016/S1369-5274(03)00066-3.

Willerslev, E. *et al.* (2003) 'Diverse plant and animal genetic records from holocene and pleistocene sediments', *Science*, 300(5620). doi: 10.1126/science.1084114.

Wood, S. A. *et al.* (2020) 'Release and degradation of environmental DNA and RNA in a marine system', *Science of the Total Environment*, 704. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.135314.

Xing, Y. *et al.* (2022) 'A Review of Environmental DNA Field and Laboratory Protocols Applied in Fish Ecology and Environmental Health', *Frontiers in Environmental Science*. doi: 10.3389/fenvs.2022.725360.

Yates, M. C., Derry, A. M. and Cristescu, M. E. (2021) 'Environmental RNA: A Revolution in Ecological Resolution?', *Trends in Ecology and Evolution*. doi: 10.1016/j.tree.2021.03.001.

Zainal Abidin, D. H. *et al.* (2022) 'Assessing a megadiverse but poorly known community of fishes in a tropical mangrove estuary through environmental DNA (eDNA) metabarcoding', *Scientific Reports*, 12(1). doi: 10.1038/s41598-022-19954-3.