

Alessandro Garcia Lopes

**Análises isoenzimáticas, moleculares e ultraestruturais em
camarões dulcícolas do gênero *Macrobrachium***

São José do Rio Preto

2014

Alessandro Garcia Lopes

**Análises isoenzimáticas, moleculares e ultraestruturais em
camarões dulcícolas do gênero *Macrobrachium***

**Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Genética junto ao Programa de
Pós-Graduação em Genética, Área de
Concentração em Genética Animal e Evolução,
do Instituto de Biociências, Letras e Ciências
Exatas da Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São
José do Rio Preto.**

Orientador: Prof. Dr. Carlos Roberto Ceron

São José do Rio Preto

2014

Alessandro Garcia Lopes.

Análises isoenzimáticas, moleculares e ultraestruturais em
camarões dulcícolas do gênero *Macrobrachium* / Alessandro Garcia
Lopes. -- São José do Rio Preto, 2014
125 f. : il., tabs.

Orientador: Carlos Roberto Ceron

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de
Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Genética animal. 2. Camarão de água doce. 3. *Macrobrachium*.
4. Isoenzimas. 5. Bioinvasão. I. Ceron, Carlos Roberto. II. Universidade
Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências,
Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 595.384.1

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Alessandro Garcia Lopes

**Análises isoenzimáticas, moleculares e ultraestruturais em
camarões dulcícolas do gênero *Macrobrachium***

**Dissertação apresentada como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Genética, junto ao
Programa de Pós-Graduação em
Genética, Área de Concentração em
Genética Animal e Evolução do Instituto
de Biociências, Letras e Ciências Exatas
da Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de
São José do Rio Preto.**

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Carlos Roberto Ceron

Departamento de Química e Ciências Ambientais
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto, SP.

Profa. Dra. Ana Maria Bonetti

Departamento de Genética
Instituto de Genética e Bioquímica
Universidade Federal de Uberlândia, MG.

Profa. Dra. Lilian Madi Ravazzi

Departamento de Biologia
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto, SP.

**São José do Rio Preto
21 de fevereiro de 2014**

*"Somos Extensões de Energia não-física,
concentradas em corpos físicos, portanto
não há nada que não possamos ser, fazer,
ou ter..."*

ABRAHAM HICKS

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela oportunidade e pela conclusão deste trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Roberto Ceron e à Profa. Dra. Lilian Castiglioni pelos ensinamentos, paciência, oportunidade, apoio e confiança dispensados a mim.

Ao Prof. Dr. Fabiano Gazzi Taddei, professor e amigo durante a graduação e depois dela e também por todos os ensinamentos e ajuda.

À CAPES pela minha bolsa de estudos.

A todos do Laboratório de Genética Bioquímica e em especial ao Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida pela ajuda e pelo acolhimento.

Aos meus amigos Alexandre Vidotto e Ana Leticia Guerra por toda a ajuda, esclarecimento, amizade e paciência. Ao Alexandre por todo o apoio, ensinamentos e ajuda em todas as coletas.

À Profa. Dra. Lilian Madi-Ravazzi pelos ensinamentos e desenvolvimento da parte de microscopia eletrônica de varredura e morfometria.

À minha amiga Dra. Rosana por toda a ajuda na preparação de amostras para a microscopia eletrônica, amizade e apoio nos momentos difíceis.

À Profa. Dra. Claudia Carareto pelos ensinamentos, apoio e por ter aberto as portas de seu laboratório de Evolução Molecular para a realização da parte molecular.

Aos meus amigos Adriana, Elaine, Joice, Wellington e Elias do Laboratório de Evolução Molecular, pelos ensinamentos e apoio.

Ao meu amigo Danilo (Kexu) pela amizade e toda a ajuda da parte de análises estatísticas.

À minha amiga Mayara (Mah) pela ajuda, amizade, e caronas que tanto me ajudaram (Mah vamos repetir o gel de amilase ?)

A todos os meus amigos do Laboratório de Biomateriais e Nanotecnologia, especialmente à Juliana, Mirelle, Richard e o Luiz pelas dicas, apoio e ajuda.

Ao meu amigo Bruno do Laboratório de Anatomia Comparada, por toda a assistência com a captura de imagens das estruturas para as análises morfométricas.

À profa. Dra. Paula Rahal pelo acolhimento em seu laboratório (Genoma), proporcionando todos os reagentes e equipamentos necessários à clonagem e sequenciamento. Agradeço também o doutorando André Luis Giacometti por toda ajuda e boa vontade durante minha estadia no Genoma e também pelos ensinamentos dos processos de clonagem e preparação do material para sequenciamento.

Às minhas amigas Mônica do Laboratório de Fitovirologia e Mari do Laboratório Beta Tax1 Ficologia do IBILCE-UNESP por todas as explicações, ajuda e dedicação para o desenvolvimento da análise filogenética.

Agradeço à minha amiga Eliane, dos laboratórios didáticos, por toda a ajuda com reagentes, conselhos e desabafos.

Ao meu amigo do Fabio do Departamento de Física, pelas explicações, paciência e análise de RMN-H da quitosana.

Aos meus amigos irmãos (verdadeiros anjos em minha vida) Marcos, Catarina, Jorge, Expedito, “Manso”, por tudo e mais um pouco, amo vocês.

À minha família por todo o apoio.

Resumo

Os camarões do gênero *Macrobrachium* (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae), encontrados em ambientes de água doce, são amplamente distribuídos pelas regiões tropicais e subtropicais do mundo, inclusive em locais próximos ao litoral. Algumas espécies desse gênero, como por exemplo *M. rosenbergii*, apresentam valor econômico, sendo cultivadas e comercializadas como alimento. Na região Noroeste do Estado de São Paulo, são encontradas as espécies classificadas como *M. amazonicum* e *M. jelskii*, as quais são espécies exóticas de camarões dulcícolas recentemente introduzidas e amplamente disseminadas em reservatórios de usinas hidrelétricas desta região. Essas espécies possuem hábitos crípticos e noturnos, sendo predadores de larvas de peixes e também presas de peixes adultos e outros organismos. *M. amazonicum* e *M. jelskii* apresentam grande similaridade interespecífica em termos de caracteres morfológicos, o que pode dificultar a classificação taxonômica desses organismos. O objetivo deste estudo foi conduzir análises morfométricas, ultraestruturais, isoenzimáticas e moleculares em *M. amazonicum* e *M. jelskii*, na tentativa de obter-se novos dados para distingui-los. Os camarões foram coletados das populações dos reservatórios de Sales/SP e Mendonça/SP. As análises morfométricas englobaram as medidas do télson, dos espinhos caudais internos e do rostro. As análises por microscopia eletrônica de varredura foram realizadas nas estruturas do télson, nos espinhos caudais internos e no apêndice masculino. As análises isoenzimáticas, realizadas por eletroforese em gel de poliacrilamida, abrangeram as enzimas álcool desidrogenase, octanol desidrogenase, glicose-6-fosfato desidrogenase, lactato desidrogenase, amilase e esterases do hepatopâncreas e tecido muscular. Análises moleculares envolveram a amplificação do espaçador intergênico interno ITS-1 (*Internal Transcribed Spacer 1*) do rDNA. Os fragmentos amplificados obtidos foram utilizados para as análises de polimorfismos de comprimento e polimorfismos de restrição, bem como utilizados para sequenciamento direto. Testes estatísticos aplicados às análises morfométricas do télson e espinhos caudais internos e do rostro evidenciaram três grupos distintos, representados pelos indivíduos classificados como *M. amazonicum*, *M. jelskii* e um terceiro grupo de indivíduos com características intermediárias. Análises ultraestruturais por microscopia eletrônica de varredura reforçaram essa divisão em três grupos, sem contudo, evidenciar uma característica específica própria de cada espécie. As análises isoenzimáticas não mostraram variabilidade genética em relação aos locos analisados. Todos os locos, exceto o da amilase mostraram-se monomórficos e invariantes entre os indivíduos de ambas as populações. Reações em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se iniciadores específicos para a amplificação da sequência correspondente à região ITS-1 do rDNA resultaram na obtenção de fragmentos amplificados de 1.200 pb, os quais não apresentaram nenhum polimorfismo de tamanho frente a várias enzimas de restrição. O sequenciamento parcial dessa região não mostrou variabilidade nucleotídica significativa entre os indivíduos analisados. Os resultados obtidos reforçam a alta similaridade genética entre as espécies atualmente classificadas como *M. amazonicum* e *M. jelskii*, sugerindo que na verdade ambas sejam de fato apenas uma, apresentando diferentes morfotipos.

Palavras-chave: Camarões Dulcícolas, *Macrobrachium amazonicum*, *Macrobrachium jelskii*, ITS-1, Análises Ultraestruturais, Análises Morfométricas, Isoenzimas

Abstract

Prawns of the genus *Macrobrachium* (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) can be found in freshwater environments, widely distributed throughout tropical and subtropical regions of the world, including regions near the coast. Some species of this genus, for example *Macrobrachium rosenbergii*, present economic value, which are reared and traded as food. In the northwest region of São Paulo State two exotic freshwater prawn species are found, classified as *M. amazonicum* and *M. jelskii*, which were recently introduced to the aquatic reservoirs of hydroelectric power plants and then, disseminated throughout reservoirs in this region of the State. These species have cryptic and overnight habits, being predators of fish larvae and also being prey to adult fishes and other organisms. *M. amazonicum* and *M. jelskii* present high rates of interspecific similarity in terms of morphological characters, which are generally used to distinguish them, what may induce mistakes in taxonomic identification. The objective of this study was to conduct morphometric, ultrastructural, isoenzymatic and molecular analyses of *M. amazonicum* and *M. jelskii*, in order to obtain more data about their differentiation. The prawns were collected in reservoirs of Sales/SP and Mendonça/SP. Morphometric analyses were performed involving the structures of telsons, internal caudal spines and rostrums. Scanning electron microscopy analyses were performed on structures of telsons, internal caudal spines and male appendices. Isoenzymatic analyses by polyacrylamide gel electrophoresis included the enzymes alcohol dehydrogenase, octanol dehydrogenase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, lactate dehydrogenase, amylase and esterases of hepatopancreas and muscle tissue. Molecular analyses were performed by amplification and sequencing of ITS-1 (Internal Transcribed Spacer 1) intergenic spacer from rDNA. The amplified fragments were used for analyzing length polymorphism restriction fragments polymorphism and also for nucleotide sequence analysis. Statistic tests applied to morphometric analyses of telson, internal caudal spines and rostrums present three different groups, representing the individuals classified as *M. amazonicum*, *M. jelskii* and a third group of individuals with intermediate characteristics. Scanning electron microscopy analyses reinforce a three group division, however presented no specific characteristic of each species. Isoenzymatic analyses presented no genetic variability. All of these loci, except for amylase, were invariable among the individuals. Reactions by PCR using specific primers for the amplifications of ITS-1 of rDNA resulted in obtaining amplified fragments of 1,200 bp, in both species indicating no length polymorphism for ITS-1 region. The partial sequencing of this region presented no significant nucleotide variability among analysed individuals. The results obtained until now indicate a high genetic similarity between the species currently classified as *M. amazonicum* and *M. jelskii* and, actually, these observations suggest that they are just one, presenting different morphotypes.

Key-words: Freshwater Prawns, *Macrobrachium amazonicum*, *Macrobrachium jelskii*, ITS-1, Ultrastructural Analyses, Morphometric Analyses, Isoenzymes

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Crustacea. Tagmas de um camarão como exemplo de um crustáceo generalizado. (Modificado de BARNES et al., 2005).	Erro! Indicador não definido.
Figura 2: Estágios do desenvolvimento larval de camarões dulcícolas. (Modificado de MAGALHÃES, 1985)	20
Figura 3: <i>Macrobrachium amazonicum</i> (A) e <i>Macrobrachium jelskii</i> (B). Fonte: arquivo pessoal.	20
Figura 4: Telson e espinhos caudais internos. A: <i>M. amazonicum</i> ; B: <i>M. jelskii</i> . Note a diferença no tamanho dos espinhos internos entre as duas espécies.	22
Figura 5: Mapa da distribuição geográfica de <i>Macrobrachium amazonicum</i> . (Modificado de MELO, 2003).	25
Figura 6: Mapa da distribuição geográfica de <i>Macrobrachium jelskii</i> . (Modificado de MELO, 2003).	26
Figura 7: Rostros. A: <i>M. amazonicum</i> ; B: <i>M. jelskii</i> . Note que o número e a disposição dos dentes são semelhantes nas duas espécies.	27
Figura 8: Organização do rDNA em eucariotos.	30
Figura 9: Mapa indicando os locais de coleta (Sales/SP e Mendonça/SP).	36
Figura 10: Vista geral da represa Barra Mansa, Mendonça/SP. (GUERRA, 2011).	36
Figura 11: Vista geral da prainha de Sales/SP. Disponível em : www.pescaki.com Acesso em : 23 jan. 2014.	37
Figura 12: Esquema geral da reação de identificação das desidrogenases pelo método do coloração com tetrazólio.	45
Figura 13: Identificação de α e β -esterases pelo método de coloração do Fast Blue RR em géis. (CERON, 1988).	47
Figura 14: Esquema geral da reação catalisada pela amilase como pode ser observada em géis.	48
Figura 15 (A-C): A : Eletromicrografia de um telson de <i>M. amazonicum</i> em vista dorsal, mostrando os dois pares de espinhos dorsais (ED), as cerdas laterais (CL) e a extremidade do telson (ET) com seus pares de espinhos caudais externos (EE) e internos (EI). B : detalhe de um espinho dorsal (ED). C : detalhe das cerdas laterais (CL) e inserção dos espinhos caudais externos (IEE) e internos (IEI) na porção ventral do telson.	55
Figura 16 (A-C): Eletromicrografias dos espinhos caudais internos, localizados na extremidade do telson, vista dorsal. EE: espinho externo; EI: espinho interno. <i>M. amazonicum</i> (A), <i>M. jelskii</i> (B) e indivíduo com padrão intermediário (C).	56
Figura 17 (A-D): Eletromicrografias do apêndice masculino de <i>M. amazonicum</i> (A) ; <i>M. jelskii</i> (B) ; indivíduo com padrão intermediário (C) e detalhe das cerdas localizadas no apêndice masculino (D).	58
Figura 18: Medidas do telson em milímetros de <i>M. amazonicum</i> , indivíduos com padrão intermediário e <i>M. jelskii</i> . A : indivíduos coletados na represa de Sales/SP ; B : indivíduos coletados na represa de Mendonça/SP.	61
Figura 19: Medidas dos espinhos caudais em milímetros de <i>M. amazonicum</i> , indivíduos com padrão intermediário e <i>M. jelskii</i> . A : indivíduos coletados na represa de Sales/SP ; B : indivíduos coletados na represa de Mendonça/SP.	62
Figura 20: Gráficos de dispersão envolvendo as medidas em mm dos telsons de <i>M. amazonicum</i> , Padrão intermediário e <i>M. jelskii</i> de Sales/SP e Mendonça/SP.	63

Figura 21 : Gráficos de dispersão envolvendo as medidas em mm dos espinhos caudais internos de <i>M. amazonicum</i> , Padrão intermediário e <i>M. jelskii</i> de Sales/SP e Mendonça/SP.....	64
Figura 22 : Esquemas das formas dos rostros apresentando as regiões dos PC1, PC2 e PC3. A : <i>Macrobrachium amazonicum</i> , ; B : <i>M. jelskii</i> ; C : <i>P. intermediário</i> . Os esquemas apresentam as imagens que representam a média das variações juntamente com os desvios padrões. Note que as principais variações são verificadas nas regiões basais e apicais dos rostros.	66
Figura 23 : Variações de contorno das formas dos rostros envolvendo a análise dos três grupos (<i>M. amazonicum</i> , <i>P. intermediário</i> e <i>M. jelskii</i>), envolvendo os três PCs (PC1, PC2 e PC3).	67
Figura 24 : Valores dos PC1, PC2 e PC3 apresentados em gráficos de dispersão, obtidos através das análises envolvendo os três grupos de camarões.....	68
Figura 25: A e B : Padrão isoenzimático da álcool desidrogenase e octanol desidrogenase do tecido muscular e hepatopâncreas, em gel de poliacrilamida a 8% e coloração específica Ma: <i>M. amazonicum</i> ; In : indivíduo intermediário e Mj: <i>M. jelskii</i> . Note a ausência de bandas das enzimas no tecido muscular e a presença de três bandas no hepatopâncreas, sendo uma banda da octanol desidrogenase (ODH) e duas bandas da álcool desidrogenase (ADH), sem distinção entre os indivíduos analisados. As amostras foram coletadas em Mendonça/SP.	71
Figura 26: Padrão isoenzimático da lactato desidrogenase (LDH) do tecido muscular, após eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% e coloração específica. Ma: <i>M. amazonicum</i> ; In: indivíduo intermediário; Mj: <i>M. jelskii</i> . Amostras coletadas em Mendonça/SP.	72
Figura 27: Padrão isoenzimático da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) de hepatopâncreas, após eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% e coloração específica. Ma: <i>M. amazonicum</i> ; In: indivíduo intermediário; Mj: <i>M. jelskii</i> . Amostras coletadas em Sales/SP.	73
Figura 28: Padrão de esterases do tecido muscular, após eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% e coloração com β -naftil acetato. Ma: <i>M. amazonicum</i> ; In: indivíduo intermediário; Mj: <i>M. jelskii</i> . Amostras coletadas em Sales/SP.....	74
Figura 29: Inibição do padrão de esterases do tecido muscular pelo PMSF a 10 mM, após eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% e coloração com β -naftil acetato Ma: <i>M. amazonicum</i> ; Mj: <i>M. jelskii</i> . A : gel controle, sem adição de PMSF ; B : gel tratado com PMSF. Note em B a inibição total das enzimas.Amostras coletadas em Mendonça/SP.	74
Figura 30: Padrão das bandas esterásicas (EST 1 a EST 12) do hepatopâncreas, coradas com α e β -naftil acetato. Ma: <i>M. amazonicum</i> ; In : indivíduo intermediário ; Mj: <i>M. jelskii</i> . Amostras coletadas em Mendonça/SP. Gel de poliacrilamida a 8%.	75
Figura 31: A e B : Padrão de coloração para a identificação de bandas de amilase. Ma: <i>M. amazonicum</i> ; In: indivíduo intermediário; Mj: <i>M. jelskii</i> . Note a presença de duas bandas de amilase representando os alelos <i>Amy</i> I e <i>Amy</i> II, indicando loco polimórfico. Amostras coletadas em Sales/SP e Mendonça/SP. Géis de poliacrilamida a 5% contendo amido.....	77
Figura 32: Fragmento amplificado da região intergênica ITS-1. LD :DNA ladder de 1kb; Ma1 e Mj1 : ITS-1 de <i>M. amazonicum</i> e <i>M. jelskii</i> amplificado com <i>primers</i> de camarão ; Ma2 e Mj2 : ITS-1de <i>M. amazonicum</i> e <i>M. jelskii</i> amplificado com <i>primers</i> de <i>Drosophila melanogaster</i> ; Dr1 : ITS-1 de <i>Drosophila mulleri</i> amplificado com <i>primers</i> espécie-específicos ; Dr2 : ITS-1 de <i>Drosophila melanogaster</i> amplificado com <i>primers</i> de camarão . Note a amplificação de um fragmento de aproximadamente 1200 pb nas espécies de camarões e de aproximadamente 600 pb em <i>Drosophila mulleri</i> .Note também que os dois pares de <i>primers</i> são capazes de amplificar a região ITS-1 destas espécies. Eletroforese em gel de agarose a 1%.	79
Figura 33 : Dendrograma construído com o método <i>Neighbor-Joining</i> . Os números dos nós representam os valores de <i>bootstrap</i>	80
Figura 34 : Dendrograma construído com o método de <i>Máxima Verossimilhança</i> . Os números dos nós representam os valores de <i>bootstrap</i>	80

Figura 35 : Polimorfismo de restrição do fragmento ITS-1 do rDNA de *M. amazonicum* (Ma) e *M. jelskii* (Mj), após tratamento com as enzimas de restrição Hind III, EcoR I, BamH I, Xba I, Sma I e Sal I. Note que apenas a enzima Hind III produziu dois fragmentos restritos, sendo um deles de aproximadamente 800 pb em ambas as espécies. Gel de agarose a 1%...... 81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores das médias e desvios padrões (s) dos télsons de cada espécie em cada ponto de coleta. Os valores estão expressos em milímetros (mm). O valor de <i>p</i> é resultado do teste de <i>Kruskal- Wallis</i> envolvendo a comparação entre os três grupos independentes e não paramétricos.....	59
Tabela 2: Valores das médias e desvios padrões (s) dos espinhos caudais internos de cada espécie em cada ponto de coleta. Os valores estão expressos em milímetros (mm). O valor de <i>p</i> é resultado do teste de <i>Kruskal- Wallis</i> envolvendo a comparação entre os três grupos independentes e não paramétricos.	60
Tabela 3: Comparação entre dois grupos independentes utilizando-se <i>teste t</i> (#) e <i>Mann Whitney</i> (*). Para todos os grupos analisados o valor de <i>p</i> foi significativo < 0,0001.....	60
Tabela 4 : Valores em % das variações dos Principais Componentes do rosto, em análises intraespecífica e interespecífica. Amostras provenientes de Mendonça/SP.....	65
Tabela 5 : Valores das médias e desvios padrões referentes aos PC1, PC2 e PC3 de cada grupo. Os valores de <i>p</i> são resultados dos testes ANOVA One Way (PC1) e <i>Kruskal-Wallis</i> (PC2 e PC3). Note que apenas para a comparação entre os valores de PC2 o valor de <i>p</i> foi significativo (<0,005).	69
Tabela 6 : Valores de <i>p</i> na comparação entre dois grupos independentes para os valores de PC1, PC2 e PC3 através dos testes <i>t</i> de <i>Student</i> (#) e <i>Mann Whitney</i> . O sinal * representa os grupos que apresentaram diferenças estatísticas (<i>p</i> <0,05).	69
Tabela 7 : Presença/Ausência das isoenzimas no tecido muscular e hepatopâncreas.	70
Tabela 8: Padrão de inibição das esterases em <i>M. amazonicum</i> , <i>P. intermediário</i> e <i>M. jelskii</i> por p-hidroximercuribenzoato (pOHMB), fluoreto de sódio (NaF) e fluoreto de fenilmetanosulfonila (PMSF) na concentração de 10 mM. Os géis foram tratados com os inibidores durante o procedimento de coloração das esterases. Grau de inibição representado pela seguinte representação: - : nenhuma inibição; +, ++, +++ e ++++: inibições crescentes.	76
Tabela 9 : Genótipos e frequências alélicas para o loco amilase em <i>M. amazonicum</i> , <i>M. Jelskii</i> e intermediários coletados em Mendonça/SP.....	78
Tabela 10 : Matrizes de Porcentagem de similaridade (na porção superior) e número de nucleotídeos divergentes (na porção inferior) entre as sequências ITS-1 dos haplótipos de <i>M. amazonicum</i> , <i>M. jelskii</i> e os grupos externos <i>M. nipponense</i> (8) e <i>M. rosenbergii</i> (9).....	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CESP – Companhia Energética de São Paulo
DNA – Ácido desoxirribonucleico
dNTP`s - Desoxirribonucleotídeos fosfatados
dATP – Desoxiadenosina Trifosfatada
dCTP – Desoxicitidina Trifosfatada
dGTP – Desoxiguanosina Trifosfatada
dTTP - Desoxitimidina Trifosfatada
G6PDH – Glicose-6-fosfato Desidrogenase
HCl – Ácido Clorídrico
IPTG - Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo
ITS-1 – Espaçador Interno Transcrito não Codificante 1 (*Internal Transcribed Spacer 1*)
ITS-2 – Espaçador Interno Transcrito não Codificante 2 (*Internal Transcribed Spacer2*)
LDH – Lactato Desidrogenase
Ma – *Macrobrachium amazonicum*
MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura
mg - miligrama
Mj – *Macrobrachium jelskii*
ml - mililitro
MTT – (3-(4, 5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-brometo de tetrazólio)
NaCl – Cloreto de sódio
NAD⁺ - Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADP - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NaF – Fluoreto de sódio
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)
PMSF – Fluoreto de fenilmetanosulfonila
PMS – Metossulfato de fenazina
pOHMB – p-hidroximercuribenzoato
RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism*
RNA – Ácido ribonucleico
rpm – rotações por minuto
TAE – Tris-Acetato-EDTA

TEMED – N,N,N',N'-tetrametiletenodiamida

TRIS – Hidroximetil aminometano

V – Volts

X-gal - 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo

μ l – microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Características gerais de <i>Macrobrachium amazonicum</i> e <i>Macrobrachium jelskii</i>	23
1.2 Bioinvasão e formação de híbridos Interespecíficos	27
1.3 Marcadores moleculares associados à estrutura do DNA ribossomal	29
1.4 Isoenzimas como Marcadores Bioquímicos	32
1.5 Análises por MEV	33
2 OBJETIVOS	35
2.1 Objetivo Geral	35
2.2 Objetivos Específicos	35
3 MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1 Obtenção das amostras	36
3.2 Preparação das amostras para a Microscopia Eletrônica de Varredura	38
3.2.1 Lavagem e fixação	38
3.2.2 Desidratação	38
3.2.3 Secagem das amostras ao ponto crítico	39
3.2.4 Montagem das amostras	39
3.2.5 Metalização (<i>sputtering</i>)	40
3.3 Análises Morfométricas	40
3.4 Análises de Isoenzimas	42
3.4.1 Processamento das amostras	42
3.4.2 Confecção dos géis, condições para a eletroforese e coloração	43
3.4.3 Identificação das isoenzimas em géis	44
3.4.3.1 Coloração para a ADH (álcool desidrogenase), ODH (octanol desidrogenase), LDH (lactato desidrogenase)	44
3.4.3.2 Coloração para a G6PDH (glicose-6-fosfato desidrogenase)	46
3.4.3.3 Coloração para Esterases	46
3.4.3.4 Coloração para a Amilase	48
3.5 Análise Molecular	48
3.5.1 Extração de DNA	48
3.5.2 Oligonucleotídeos iniciadores e condições de reação da polimerase para amplificação da região ITS-1	49
3.5.3 Condições para a clonagem	50
3.5.4 Sequências consenso e análise filogenética	52
3.5.5 Análise por RFLP (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)	52
4 RESULTADOS	54

4.1 Dados de Coletas e Análise Ultraestrutural	54
4.2 Análises morfométricas	59
4.2.1 Morfometria dos télsons e espinhos caudais internos	59
4.2.2 Análises da forma dos rostros através do programa Shape	65
4.3 Análises de isoenzimas	70
4.3.1 Ensaio para a álcool desidrogenase (ADH) e octanol desidrogenase (ODH)	70
4.3.2 Ensaio para a lactato desidrogenase (LDH)	71
4.3.3 Ensaio para a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH)	72
4.3.4 Ensaio para esterases	73
4.3.5 Ensaio para a amilase	77
4.4 Análise molecular	78
5 DISCUSSÃO	82
6 CONCLUSÃO.....	86
7 REFERÊNCIAS	87
ANEXOS	96
APÊNDICE	113

1 INTRODUÇÃO

São conhecidas aproximadamente 38.000 espécies do subfilo Crustacea (BARNES et al., 2005). Muitas dessas espécies são comestíveis, incluindo caranguejos, camarões, lagostas e lagostins (DORNELLAS et al., 2011). A anatomia destes crustáceos, pertencentes à Classe Malacostraca, caracteriza-se da seguinte forma: cabeça consistindo em cinco segmentos, tórax que sempre possui oito segmentos e o abdome que, na maioria das vezes, apresenta seis segmentos, totalizando dezenove segmentos (BARNES et al., 2005). Além dessas características anatômicas, esses organismos apresentam uma estrutura quitinosa denominada télson, que se localiza logo após o último segmento do abdome. Nessa estrutura estão inseridos os cercos ou espinhos caudais, cuja morfologia tem sido utilizada para diferenciação de algumas espécies de camarões. A Figura 1 representa um camarão como forma de crustáceo generalizado.

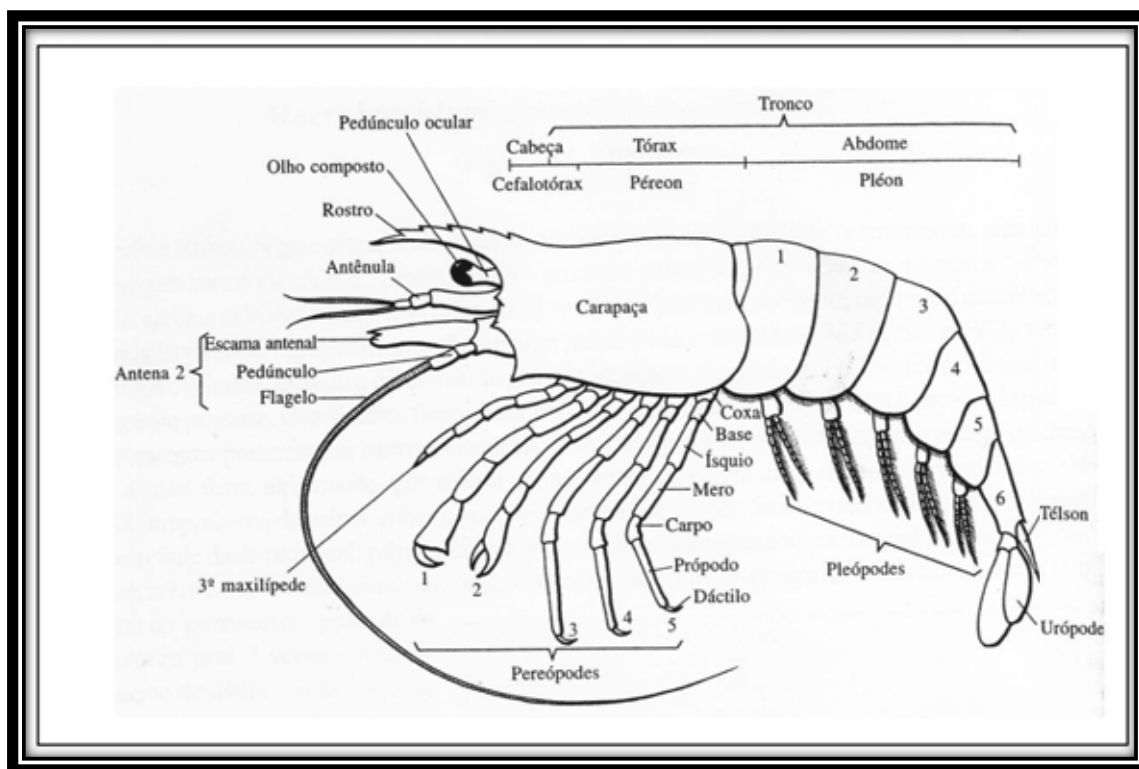


Figura 1 : Crustacea. Tagmas de um camarão como exemplo de um crustáceo generalizado. (Modificado de BARNES et al., 2005).

Os crustáceos têm grande importância nos processos ecológicos dos ambientes aquáticos, pois atuam em diferentes níveis da cadeia trófica desses ambientes, quer como herbívoros, predadores, necrófagos ou presas de outros grupos (BOWLES, 2000). Os camarões de água doce ou camarões dulcícolas são encontrados em águas correntes dos

grandes rios, lagos de várzea, planícies inundadas, açudes, pântanos e represas (MAGALHÃES, 2000). Embora sejam chamados de camarões, como os de água salgada, os de água doce são evolutivamente mais próximos das lagostas, apresentando muitas semelhanças com estas (ISMAEL; NEW, 2000). Os camarões dulcícolas pertencem à ordem Decapoda e subordem Pleocyemata (MARTIN; DAVIS, 2001).

Dentre os camarões dulcícolas, aqueles pertencentes à família Palaemonidae (Rafinesque, 1815) são distribuídos por todo o globo, em regiões tropicais e temperadas, compreendendo 981 espécies descritas, dentre as quais incluem-se as espécies do gênero *Macrobrachium* encontradas no Brasil (PILEGGI; MANTELATTO, 2012). Nesse gênero há aproximadamente 240 espécies reconhecidas e numerosas espécies crípticas ainda não descritas (SHORT, 2004).

Algumas espécies do gênero *Macrobrachium* apresentam potencial valor econômico, pois constituem fontes de proteína para a dieta humana e animal e, devido à qualidade de sua carne, encontram aceitação no mercado consumidor (VALENTI, 1984). O cultivo de espécies do gênero *Macrobrachium* de importância econômica realiza-se em duas fases: a larvicultura (obtenção e cultivo de larvas até estas atingirem a metamorfose) e a engorda (onde permanecem até atingirem tamanho comercial) (MORAIS-VALENTI; VALENTI, 2010).

A maioria dos membros deste gênero é facilmente reconhecida por seu desenvolvimento, o qual é, geralmente, abreviado. As características principais que tradicionalmente distinguem as espécies, como o rostro, o segundo pereópode e o télson são altamente variáveis dentro das espécies, o que torna este gênero um desafio taxonômico (HOLTHUIS, 1952; CHACE; BRUCE, 1993; MAGALHÃES, 2005). O corpo desses camarões tende a ser cilíndrico ou achatado lateralmente e com um abdome muscular bem desenvolvido. O cefalotórax possui um rostro serrilhado em forma de quilha. Os pereópodes e pleópodes são geralmente finos e os quelípodes podem estar presentes ou ausentes. O exoesqueleto é comumente fino, flexível e não calcificado. Os pleópodes são as principais estruturas envolvidas na natação (BARNES et al., 2005). Seus representantes habitam as proximidades do litoral e, também, outros ambientes de água doce (TADDEI, 2006). No Brasil, a distribuição típica desses camarões do gênero *Macrobrachium* concentra-se na bacia central do rio Amazonas na região de Manaus, onde são muito abundantes em águas ricas em sedimentos e sais dissolvidos (ODINETZ-COLLART; MOREIRA, 1993). Esses organismos habitam água doce ou salobra, apresentando hábitos crípticos com maior atividade no fim da tarde e à noite. No período diurno escondem-se em abrigos formados por fendas, buracos ou raízes e folhas submersas (MOSSOLIN; BUENO, 2003).

A presença desses camarões nos ecossistemas aquáticos acima mencionados é importante devido ao fato de que os mesmos atuam como predadores de larvas de peixes e de outros invertebrados e, por outro lado, são presas de alguns insetos, peixes, aves, répteis e mamíferos (MAGALHÃES et. al., 2005). Além disso, essas espécies se alimentam de peixes em decomposição (TADDEI, 2006).

Espécies do gênero *Macrobrachium* provavelmente originaram-se de ancestrais marinhos e estima-se que estes organismos migraram para águas continentais no início do período quartenário Pleistoceno. Estes organismos provenientes de vários nichos diferentes em ambiente marinho foram, com o tempo, formando ondas diferentes de migrações em direção aos ambientes de água doce, com isso sofrendo diferentes processos de adaptação, o que, consequentemente, gerou padrões de desenvolvimento larval de vários tipos (ORTMANN, 1902; TIWARI, 1955). Esse processo de mudança do ambiente marinho em direção às águas continentais é denominado *freshwaterization*. Baseado no número de estágios larvais, são identificados três tipos de desenvolvimentos: Tipo I (prolongado ou normal, compreendendo de 8 a 10 estágios larvais ou mais de 10), Tipo II (parcialmente abreviado, apresentando até 3 estágios larvais) e Tipo III (totalmente abreviado, somente uma fase larval) (JALIHALL et. al., 1993).

No desenvolvimento larval do Tipo I, destacam-se muitas espécies de camarões marinhos assim como várias espécies de outros grupos de crustáceos, os quais liberam seus ovos fecundados na água, eclodindo como larvas planctônicas que passam por vários estágios de desenvolvimento até se tornarem adultos, necessitando de alta concentração salina durante a metamorfose (JALIHALL et. al., 1993; ARAUJO, 2005). Neste tipo de desenvolvimento, a maioria dos filhotes é devorada por predadores, devido à falta de desenvolvimento das larvas em estágios iniciais.

Grande parte de camarões dulcícolas apresenta o desenvolvimento larval Tipo II, no qual a fêmea transporta os ovos por período maior de tempo, os quais ficam incubados em uma bolsa alojada no espaço entre o segundo par de pleuras abdominais. Este período de incubação pode variar de uma espécie para outra, mas o objetivo é manter os ovos sob a proteção da mãe. Assim, os ovos eclodem em estágios mais avançados de desenvolvimento larval, apresentando maior chance de sobrevivência em relação à predação. Devido ao período de incubação, parte do desenvolvimento larval ou estágios de desenvolvimento iniciais ocorrem dentro dos ovos. Este processo também pode ser chamado de reprodução abreviada ou especializada (BUENO; RODRIGUES, 1995; MURPHY; AUSTIN, 2005). Como as primeiras fases do desenvolvimento ocorrem dentro do ovo, algumas espécies mais adaptadas

ao continente não apresentam a necessidade de água salobra durante o desenvolvimento larval, em contrapartida, outras espécies dulcícolas que apresentam menor tempo de incubação, ainda necessitam de certa concentração salina durante o desenvolvimento larval (MAGALHÃES; WALKER, 1988; JALIHALL et al., 1993; MAGALHÃES, 2000; PANTALEÃO et al., 2011). Os camarões de reprodução especializada são mais independentes em relação às condições externas durante o desenvolvimento e apresentam uma quantidade menor de ovos, os quais possuem maiores dimensões devido ao tamanho do embrião (VALENTI, 1998).

O padrão de desenvolvimento Tipo III, o qual apresenta apenas um estágio larval, é extremamente raro, sendo representado pelas espécies *M. hendersoni*, *M. hendersonianum* e *M. dayanum*, encontrados somente na Índia (JALIHALL et al., 1993).

Durante a fase de desenvolvimento dos camarões e outros crustáceos em geral, incluem-se até 4 fases larvais, acompanhadas de alterações morfológicas e de comportamento. Na morfologia, destaca-se o surgimento sequencial dos apêndices cefálicos e abdominais. A primeira fase larval é o náuplio, na qual os indivíduos apresentam somente o primeiro e o segundo pares de antenas e a mandíbula, estruturas utilizadas na natação. A segunda fase, protozoa, destacam-se também os apêndices torácicos na natação. A fase seguinte, zoea, é caracterizada pela ação dos apêndices torácicos na natação e os apêndices cefálicos utilizados para a natação e alimentação. A pós-larva é a última fase antes do adulto, na qual surge a natação abdominal. A fase protozoa ocorre apenas na subordem Dendrobrachiata, que inclui camarões marinhos (PEREIRA; GARCÍA, 1995; ALEKHNOVICH; KULESH, 2001; QUADROS et al., 2004; FERNANDES; BONECKER, 2006).

Assim, o desenvolvimento larval de camarões dulcícolas é composto pelas fases de náuplio, zoea (subdividindo-se em 10 estágios) e pós-larva. Como a fase de náuplio ocorre dentro do ovo, as larvas de camarões dulcícolas são denominadas zoea. O desenvolvimento larval dos camarões dulcícolas está resumidamente representado na Figura 2.

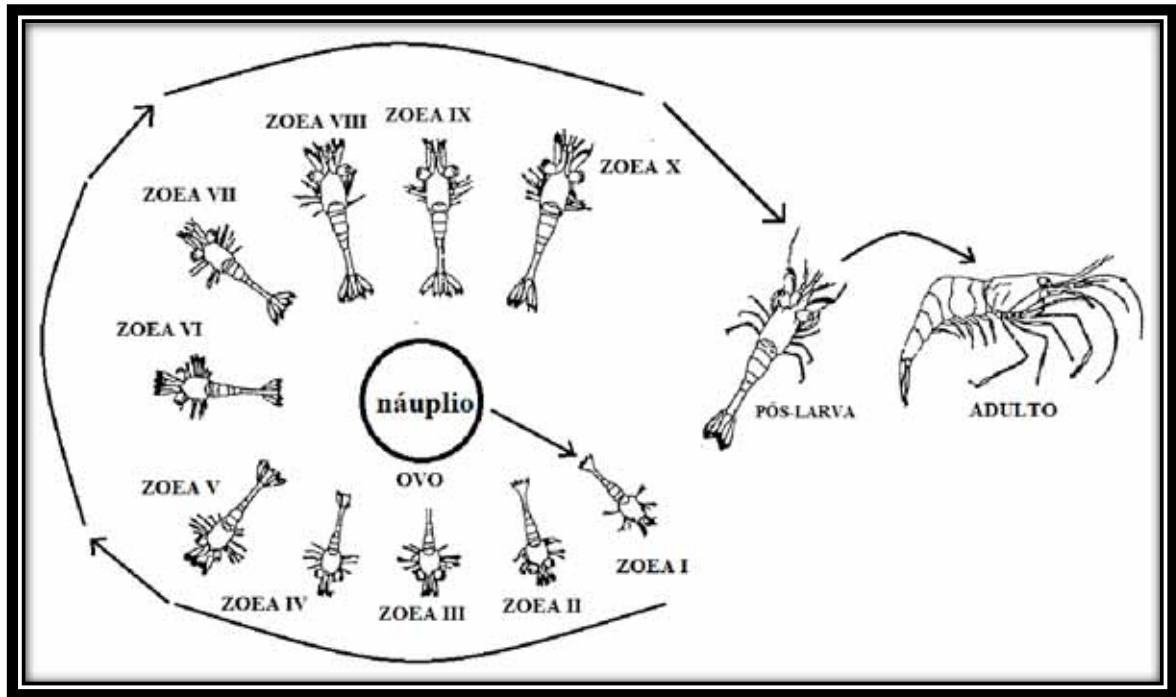


Figura 2: Estágios do desenvolvimento larval de camarões dulcícolas. (Modificado de MAGALHÃES, 1985)

Dentre os camarões do gênero *Macrobrachium*, as espécies *M. jelskii* e *M. amazonicum* são endêmicos da região tropical da América do Sul (Figura 3).

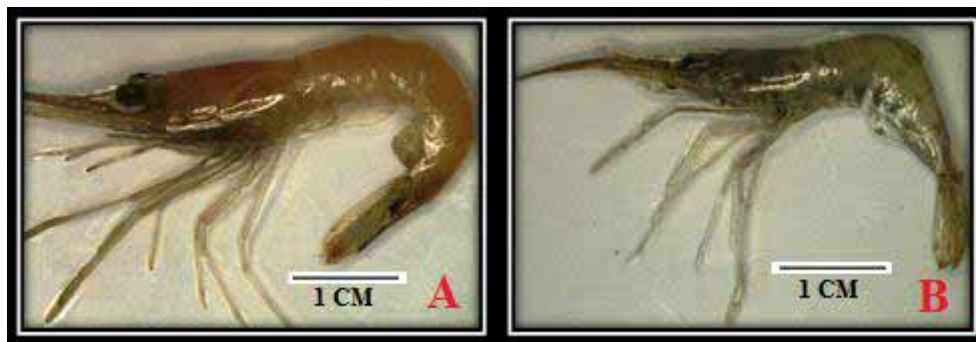


Figura 3(A e B): *Macrobrachium amazonicum* (A) e *Macrobrachium jelskii* (B). Fonte: arquivo pessoal.

Na distribuição natural dessas espécies incluem-se as bacias dos Rios Orinoco e Amazonas e as bacias dos Rios Paraguai e baixo Paraná (MAGALHÃES et al., 2005). A dispersão de camarões dulcícolas feita através da atividade humana ainda é pouco documentada, exceto relatos que tratam da introdução de *Macrobrachium rosenbergii* nos Estados do Amazonas e Espírito Santo. A diversidade da fauna de decápodos dulcícolas no Estado de São Paulo é bem conhecida. Magalhães (1999) fez um levantamento indicando a existência de 32 espécies pertencentes a cinco famílias e oito gêneros, apontando também a ocorrência de espécies exóticas (MAGALHÃES et al., 2005).

A introdução de *M. amazonicum* e *M. jelskii* no Estado de São Paulo foi relatada por Machado (1966) e Torloni et al. (1993). Durante os anos de 1966 a 1973 esses camarões foram introduzidos nas estações de piscicultura da CESP (Companhia Energética de São Paulo) como parte de um programa de piscicultura para a corvina (*Plagioscion squamosissimus*), proveniente dos reservatórios do nordeste brasileiro (TORLONI et al., 1993). Esses mesmos autores relataram que, em 1970, formas jovens desses animais escaparam das estações, atingindo ambientes naturais do Rio Pardo, em seguida o Rio Grande e daí alcançando os reservatórios de Jupiá e Ilha Solteira. Formas larvais, juvenis ou imaturas desses organismos também podem ter sido disseminadas para reservatórios do Estado de São Paulo a partir de populações de *M. jelskii* e *M. amazonicum* do Pantanal mato-grossense, que teriam sido transportadas associadas às raízes de plantas aquáticas utilizadas nos tanques para transporte de peixes daquela região para os “Pesque e Pague”, os quais são lagoas de pesca esportiva bastante difundidas nessa região do Estado (MAGALHÃES, 2005). Das espécies nativas do Brasil, *M. amazonicum* é a preferida atualmente para cultivos, devido ao seu rápido crescimento e fácil manutenção em cativeiro (ARAUJO-NETO, 2010).

Taddei (2006) estudou a biologia populacional, reprodutiva e de crescimento em duas espécies de camarões dulcícolas do gênero *Macrobrachium* (*M. jelskii* e *M. brasiliense*), coletados na região Noroeste de São Paulo, na tentativa de contribuir para o entendimento da biologia desses organismos. Um fato importante, mencionado nos estudos de Magalhães et al. (2005) e Taddei (2006), é a dificuldade na classificação taxonômica de algumas espécies do gênero *Macrobrachium*, com base apenas em características morfológicas. Estudos taxonômicos com o gênero *Macrobrachium* são dificultados pelo restrito número de caracteres morfológicos disponíveis para a identificação das espécies, uma vez que estas são bastante similares quanto à forma geral do corpo (QING-YI; QI-QUN; WEI-BING, 2009). Holthuis (1952) estabeleceu dificuldades taxonômicas neste gênero graças à forte conservação interespecífica e grande variabilidade intraespecífica, listando algumas características diferenciais entre *M. amazonicum* e *M. jelskii* com base no número de dentes, forma e tamanho do rostro, no tamanho dos espinhos internos do télson, nas características e proporções dos diferentes artículos do segundo par de pereópodes e no tamanho e número de ovos. Porém, a diferenciação dessas duas espécies é dificultada pelas variações verificadas em alguns desses caracteres em *M. amazonicum*. Até o momento, para a diferenciação de *Macrobrachium jelskii* e *Macrobrachium amazonicum*, tem-se utilizado os espinhos caudais internos localizados na estrutura quitinosa denominada télson, situado após o último segmento do abdome, as quais são estruturas diminutas e visualizadas com o auxílio de lupa

(MAGALHÃES et al., 2005; TADDEI, 2006). Em *M. amazonicum* o par de espinhos internos não atinge a extremidade distal do télson, já em *M. jelskii*, o par de espinhos internos ultrapassam a extremidade distal do télson (Figura 4 A e B). Contudo, tais características são difíceis de serem visualizadas devido ao pequeno tamanho dos indivíduos e das estruturas anatômicas consideradas. Além disso, em *M. amazonicum*, as formas jovens e imaturas apresentam variações no tamanho dos espinhos caudais internos conforme o desenvolvimento, sendo assim confundidos com *M. jelskii* (GARCÍA-DÁVILA; MAGALHÃES, 2003). Esses aspectos, aliados a outros dados da literatura, levantam algumas hipóteses quanto ao fato de *M. amazonicum* e *M. jelskii* tratarem-se de apenas uma espécie ou metapopulações ou, ainda, espécies crípticas que se inter cruzam produzindo híbridos interespecíficos (TADDEI, 2006).

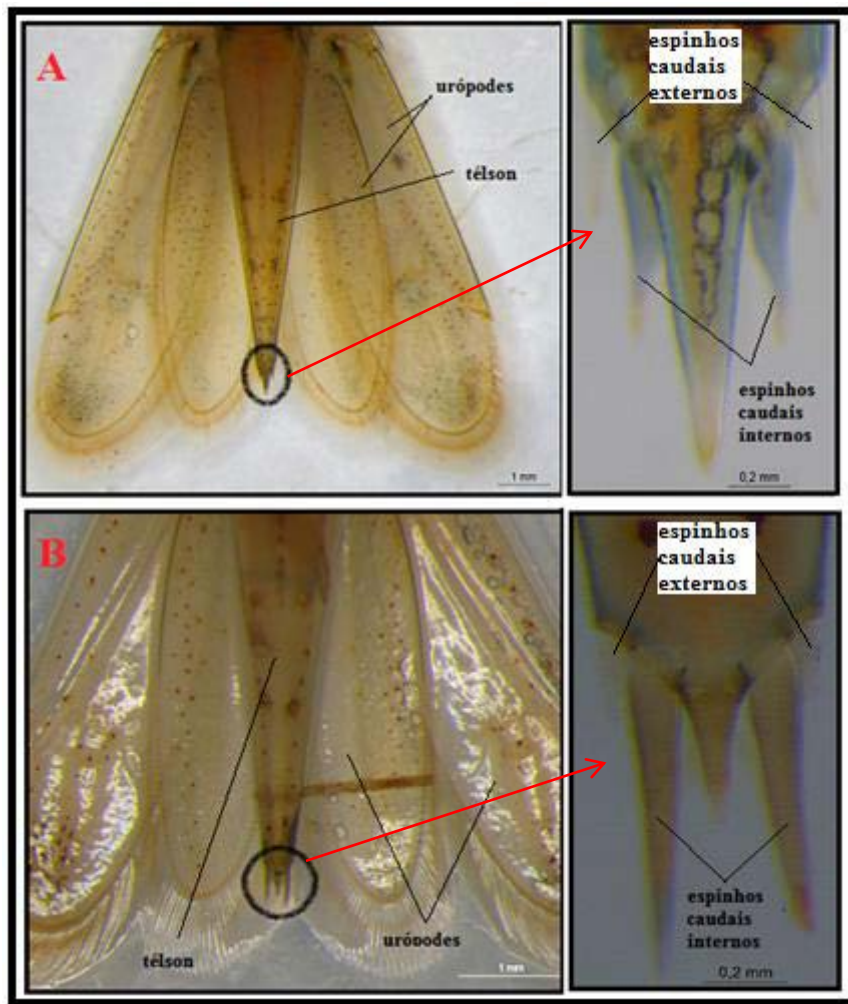


Figura 4 (A e B): Télson e espinhos caudais internos. A: *M. amazonicum*; B: *M. jelskii*. Note a diferença no tamanho dos espinhos internos entre as duas espécies.

Atualmente, a classificação taxonômica mais utilizada para *M. amazonicum* e *M. jelskii* é a descrita por Melo (2003):

Filo Arthropoda

Subfilo Crustacea

Classe Malacostraca

Subclasse Eumalacostraca

Superordem Eucaridea

Ordem Decapoda

Subordem Pleocyemata

Infraordem Caridea

Família Palaemonidae

Subfamília Palaemoninae

Gênero *Macrobrachium*

Espécies: *Macrobrachium jelskii* e *M. amazonicum*.

1.1 Características gerais de *Macrobrachium amazonicum* e *Macrobrachium jelskii*

- *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862)

Distribuição geográfica (Figura 5): Venezuela, Guiana, Guiana Inglesa, Suriname, Equador, Peru, Bolívia, Paraguai, Argentina e Brasil (Amapá, Amazonas, Pará, Maranhão, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Mato Grosso, Paraná, Acre, Goiás, Mato Grosso do Sul) (MELO, 2003).

No Brasil, a espécie *M. amazonicum* ocorre principalmente na bacia Amazônica, nos rios Solimões, Amazonas e em seus afluentes, onde é amplamente explorada pela pesca artesanal (FAVARETTO et al, 1976). Pode ser separado em dois grupos distintos: populações costeiras e populações continentais, sem contato com o litoral (MORAIS-VALENTI; VALENTI, 2010). Os maiores indivíduos chegam a 150 mm e, indivíduos desta espécie, possuem menor crescimento em relação a outras espécies do gênero, além disso, são mais resistentes a doenças e predadores (ARAÚJO-NETO, 2010).

Os caracteres morfológicos gerais de *M. amazonicum* compreendem rostro longo, delgado e sinuoso, arqueado na porção sobre as órbitas e obliquamente curvado em sua porção distal, com margem superior provida de nove a doze dentes, dos quais 7 a 8 dentes proximais formam uma crista basal, a disposição dos dentes entre os indivíduos desta espécie pode apresentar variações de localização ao longo do rostro, apresentando margem inferior com oito a dez dentes distribuídos irregularmente (GARCÍA-DÁVILA; MAGALHÃES, 2003) (Figura 7A). Carapaça e abdome lisos e transparentes, apresentando o télson em forma cônica no qual, em sua parte final, estão dispostos dois pares de espinhos (um par externo e outro interno), com o par interno não alcançando a extremidade do télson, exceto em indivíduos no estágio juvenil. Machos apresentam mero, carpo e própode cobertos por espículos curtos, os quais nas fêmeas estão ausentes (MELO, 2003). Apresentam sexos separados e suas características morfológicas permitem distinguir facilmente o sexo dos indivíduos (NEW, 2002). O tamanho entre os machos varia de 45 a 91 mm e entre as fêmeas de 41 a 95 mm em média (GARCÍA-DÁVILA; MAGALHÃES, 2003).

As fêmeas ovígeras de *M. amazonicum* incubam seus ovos por um certo período de tempo, os quais apresentam um padrão menor de tamanho, eclodindo em estágio de zoea, apresentando desenvolvimento larval composto de 11 estágios livre-natantes (incluindo as 10 estágios de zoea e 1 estágio de pós-larva).

Particularmente no Estado de São Paulo, encontramos populações de tamanhos variáveis, apresentando os caracteres morfológicos já citados não muito bem definidos (MAGALHAES, 2005; MELO, 2003).



Figura 5: Mapa da distribuição geográfica de *Macrobrachium amazonicum*. (Modificado de MELO, 2003).

- *Macrobrachium jelskii* (Miers, 1877)

Distribuição geográfica (Figura 6) : Trinidad, Venezuela, Guiana, Guiana Francesa, Suriname, Bolívia e Brasil (Amapá, Amazonas, Pará, Maranhão, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo, Mato Grosso, São Paulo e Santa Catarina) (MELO, 2003).

A espécie *M. jelskii* também é conhecida no Brasil como camarão “sossego”. Esta espécie possui elevada abundância em reservatórios aquáticos brasileiros, demonstrando certo grau de resistência em relação às outras espécies (NUNES et al., 2011). Indivíduos dessa espécie são frequentemente encontrados em águas escuras com pouca vegetação marginal e em substrato lodoso e também em águas transparentes e rápidas, com gramíneas, pedras e areia (MELO, 2003). Segundo Paiva; Barreto (1960) e Montoya (2003) estes ambientes podem fornecer recursos alimentares e proteção para fêmeas ovígeras e para o desenvolvimento larval dessa espécie.

M. jelskii possui rostro delgado com sua parte distal curvada para cima e a porção sobre as orbitas apresenta forma retilínea, apresentando dentes nas margens superior e inferior (GARCÍA-DÁVILA; MAGALHÃES, 2003) (Figura 7B). Apresenta cefalotórax e abdome lisos, com o télson apresentando forma distinta, contendo dois pares de espinhos (um par externo e outro par interno) , sendo que o par mais internamente localizado ultrapassa a extremidade do télson. O tamanho entre os machos varia de 34 a 36 mm e entre as fêmeas de 35 a 42 mm em média (GARCÍA-DÁVILA; MAGALHÃES, 2003).

As fêmeas ovígeras abrigam poucos ovos, os quais são de tamanho grande, eclodindo como larvas bentônicas as quais passam por 3 estágios de desenvolvimento até o término da metamorfose (MAGALHÃES, 2002, 2005).

M. amazonicum e *M. jelskii* apresentam similaridades quanto ao número de dentes e disposição destes ao longo do rostro, havendo uma sobreposição na comparação destas duas espécies, dificultando a identificação entre elas quando baseada apenas neste carácter.



Figura 6 : Mapa da distribuição geográfica de *Macrobrachium jelskii*. (Modificado de MELO, 2003).

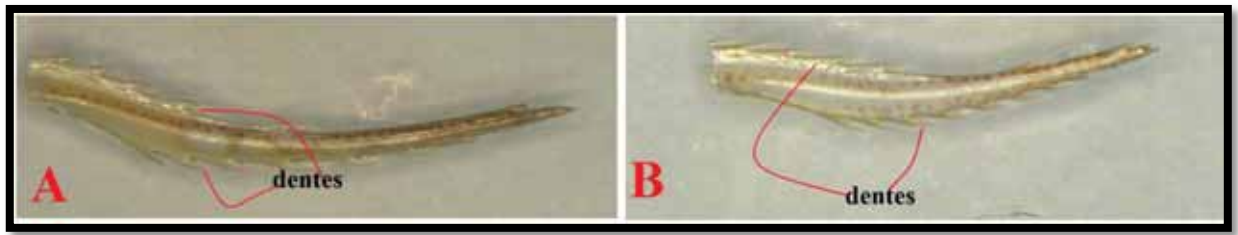


Figura 7 (A e B): Rostros. A: *M. amazonicum*; B: *M. jelskii*. Note que o número e a disposição dos dentes são semelhantes nas duas espécies.

1.2 Bioinvasão e formação de híbridos Interespecíficos

A ocupação de habitats por novas espécies devido à ação do homem, de uma forma deliberada ou acidental, constitui uma forma de alteração na distribuição natural de espécies através da migração ou introdução. Alterações da paisagem provocada por aspectos econômicos, urbanização, tomadas de áreas pela agricultura e outras causas aceleram os processos de dispersão e introdução de espécies nos ecossistemas, causando distúrbios biológicos, principalmente para os habitats invadidos (DELARIVA; AGOSTINHO, 1999). As espécies invasoras podem desestruturar o equilíbrio ecológico em um determinado habitat através de alterações em relações ecológicas, tais como predação e disputa por nichos.

A introdução de espécies exóticas em ecossistemas naturais, mediada pela atividade humana, tem sido relatada atualmente no Brasil através de estudos em alguns organismos, mas ela existe desde os tempos de colonização, sendo mais comum estudos dessa área na América do Norte e Europa. Embora recentemente tenha havido um aumento de bioinvasões em ambientes aquáticos, ainda estes casos são restritos a apenas algumas regiões e determinadas espécies (CARLTON, 1985; PYSEK et al., 2008).

O conhecimento da biologia, biogeografia e monitoramento das espécies em âmbito multidisciplinar tem sido essencial para o gerenciamento da bioinvasão e a criação de medidas de controle e prevenção. As espécies exóticas são aquelas que se encontram em habitats diferentes dos habitats nos quais evoluíram e se adaptaram, por isso sofrem pressões seletivas como gargalo de garrafa, efeito do fundador, rearranjos genômicos, hibridização e modificação do genoma induzida por fatores abióticos (LEE, 2002; PRENTIS et al., 2008). Em populações naturais pequenas, ainda pode haver o processo de deriva genética, força evolutiva sob a qual apenas certa quantidade de genes seguirá nas populações futuras. A velocidade da bioinvasão pode ser contida ou reduzida pela capacidade dos novos indivíduos

de se adaptarem a um novo habitat, devido às suas constituições genéticas, no entanto, apesar de as mudanças genéticas serem lentas em tempos ecológicos, estudos têm demonstrado mudanças bem rápidas de padrão morfológico em apenas 100 gerações (BARTON; TURELLI, 1989; GARCIA-RAMOS; RODRIGUEZ, 2002) . Também mediante à exposição aos fatores ambientais, ocorrem modificações no genoma como mutações e rearranjos do DNA causados pela atividade de transposons, os quais podem ligar ou desligar genes, causando instabilidade no genoma. Forças estas que, na maioria das vezes, são deletérias mas que podem gerar recursos para adaptação (LEE, 2002; PRENTIS et al., 2008).

Uma alternativa para acelerar o processo de adaptação das espécies invasoras seria a hibridização. Por exemplo, Lee (2002) ressalta que a hibridização entre populações das espécies nativas com as espécies invasoras, ou mesmo das invasoras entre si tem o potencial de reduzir a perda da variabilidade genética associada ao processo de bioinvasão, além de impulsionar o surgimento de novos genótipos importantes para a adaptação das espécies exóticas ao novo ambiente. Em experimentos com peixes da família dos ciclídeos introduzidos no Parque Nacional do Lago Malawi na África, foi observada uma elevada hibridização entre a espécie introduzida (*Cycnotilapia afra*) e a espécie nativa (*Metriaclima zebra*) (STREELMAN et al., 2004). Mais recentemente, foi observada hibridização introgressiva entre ciclídeos em grandes lagos africanos, com quebra das barreiras de isolamento reprodutivo que mantinham os padrões de coloração entre as espécies relacionadas. Essas observações foram associadas à flutuação das condições ambientais nesses ecossistemas, tais como, a explosão periódica do crescimento de algas e o aumento da sedimentação, levando a um aumento da turbidez das águas (EGGER et al., 2012).

Híbridos interespecíficos de camarões entre fêmeas de *Penaeus monodon* e machos de *Penaeus esculentus* foram conseguidos em laboratório através de inseminação artificial. A taxa de eclosão de larvas foi baixa, mas a maioria das larvas que eclodiram desenvolveram-se e apresentaram os mesmos padrões de coloração dos corpos dos parentais (BENZIE et al., 1995).

Híbridos interespecíficos entre diferentes espécies do gênero *Macrobrachium* já foram observados. Sankolli et al. (1982) constatou o cruzamento natural entre as espécies *M. rosenbergii* e *M. malacolmsii*. Shokita (1978) obteve híbridos de cruzamento natural entre *M. asperulum* e *M. shokita*. Uno; Fujita (1972) promoveram hibridização experimental entre *M. formosense* e *M. nipponense*. Fu et al. (2004) foram os primeiros a relatar cruzamentos interespecíficos bem sucedidos do gênero, entre *M. nipponense* e *M. hainanense*. A

constatação dos híbridos foi obtida por meio de análise do padrão eletroforético das enzimas malato desidrogenase e esterases.

As bacias hidrográficas do Estado de São Paulo sofreram severas intervenções antropogênicas, tais como os represamentos, a remoção da vegetação, as práticas agrícolas inapropriadas e a liberação de poluentes das indústrias (MAGALHÃES et al., 2005), o que favoreceu a invasão de espécies exóticas e drásticas modificações da biota aquática. Como já mencionado, *M. amazonicum* e *M. jelskii* foram introduzidos no Estado de São Paulo em programas de piscicultura da CESP, tendo posteriormente se disseminado por toda a região noroeste do Estado.

Não há relatos na literatura sobre cruzamentos naturais entre *M. amazonicum* e *M. jelskii*, mas alguns indivíduos parecem apresentar características morfológicas intermediárias na estrutura dos espinhos internos localizados na extremidade do télson, dificultando sua diferenciação (TADDEI, 2006). Nesse contexto, a introdução das espécies exóticas *M. jelskii* e *M. amazonicum* nos reservatórios da região Noroeste do Estado de São Paulo merece ser investigada.

1.3 Marcadores moleculares associados à estrutura do DNA ribossomal

O DNA ribossômico (rDNA) constitui uma família multigênica, conservada evolutivamente, onde os genes ribossômicos 18S, 5,8S e 28S estão estruturalmente arranjados em unidades de repetição (UR), nas chamadas Regiões Organizadoras Nucleolares (RONs). O Organizador Nucleolar (ON) é a região cromossômica que contém os genes para rRNA, com a qual o nucléolo se associa e é responsável por sua formação (HOOD et al., 1975; LINARES et al., 1994; LUCCHINI et al., 1997; POLANCO et al., 1998; TOVAR et al., 2000).

As unidades repetidas (UR) do rDNA são estruturalmente intercaladas com regiões espaçadoras não codificadoras. Cada unidade repetitiva, ou unidade de transcrição do rDNA, é constituída por uma região EST (*External Transcribed Spacer*), a região correspondente ao gene para o rRNA 18S, uma região espaçadora interna transcrita denominada ITS-1 (*Internal non Coding Transcribed Spacer 1*), a região correspondente ao gene para o rRNA 5,8S, uma segunda região espaçadora interna transcrita, ITS-2 (*Internal non Coding Transcribed Spacer 2*), a região correspondente ao gene para o rRNA 28S e, finalmente, a região espaçadora intergênica não transcrita, denominada IGS (*Intergenic non Transcribed Spacer*), que separa uma unidade repetitiva de outra, localizada entre os genes 28S e 18S. A unidade repetitiva

como um todo, é transcrita pela RNA polimerase I, como uma única molécula precursora de 45S (BARGUES et al., 2000; LAGE, 2005; FLOWERS; BURTON, 2006; COMMAR, 2007; RAUPACH et al., 2009). A organização do rDNA em eucariotos está representada na Figura 8 (HILLIS; DIXON, 1991):

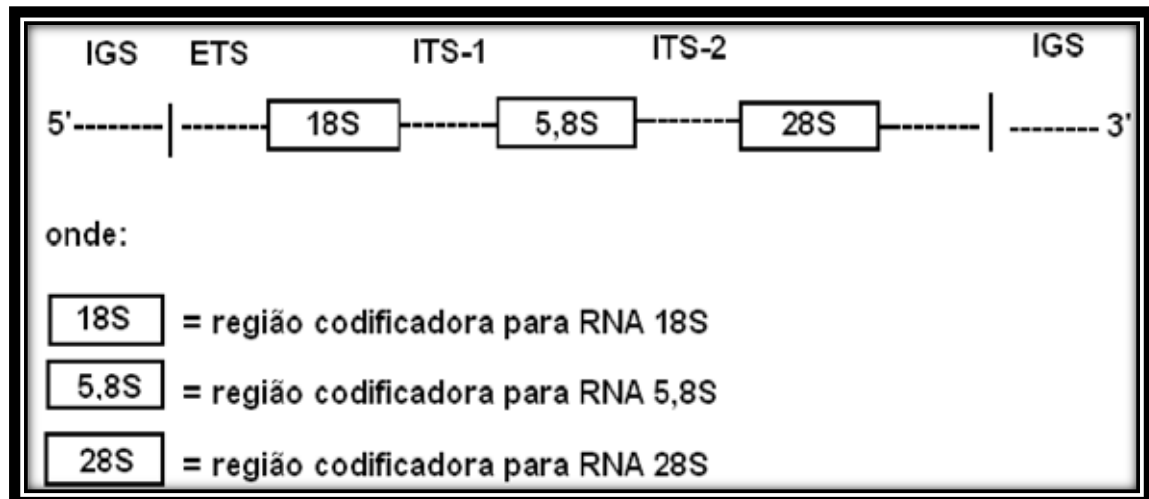


Figura 8 : Organização do rDNA em eucariotos.

As linhas tracejadas correspondem às regiões intergênicas (IGS) e aos espaçadores externo (ETS) e internos (ITS-1 e ITS-2) não codificadores, que são eliminados durante o processamento do RNA.

A família multigênica do rDNA com suas regiões codificadoras de rRNA, filogeneticamente conservadas, possuem espaçadores divergentes. Destes, o espaçador ITS-1 permite análises filogenéticas entre espécies estreitamente relacionadas (BOWER et al., 2009).

Como já mencionado, as regiões codificadoras para os rRNAs 18S, 5,8S e 28S são altamente conservadas, ao contrário das regiões espaçadoras, as quais são retiradas durante o processamento do transcrito primário. Essas últimas são altamente variáveis entre as espécies, incluindo espécies relacionadas, possibilitando que as regiões ITS-1 e ITS-2 sejam utilizadas como marcadores moleculares. Polimorfismos de tamanho e restrição dessas regiões têm sido amplamente utilizados para análises moleculares, permitindo a identificação de espécies intimamente relacionadas, incluindo espécies crípticas. Em *Drosophila*, a análise do polimorfismo da região ITS-1 possibilitou a diferenciação molecular de espécies de *Drosophila* do grupo repleta, bem como a verificação em nível molecular do fenômeno de

dominância nucleolar entre espécies desse grupo (BAFFI ; CERON, 2002; COMMAR et al., 2007).

Variações intra e interespecíficas nas seqüências das regiões espaçadores do rDNA já tem sido detectadas em várias classes de animais, por exemplo em ácaros, caramujos e outros organismos eucariotos (NAVAJAS et al., 1992; TUAN; SANTOS, 2007; MULLER et al., 2007; KOETSCHAN et al., 2010).

Análises das seqüências de nucleotídeos das regiões espaçadoras das regiões ITS-1 e ITS-2 do rDNA em *Tunga penetrans* (pulga da areia), para a comparação entre indivíduos, resultou em polimorfismos intraespecíficos nestas regiões, podendo assim separar populações destes organismos (GAMERSCHLAG et al., 2008).

Os polimorfismos de tamanho para a região ITS-1, associados à análise de fragmentos restritos dessa mesma região permitiram demonstrar as relações filogenéticas entre varias espécies de triatomíneos (TARTAROTTI; CERON 2005).

Em crustáceos, níveis de variação intragenômica envolvendo os marcadores ITS-1 e ITS-2 foram analisados em sete espécies de lagostins de água doce. Os resultados mostraram seqüências mais longas do que usualmente observadas em outras espécies com um alinhamento de 760 e 1.300 pb, respectivamente. Além disso, foi observado que essas seqüências contêm múltiplas inserções de microssatélites, que apresentam considerável variação intragenômica quanto ao número de repetições (HARRIS; CRANDALL, 2000).

O marcador molecular ITS-1 juntamente com genes mitocondriais foram utilizados na tentativa de elucidar questões filogenéticas envolvendo espécies de caranguejos do gênero *Eriocheir* de importância comercial e endêmicas da China, Coréia e Japão. Espécies desse gênero apresentam similaridades causando confusões taxonômicas e levantando suspeitas de possível hibridização, após análises de indivíduos com características intermediárias encontrados no sudeste da China (CHU et al., 2003)

Especificamente em camarões, análises da região ITS-1 possibilitaram vários estudos em diferentes abordagens, como morfologia, aspectos ecológicos e filogenia. No gênero *Artemia* (camarões-de-salmoura), análises da região ITS-1 e marcadores RFLP apontaram significativas divergências interespecíficas entre as espécies de isolados globais, assim como identificação de organismos originados por partenogênese e combinados com os antepassados de reprodução sexuada. Assim a região ITS-1, além de sua utilidade filogenética, serviu como marcador para identificar organismos desconhecidos do gênero *Artemia* (BAXEVANIS et al., 2006).

A região ITS-1 exibiu um alto grau de polimorfismos de comprimento, variando de 448 pb nas espécies de camarões *Metapenaeopsis dalei* a 1491 em *Macrobrachium nipponense*, em estudo envolvendo oito espécies de camarões exportados no sudeste da China, sendo a região ITS-1 investigada na busca de um marcador genético apropriado para estudo de filogenia. Tradicionalmente características morfológicas são utilizadas para a classificação de diferentes espécies de camarões, mas em espécies muito próximas, as características morfológicas são tão similares que apenas especialistas podem diferenciá-las, tornando este método, às vezes, inviável. Assim o uso de marcadores moleculares apropriados, como o espaçador ITS-1, tem sido comum para muitos estudos filogenéticos (WU, et al., 2009).

1.4 Isoenzimas como Marcadores Bioquímicos

As isoenzimas são diferentes formas moleculares de uma mesma enzima que ocorrem em uma espécie, fazendo parte de um grupo diferenciado de proteínas que possuem funções metabólicas específicas (BRAMMER, 2000). Marcadores bioquímicos baseados em eletroforese de isoenzimas são úteis em programas de melhoramento, permitindo, a partir de fenótipos isoenzimáticos, a identificação de genes que conferem resistência a doenças, bem como a caracterização do controle genético desses genes. Estudos desses marcadores bioquímicos são interessantes porque cada isoenzima é um produto de um alelo específico, viabilizando as diferenças genéticas entre indivíduos e permitindo que muitas dificuldades apresentadas pelo uso dos marcadores morfológicos fossem resolvidas (SHIELDS et al., 1983; BRAMMER, 2000). Quaisquer mudanças que ocorram nas sequências nucleotídicas codificadoras dos genes, refletirão em mudanças nas sequências de aminoácidos das proteínas, que poderão acarretar mudanças no fenótipo ou até inviabilizar a ação proteica. Graças a esses polimorfismos isoenzimáticos, a técnica de eletroforese de isoenzimas é extensivamente utilizada em estudos filogenéticos, taxonômicos e genética de populações, em ampla gama de organismos (LANDA; RAMOS, 2009).

Existem poquíssimos trabalhos na literatura relacionados aos estudos de isoenzimas em crustáceos. Sbordoni et al. (1986) foram os primeiros a estudar camarões com base em marcadores isoenzimáticos, o que representou um marco no uso de marcadores bioquímicos na carcinocultura. Outro estudo relacionado à caracterização de isoenzimas nesses organismos refere-se ao trabalho de Landa; Ramos (2009) em populações naturais de

Thermocyclops decipiens, um copépode muito presente em ambientes aquáticos, que são predadores de larvas de mosquitos.

1.5 Análises por MEV

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma ferramenta muito útil em análises de caracteres morfológicos dos organismos, contribuindo com detalhes e aspectos microscópicos das estruturas analisadas, oferecendo informações histológicas, funcionais e particulares das espécies estudadas. Análises de MEV têm contribuído para a elucidação da morfologia de estruturas em muitos grupos de crustáceos, apresentando técnica simples de preparação de amostras e poucos reagentes químicos (SCOTTO, 1980).

Entre os crustáceos decápodos, estudos de estruturas como pleópodes, télson, urópodes e estruturas bucais do camarão *Calianassa subterrânea* foram analisadas por MEV, revelando detalhes anatômicos destas estruturas, os quais ajudaram na compreensão de suas funções principais como locomoção, propulsão, ventilação, alimentação e reprodução (STAMHUIS; VIDELER, 1998; STAMHUIS et al., 1998).

Estudos por MEV da morfologia de pleópodes, pereópodes e estruturas bucais de vários grupos de crustáceos decápodos já foram investigados por outros pesquisadores, como a morfologia de partes bucais e pereópodes da lagosta *Nephrops norvegicus* por Farmer (1974), o camarão *Atya innocous* por Felgenhauer; Abele (1983), no camarão *Panaeus merquiensis* por Hindley; Alexander (1978) e Alexander et al. (1980).

Harlioglu (2008) realizou estudos morfológicos por MEV contribuindo para a investigação comparativa entre duas espécies similares de lagostins, *Astacus leptodactylus* e *Pacifastacus leniusculus* (Crustacea:Decapoda:Astacoidea). Através destes estudos puderam-se destacar diferenças no rostro e, principalmente, nas peças bucais e número de dentes da mandíbula. As análises das peças bucais foram realizadas em indivíduos durante seus estágios juvenis, detacando-se as diferenças das estruturas bucais entre as duas espécies ao longo do processo de desenvolvimento. Essas diferenças entre as estruturas bucais destas espécies revelaram hábitos alimentares diferentes devido à escolha pelo alimento.

Análises por microscopia eletrônica da espermatogênese de *Macrobrachium rosenbergii*, revelaram detalhes ultraestruturais durante o desenvolvimento das células germinativas, desde espermatogônias até espermatozoides maduros; estes passam por vários estágios de desenvolvimento que são similares à espermatogênese de outros invertebrados,

mas apresentando características morfológicas particulares desta espécie. A morfologia externa dos espermatozoides de *M. resenbergii* foi analisada por MEV e, assim como outros palemonídeos, o espermatozóide apresenta forma de guarda-chuva com uma projeção anterior chamada de ferrão e sem flagelo (POLJAROEN et al., 2010).

O presente trabalho tem por base a utilização de técnicas ultraestruturais, bioquímicas e moleculares em estudos envolvendo *M. amazonicum* e *M. jelskii*, espécies de camarões de água doce introduzidos nos reservatórios aquáticos da região Noroeste do Estado de São Paulo, visando obter novas informações relacionadas à distinção dessas espécies.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Distinção de populações de *M. amazonicum* e *M. jelskii* com base em análises isoenzimáticas, moleculares, morfométricas e ultraestruturais.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar os polimorfismos de comprimento e de fragmentos de restrição para a região ITS-1 do rDNA em *M. jelskii* e *M. amazonicum*, com base na amplificação dessas sequências pela reação em cadeia da polimerase, com o objetivo de distinguir essas espécies pelo comprimento e padrão de restrições dos fragmentos amplificados.
- Realizar sequenciamento das regiões ITS-1 do rDNA amplificadas por PCR, com o objetivo de verificar a ocorrência de haplótipos específicos para *M. jelskii* e *M. amazonicum*.
- Realizar análises de isoenzimas na tentativa de se obter dados de bandejamento específicos que possam caracterizar estas espécies.
- Realizar análises ultraestruturais do télson e espinhos caudais internos de *M. jelskii* e *M. amazonicum* por microscopia eletrônica de varredura, como um critério morfológico adicional na distinção dessas espécies.
- Realizar análises morfométricas do télson, espinhos caudais internos, apêndice masculino e rostro, como um critério morfológico adicional na distinção dessas espécies.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção das amostras

As amostras de *M. amazonicum*, *M. jelskii* e dos indivíduos intermediários utilizadas neste estudo foram coletadas nas represas do Cervinho (21°21'38"S e 49°28'59"W) e Barra Mansa (21°14'27"S e 49°56'28"W), pertencentes aos municípios de Sales/ SP e Mendonça/ SP respectivamente, (Figuras 9, 10 e 11). As coletas foram realizadas mediante a Autorização para atividades com finalidade científica concedida pelo Ministério do Meio Ambiente (MMA), Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO (Anexo 1).



Figura 9 : Mapa indicando os locais de coleta (Sales/SP e Mendonça/SP).



Figura 10 : Vista geral da represa Barra Mansa, Mendonça/SP. (GUERRA, 2011).



Figura 11: Vista geral da prainha de Sales/SP. Disponível em :www.pescaki.com Acesso em : 23 jan. 2014.

Para a realização das coletas utilizamos uma peneira com malha de 2 mm de diâmetro passada sob a vegetação subaquática marginal. Os animais coletados foram armazenados em caixas de plástico contendo água proveniente dos próprios pontos de coleta e transportados até o laboratório de Genética Bioquímica do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE/UNESP) de São José do Rio Preto/SP. No laboratório, os camarões foram mortos por congelamento e em seguida as espécies foram identificadas e separadas através da análise dos espinhos caudais internos (também chamados de cercos caudais) localizados na extremidade do télson, com auxílio de lupa, segundo Melo (2003). Após esta etapa, os camarões foram dissecados para a remoção do tecido muscular abdominal, hepatopâncreas, rostro, apêndice masculino, télson e espinhos caudais internos. As amostras de tecido muscular e hepatopâncreas foram colocados em microtubos de 1,5 ml e congelados à temperatura de -80°C para as análises moleculares e isoenzimáticas. As amostras dos télsons, espinhos caudais internos e apêndices masculinos destinadas às análises por microscopia eletrônica de varredura foram acondicionadas em geladeira em microtubos de 0,2 ml com solução do fixador Karnovsky modificado, como parte da técnica de processamento do material biológico destinado às análises por microscopia eletrônica de varredura. As amostras dos rostros, télsons e espinhos caudais internos destinadas às análises morfométricas foram congeladas a seco à temperatura de -20°C em microtubos de 0,2 ml. No caso de *M. amazonicum*, as carapaças foram armazenadas a -20°C para a extração da quitina (Apêndice).

3.2 Preparação das amostras para a Microscopia Eletrônica de Varredura

3.2.1 Lavagem e fixação

As estruturas analisadas neste estudo foram o télson, os espinhos caudais e os apêndices masculinos. As estruturas após serem extraídas, foram lavadas em água destilada e em seguida imersas em 200 µl de solução do fixador Karnovsky modificado, composto de glutaraldeído a 2,5% e tampão fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4) e dibásico (Na_2HPO_4) a 0,2 M e pH 7,2, permanecendo em repouso na geladeira por no mínimo 24 horas. Após essa etapa, as amostras foram lavadas 3 vezes em solução composta de fosfato de sódio monobásico e dibásico (0,2 M e pH 7,2) para a remoção do excesso da solução fixadora.

As amostras já fixadas foram então imersas em solução de tetróxido de ósmio (OsO_4) a 1% e mantidas em repouso em geladeira por 30 minutos. Em seguida foram lavadas em água destilada, apresentando uma coloração escura.

3.2.2 Desidratação

A desidratação é uma etapa essencial para a remoção da água das amostras, visto que a coluna do microscópio opera em alto vácuo.

As amostras foram submetidas em soluções de concentrações crescentes de álcool etílico a 30%, 50%, 70%, 90% e 100%, permanecendo 10 minutos em cada concentração, sendo que na solução de concentração 100% as amostras foram submetidas por 3 vezes (se houver a necessidade de interrupção do processo, isto deve ser feito na solução de 70%, permanecendo as amostras nesta solução).

Ao término da desidratação, as amostras foram separadas em gaiolas metálicas específicas onde foram identificadas, passando pelo processo de secagem ao ponto crítico.

3.2.3 Secagem das amostras ao ponto crítico

A secagem ao ponto crítico de amostras para a microscopia eletrônica de varredura é uma etapa muito importante, a fim de evitar danos ao microscópio e às amostras. Em relação às amostras, os principais danos que devem ser evitados são as distorções, promovidas pela tensão superficial da umidade do ar.

A secagem ao ponto crítico tornou-se o método mais difundido nos laboratórios, devido sua simplicidade e baixo custo. Quando um líquido, armazenado em uma câmara hermeticamente fechada é aquecido, a temperatura e a pressão críticas são alcançadas, nas quais a densidade da fase líquida é igual à densidade da fase gasosa. Então o ponto crítico de uma substância é a união entre temperatura e pressão, sob as quais essa substância pode coexistir na fase líquida e gasosa, sem que haja uma separação entre essas fases.

Os equipamentos utilizados nesse processo são chamados de secadores ao ponto crítico. A solução utilizada neste estudo foi álcool etílico absoluto juntamente com gás carbônico (CO_2). O gás carbônico é utilizado rotineiramente devido ao seu ponto crítico se aproximar às condições normais, apresentando temperatura e pressão críticas mais baixas. O modelo de secador ao ponto crítico utilizado foi EMCPD030 da Leica.

As amostras foram separadas em uma gaiola de metal com divisórias, composta por uma tela que permite o contato do álcool e gás carbônico com as amostras, onde cada divisória recebia um tipo de amostra, sendo cada uma delas identificadas. A gaiola contendo as amostras foi então levada à câmara do secador ao ponto crítico. Após atingido o ponto crítico e eliminados o álcool e o gás carbônico da câmara, as amostras já secas e protegidas da umidade do ar passaram pelo processo de montagem.

3.2.4 Montagem das amostras

As amostras foram montadas em porta-espécimes metálicos denominados *stubs*. Um *stub* é um disco metálico de 12 a 13 mm de diâmetro, apresentando um pino no centro de sua superfície inferior, o qual serve para acoplá-lo no metalizador e ao microscópio eletrônico de varredura (o tamanho do *stub* varia dependendo do modelo do microscópio). A superfície de cada *stub* foi coberta por uma fita adesiva de cobre com dupla face, promovendo a fixação das amostras. Após a montagem das amostras, estas foram para a próxima etapa que é a

metalização. Se não for feita a metalização imediatamente, as amostras devem ser armazenadas em uma câmara a vácuo.

3.2.5 Metalização (*sputtering*)

O processo de metalização corresponde a uma vaporização de ouro sobre as amostras. No metalizador, os *stubs* contendo as amostras são encaixados em uma plataforma, ao redor da qual acopla-se um cilindro de vidro com sua parte superior vedada por um disco de metal que possui em sua face interior uma placa de ouro. O cilindro forma então uma câmara hermeticamente fechada contendo as amostras em seu interior, e externamente a ele, estão acoplados uma bomba a vácuo e um cilindro de argônio.

Quando o metalizador entra em funcionamento, o vácuo no seu interior começa a ser formado e ocorre a entrada do argônio. Ao atingir o vácuo requerido, estabelece-se entre a placa de ouro e as amostras uma diferença de potencial suficiente para ionizar o gás dentro do cilindro, formando uma coloração violeta. Os íons positivos bombardeiam a placa de ouro arrancando seus átomos, os quais se movimentam pelo gás e se depositam na superfície inferior do cilindro, inclusive sobre as amostras, metalizando-as. Após essa etapa, as amostras já estão prontas para serem analisadas ao microscópio eletrônico de varredura. O modelo de metalizador utilizado no presente estudo foi o K550 da Emitech.

3.3 Análises Morfométricas

As análises morfométricas foram realizadas em indivíduos acima de dois centímetros de comprimento. As estruturas analisadas foram os télsons, os espinhos caudais internos e os rostros de *M. amazonicum*, *M. jelskii* e indivíduos com características morfológicas intermediárias, provenientes dos dois pontos de coletas já citados (exceto para os rostros, os quais foram obtidos de camarões coletados apenas em Mendonça /SP). Para os télsons e os espinhos caudais internos foram utilizados 240 camarões, sendo 40 *M. amazonicum*, 40 *M. jelskii* e 40 camarões intermediários. Para os rostros foram utilizados 30 indivíduos de cada grupo. Após os camarões estarem mortos, estas estruturas foram removidas com gilete, lavadas com água destilada e armazenadas a seco em microtubos de 0,2 ml.

Foram realizadas 480 medidas do comprimento de télsons e espinhos caudais internos em estereomicroscópio equipado com ocular micrométrica (Anexo 2). Obtidos os dados, foram feitas as análises estatísticas começando pela estatística descritiva, avaliando se os dados eram paramétricos ou não. A normalidade foi checada pela inspeção dos histogramas através do teste de *Shapiro-Wilks* e a homogeneidade foi checada através do teste de *Levene*. A maioria dos dados apresentaram-se como não paramétricos, devido a uma não distribuição normal ao longo da curva de normalidade. Para a comparação entre dois grupos independentes foi utilizado o teste t de *Student* para os dados paramétricos e o teste *Mann Whitney* para dados não paramétricos. Para a comparação entre três grupos independentes foi utilizado o teste *Kruskal-Wallis* (para dados não paramétricos). Todos os testes estatísticos foram realizados no programa *Statistica* versão 8.0 e em todas as análises o nível de significância considerado foi de 5% ($p \leq 0,05$).

As análises morfométricas dos rostros basearam em suas formas e contornos. Primeiro as imagens dos rostros foram capturadas com o auxílio de lupa e, em seguida, essas imagens foram processadas no programa Adobe Photoshop CS6, a fim de se obter imagens de contorno preto e branco (Anexo 3), requisito necessário para as análises dessas imagens no programa Shape v.1.3 (IWATA; UKAI, 2002). O Shape é um pacote de programas de computador que avaliam as formas biológicas baseadas em Descritores de Fourier Elípticas (DFEs), originalmente proposto por Kuhl e Giardina (1982). Esses programas são capazes de realizar delineamento bidimensional fechado de qualquer forma. Através destas imagens bidimensionais fechadas, o programa calcula os Principais Componentes (PCs), com base numa matriz de variância e covariância dessas imagens, criada a partir dos coeficientes dos DFEs. Os valores dos PCs (de cada imagem ou amostra) representam medições numéricas de caracteres morfológicos, sendo usados em análises estatísticas tradicionais. Os tamanhos das amostras são desconsiderados nas análises estatísticas, pois os coeficientes de Fourier são normalizados com base na primeira elipse harmônica. Os principais programas do Shape utilizados para o processamento das formas foram ChainCoder.exe, CHC2NEF.exe, PrinComp.exe e PrinPrint.exe.

Após as análises realizadas com os programas do Shape, foram obtidos, para os rostros, valores de três PCs relevantes, PC1, PC2 e PC3 (Anexo 4) para os três grupos de camarões analisados. Os valores destes PCs foram submetidos à análise estatística descritiva, através do teste de *Shapiro-Wilks* para a normalidade e teste de *Levene* para a homogeneidade dos dados e apenas os valores do PC1 apresentaram-se como paramétricos, já os os valores dos PC2 e PC3 apresentaram-se como não paramétricos. Para a análise estatística

interespecífica dos valores do PC1 dos rostros de *M. amazonicum*, *M. jelskii* e os indivíduos intermediários, foi-se utilizado o teste ANOVA *One Way*, complementado pelo teste de *Tukey* como *post hoc*. Já para as análises estatísticas interespecíficas envolvendo os valores de PC2 e PC3 foi utilizado o teste para dados não paramétricos *Kruskal-Wallis*, complementado pelo teste de *Dunn* como *post hoc*. Para a análise estatística interespecífica para dois grupos independentes foi utilizados o teste t de *Student* para dados paramétricos e *Mann Whitney* para os dados não paramétricos.

3.4 Análises de Isoenzimas

As análises isoenzimáticas foram realizadas envolvendo tecido muscular abdominal e hepatopâncreas (órgão que participa no processo de digestão), dependendo da natureza funcional da isoenzima utilizada.

3.4.1 Processamento das amostras

As amostras foram pesadas individualmente em balança de precisão e homogeneizadas com mixer em tampão de amostra composto por Tris-HCl a 0,1 M e pH 8,8 contendo glicerol a 10% e azul de bromofenol a 0,2%, a 0° C, depois sendo centrifugadas a 14.000 rpm por 2 minutos. O padrão de homogeneização utilizado foi de 1 :10, ou seja, a cada 1 mg de tecido foram utilizados 10 µl de tampão de amostra.

Um volume de 10 µl do sobrenadante de cada amostra foi aplicado em gel de poliacrilamida. Este padrão de aplicação das amostras foi utilizado para todos os sistemas enzimáticos exceto para a enzima amilase, a qual sofreu uma diluição do sobrenadante em tampão de amostra na proporção de 1 :25, ou seja, 1 µl do sobrenadante foi diluído em 25 µl de tampão de amostra. Essa padronização diferenciada para a enzima amilase foi escolhida após uma série de testes envolvendo vários padrões de diluição, na tentativa de se obter uma concentração que apresentasse melhor resultado na separação das bandas por eletroforese.

Os sistemas enzimáticos analisados neste estudo foram álcool desidrogenase (ADH - E.C. 1.1.1.1), octanol desidrogenase (ODH – E.C. 1.1.1.73), lactato-desidrogenase (LDH – E.C.1.1.1.27), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH – E.C. 1.1.1.49), esterases (E.C. 3.1.1.1) e amilase (E.C. 3.2.1.1)

3.4.2 Confeção dos géis, condições para a eletroforese e coloração

A concentração dos géis de poliacrilamida utilizada foi de 8%, segundo o seguinte protocolo : água 17,7 ml, solução de acrilamida e bisacrilamida (N, N' metilenobisacrilamida) 7,8 ml, tampão do gel (Tris-HCl 1,5 M pH 8,8) 4 ml, solução de persulfato de potássio a 2% 0,5 ml e TEMED (N, N, N', N' tetrametilenodiamina) 20 µl, totalizando 30 ml de volume final de gel. O volume final do gel é calculado de acordo com as dimensões das placas de vidro da cuba de eletroforese, sendo que as quantidades de reagentes varia conforme varia o volume final de gel a ser preparado. Após a aplicação do gel, este ainda em forma líquida, as placas foram mantidas ao abrigo da luz por 1 h para uma perfeita polimerização do gel. Após a polimerização, as placas foram devidamente acopladas à cuba de eletroforese e em seguida as amostras foram aplicadas em seus respectivos poços com o auxílio de micropipetadores e ponteiros (foram aplicados no gel 10 µl de cada amostra, exceto para a enzima amilase, para a qual foram aplicados 5 µl de cada amostra). Em seguida foi adicionado à cuba o tampão de corrida, composto por 0,025 M de Tris e 0,192 M de glicina, pH 8,3. A corrida teve duração de 4 horas a 180 V. Foram confeccionados géis individuais para cada sistema enzimático.

A confecção do gel para a amilase seguiu um outro protocolo, com concentração do gel a 5% e volume final de 25 ml, descrito a seguir : 9 ml de água, 0,5g de amido dissolvidos em 5 ml de água (deve-se aquecer a solução para uma completa dissolução do amido), 4 ml de solução de acrilamida/bisacrilamida, 6,5 ml de tampão do gel (Tris-HCl 1,5 M pH 8,8), 0,5 ml (ou 500 µl) de persulfato de potássio e 60 µl de TEMED. Para a amilase a corrida também foi de 4 horas a 180 V.

As soluções utilizadas neste trabalho estão descritas a seguir :

- Solução estoque de acrilamida/bisacrilamida: 30g de acrilamida e 0,8g de bisacrilamida dissolvidas em água, num volume final de 100 ml. Essa solução deve ser mantida em geladeira, em frasco escuro.
- Tampão do gel concentrado: Tris 1,5 M ajustado para pH 8,8 com HCl 6M. Deve ser mantido na geladeira, em frasco escuro.
- Solução de persulfato de potássio a 2%, esta deve ser congelada em alicotas, das quais as sobras não devem ser reutilizadas. Utilizando-se uma alicota de 500 µl para a confecção de cada gel.
- TEMED com aproximadamente 99% de pureza: este deve ser o último componente adicionado à solução, dando início à polimerização.

-Tampão da amostra: Tris-HCl 0,1 M pH 8,8 contendo glicerol a 10% e azul de bromofenol a 0,2%. Este deve ser guardado no congelador.

- Tampão de corrida : 0,025 M de Tris e 0,192 M de glicina, pH 8,3.

Após o término da corrida, os géis foram retirados das placas de vidro e incubados em 100 ml de tampões específicos (conforme o sistema enzimático estudado) e mantidos sob agitação por 1 h para ajuste do pH do gel. Para esterases o tampão de incubação foi composto de fosfato de sódio monobásico e dibásico na concentração de 0,1 M e pH 6,6, preparado a partir de 35 ml de fosfato de sódio monobásico a 0,2 M e 15 ml de fosfato de sódio dibásico a 0,2 M diluídos em 50 ml de água destilada. Para as enzimas álcool desidrogenase, octanol desidrogenase, lactato desidrogenase, glicose-6-fosfato desidrogenase e amilase, o tampão de incubação foi composto por 100 ml de Tris-HCl a 0,1 M e pH 7,2.

3.4.3 Identificação das isoenzimas em géis

3.4.3.1 Coloração para a ADH (álcool desidrogenase), ODH (octanol desidrogenase), LDH (lactato desidrogenase)

Para a identificação dessas isoenzimas foi utilizado um método usando um composto de tetrazólio {5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4,5-dimetil-2-tiazoli)-3-(4-sulfofenil ou MTT)} que indica a presença de desidrogenase nos sistemas biológicos ou extratos celulares submetidos à eletroforese em condições não desnaturantes. Quando o MTT é usado com o reagente PMS, ele pode ser reduzido para formação da formazana que forma um precipitado (BUTTKE et al., 1993; CORY et al., 1991). Esta metodologia foi utilizada para detectar a presença das enzimas álcool desidrogenase (ADH), octanol desidrogenase (ODH), lactato desidrogenase (LDH) e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH). Quando os sais de tetrazólio são reduzidos, eles dão início a formação do cristal de formazana que se precipita no gel (TELLIER et al., 1992). A reação de formação da formazana que permite a identificação das desidrogenases está indicada na Figura 12.

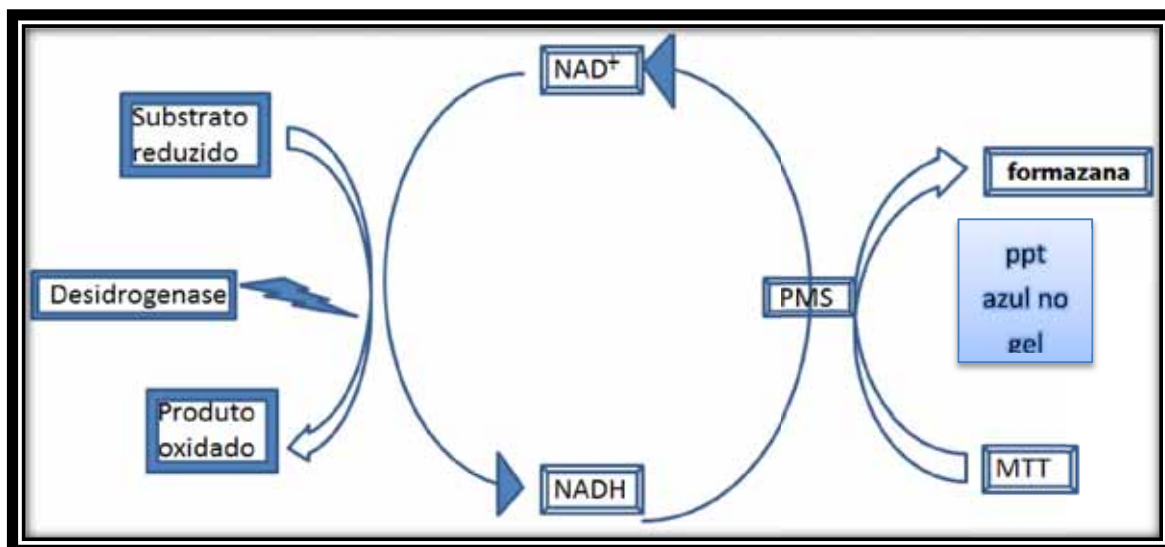


Figura 12 : Esquema geral da reação de identificação das desidrogenases pelo método do coloração com tetrazólio.

As enzimas álcool desidrogenase, octanol desidrogenase e lactato desidrogenase foram analisadas no tecido muscular e hepatopâncreas das espécies *M. amazonicum* e *M. jelskii*.

O ensaio para a identificação da álcool-desidrogenase após a eletroforese foi constituído pelo seguinte sistema :

- 100 ml de Tris-HCL a 0,1 M e pH 7,2.
- 2 ml de etanol absoluto
- 10 mg de NAD^+
- 10 mg de MTT
- 5 mg de PMS

A coloração do gel foi realizada por duas horas em temperatura ambiente sob agitação.

Para a octanol desidrogenase, foram adicionados 2 ml de octanol no mesmo gel para a ADH e a coloração foi realizada por mais 5 horas em temperatura ambiente sob agitação.

Para a lactato desidrogenase foi utilizado como substrato 100 mg de lactato de cálcio penta-hidratado previamente dissolvido sob aquecimento e introduzido na solução de coloração acima descrita. A coloração foi realizada por 2 horas em temperatura ambiente sob agitação.

Após a coloração os géis foram tratados com 100 ml de solução descorante composta de álcool etílico absoluto, ácido acético e água destilada na proporção de 5:1:5, respectivamente, e em seguida os géis foram escaneados e as imagens documentadas para análises.

3.4.3.2 Coloração para a G6PDH (glicose-6-fosfato desidrogenase)

A enzima glicose-6-fosfato desidrogenase é amplamente polimórfica entre os organismos e catalisa a reação de oxidação da glicose-6-fosfato para 6-fosfo-gliconato, utilizando-se como coenzima o NADP^+ . A atividade desta enzima pode ser identificada após a eletroforese, pelo sistema do tetrazólio já mencionado (Figura 12), substituindo-se o NAD^+ pelo NADP^+ .

O ensaio para a identificação da glicose-6-fosfato desidrogenase após a eletroforese foi constituído pelo seguinte sistema :

- 100 ml de Tris-HCL a 0,1 M e pH 7,2.
- 50 mg de glicose-6-fosfato
- 10 mg de NADP^+
- 10 mg de MTT
- 5 mg de PMS

A coloração do gel foi realizada por duas horas em temperatura ambiente sob agitação.

Após a coloração os géis foram tratados com 100 ml de solução descorante composta de álcool etílico absoluto, ácido acético e água destilada na proporção de 5 :1 :5 respectivamente e em seguida escaneados.

3.4.3.3 Coloração para Esterases

As enzimas esterases fazem parte de um amplo grupo de enzimas que hidrolisam principalmente os ésteres de ácidos carboxílicos. Essas enzimas são amplamente disseminadas entre os organismos, apresentando ampla variabilidade genética. Neste trabalho identificamos esterases no tecido muscular e hepatopâncreas dos camarões. As reações de coloração que permitem a identificação de esterases em géis estão descritas na Figura 13.

Após a eletroforese, os géis foram tratados com a seguinte solução :

- 100 ml de tampão fosfato de sódio monobásico e dibásico a 0,1 M, pH 6,6, contendo :
- 20 mg de α -naftil acetato (ou 1-naftil acetato)
- 20 mg de β -naftil acetato (ou 2-naftil acetato)
- 50 mg de Fast Blue RR salt
- 5 ml de n-propanol

A diluição do α -naftil acetato e do β -naftil acetato foi feita em 2 ml de acetona antes de se misturar aos demais reagentes. A solução final foi filtrada e adicionada sobre o gel. O gel foi incubado por 1 hora ao abrigo da luz sob agitação.

A solução de coloração para os géis tratados com inibidores de esterases seguiram o mesmo protocolo de coloração descrito acima, mais a adição do inibidor na concentração de 10 mM. Os inibidores de esterases utilizados neste trabalho foram NaF, pOHMB e PMSF. O PMSF é insolúvel na solução tampão de fosfato de sódio monobásico e dibásico, foi assim, solubilizado em 2 ml de metanol antes de ser acrescentado à solução de coloração. A incubação com os inibidores ocorreu da mesma forma já descrita acima.

Após a coloração os géis foram tratados com 100 ml de solução descorante composta de álcool etílico absoluto, ácido acético e água destilada na proporção de 5 :1 :5 respectivamente e em seguida escaneados.

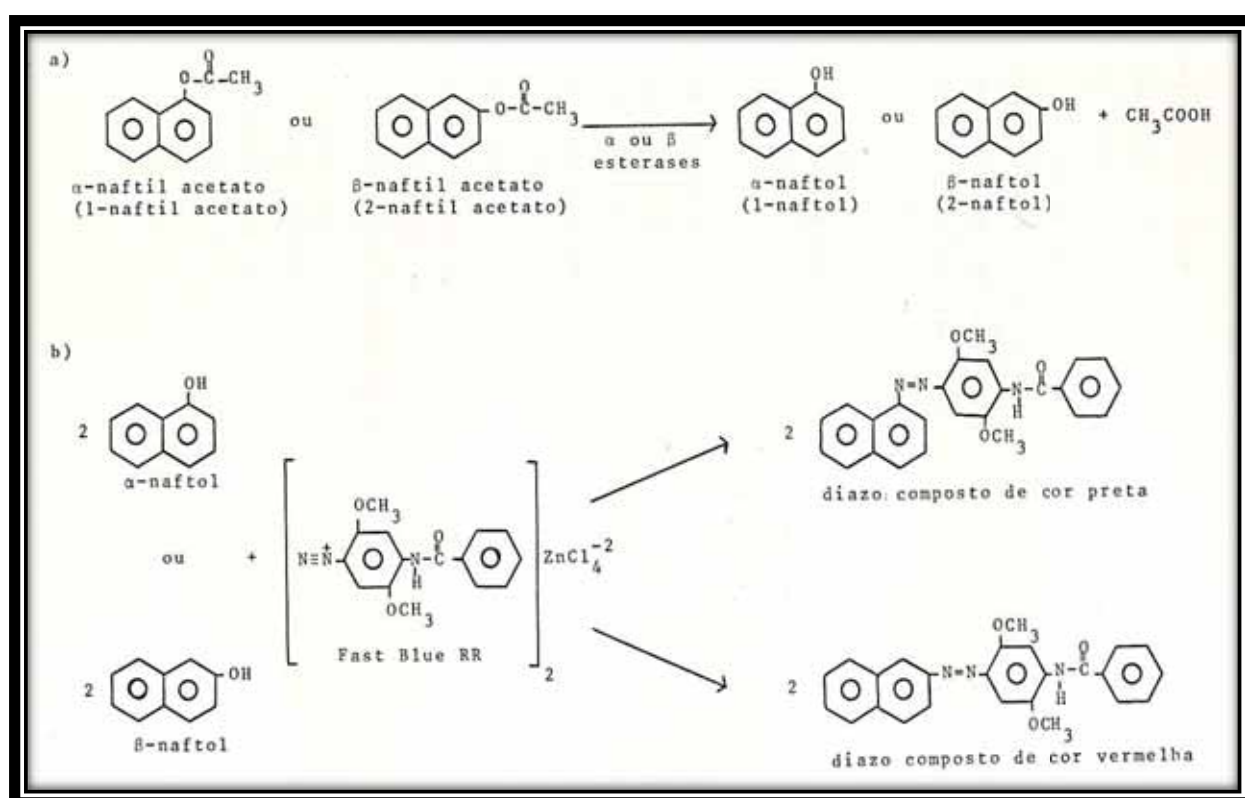


Figura 13 : Identificação de α e β -esterases pelo método de coloração do Fast Blue RR em géis. (CERON, 1988).

3.4.3.4 Coloração para a Amilase

O preparo da coloração para esta isoenzima está no momento em que o amido é incorporado no gel, durante a preparação deste. Além dos reagentes habituais, adiciona-se 500 mg de amido previamente aquecido à solução de polimerização do gel. Para observação das bandas das isoenzimas da amilase, após a eletroforese, o gel é incubado em 100 ml tampão Tris-HCl (0,1 M pH 7,2) contendo 50 mg de Iodo (I_2) e 50 mg de Iodeto de Potássio (KI). O resultado pode ser visualizado como um gel de poliacrilamida de coloração azul, devido à reação do $KI+I_2$ com o amido presente em todo o gel, exceto nas regiões das bandas isoenzimáticas, nas quais as enzimas degradaram o amido. Os géis foram escaneados logo após a coloração, pois a mesma não é permanente. O esquema de ação geral da amilase está representado na Figura 14 a seguir :

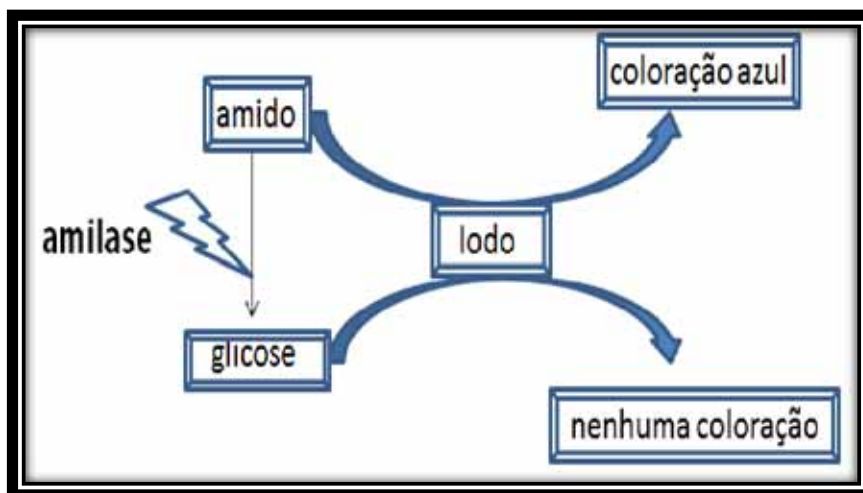


Figura 14 : Esquema geral da reação catalisada pela amilase como pode ser observada em géis.

3.5 Análise Molecular

3.5.1 Extração de DNA

Para as análises moleculares, foram utilizadas amostras individuais de *M. amazonicum* e *M. jelskii*, coletados nos reservatórios de Mendonça/SP ou Sales/SP. O DNA total de cada indivíduo foi extraído do tecido muscular abdominal utilizando-se a técnica de extração com fenol-clorofórmio (Anexo 5). As amostras de DNA, após a extração, foram verificadas em gel

de agarose a 1% (aplicando-se 2 µl de cada amostra no gel) para checagem da qualidade deste material e, a seguir, o DNA foi quantificado em espectrofotômetro ND-1000 NanoDrop (Uniscience) a fim de se obter as concentrações de cada amostra para a montagem das reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction* - Reação em Cadeia da Polimerase). As amostras de DNA foram mantidas congeladas a temperatura de -30° C.

3.5.2 Oligonucleotídeos iniciadores e condições de reação da polimerase para amplificação da região ITS-1

Para a amplificação por PCR da região ITS-1 do rDNA de *M. amazonicum* e *M. jelskii* foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) para a região intergênica ITS-1 do rDNA inicialmente desenhados para *Drosophila*, com as seguintes sequências:

- F.5'-CGTAACAAGGTTTCCGTAGG-3'
- R.5'- GCTGCGTTCTTCATCGAC- 3' (BAFFI; CERON, 2002)

Também foram utilizados *primers* desenhados para a amplificação da região ITS-1 em *Macrobrachium* (WU et al., 2009), com as seguintes sequências:

- F.5'- TGAACCTGCGGAAGGATCAT-3'
- R.5'-GTYCTTCMTCGACSCACGAG-3'

Para as reações de PCR foram preparadas soluções com volume final de 25 µl para cada amostra, contendo os seguintes reagentes:

- 2,5 U de Taq DNA Polimerase, 0,5 µl, (Sigma-Aldrich, cat. D4545-250U)
- 2,5 µl de tampão 10x (que acompanha a enzima), numa concentração final de 1x na reação
- 1,5 µl de MgCl₂ (cloreto de magnésio) 25 mM, numa concentração final de 1,5 mM na reação
- 2,5 µl de solução de dNTPs a 2 mM cada base (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- 1 µl de cada solução de primer (*forward* e *reverse*) a 10 pM cada
- 150 ng de DNA *template*
- água Milli-Q autoclavada, completando o volume final para 25 µl.

A ciclagem para a amplificação da região ITS-1 em termociclador *Eppendorf* está descrita abaixo :

- 3 minutos a 95°C para a desnaturação inicial
- 1 minuto a 95° C para cada ciclo

- 1 minuto a 55° C para anelamento dos primers de *Drosophila* e 57° C para os primers de camarão
- 1,15 minuto a 72° C para a ação da Taq DNA Polimerase
- 34 repetições (ou ciclos, reiniciando na temperatura de 95 °C 1 minuto)
- 10 minutos de extensão final pela Taq DNA Polimerase

Após a reação, os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1% e corados com brometo de etídio a 1%. Para cada amostra foram aplicados no gel 2 µl do amplificado juntamente com 1 µl de solução de azul de bromofenol preparada em glicerol. Foram utilizados 3 µl *DNA Ladder* 1Kb (Sigma-Aldrich) como marcador de tamanho molecular. A corrida foi realizada em tampão TAE durante 70 minutos a 90 V. Os fragmentos de DNA em gel foram visualizados em transluminador UV e as imagens digitalizadas.

Devido a presença de bandas inespecíficas, a banda de interesse foi recortada do gel e purificada com o kit *GFX PCR DNA & Gel Band* (GE Healthcare and Life Technologies), de acordo com as instruções do fabricante. Para a purificação da banda em gel, foram utilizados volumes de 100 µl de produto de PCR para cada amostra, a fim de se obter concentrações adequadas do DNA amplificado após a purificação, as quais são necessárias para o sequenciamento.

Os sequenciamentos de DNA foram realizados no Laboratório Multiusuário para Sequenciamento de DNA do Departamento de Tecnologia do Câmpus da FCAV-UNESP de Jaboticabal, no Centro de Estudos do Genoma Humano da USP em São Paulo e no Laboratório de Estudos Genômicos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, IBILCE-UNESP, Câmpus de São José do Rio Preto. Neste laboratório também foram realizados os experimentos de clonagem dos fragmentos ITS-1 de *M. amazonicum* e *M. jelskii*.

3.5.3 Condições para a clonagem

Para a clonagem, cinco amostras individuais de cada espécie (*M. amazonicum* e *M. jelskii*) foram utilizadas. Primeiro foram realizadas reações de PCR para a amplificação do fragmento ITS-1, segundo o protocolo de PCR já descrito acima. Para a eletroforese, a corrida foi de 80 minutos a 90 V em tampão TAE. Em seguida os produtos de PCR separados em gel foram purificados utilizando-se o kit *GFX PCR DNA & Gel Band* (GE Healthcare and Life

Technologies) de acordo com as instruções do fabricante. O DNA purificado foi armazenado a -30° C.

A clonagem foi realizada utilizando-se o kit *pGEM-T® and pGEM-T® Easy Vector Systems* da Promega, de acordo com as instruções do fabricante, junto à bactéria *Escherichia coli* (em linhagens competentes). O vetor utilizado deste kit foi o pGEM-T de 3000 pb, contendo o gene *lacZ* responsável pela produção da enzima β -galactosidade.

As bactérias transformadas foram inoculadas em placas de petri em meio de cultura sólido LB (Luria-Bertani) contendo X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo) e IPTG (Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo), uma técnica chamada rastreio azul e branco. O produto do gene *lacZ* do operon lac é a enzima β -galactosidade, a qual, na presença do IPTG (indutor da proteína) cliva o X-gal produzindo galactose e 5-bromo-4-cloro-3-hidroxiindol o qual é oxidado formando um composto azul insolúvel, 5,5'-dibromo-4, 4'-dicloro-índigo, que se precipita e serve como um indicativo da transformação bacteriana. As bactérias transformadas com vetores que não possuem o inserto, apresentam o gene *lacZ* ativo, o qual produz a enzima β -galactosidade que reage com o X-gal produzindo colônias azuis, segundo o esquema acima. As bactérias transformadas com os vetores que possuem o inserto de interesse (que se liga à região promotora do gene *lacZ*, inativando-o) não produzirão a enzima β -galactosidade, assim não haverá reações com o X-gal e as colônias permanecerão brancas. Essas colônias brancas que possuem o inserto serão utilizadas para a extração do DNA plasmidial. As colônias brancas foram transferidas para tubos falcon contendo 40 ml de meio LB líquido (um tubo para cada colônia), no qual permaneceram 24 h em estufa a 37° C para proliferação das bactérias.

A extração do DNA plasmidial foi realizada com o kit *GeneJet Plasmid Miniprep®* da *Thermo Scientific*, de acordo com as instruções do fabricante. O DNA plasmidial purificado foi armazenado a -30° C. Reações de PCR foram realizadas utilizando-se *primers* para a amplificação do plasmídio e *primers* específicos para a amplificação da região ITS-1, para a checagem da clonagem do inserto.

3.5.4 Sequências consenso e análise filogenética

As sequências de DNA foram obtidas no sequenciador automático 3130 XL da *Applied Biosystems* do Laboratório de Estudos Genômicos do IBILCE. Inicialmente o material a ser sequenciado foi submetido à reação de marcação com o método de *BigDye® Terminator v3.1* da *Life Technologies*, de acordo com as instruções do fabricante e em seguida aplicadas ao sequenciador. Também foram sequenciadas algumas amostras no Centro de Pesquisa do Genoma Humano e Células Tronco da Universidade de São Paulo (USP).

As sequências obtidas correspondentes à região ITS-1 de 3 indivíduos *M. amazonicum* e 4 *M. jelskii* provenientes de Mendonça/SP foram inicialmente analisadas com o software BioEdit 5.0.9 (HALL, 1999). Uma sequência consenso foi obtida para cada segmento de DNA de cada um dos indivíduos.

Posteriormente, as sequências de todos os indivíduos foram alinhadas utilizando-se o editor ClustalW (THOMPSON et al., 1997) acoplado ao software DAMBE (XIA, XIE, 2001). As variações nucleotídicas, padrões de substituições e distâncias genéticas foram estimadas usando o software MEGA 6.0 (TAMURA et al., 2013).

O cálculo da taxa de divergência entre as espécies utilizou o modelo de substituição nucleotídica Kimura-2-parameter (K2P) (KIMURA, 1980). As relações filogenéticas foram inferidas utilizando-se o método de *Neighbor-Joining* e da Máxima Verossimilhança (*MaximumLikelihood – ML*) de Guindon e Gascuel (2003).

3.5.5 Análise por RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

Para a técnica de RFLP utilizou-se amostras do fragmento amplificado correspondente à região ITS-1 de *M. amazonicum* e *M. jelskii*, incubados separadamente com as enzimas de restrição *Hind* III, *EcoR* I, *Sal* I, *Xba* I, *Sma* I e *BamH* I de acordo com o protocolo abaixo:

- 6 µl de água MILLI-Q® autoclavada
- 2 µl de tampão (cada enzima vem com seu tampão específico – *React Buffer*), na concentração de 1x no volume final da reação
- 2 µl de enzima de restrição a 5U/µl
- 10 µl do DNA purificado, numa concentração de 20 ng/µl, totalizando um volume final de 20 µl por amostra

As reações foram realizadas em microtubos de 0,2 ml e em seguida incubadas em banho-maria por 4 horas a 37° C. Após este período elevou-se a temperatura para 60° C por 5 minutos para a inativação das enzimas de restrições. Em seguida o material foi submetido à eletroforese em gel de agarose por 60 minutos a 90 V em tampão TAE, para a visualização dos fragmentos restritos.

4 RESULTADOS

4.1 Dados de Coletas e Análise Ultraestrutural

O principal critério de distinção dos espécimes, nas coletas realizadas nas duas localidades, foi baseado nas diferenças de tamanho dos espinhos caudais internos localizados na extremidade da estrutura quitinosa denominada télson.

A Figura 15 (A-C) corresponde a uma eletromicrografia por MEV (Microscopia Eletrônica de Varredura) mostrando em detalhes a estrutura do télson em *M. amazonicum*. Nestas figuras pode-se observar 2 pares de pequenos espinhos dorsais, cerdas nas margens laterais na porção ventral e 2 pares de espinhos caudais localizados na sua extremidade (Figura 15A). A Figura 15 (B-C) apresentam detalhes dessas estruturas. Os dois pares de espinhos caudais (externos e internos) possuem suas inserções na face ventral do télson e, como já mencionado, têm sido utilizados como um critério de distinção entre *M. amazonicum* e *M. jelskii*. O par de espinhos externos é menor que o par de espinhos internamente localizado e esta característica não muda entre as espécies. Já a morfologia dos espinhos caudais internos apresenta variação de tamanho entre elas. Em *M. amazonicum* eles são menores, não alcançando a extremidade do télson e em *M. jelskii* os mesmos são maiores e ultrapassam em comprimento a extremidade do télson (Figura 16 A-B). Essa diferença observada no par de espinhos caudais internos em *M. amazonicum* e *M. jelskii* é o principal critério utilizado atualmente para a distinção dos espécimes pertencentes às essas espécies. Entretanto, alguns indivíduos apresentam tamanhos intermediários quanto ao par de espinhos internos, o que dificulta sua classificação como *M. amazonicum* ou *M. jelskii* (Figura 16 C).

De acordo com os critérios acima mencionados, em Mendonça o maior número de camarões coletados foi da espécie *M. Jelskii* com 67,4% do total de indivíduos, em seguida *M. amazonicum* com 17,3% e indivíduos intermediários com 15,1%. Já em Sales, as coletas mostraram que *M. amazonicum* apresentou maior predominância com 58,8% do total de indivíduos coletados, acompanhado de 24,9% de *M. jelskii* e 16,2% de indivíduos intermediários.

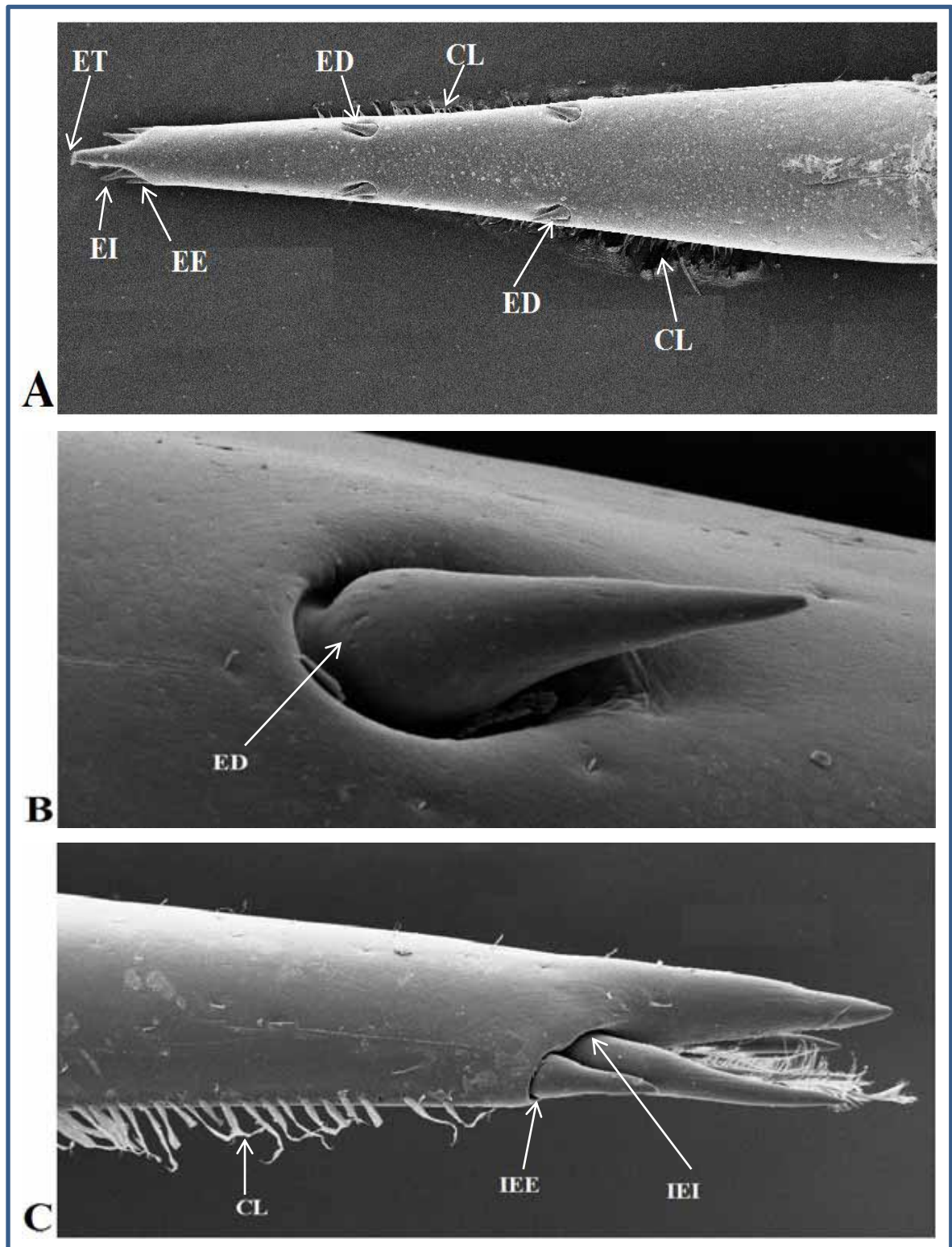


Figura 15 (A-C): A : Eletromicrografia de um télson de *M. amazonicum* em vista dorsal, mostrando os dois pares de espinhos dorsais (ED), as cerdas laterais (CL) e a extremidade do télson (ET) com seus pares de espinhos caudais externos (EE) e internos (EI). B : detalhe de um espinho dorsal (ED). C : detalhe das cerdas laterais (CL) e inserção dos espinhos caudais externos (IEE) e internos (IEI) na porção ventral do télson.

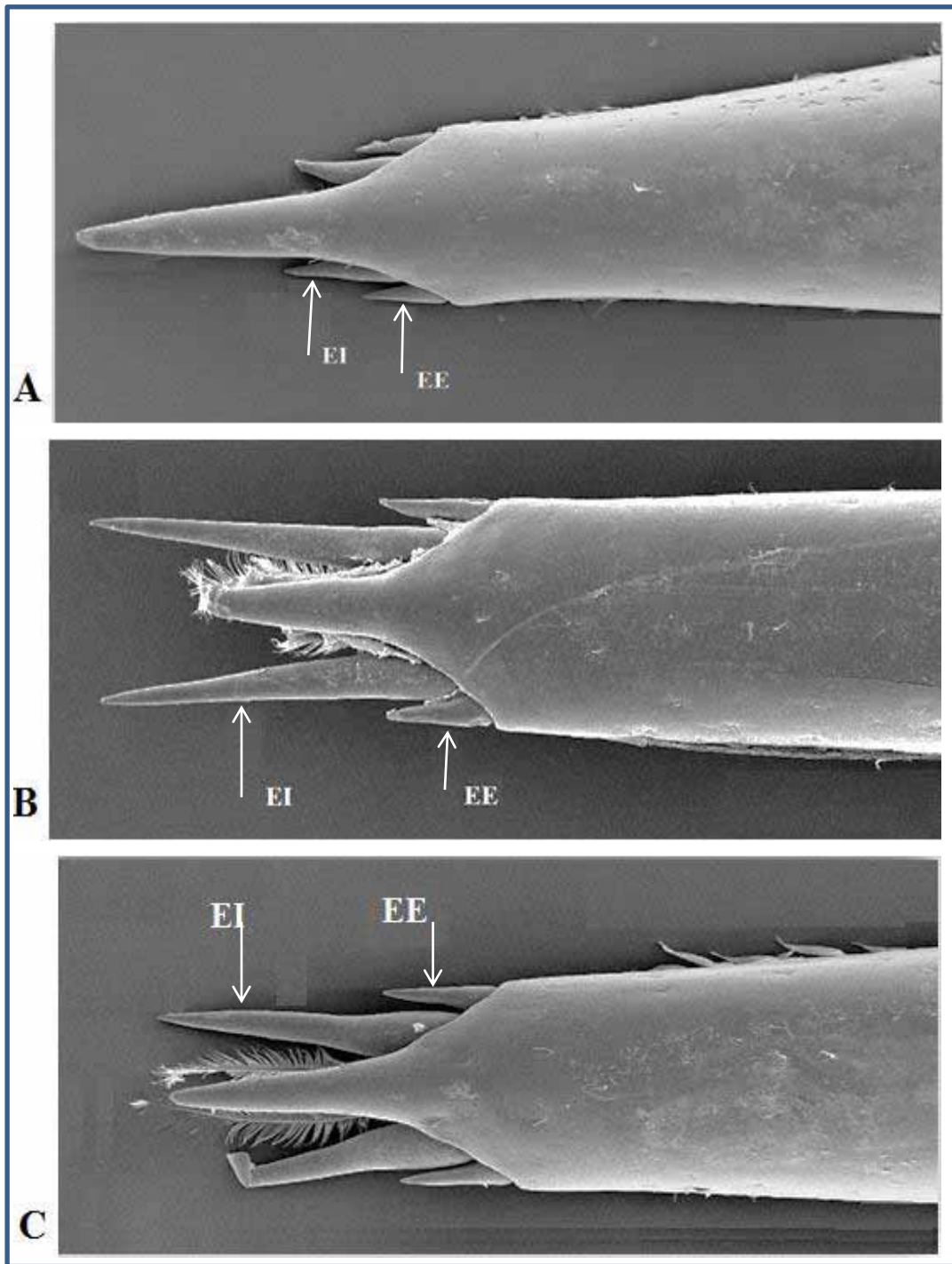


Figura 16 (A-C): Eletromicrografias dos espinhos caudais internos, localizados na extremidade do télson, vista dorsal. EE: espinho externo; EI: espinho interno. *M. amazonicum* (A), *M. jelskii* (B) e indivíduo com padrão intermediário (C).

A Figura 17 (A-C) mostra a morfologia geral dos apêndices masculinos de *M. amazonicum* e *M. jelskii* e de um indivíduo apresentando padrão intermediário. Pode-se observar que os apêndices masculinos, dispostos no segundo par de pereópodes entre o exopódito e o apêndice interno, localizados no abdome não apresentam diferenças significativas em sua morfologia entre indivíduos classificados como *M. amazonicum*, *M. jelskii* ou intermediários. Esse apêndice apresenta-se como uma haste rígida da qual partem muitas cerdas (detalhe Figura 17 D).

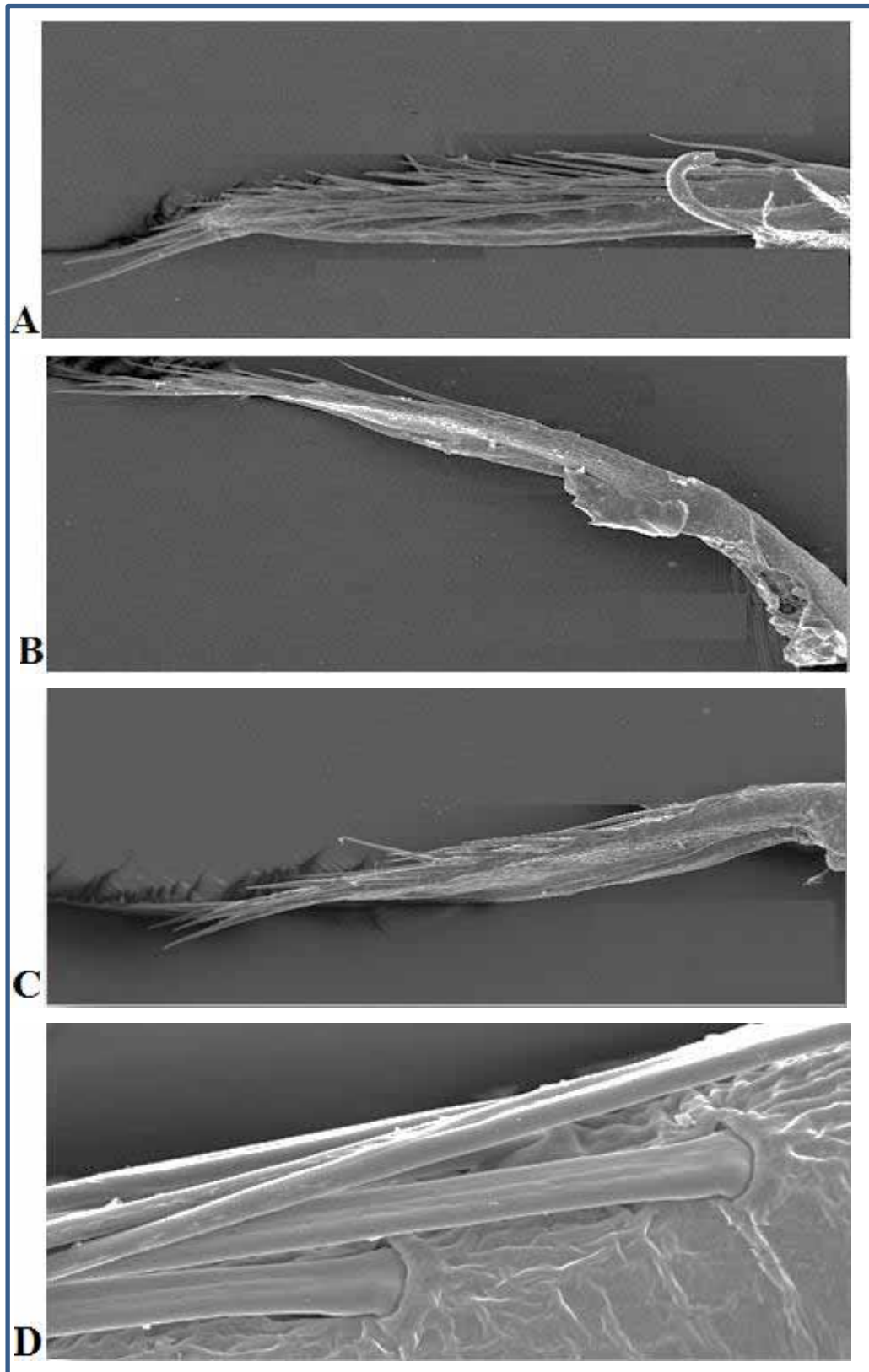


Figura 17 (A-D) : Eletromicrografias do apêndice masculino de *M. amazonicum* (A) ; *M. jelskii* (B) ; indivíduo com padrão intermediário (C) e detalhe das cerdas localizadas no apêndice masculino (D).

4.2 Análises morfométricas

4.2.1 Morfometria dos télsons e espinhos caudais internos

As medidas morfométricas dos télsons e espinhos caudais de *M. amazonicum*, *M. jelskii* e indivíduos com padrão intermediário provenientes de Sales/SP e Mendonça/SP foram realizadas em estereomicroscópio equipado com ocular micrométrica. Após serem obtidas as medidas, estas foram submetidas a testes estatísticos, os quais revelaram diferenças entre as espécies e o padrão intermediário, nas duas variáveis analisadas (tamanho do télson e tamanho dos espinhos caudais internos).

Como os dados referentes às medidas não são paramétricos em sua maioria, o teste estatístico de variância utilizado foi *Kruskal-Wallis* complementado pelo teste de *Dunn (post hoc)*.

Os valores das análises estatísticas descritivas envolvendo médias e desvios padrões dos télsons e espinhos caudais estão detalhados nas Tabelas 1 e 2 abaixo, além do valor de *p* obtido na comparação dos três grupos.

Tabela 1: Valores das médias e desvios padrões (*s*) dos télsons de cada espécie em cada ponto de coleta. Os valores estão expressos em milímetros (mm). O valor de *p* é resultado do teste de *Kruskal-Wallis* envolvendo a comparação entre os três grupos independentes e não paramétricos.

	TÉLSON					
	SALES/SP			MENDONÇA/SP		
	$\bar{x}$	<i>s</i>	<i>p</i>	$\bar{x}$	<i>s</i>	<i>p</i>
<i>M.amazonicum</i>	6,62	0,52		6,15	0,76	
<i>M.jelskii</i>	3,92	0,56	0,0000	3,58	0,58	0,0000
<i>Intermediário</i>	4,65	0,62		4,70	0,73	

Tabela 2: Valores das médias e desvios padrões (s) dos espinhos caudais internos de cada espécie em cada ponto de coleta. Os valores estão expressos em milímetros (mm). O valor de *p* é resultado do teste de *Kruskal-Wallis* envolvendo a comparação entre os três grupos independentes e não paramétricos.

	ESPINHOS CAUDAIS INTERNOS					
	SALES/SP			MENDONÇA/SP		
	$\bar{x}$	s	<i>p</i>	$\bar{x}$	s	<i>p</i>
<i>M.amazonicum</i>	0,33	0,05		0,32	0,05	
<i>M.jelskii</i>	0,48	0,08	0,0000	0,47	0,04	0,0000
Intermediário	0,39	0,04		0,39	0,05	

As análises estatísticas entre dois grupos foram realizadas com o teste *t* de *Student* para os grupos normais e homogêneos (dados paramétricos) e com o teste *Mann Whiney* para os grupos não normais e não homogêneos (dados não paramétricos). Em todas as análises *p* foi significativo, < 0,0001, assim demonstrando diferenças entre os grupos analisados (*M. amazonicum*, *M. jelskii* e indivíduos intermediários), como mostra a Tabela 3 abaixo:

Tabela 3: Comparação entre dois grupos independentes utilizando-se teste *t* (#) e *Mann Whitney* (*). Para todos os grupos analisados o valor de *p* foi significativo < 0,0001.

ESTRUTURA	PONTO DE COLETA	GRUPOS	VALOR DE <i>p</i>
TÉLSON	SALES	<i>M. amazonicum</i> x <i>M.jelskii</i> *	< 0,0001
		<i>M. amazonicum</i> x intermediário*	
		<i>M. jelskii</i> x intermediário*	
	MENDONÇA	<i>M. amazonicum</i> x <i>M.jelskii</i> *	
		<i>M. amazonicum</i> x intermediário*	
		<i>M. jelskii</i> x intermediário*	
ESPINHOS CAUDAIS INTERNOS	SALES	<i>M. amazonicum</i> x <i>M.jelskii</i> *	< 0,0001
		<i>M. amazonicum</i> x intermediário #	
		<i>M. jelskii</i> x intermediário*	
	MENDONÇA	<i>M. amazonicum</i> x <i>M.jelskii</i> *	
		<i>M. amazonicum</i> x intermediário*	
		<i>M. jelskii</i> x intermediário #	

As medidas individuais dos télsons e espinhos caudais internos dos três grupos foram plotadas em gráficos de barras e de dispersão, oferecendo, em dimensão visual, as diferenças já descritas pelas análises estatísticas (Figuras 18, 19, 20 e 21).

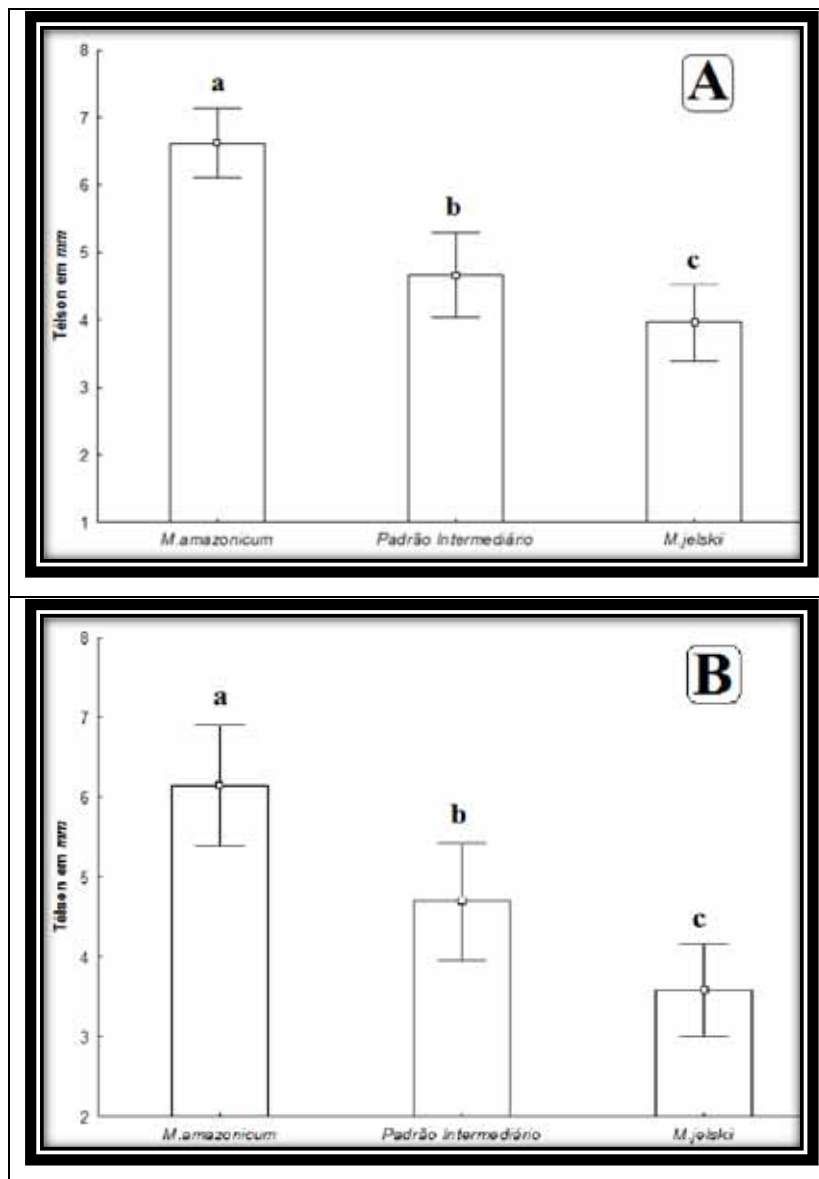


Figura 18 (A e B): Medidas do télson em milímetros de *M. amazonicum*, indivíduos com padrão intermediário e *M. jelskii*. A : indivíduos coletados na represa de Sales/SP ; B : indivíduos coletados na represa de Mendonça/SP.

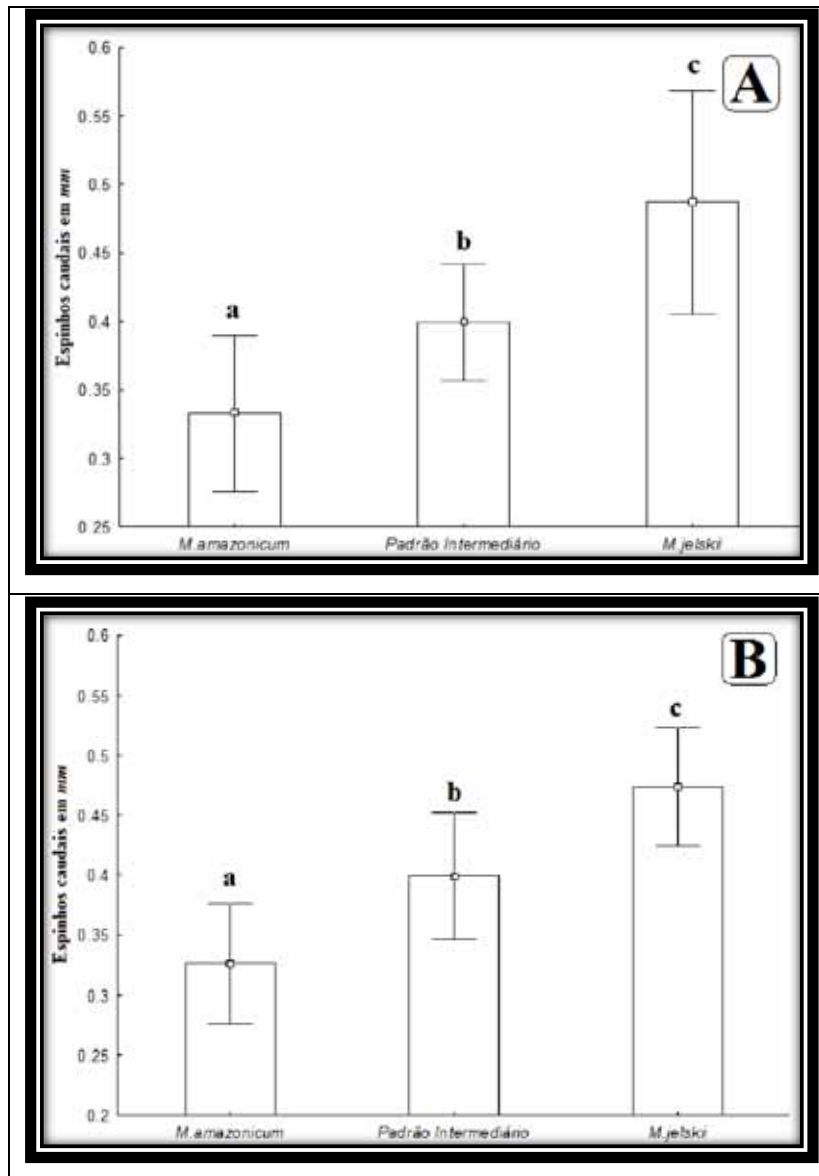


Figura 19 (A e B): Medidas dos espinhos caudais em milímetros de *M. amazonicum*, indivíduos com padrão intermediário e *M. jelskii*. A : indivíduos coletados na represa de Sales/SP ; B : indivíduos coletados na represa de Mendonça/SP.

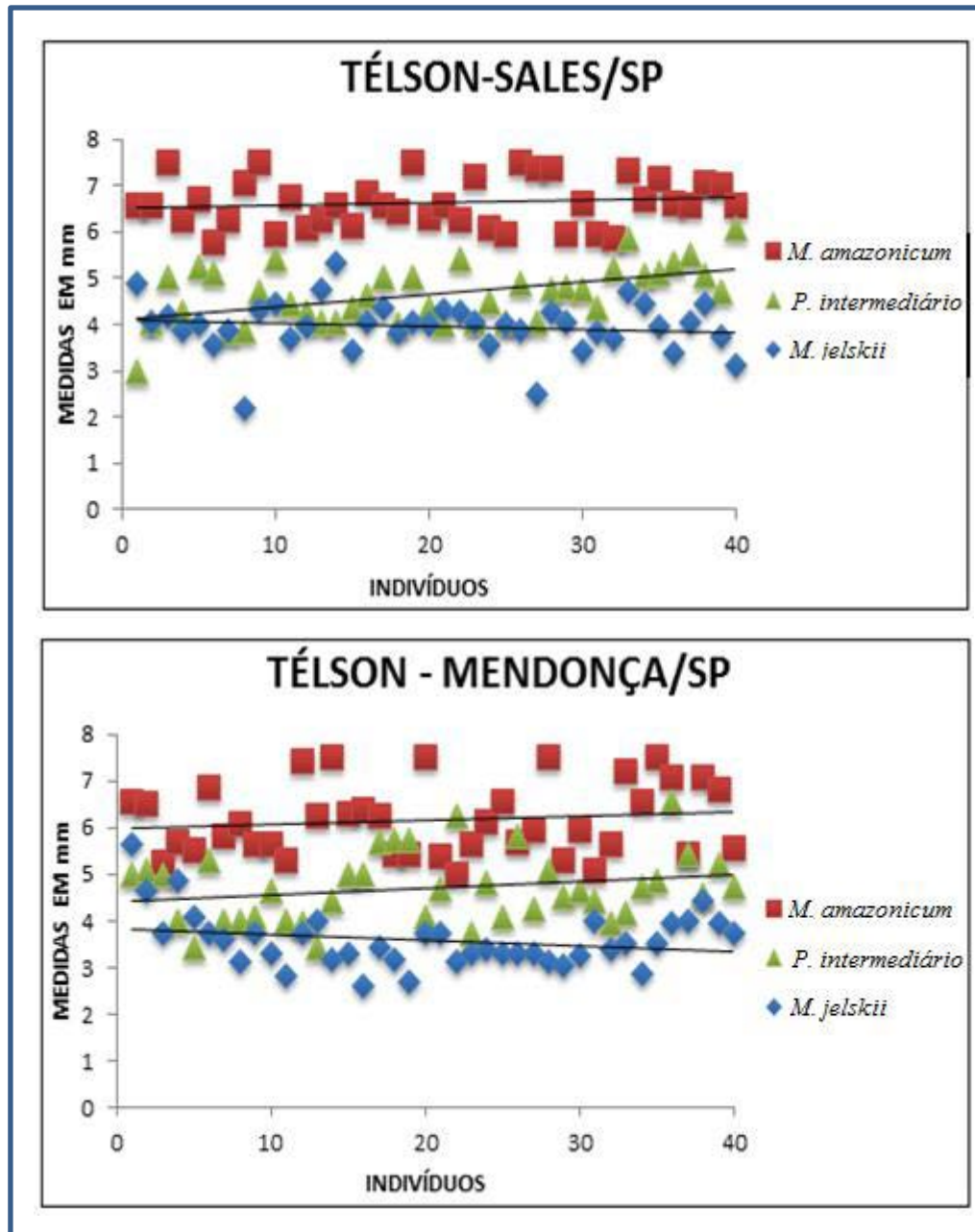


Figura 20 : Gráficos de dispersão envolvendo as medidas em mm dos télsons de *M. amazonicum*, Padrão intermediário e *M. jelskii* de Sales/SP e Mendonça/SP

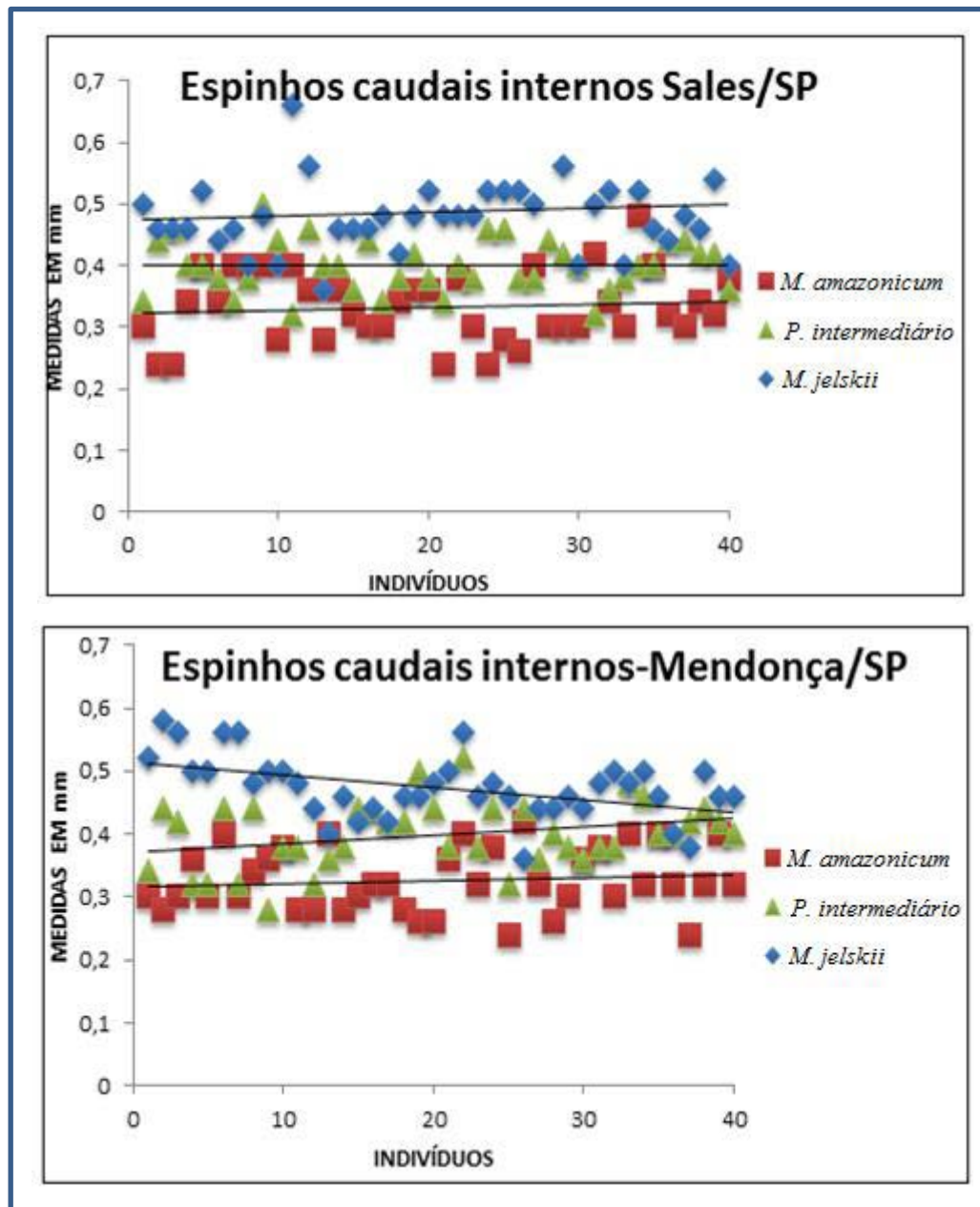


Figura 21 : Gráficos de dispersão envolvendo as medidas em mm dos espinhos caudais internos de *M. amazonicum*, Padrão intermediário e *M. jelskii* de Sales/SP e Mendonça/SP.

4.2.2 Análises da forma dos rostros através do programa Shape

As imagens dos rostros após serem contornadas e convertidas para o padrão de cores preto e branco através do programa Adobe Photoshop CS6, foram submetidas às análises realizadas pelo pacote de programas do Shape v.1.3. As imagens foram analisadas de acordo com Descritores de Fourier Elípticas (DFEs), através do delineamento bidimensional fechado, gerando assim uma matriz numérica, a qual foi utilizada para as análises estatísticas. As formas de cada imagem foram convertidas em valores numéricos, calculados pelo próprio programa. Quando as formas das imagens são comparadas, o programa apresenta as regiões onde há maior variação entre elas. Essas regiões são denominadas PCs (Principais Componentes). Cada PC apresenta um maior valor ou menor, dependendo do grau de variação das formas analisadas.

Através das análises das formas dos rostros realizadas neste trabalho, pode-se identificar três PCs que apresentaram maior porcentagem de variância, foram eles PC1, PC2 e PC3, onde cada um deles referem-se a uma região variável.

A Tabela 4 apresenta os valores de variações dos PCs em cada grupo isolado e quando comparados os três grupos juntos.

Tabela 4 : Valores em % das variações dos Principais Componentes do rosto, em análises intraespecífica e interespecífica. Amostras provenientes de Mendonça/SP.

Variações Intraespecíficas			Variações Interespecíficas		
Espécies	PCs	Valor em %	Espécies	PCs	Valor em %
<i>M. amazonicum</i>	PC1	36,2	<i>M. amazonicum</i>	PC1	34,6
	PC2	15,6	<i>P. intermediário</i>		
	PC3	8,7	<i>M. jelskii</i>		
<i>P. intermediário</i>	PC1	38,4	<i>M. amazonicum</i>	PC2	18,2
	PC2	16,4	<i>P. intermediário</i>		
	PC3	7,1	<i>M. jelskii</i>		
<i>M. jelskii</i>	PC1	43,9	<i>M. amazonicum</i>	PC3	4,8
	PC2	11,8	<i>P. intermediário</i>		
	PC3	6,6	<i>M. jelskii</i>		

Em âmbito intraespecífico, a Figura 22 apresenta as variações de contorno das formas dos rostos de cada grupo, destacando as regiões variáveis dos Principais Componentes (PC1, PC2 e PC3), além das imagens que representam as médias e os desvios padrões.

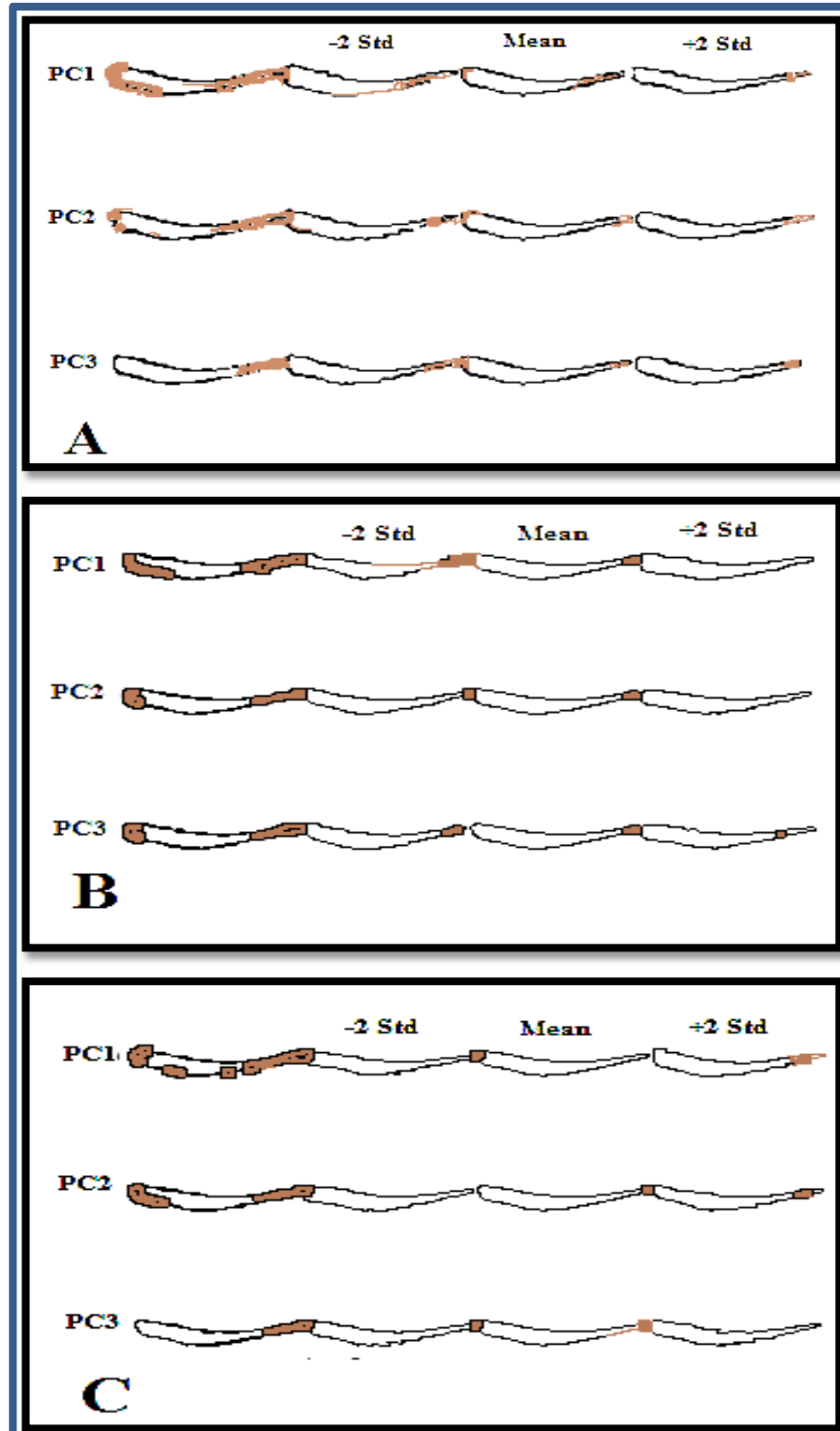


Figura 22 (A-C): Esquemas das formas dos rostos apresentando as regiões dos PC1, PC2 e PC3. A : *Macrobrachium amazonicum*, ; B : *M. jelskii* ; C : *P. intermediário*. Os esquemas apresentam as imagens que representam a média das variações juntamente com os desvios padrões. Note que as principais variações são verificadas nas regiões basais e apicais dos rostos.

A Figura 23 apresenta as análises de contorno das variações interespecíficas dos PCs (PC1, PC2 e PC3) envolvendo os três grupos de camarões. A Figura 24 apresenta os valores dos PCs plotados em gráficos de dispersão, referentes aos três grupos analisados.

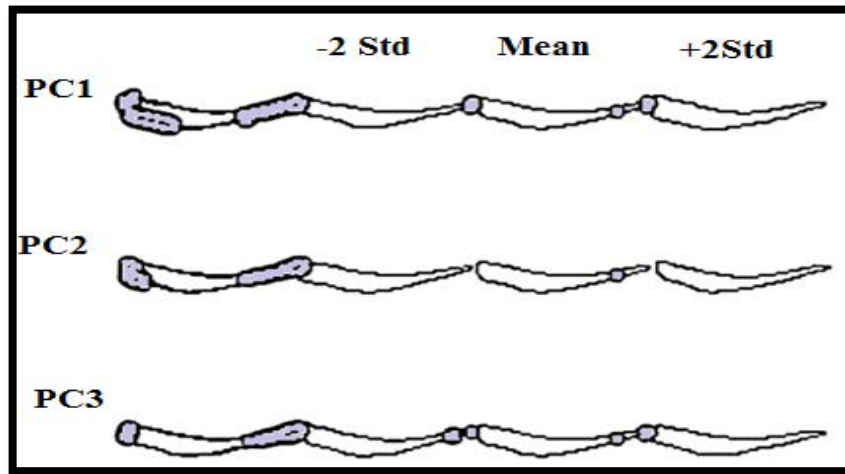


Figura 23 : Variações de contorno das formas dos rostros envolvendo a análise dos três grupos (*M. amazonicum*, *P. intermediário* e *M. jelskii*), envolvendo os três PCs (PC1, PC2 e PC3).

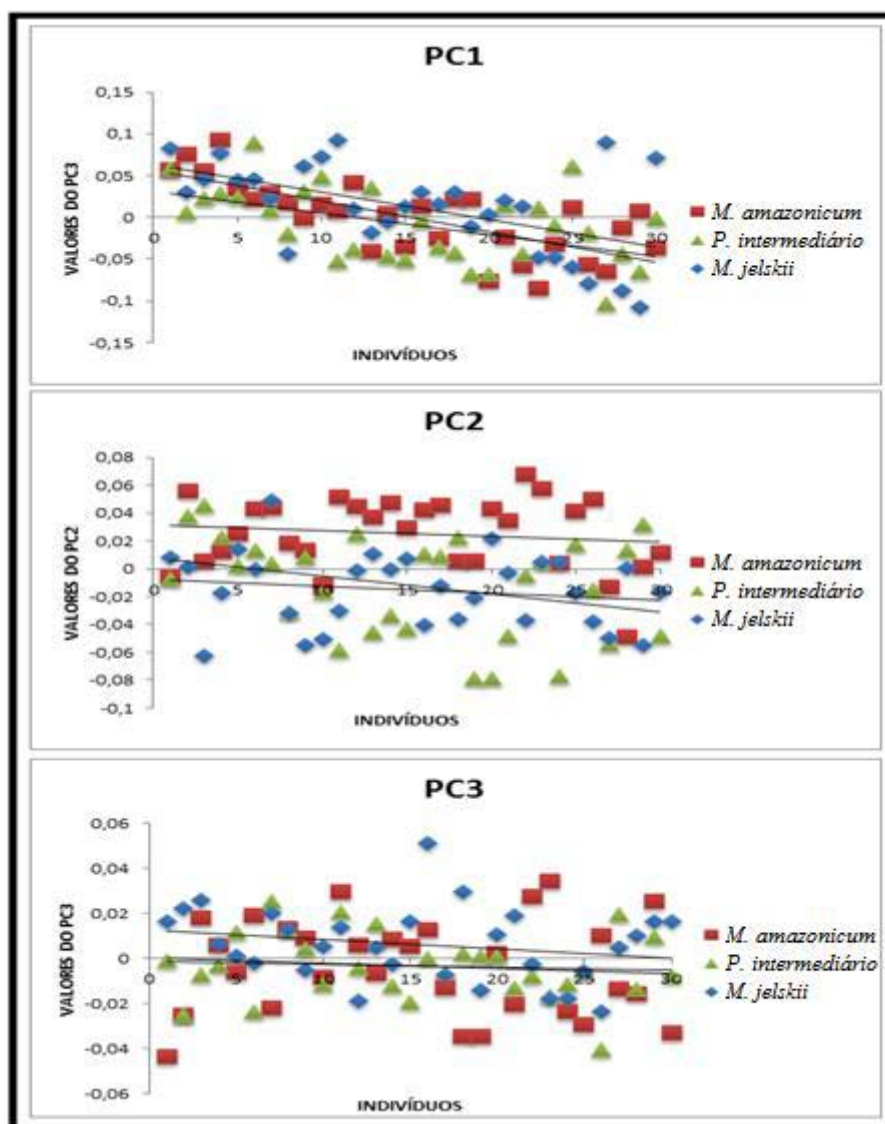


Figura 24 : Valores dos PC1, PC2 e PC3 apresentados em gráficos de dispersão, obtidos através das análises envolvendo os três grupos de camarões.

As análises estatísticas descritivas realizadas com os valores dos PCs foram o teste de normalidade *Shapiro-Wilks* e de homogeneidade *Levene*. Os resultados desses testes indicaram que apenas os valores do PC1 são paramétricos, sendo os valores de PC2 e PC3 não paramétricos. Portanto para as análises estatísticas dos PCs envolvendo dois grupos independentes foram utilizados o teste t de *Student* para os valores paramétricos e *Mann Whitney* para os valores não paramétricos. Para as análises estatísticas de variância dos PCs envolvendo três grupos independentes foram utilizados os testes ANOVA One Way complementado pelo teste de *Tuckey (post hoc)* para os dados paramétricos (PC1) e *Kruskal-Wallis* complementado pelo teste de *Dunn (post hoc)* para os dados não paramétricos (PC2 e PC3). Os resultados desses testes mostram que, na comparação de três grupos independentes,

apenas os valores de PC2 foram estatisticamente significativos apresentando valor de $p=0,000$. Em relação aos PC1 e PC3, não houve diferença estatística relevante (Tabela 5).

Tabela 5 : Valores das médias e desvios padrões referentes aos PC1, PC2 e PC3 de cada grupo. Os valores de p são resultados dos testes ANOVA One Way (PC1) e *Kruskal-Wallis* (PC2 e PC3). Note que apenas para a comparação entre os valores de PC2 o valor de p foi significativo ($<0,005$).

Comparação entre três grupos independentes									
	PC1			PC2			PC3		
	$\bar{x}$	s	p	$\bar{x}$	s	p	$\bar{x}$	s	p
<i>M.amazonicum</i>	-6,00E-04	4,40E-02	0,243*	2,52E-02	2,60E-02	0,000	-3,40E-03	2,10E-02	0,068*
<i>M. jelskii</i>	1,21E-02	5,40E-02		-1,52E-02	2,60E-02		6,20E-03	1,60E-02	
<i>P.intermediário</i>	-8,90E-03	4,50E-02		-1,23E-02	3,60E-02		-3,50E-03	1,40E-02	

As análises estatísticas envolvendo dois grupos foram não significativas, em sua maioria, apresentando valores de $p>0,05$, ou seja, demonstrando que a comparação das variações dos PCs entre esses grupos não apresentam diferenças estatísticas. Apenas nas análises referentes aos valores do PC2 entre *M. amazonicum* x *M. jelskii* e *M. amazonicum* x *P. intermediário* e na análise referente aos valores do PC3 entre *M. jelskii* x *P. intermediário*, foram estatisticamente relevantes, apresentando o valor de $p<0,05$ (Tabela 6). Os resultados dos testes *post hoc* utilizados neste trabalho encontram no Anexo 6.

Tabela 6 : Valores de p na comparação entre dois grupos independentes para os valores de PC1, PC2 e PC3 através dos testes *t* de Student (#) e *Mann Whitney*. O sinal * representa os grupos que apresentaram diferenças estatísticas ($p<0,05$).

COMPARAÇÃO ENTRE DOIS GRUPOS INDEPENDENTES		
Principais Componentes	Grupos	Valores de p
PC1	<i>M.amazonicum</i> x <i>M.jelskii</i> #	0,285
	<i>M.amazonicum</i> x <i>intermediário</i> #	0,871
	<i>M.jelskii</i> x <i>intermediário</i> #	0,362
PC2	<i>M.amazonicum</i> x <i>M.jelskii</i>	0,000*
	<i>M.amazonicum</i> x <i>intermediário</i>	0,000*
	<i>M.jelskii</i> x <i>intermediário</i>	0,414
PC3	<i>M.amazonicum</i> x <i>M.jelskii</i>	0,964
	<i>M.amazonicum</i> x <i>intermediário</i>	0,959
	<i>M.jelskii</i> x <i>intermediário</i>	0,020*

4.3 Análises de isoenzimas

As análises isoenzimáticas foram realizadas em dois tecidos, o tecido muscular abdominal e o hepatopâncreas. Devido às características fisiológicas de cada um destes tecidos, em relação às suas especificidades, os padrões de bandejamento isoenzimáticos mostraram-se diferentes em cada tecido e conforme a enzima analisada. Portanto a presença ou a ausência de cada enzima em cada tecido foi diferente (Tabela 7)

Tabela 7. Presença/Ausência das isoenzimas no tecido muscular e hepatopâncreas.

	ADH	ODH	LDH	G6PDH	ESTERASES	AMILASES
Músculo	-	-	X	-	X	-
Hepatopâncreas	X	X	-	X	X	X

4.3.1 Ensaio para a álcool desidrogenase (ADH) e octanol desidrogenase (ODH)

As enzimas álcool desidrogenase e octanol desidrogenase foram analisadas em gel de poliacrilamida a 8% (Figura 25). Estas enzimas mostraram-se ausentes no tecido muscular e presentes no hepatopâncreas das duas espécies analisadas. No tecido muscular houve a presença de três bandas indicando atividade de três isoenzimas.

Para a ADH foram observadas a presença de duas bandas monomórficas em ambas as espécies e nos indivíduos intermediários. Para a ODH foi observada apenas uma banda monomórfica. Ambas as enzimas mostraram-se invariantes em todos os indivíduos analisados.

A falta de variabilidade enzimática entre os indivíduos para a atividade da ADH não nos permite dizer se essas espécies apresentam dois *loci* distintos para essas enzimas ou se temos duas isoenzimas no mesmo loco.

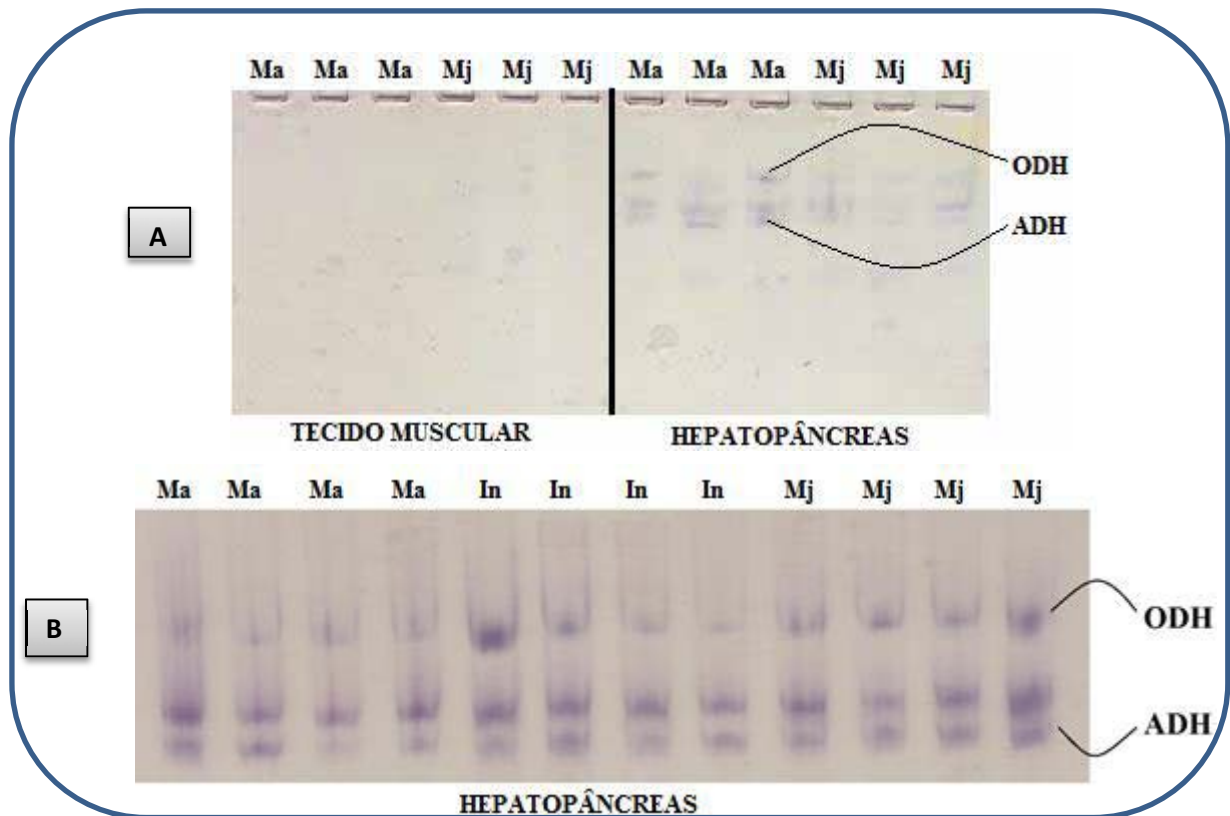


Figura 25: A e B : Padrão isoenzimático da álcool desidrogenase e octanol desidrogenase do tecido muscular e hepatopâncreas, em gel de poliacrilamida a 8% e coloração específica. Ma: *M. amazonicum*; In : indivíduo intermediário e Mj: *M. jelskii*. Note a ausência de bandas das enzimas no tecido muscular e a presença de três bandas no hepatopâncreas, sendo uma banda da octanol desidrogenase (ODH) e duas bandas da álcool desidrogenase (ADH), sem distinção entre os indivíduos analisados. As amostras foram coletadas em Mendonça/SP.

4.3.2 - Ensaio para a lactato desidrogenase (LDH)

A enzima lactato desidrogenase foi analisada no tecido muscular e hepatopâncreas dos camarões, em gel de poliacrilamida a 8%. Após a coloração e análise do gel, pôde-se verificar que no hepatopâncreas nenhuma atividade foi observada (dados não apresentados), já no tecido muscular foi detectada apenas uma banda monomórfica e invariante para todos os indivíduos (Figura 26). Este resultado demonstra que para a lactato desidrogenase em *M. amazonicum*, *M. jelskii* e o indivíduo intermediário, esta enzima é codificada por um mesmo locus invariante. Assim a lactato desidrogenase do tecido muscular não pode ser utilizada como um marcador bioquímico para estas espécies.

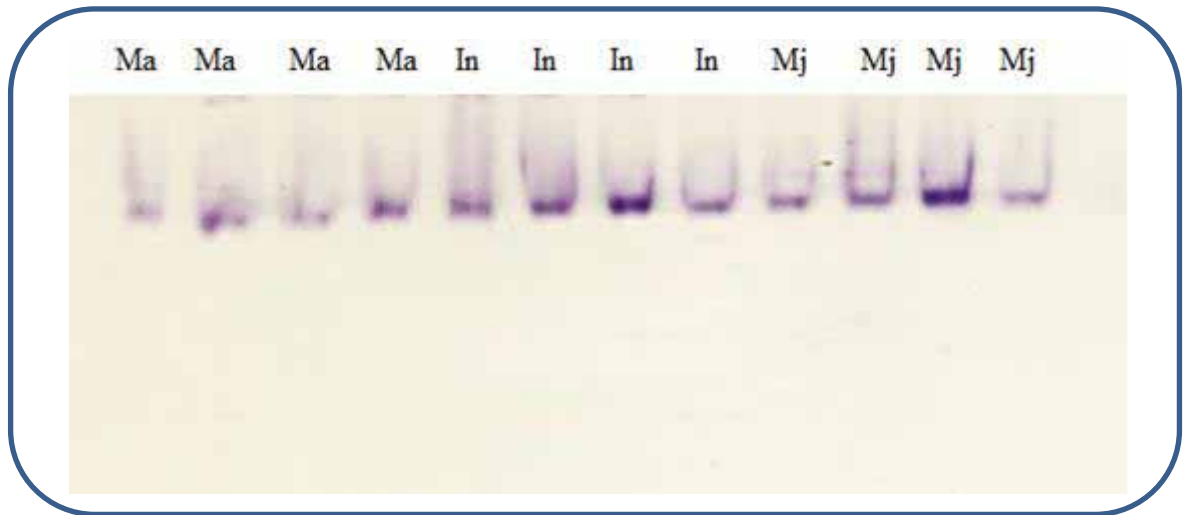


Figura 26: Padrão isoenzimático da lactato desidrogenase (LDH) do tecido muscular, após eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% e coloração específica. Ma: *M. amazonicum*; In: indivíduo intermediário; Mj: *M. jelskii*. Amostras coletadas em Mendonça/SP.

4.3.3 Ensaio para a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH)

A enzima glicose-6-fosfato desidrogenase foi analisada no tecido muscular e hepatopâncreas (glândula digestiva) dos camarões, em gel de poliacrilamida a 8%. Após a coloração e análise do gel, pôde-se verificar que no tecido muscular nenhuma atividade foi observada (dados não apresentados), já no hepatopâncreas foi detectada apenas uma banda invariante para todos os indivíduos (Figura 27). Este resultado demonstra que para a glicose-6-fosfato desidrogenase em *M. amazonicum*, *M. jelskii* e o indivíduo intermediário, esta enzima é codificada por um locus sem variabilidade. Assim a glicose-6-fosfato desidrogenase do hepatopâncreas não funciona como um marcador bioquímico para *M. amazonicum* e *M. jelskii*, uma vez que não há variabilidade genética entre eles.

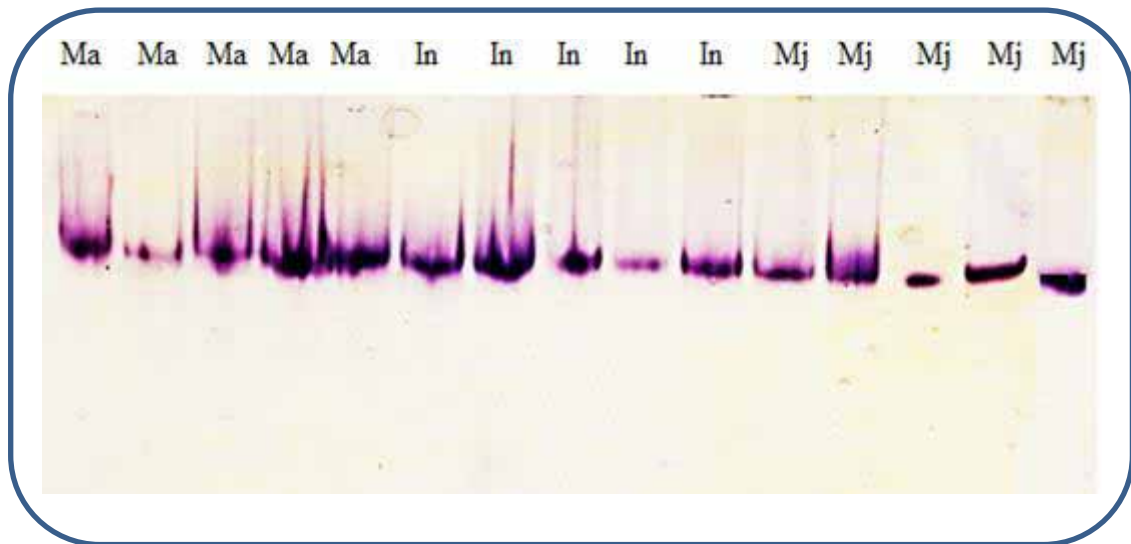


Figura 27: Padrão isoenzimático da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) de hepatopâncreas, após eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% e coloração específica. Ma: *M. amazonicum*; In: indivíduo intermediário; Mj: *M. jelskii*. Amostras coletadas em Sales/SP.

4.3.4 - Ensaio para esterases

O ensaio para as esterases foi realizado em gel de poliacrilamida a 8% para os dois tecidos, o músculo e o hepatopâncreas. Para ambos os tecidos, o gel foi corado para identificação de bandas esterásicas com atividade frente ao α e β -naftil acetatos.

No tecido muscular foram identificados dois locos que codificam enzimas com atividade frente ao β -naftil acetato. O padrão de bandejamento nesse caso apresentou-se o mesmo entre todos os indivíduos analisados (Figura 28).

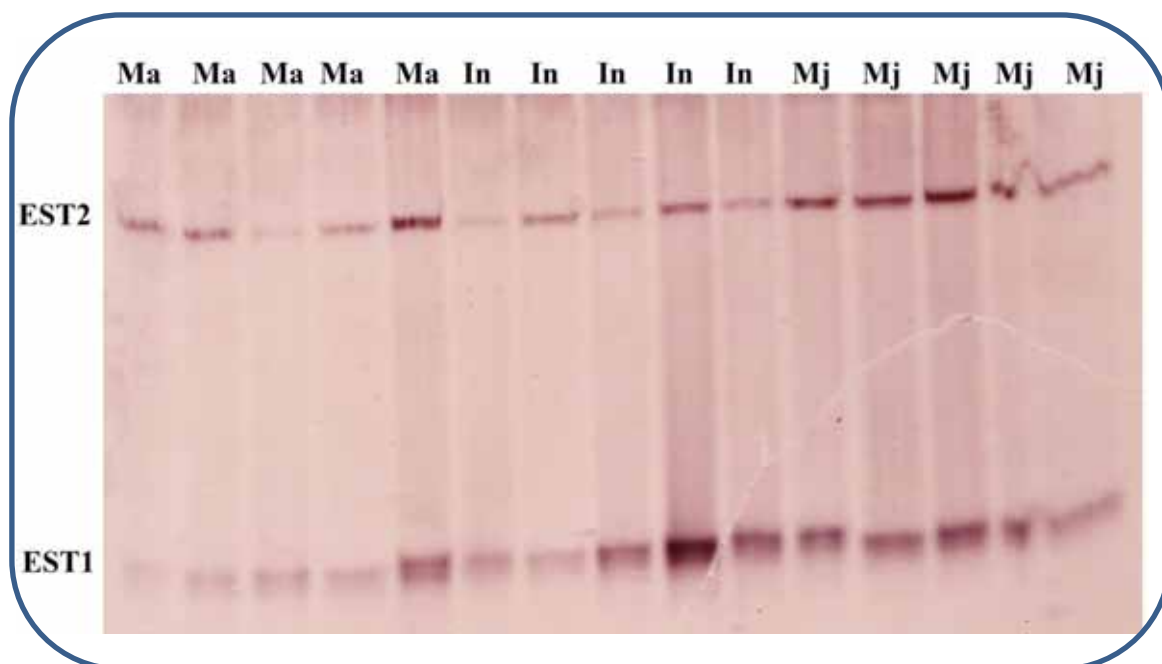


Figura 28: Padrão de esterases do tecido muscular, após eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% e coloração com β -naftil acetato. Ma: *M. amazonicum*; In: indivíduo intermediário; Mj: *M. jelskii*. Amostras coletadas em Sales/SP.

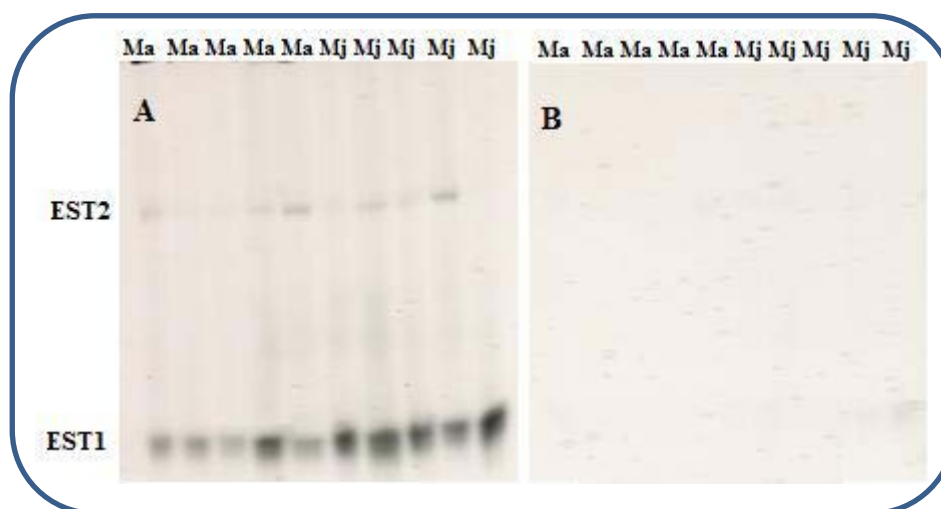


Figura 29: Inibição do padrão de esterases do tecido muscular pelo PMSF a 10 mM, após eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% e coloração com β -naftil acetato Ma: *M. amazonicum*; Mj: *M. jelskii*. A : gel controle, sem adição de PMSF ; B : gel tratado com PMSF. Note em B a inibição total das enzimas. Amostras coletadas em Mendonça/SP.

Ainda para o tecido muscular, foi realizado um ensaio para a atividade dessas enzimas na presença de PMSF (fluoreto de fenilmetanosulfonila), que normalmente inibe a ação esterásica porque reage com a serina presente no centro ativo da enzima (Figura 29). Na solução de coloração foi adicionado PMSF a 10 mM, o qual fora previamente dissolvido em metanol. Para este ensaio foram utilizadas amostras de tecido muscular de *M. amazonicum* e *M. jelskii*, numa tentativa de se obter padrões de inibição diferentes de esterases entre as duas

espécies. Após o tratamento com o inibidor, as duas bandas esterásicas específicas de tecido muscular dos camarões foram igualmente inibidas.

O ensaio de esterases para o hepatopâncreas seguiu o mesmo protocolo descrito para o tecido muscular, apresentando padrões de bandejamento esterásicos específicos para α e β -naftil acetatos. Foram identificadas 12 bandas esterásicas, assim como já descrito por Lima et al., (2013) (Figura 30).

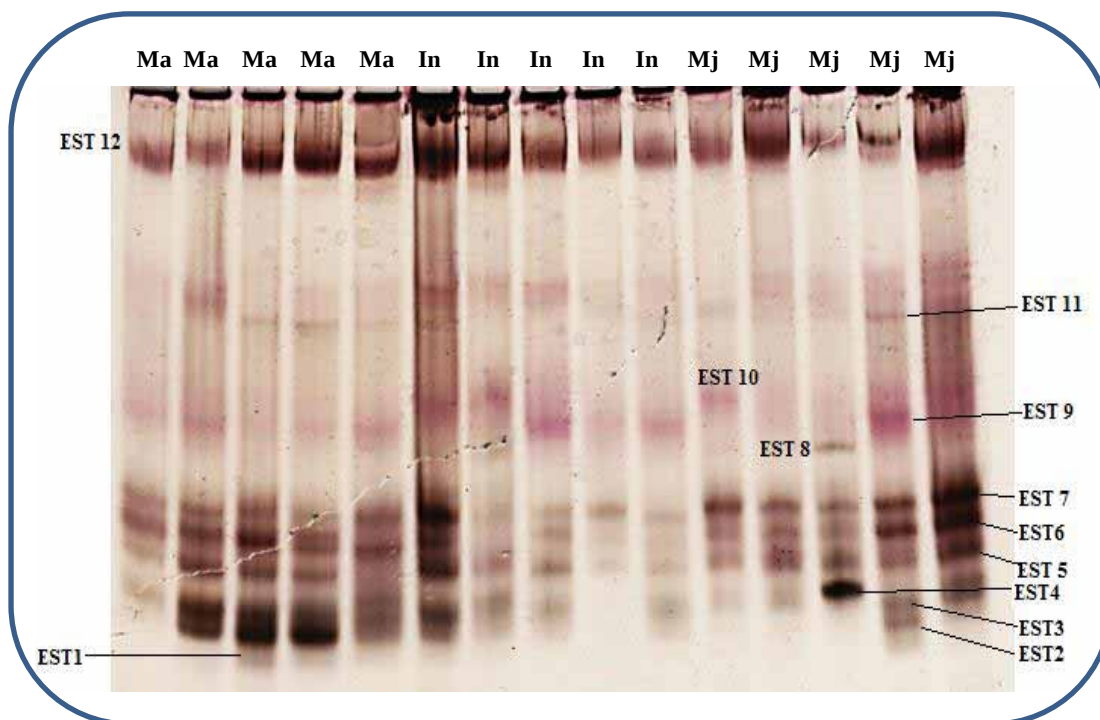


Figura 30: Padrão das bandas esterásicas (EST 1 a EST 12) do hepatopâncreas, coradas com α e β -naftil acetato. Ma: *M. amazonicum*; In: indivíduo intermediário; Mj: *M. jelskii*. Amostras coletadas em Mendonça/SP. Gel de poliacrilamida a 8%.

Os géis de esterases do hepatopâncreas foram tratados com inibidores de esterases, como p-hidroximercuribenzoato (pOHMB), fluoreto de sódio (NaF) e fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF). Esses compostos são inibidores de bandas esterásicas, reagindo com grupos essenciais para catalise presentes no centro ativo da enzima, inativando-as. Os resultados são, dependendo da competência do composto inibidor, inibições parciais ou totais da atividade. A Tabela 8 apresenta a ação dos inibidores utilizados, os graus de inibição observados e a classificação das bandas esterásicas de acordo com Lima et al., (2013). Pode-se observar que o padrão de inibição foi constante para os três grupos testados.

Tabela 8: Padrão de inibição das esterases em *M. amazonicum*, Padrão intermediário e *M. jelskii* por p-hidroximercuribenzoato (pOHMB), fluoreto de sódio (NaF) e fluoreto de fenilmetanosulfonila (PMSF) na concentração de 10 mM. O géis foram tratados com os inibidores durante o procedimento de coloração das esterases. Grau de inibição indicado pela seguinte representação : - : nenhuma inibição ; +, ++, +++ e ++++ : inibições crescentes.

Bandas	Espécies de <i>Macrobrachium</i>												Classificação
	<i>M. amazonicum</i>			<i>Padrão intermediário</i>			<i>M. jelskii</i>						
	pOHMB	NaF	PMSF	pOHMB	NaF	PMSF	pOHMB	NaF	PMSF				
EST1	-	+++	+++	-	+++	+++	-	+++	+++	-	+++	+++	acetilesterase
EST2	-	+++	+++	-	+++	+++	-	+++	+++	-	+++	+++	acetilesterase
EST3	-	+++	+++	-	+++	+++	-	+++	+++	-	+++	+++	carboxilesterase
EST4	-	+++	+++	-	+++	+++	-	+++	+++	-	+++	+++	acetilesterase
EST5	-	+++	+++	-	+++	+++	-	+++	+++	-	+++	+++	acetilesterase
EST6	-	+++	+	-	+++	+	-	+++	+	-	+++	+	acetilesterase
EST7	-	+++	+	-	+++	+	-	+++	+	-	+++	+	carboxilesterase
EST8	++	+++	+++	++	+++	+++	++	+++	+++	++	+++	+++	acetilesterase
EST9	+	+++	+++	+	+++	+++	+	+++	+++	+	+++	+++	arilesterase
EST10	+++	+++	+	+++	+++	+	+++	+++	+	+++	+++	+	acetilesterase
EST11	-	+++	+	-	+++	+	-	+++	+	-	+++	+	não detectada
EST12	-	++	+	-	++	+	-	++	+	-	++	+	colinesterase

4.3.5 - Ensaio para a amilase

A enzima amilase foi analisada no hepatopâncreas de indivíduos das pressupostas espécies e indivíduos intermediários em gel de poliacrilamida a 5% contendo amido, devido ao fato do hepatopâncreas desempenhar nesses organismos uma função digestiva. Vários ensaios foram realizados para se atingir um padrão de diluição ideal das amostras a serem aplicadas no gel, devido a grande quantidade de amilase presente no hepatopâncreas dos camarões. A diluição que demonstrou melhor resultado foi a de 1 :25 (1 µl do homogeneizado de hepatopâncreas na concentração 1 µg em 10 µl de tampão de amostra diluído para 25 µl do mesmo tampão). Após a separação, observou-se que o loco para a amilase é polimórfico apresentando dois alelos designados *Amy I* e *Amy II* que codificam a síntese de uma enzima monomérica. Esse padrão foi observado invariavelmente entre indivíduos classificados como *M. amazonicum*, *M. jelskii* ou intermediários, não possibilitando a utilização desse loco para a diferenciação bioquímica entre esses grupos (Figura 31).

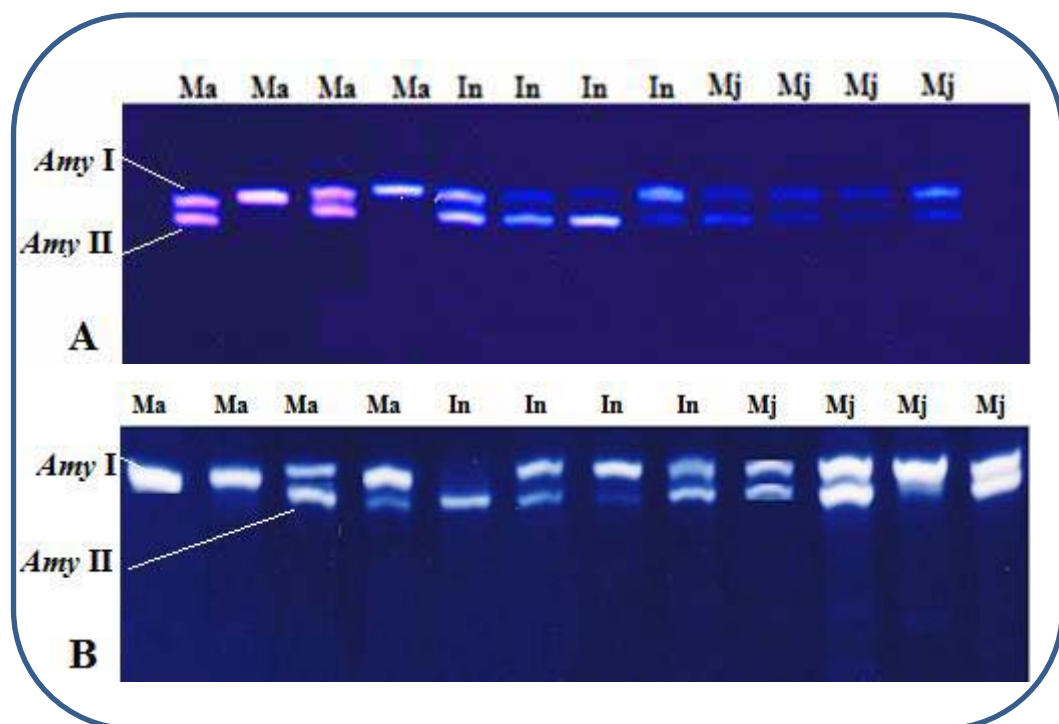


Figura 31: A e B : Padrão de coloração para a identificação de bandas de amilase. Ma: *M. amazonicum*; In: indivíduo intermediário; Mj: *M. jelskii*. Note a presença de duas bandas de amilase representando os alelos *Amy I* e *Amy II*, indicando loco polimórfico. Amostras coletadas em Sales/SP e Mendonça/SP. Géis de poliacrilamida a 5% contendo amido.

As frequências dos alelos *Amy I* e *Amy II* foram calculadas com base na análises de 112 camarões de cada espécie e intermediários, em 28 géis para a identificação da amilase. As frequências dos alelos estão representadas na Tabela 9.

Tabela 9 : Genótipos e frequências alélicas para o loco amilase em *M. amazonicum*, *M. jelskii* e intermediários coletados em Mendonça/SP.

ESPÉCIES	GENÓTIPOS			FREQUÊNCIA DOS ALELOS EM %	
	heterozigotos <i>Amy I/Amy II</i>	homozigotos- <i>Amy I</i>	homozigotos <i>Amy II</i>	<i>Amy I</i>	<i>Amy II</i>
<i>Macrobrachium amazonicum</i>	57	44	11	64,7	35,2
Padrão intermediário	45	34	33	50,4	49,5
<i>Macrobrachium jelskii</i>	66	35	11	60,7	39,2

4.4 –Análise molecular

A análise molecular foi realizada com base na amplificação e posterior sequenciamento da região intergênica transcrita não codificante ITS-1 do rDNA, que está localizada entre os genes 18S e 5,8S, os quais são genes codificadores de RNAs ribossômicos.

Nas reações de PCR para a amplificação da região ITS-1 de *M. amazonicum* e *M. jelskii*, foram utilizados *primers* que se hibridizam respectivamente com a sequência terminal 3' do gene 18S para o rRNA e com a sequência inicial do gene 5,8S. Esses *primers* foram inicialmente para a amplificação completa da região intergênica ITS-1 em *Drosophila* e outros insetos (BAFFI; CERON, 2002 ; TARTAROTTI; CERON, 2005). Também foram utilizados *primers* que amplificam a mesma sequência em 8 espécies de camarões pertencentes aos gêneros *Macrobrachium*, *Penaeus*, *Metapenaeopsis*, *Solenocera* e *Panulinus*. (WU et al., 2009). Esses conjuntos de *primers* apresentam uma similaridade de sequência em torno de 70%. A análise dos fragmentos amplificados por eletroforese em gel de agarose a 1% mostrou um fragmento de aproximadamente 1200 pb em ambas as espécies que corresponde à sequência intergênica não codificante ITS-1 (Figura 32).

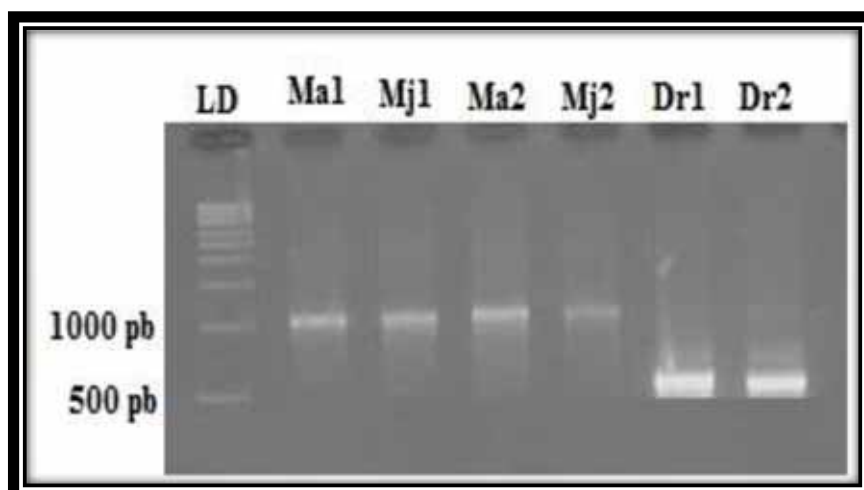


Figura 32: Fragmento amplificado da região intergênica ITS-1. LD :DNA ladder de 1kb; Ma1 e Mj1 : ITS-1 de *M. amazonicum* e *M. jelskii* amplificado com *primers* de camarão ; Ma2 e Mj2 : ITS-1 de *M. amazonicum* e *M. jelskii* amplificado com *primers* de *Drosophila melanogaster* ; Dr1 : ITS-1 de *Drosophila mulleri* amplificado com *primers* espécie-específicos ; Dr2 : ITS-1 de *Drosophila melanogaster* amplificado com *primers* de camarão . Note a amplificação de um fragmento de aproximadamente 1200 pb nas espécies de camarões e de aproximadamente 600 pb em *Drosophila mulleri*. Note também que os dois pares de *primers* são capazes de amplificar a região ITS-1 destas espécies. Eletroforese em gel de agarose a 1%.

Nos experimentos visando-se o sequenciamento de DNA, a primeira tentativa foi a realização da clonagem do fragmento ITS-1 obtido por amplificação. Entretanto esses experimentos não foram bem sucedidos o que nos levou a realização do sequenciamento direto do produto de PCR dessa sequência intergênica.

As primeiras tentativas para os sequenciamentos da região ITS-1 desses camarões foram realizados no câmpus da UNESP de Jaboticabal, mas os resultados não foram satisfatórios. Diante disso, novas tentativas foram realizadas no Centro de Genoma Humano da USP/SP e no Laboratório de Estudos Genômicos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, IBILCE/UNESP, Câmpus de S. J. do Rio Preto. Das 34 amostras encaminhadas para sequenciamento, obtivemos resultados satisfatórios para 4 sequências realizadas em São Paulo e 10 realizadas no Laboratório de Estudos Genômicos deste câmpus ressaltando-se que esses dados foram obtidos apenas as sequências reversas. Dessas obtivemos 7 sequências consenso de 570 bases que foram utilizadas para as análises filogenéticas.

As sequências consensos foram inicialmente obtidas pelo *software* BioEdit 5.0.9 (HALL, 1999) e posteriormente alinhadas pelo *software* ClustalW (THOMPSON et al., 1997) acoplado ao *software* DAMBE (XIA, XIE, 2001). As variações nucleotídicas, padrões de substituições e distâncias genéticas foram estimadas usando o *software* MEGA 6.0 (TAMURA et al., 2013). O cálculo da taxa de divergência entre as espécies utilizou o modelo

de substituição nucleotídica Kimura-2-parameter (K2P) (KIMURA, 1980). As relações filogenéticas foram inferidas utilizando-se o método de *Neighbor-Joining* e da Máxima Verossimilhança (*MaximumLikelihood – ML*) de Guindon e Gascuel (2003).

Os resultados dessas análises filogenéticas são mostrados nas Figuras 33 e 34 utilizando-se os métodos de agrupamento *Neighbor-Joining* e *Máxima Verossimilhança*. A Tabela 10 apresenta as matrizes de porcentagem de similaridade e divergência nucleotídica dos haplótipos de *M. amazonicum* e *M. jelskii*.

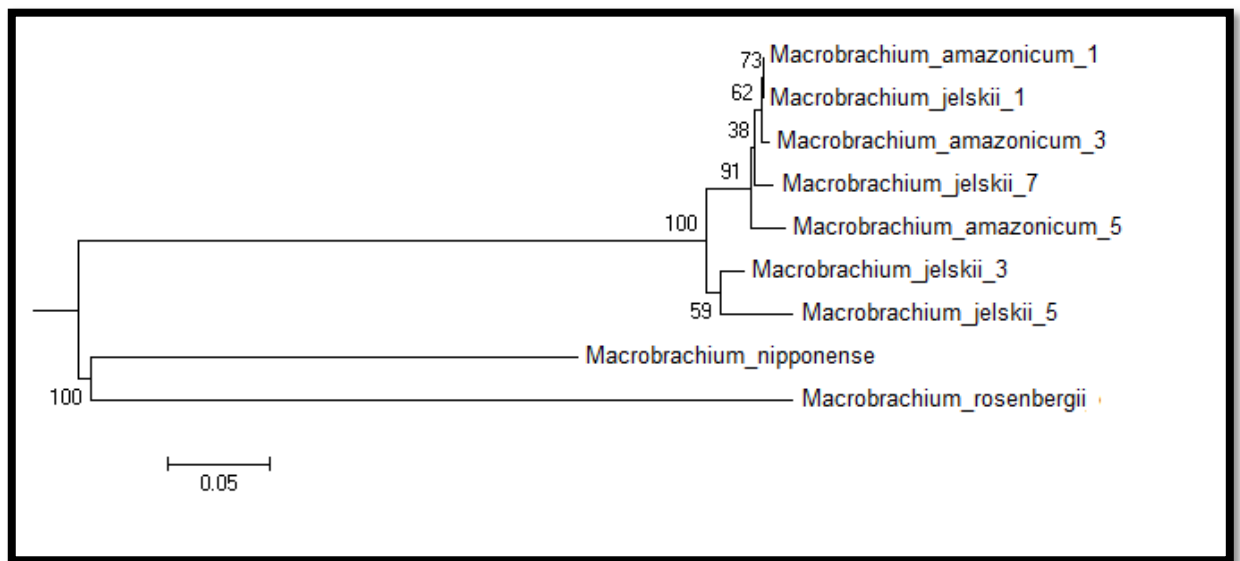


Figura 33 : Dendrograma construído com o método *Neighbor-Joining*. Os números dos nós representam os valores de *bootstrap*.

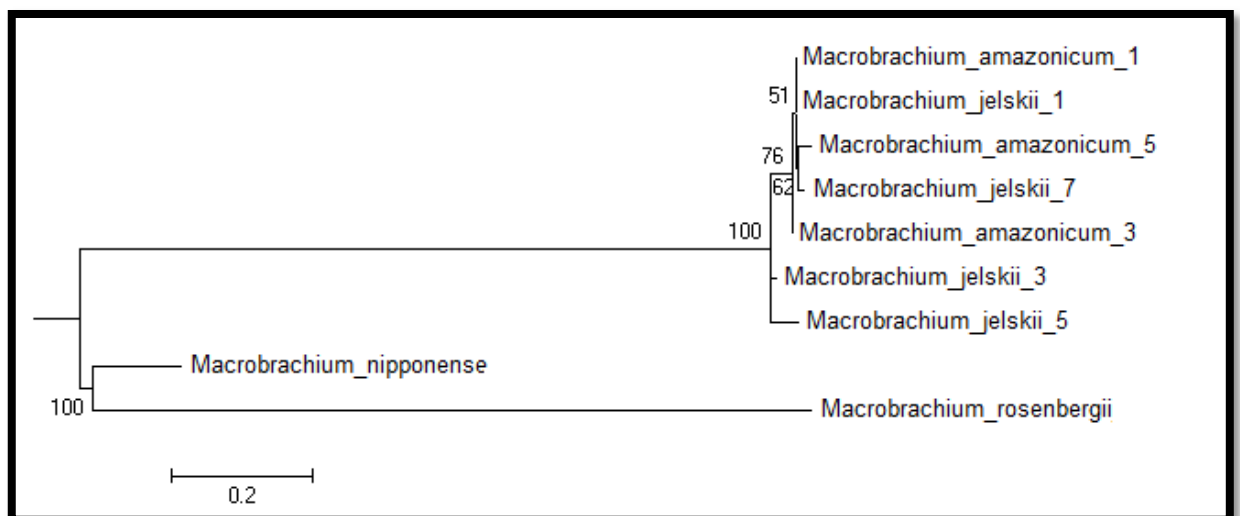


Figura 34 : Dendrograma construído com o método de *Máxima Verossimilhança*. Os números dos nós representam os valores de *bootstrap*.

Tabela 10 : Matrizes de Porcentagem de similaridade (na porção superior) e número de nucleotídeos divergentes (na porção inferior) entre as sequências ITS-1 dos haplótipos de *M. amazonicum*, *M. jelskii* e os grupos externos *M. nipponense* (8) e *M. rosenbergii* (9).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Seq->	Ma 1	Ma 3	Ma 5	Mj 1	Mj 3	Mj 5	Mj 7	Mn	Mr
1 Macrobrachium_amazonicum_1	ID	99,1%	91,2%	100,0%	92,2%	92,0%	96,6%	35,2%	26,1%
2 Macrobrachium_amazonicum_3	2 ID		90,4%	99,1%	93,0%	92,9%	95,8%	35,2%	26,1%
3 Macrobrachium_amazonicum_5	21	23 ID		91,2%	84,1%	84,1%	89,9%	33,0%	25,3%
4 Macrobrachium_jelskii_1	0	2	21 ID		92,2%	92,0%	96,6%	35,2%	26,1%
5 Macrobrachium_jelskii_3	19	17	39	19 ID		92,2%	89,0%	36,7%	26,3%
6 Macrobrachium_jelskii_5	19	17	38	19	19 ID		88,7%	35,2%	26,3%
7 Macrobrachium_jelskii_7	8	10	24	8	27	27 ID		34,9%	26,1%
8 Macrobrachium_nipponense	176	176	182	176	172	176	177 ID		34,6%
9 Macrobrachium_rosenbergii	192	192	194	192	193	190	192	179 ID	

A Figura 35 apresenta os resultados da clivagem da sequência correspondente à região ITS-1 do rDNA de *M. amazonicum* e *M. jelskii*, submetidas à ação de enzimas de restrição. Apenas a enzima *Hind* III apresentou uma digestão parcial deste fragmento, produzindo dois fragmentos restritos dessa sequência em ambas as espécies. O sítio de restrição para a enzima *Hind* III foi identificado nas sequências obtidas para a região ITS-1 dessas espécies.

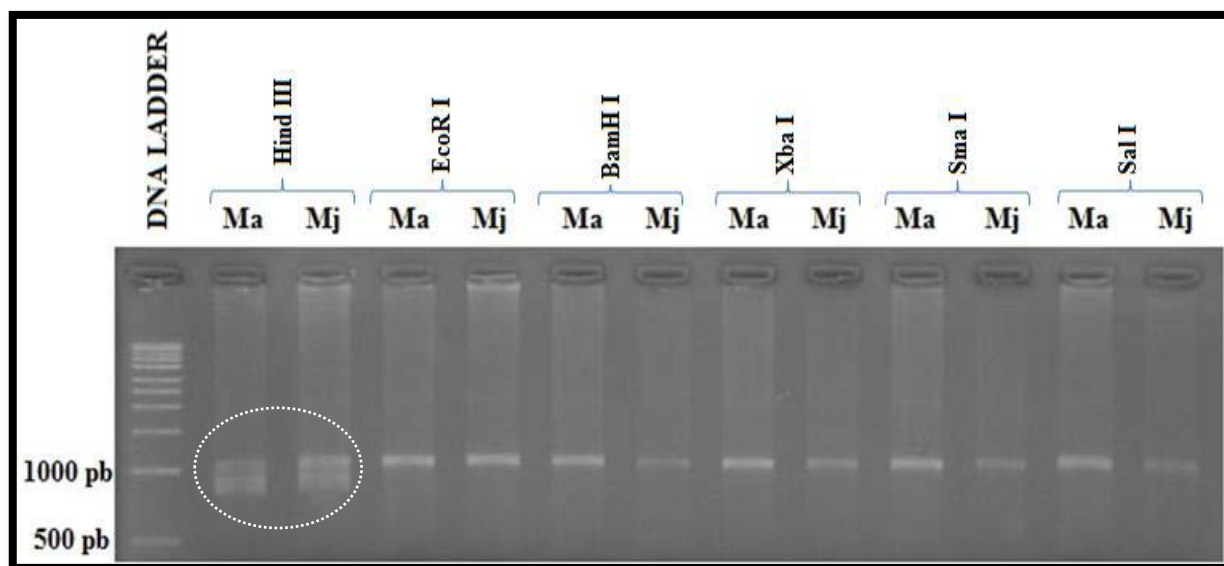


Figura 35 : Polimorfismo de restrição do fragmento ITS-1 do rDNA de *M. amazonicum* (Ma) e *M. jelskii* (Mj), após tratamento com as enzimas de restrição *Hind* III, *EcoR* I, *BamH* I, *Xba* I, *Sma* I e *Sal* I. Note que apenas a enzima *Hind* III produziu dois fragmentos restritos, sendo um deles de aproximadamente 800 pb em ambas as espécies. Gel de agarose a 1%.

5 - DISCUSSÃO

A introdução de organismos em um ambiente diferente de seus habitats naturais pode gerar uma série de consequências, tanto para a espécie exótica quanto para as espécies naturais. Sabe-se que vários aspectos genéticos e seletivos podem estar envolvidos em relação à adaptação de espécies exóticas a novos habitats, como o gargalo de garrafa, efeito do fundador e deriva genética. Outros aspectos como endocruzamentos, que causam a perda de variabilidade genética ou atividades de transposons que podem ativar ou inativar genes importantes, modificando a expressão gênica ou ainda, hibridizações e alterações epigenéticas causadas pelo estresse, contribuem para a adaptação ao novo ambiente (LEE, 2002; PRENTIS et al., 2008).

Principalmente no Estado de São Paulo, a atividade humana alterou de forma brusca os ecossistemas, tanto terrestres como aquáticos, modificações estas que já destruíram muitos habitats naturais, causando a diminuição brusca da fauna e flora, extinções de espécies e remanejo de outras para outros habitats. Em relação à introdução das espécies *M. amazonicum* e *M. jelskii* no Noroeste paulista, ela está associada às construções das usinas hidrelétricas e repovoamento dos reservatórios para a piscicultura. Acredita-se que ambas as espécies foram inicialmente introduzidas nas estações de piscicultura da CESP e posteriormente disseminadas por todos os reservatório do Estado, ao longo das usinas hidrelétricas do Rio Tietê e outros reservatórios. Outra possibilidade é que formas larvais ou juvenis desses camarões tenham sido transportadas para os reservatórios do Estado associadas às raízes de plantas aquáticas do pantanal mato-grossense utilizadas para abrigo dos peixes (MACHADO, 1966; TORLONI et. al., 1993; MAGALHÃES et. al., 2005).

O presente estudo teve o foco voltado para a distinção dessas duas espécies utilizando-se marcadores morfológicos, bioquímicos e moleculares. Uma das ferramentas utilizadas neste estudo foi análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de varredura. As eletromicrografias mostraram que o télson apresenta uma forma cônica, terminando em sua extremidade distal em um único espinho acompanhado por inserções ventrais de outros 2 pares de espinhos, denominados espinhos caudais. Devido à localização da inserção desses espinhos caudais, eles são classificados em espinhos caudais externos e internos.

Nossos resultados obtidos por MEV confirmam que em relação aos espinhos caudais externos, estes não apresentam variações significativas em relação à forma e tamanho entre os grupos estudados, *M. amazonicum*, *M. jelskii* e indivíduos intermediários. Já o par de espinhos

internos apresenta variações de tamanhos as quais são bem significativas entre esses grupos. Atualmente, os espinhos caudais internos são os principais caracteres utilizados na identificação dessas espécies (MELO, 2003; GUERRA, 2011; LIMA et. al., 2013). Entretanto, *M. amazonicum* apresentam variações de comprimento desses espinhos ao longo de seu desenvolvimento (HOLTHUIS, 1952; GARCÍA-DÁVILA; MAGALHÃES, 2003). Esse fato torna praticamente impossível afirmar se os indivíduos que apresentam o padrão intermediário para os espinhos caudais internos são indivíduos jovens de *M. amazonicum* ou um morfotipo desta espécie, um morfotipo de *M. jelskii* ou mesmo um híbrido interespecífico. Uma alternativa para a classificação dessas espécies seria a combinação de vários caracteres morfológicos para a diferenciação entre elas, como forma e número de dentes do rosto, características e proporções dos diferentes artículos dos pereópodes e tamanho é número de ovos (GRACÍA-DÁVILA; MAGALHÃES, 2003; TADDEI, 2006; QING-YI; QI-QUN; WEI-BING, 2009). As análises por MEV dos apêndices masculinos desse trabalho mostraram que estas estruturas não apresentam variações relevantes que pudessem elucidar a identificação de *M. amazonicum* e *M. jelskii*. Até o momento na literatura, a estrutura do apêndice masculino não foi mencionada como uma carácter relevante para a classificação desses camarões. Em outros organismos, por exemplo, em *Drosophila*, a análise dos edeagos (chamados de apêndices masculinos em camarões) é muito utilizada para a identificação e separação de espécies e até mesmo populações (EBERHARD et. al., 1985; RATICOV; VILELA, 2007; FRANCO, et al., 2008). Outra abordagem desse trabalho foi a realização de análises morfométricas dos rostros, baseadas em suas formas e contornos. Essas análises também não mostraram diferenças entre as pressupostas espécies e entre elas e o grupo intermediário.

As análises morfométricas dos tamanhos dos télsons e dos espinhos caudais internos dos camarões revelaram diferenças estatísticas entre os grupos, com um $p < 0,0001$, tanto para a análise de variância envolvendo três grupos como as análises envolvendo dois grupos. Esses dados são compatíveis com a distribuição em três grupos distintos, *M. amazonicum* e *M. jelskii* e um terceiro grupo intermediário, mas por si só não permitem a diferenciação das pressupostas espécies, nem permitem qualquer inferência sobre a base genética do grupo intermediário.

Em relação às isoenzimas, o principal objetivo deste trabalho foi analisar diferentes sistemas isoenzimáticos do hepatopâncreas e do tecido muscular das duas espécies *M. amazonicum*, *M. jelskii* e indivíduos intermediários na tentativa de se encontrar um marcador bioquímico que pudesse diferenciá-los.

Os sistemas isoenzimáticos estudados foram álcool desidrogenase (ADH), octanol desidrogenase (ODH), lactato desidrogenase (LDH), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), amilase e esterases. Para a ADH, ODH, LDH e G6PDH, os resultados obtidos mostraram que cada uma dessas enzimas é codificada por apenas um loco gênico e que nenhuma variabilidade genética foi encontrada entre todos os indivíduos analisados. Indicando que não há qualquer variabilidade genética entre essas espécies.

No caso das esterases do hepatopâncreas, foram encontradas 10 bandas esterásicas com atividade frente ao α -naftil acetato (α -esterases) e 2 bandas frente ao β -naftil acetato (β -esterases). Esses resultados são concordantes com os obtidos por Lima et. al. (2013) que analisaram essas espécies coletadas no reservatório de Mendonça/SP. Para as esterases do hepatopâncreas, os inibidores pOHMB, NaF e PMSF apresentaram padrões exclusivos para cada inibidor, porém os perfis de inibição de cada um desses inibidores foram os mesmos entre os três grupos de camarões. Para o tecido muscular duas esterases com especificidade pelo β -naftil acetato foram detectadas, porém sem qualquer variabilidade entre os três grupos analisados.

Com relação à amilase, detectamos a presença de dois alelos, denominados *Amy I* e *Amy II* nos três grupos analisados, cujas frequências foram calculadas. Esse foi o único loco que se mostrou polimórfico entre os sistemas isoenzimáticos analisados no presente trabalho. Entretanto, não foi possível identificar um padrão específico para qualquer um dos grupos que pudesse ser utilizado como um marcador bioquímico para sua distinção. Polimorfismo do loco da amilase já foi relacionado com hábitos alimentares de alguns espécies de camarões. De acordo com esses estudos, camarões onívoros são os que apresentam maior variabilidade genética em relação ao loco da amilase, oferecendo bases genéticas para a diferenciação desses organismos, com exceção àqueles pertencentes ao gênero *Macrobrachium* (WORMHOUDT et. al. 1995).

O marcador molecular ITS-1 corresponde a uma sequência intergênica intrônica que é excisada durante o processamento do transcrito primário do rRNA. Essa é uma sequência altamente variável entre as espécies, constituindo-se em um excelente marcador molecular. Polimorfismos de tamanho e de sequências da região ITS-1 tem sido largamente utilizado em estudos filogenéticos. Por exemplo, em oito espécies de camarões pertencentes aos gêneros *Penaeus*, *Metapenaeopsis*, *Solenocera*, *Panulinus* e *Macrobrachium*, foram encontrados polimorfismos de tamanho para a região ITS-1 que variaram de 448 a 1491 pb (WU et. al., 2009). Nossos resultados indicam que tanto em *M. amazonicum* quanto em *M. jelskii*, o comprimento da região ITS-1 corresponde a uma sequência de aproximadamente 1.200 pb, as

quais foram amplificadas nas reações de PCR usando-se dois pares de iniciadores, um deles inicialmente utilizados em *Drosophila* e outros insetos e o outro desenhado especificamente para a amplificação da região ITS-1 em camarões. Ressalta-se que esses pares de iniciadores têm uma identidade de sequência de cerca de 70% e funcionaram eficientemente para a amplificação dessa região intergênica nas pressupostas espécies de camarões e também para a amplificação de uma sequência de aproximadamente 600 pb correspondente à região ITS-1 de *Drosophila mulleri*. Polimorfismos de tamanho para a região ITS-1 já foram utilizados para a diferenciação de espécies de *Drosophila* do grupo repleta e de seus híbridos, incluindo a identificando em nível molecular da presença de cistrons ribossômicos para o rDNA nos cromossomos sexuais e microcromossomos dessas espécies (BAFFI; CERON, 2002), bem como para a comprovação do fenômeno de dominância nucleolar entre elas (COMMAR et. al., 2007). Outros estudos utilizando-se a análise do polimorfismo de comprimento e de fragmentos restritos da região ITS-1 mostraram a diferenciação entre oito espécies de triatomíneos pertencentes aos gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus* (TARTAROTTI; CERON, 2005). Relações filogenéticas obtidas para oito espécies do *cluster buzzatii* (Complexo *buzzatii*, Grupo *repleta*) utilizando-se sequências para a região ITS-1, demonstraram que as espécies desse *cluster* correspondem a um grupo monofilético constituído por espécies pouco divergentes (DE LUCCA JR, 2006).

Análises do polimorfismo de restrição para a sequência ITS-1, utilizando-se várias enzimas de restrição mostraram que há um único sítio de restrição para a *Hind* III, em ambas as espécies, produzindo fragmentos restritos de mesmo tamanho. Os resultados de amplificação da sequência e de obtenção de fragmentos restritos para a região ITS-1 mostram que não há variabilidade de tamanho, nem de fragmentos restritos para ambas as espécies.

As análises das sequências nucleotídicas da região ITS-1 ofereceram dados relevantes em relação à filogenia dessas espécies. O dendrograma de agrupamento por distância pelo método de *Neighbor-Joining* e o dendrograma obtido pelo método de Máxima Verossimilhança agruparam os indivíduos dessas pressupostas espécies como um *cluster* indissociável, o qual apresentou um valor de 100% de *bootstrap*.

Guerra (2011) realizou estudos populacionais de *M. amazonicum* e *M. jelskii* em reservatórios aquáticos do Noroeste Paulista, comparando as taxas de divergência genética entre essas espécies através da análise das sequências obtidas utilizando-se a amplificação e sequenciamento da região COI I do DNA mitocondrial e a região correspondente à sequência 16S do rDNA. Segundo esse estudo foi constatada uma baixa divergência genética entre esses organismos. Os resultados obtidos neste trabalho não suportam a hipótese de que os

camarões dulcícolas atualmente disseminados por praticamente todos os reservatórios aquáticos do Estado de São Paulo e nomeados como *M. amazonicum* e *M. jelskii*, sejam duas espécies independentes.

6 CONCLUSÃO

Os dados obtidos com as análises ultraestruturais e morfométricas e as análises isoenzimáticas e moleculares realizadas neste trabalho sugerem que *M. amazonicum* e *M. jelskii* sejam uma única espécie.

7 – REFERÊNCIAS

- ALEKHNOVICH, A.V.; KULESH, V.F. Variation in the Parameters of the Life Cycle in Prawns of the Genus *Macrobrachium* Bate (Crustacea, Palaemonidae). **Russian Journal of Ecology**. v.32, n. 6,p. 420-425, 2001.
- ALEXANDER, C. G.; HINDLEY, J. P. R.; JONES, S. G. Structure and function of the third maxillipeds of the banana prawn *Penaeus merguensis*. **Mar. Biol.**v.58, p.245-9, 1980.
- ARAÚJO, M.C. Efeitos da salinidade, luminosidade e alimentação na larvicultura do camarão-da-amazônia,*Macrobrachium amazonicum*. **Tese de Doutorado, Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista (CAUNESP), Jaboticabal, SP**, p.270, 2005
- ARAUJO-NETO, M. P. de. *Macrobrachium amazonicum* oriundos de ambiente natural e de cativeiro: determinação da microbiota por leveduras, sensibilidade antifúngica e fatores de virulência. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - **Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará**, 2010.
- BAFFI, M.A.; CERON,C.R. Molecular analysis of the rDNA ITS-1 intergenic spacer in *Drosophila mulleri*, *D. arizonae* and their hybrids. **Biochemical Genetics**, v. 40, p. 411-421, 2002.
- BARGUES, M. D.; MARCILLA, A.; RAMSEY, J. M.; DUJARDIN, J. P.; SCHOFIELD, C. J.; MAS-COMA, S. Nuclear rDNA- Based molecular clock of the evolution of *Triatominae* (Hemiptera: Reduviidae), vectors of Chagas' disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 95, p.567-573, 2000.
- BARNES, R.D, RUPER, E.E. **Zoologia dos Invertebrados**. ed. 6. Editora Roca, 2005.
- BARTON, N.; TURELLI, M. "Evolutionary quantitative genetics: How little do we know?" **Ann. Rev. Genet.**v. 23, p. 237–370, 1989.
- BAXEVANIS, A. D.; KAPPAS, I.; ABATZOPOULOS, T.J. Molecular phylogenetics and asexuality in the brine shrimp *Artemia*. **Mol. Phylogen. Evol.**, v.40, p. 724-738, 2006.
- BENZIE, J. A H. ; KENWAY, M.; BAILMENT, E.; FRUSHER, S.; TROTT, L. interspecific hybridization of the tiger prawns *Penaeus monodon* and *Penaeus esculentus*. **North**, v. 133, n. 2, p. 103–111, 1995.
- BRAMMER, S.P. Marcadores moleculares: princípios básicos e uso em programas de melhoramento genético vegetal. Passo Fundo: **Embrapa Trigo**,2000.
- BOWER, J.E.; COOPER, R.D.;BEEBE, N.W. Internal repetition and intraindividual variation in the rDNA ITS-1 of the *Anopheles punctilatus* group (Diptera: Culicidae):multiple units and rates of turnover. **Journal of Molecular Evolution**, v. 68, number 1, p. 66-79, 2009.

BOWLES, D.E.; AZIZ, K.; KNIGHT, C.L. Macrobrachium (DECAPODA: CARIDEA: PALAEMONIDAE) in the Contiguous United States: A Review of the species and an assessment of threats to their survival. **Journal of Crustacean Biology**. 20:158-174, 2000.

BUENO, S.L.D.S; RODRIGUES, S.D.A. Abbreviated Larval Development of the Freshwater Prawn, *Macrobrachium iheringi* (Ortmann, 1897) (Decapoda, Palaemonidae), Reared in the Laboratory. **Crustaceana**, v. 68, n. 8, p. 665-686, 1995.

BUTTKE, T. M.; McCUBREY, J. A.; OWEN, T. C. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay to measure viability and proliferation of lymphokine-dependent cell lines. **J. Immunol. Methods**, v.157, p.233-240, 1993.

CARLTON, J.T. "Transoceanic and inter-oceanic dispersal of coastal marine organisms: the biology of ballast water". **Oceanogr. Mar.Biol. Rev.** v.23, p.313-317, 1985.

CERON, C.R. Padrão de esterases em *Drosophila mulleri*, *Drosophila arizonensis* e seus híbridos. **Instituto de Biociências USP** (Tese de Doutorado), 1988.

CHACE, F. A.; BRUCE, A. J. The Caridean Shrimps (Crustacea:Decapoda) of the Albatross Philippine Expedition, 1907-1910, Part 6: Superfamily Palaemonoidea. **Washington: Smithsonian Institution**, 1993.

CHU, K. H.; HO, H.Y.; LI, C.P.; CHAN, T.Y. Molecular phylogenetics of the mitten crab species in *Eriocheir*, sensu lato (Brachyura: molecular phylogenetics of the mitten crab species). **Journal of Crustacean Biology**. v. 23, n. 3, p. 738-746, 2003.

COMMAR, L. S.; BICUDO, H. E. M. C.; RAHAL, P.; CERON, C. R. Differential transcription of ribosomal cistrons denoting nucleolar dominance in hybrids of *Drosophila mulleri* and *Drosophila navojoa* (mulleri complex, Repleta group). **Genet. Mol. Biol.**, v. 30, n. 4, 2007.

CORY, A. H. et al. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. **Cancer Commun.**, v.3, p.207-212, 1991.

DELARIVA, R.L.; AGOSTINHO, A.A. Introdução de espécies: uma síntese comentada. **Acta Scientiarum**. v. 21(2), p.255-262, 1999.

DE LUCCA JR, M. Análises de sequências da região intergênia ITS-1 do Rdna em espécies de *Drosophila* do cluster *buzzatii* (Complexo *buzzatii*, Subgrupo *mulleri*, Grupo *repleta*). **Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto/SP, IBILCE/UNESP**. (Tese de doutorado), 2006.

DORNELLAS, E. J.; SILVA, F. M.; MOTTA, D. G.; SIMÕES, C. B.; SA, F. S. Ocorrência de *Macrobrachium olfersii* (CRUSTACEA, DECAPODA, PALAEMONIDAE) em um afluente do Rio Santa Maria da Vitória, em Santa Leopoldina, ES, sudeste do Brasil. **Natureza On line**. Espírito Santo, v.9, n.1, p. 19-26, 2011.

EBERHARD, W. G.; HUBER, B. A.; RODRIGUEZ, S. R. L.; BRICEÑO, R. D.; SALAS, I.; RODRIGUEZ, V. One size fits all? Relationships between the size and degree of variation in genitalia and other body parts in twenty species of insects and spiders. **Evolution**, v. 52, p. 415-431, 1998.

EGGER, B.; SEFC, K.M.; MAKASA, L.; STURMBAUER, C.; SALZBURGER, W. Introgressive hybridization between color morphs in a population of cichlid fishes twelve years after human-induced secondary admixis. **J. Hered.**, 2012.

FARMER, A.S. The functional morphology of the mouthparts and pereopods of *Nephrops norvegicus* (L.) (Decapoda: Ne-phropidae). **J nat Hist.** v. 8, p.121-142, 1974.

FAVARETTO, L.; BOGDAN, A.; SANTOS, E. S. Consumo de oxigênio em *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862). Efeito da saturação do oxigênio dissolvido. **Acta Amazônica**, v.6, n.4, p.449-453, 1976.

FELGENHAUER B.E; ABELE L.G. Ultrastructure and functional morphology of feeding and associated appendages in the tropical fresh-water shrimp *Atya innocous* (Herbst) with notes on its ecology. **J Crustacean Biol.** v.3, p.336-363, 1983.

FERNANDES, L.D.A; BONECKER, S.L.C. Fases do Desenvolvimento Larvar e Metamorfose em Crustacea Decapoda – Artigo de Revisão. **Saúde & Ambiente em Revista**, Duque de Caxias, v.1, n.2, p.11-17, jul-dez 2006.

FLOWERS, J.M.; BURTON, R.S. Ribosomal RNA genes silencing interpopulation hybrids of *Tigriopus californicus*: nucleolar dominance in the absence of intergenic spacer subrepeats. **Genetics**, p.3-33, 2006.

FRANCO, F. F.; SOTO, I. M.; SENE, F. M.; MANFRIN, M. H. Phenotypic variation of the aedeagus of *Drosophila serido* Vilela & Sene (Diptera:Drosophilidae). **Neotropical Entomology**, v. 37, p. 558-563, 2008.

FU, H.; GONG, Y.; WU, Y.; XU, P.;WU, C. Artificial interspecific hybridization between *Macrobrachium* species. **Aquaculture**, n. 232, p. 215-223, 2004.

GAMERSCHLAG, S.; MEHLHORN, H.; HEUKELBACH, J.; FELDMEIER, H.; D'HAESE J. Repetitive sequences in the ITS-1 region of the Ribosomal DNA of *Tunga penetrans* and other flea species (Insecta, Siphonaptera). **Biomedical and Life Sciences Parasitology Research**, v. 102, number 2, p. 193-199, 2008

GARCÍA-DÁVILA, C. R.; MAGALHÃES, C. Revisão taxonômica dos camarões de água doce (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae, Sergestidae) da Amazônia peruana. **Acta Amazonica**, v.33, n.4, p. 663-686, 2003.

GARCIA-RAMOS, G.; RODRIGUEZ, D. “Evolutionary speed of species invasions”. **Evolution**. v. 56(4), p.661–668,2002.

GUERRA, A. L. Caracterização molecular da estrutura genética de populações e espécies de camarões palaemonídeos do gênero *Macrobrachium*. **Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, IBILCE/UNESP** (Dissertação de mestrado), 2011.

GUINDON, S.; GASCUEL, O. A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. **Syst. Biol.**, v.52, p. 696-704, 2003.

HALL, T. A. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symp Ser**, v. 41, p. 95–98, 1999.

HALIOGLU, M.M. A Scanning Electron Microscopic Study on the Appendage Morphology of *Astacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823) and *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852) (Crustacea: Decapoda: Astacoidea). **Int. J. Morphol.** v.26(4), p.1035-1051, 2008.

HARRIS, D.J.; CRANDALL, K.A. Intragenomic variation within ITS1 and ITS2 of freshwater crayfishes (Decapoda: Cambaridae): Implications for Phylogenetic and Microsatellite Studies. **Mol. Biol. Evol.**, v.17, n.2, p. 284-291, 2000.

HILLIS, D. M.; DIXON, M.T. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. **Q. Ver. Biol.**, v. 66. p. 441-453, 1991.

HINDLEY, J. P. R.; ALEXANDER, C. G. Structure and function of the chelate pereopods of the banana prawn *Penaeus merguensis*. **Mar. Biol.** v. 48, p. 153-160, 1978.

HOLTHUIS, L.B. A general revision on the Palaemonidae (Crustacea: Decapoda: Natantia) of the Americas. II. The subfamily Palaemonidae. **Occidental Paper Allan Hancock**. Los Angeles, 12., p.396, 1952.

HOOD, L. CAMPBELL, J. H.; ELGINS, S. C. R. The organization, expression, and evolution of antibody genes and other multigene families. **Annu. Rev. Genet.**, v. 9, p. 304-354, 1975.

ISMAEL, D; NEW, M. B. Biology. In: NEW, M.B.; VALENTI, W.C. Freshwater prawn culture: the farming of *Macrobrachium rosenbergii*. London: **Brackwell Science**, p. 18-40, 2000.

IWATA, H.; UKAI, Y. SHAPE: A computer program package for quantitative evaluation of biological shapes based on elliptic Fourier descriptors. *Journal of Heredity* 93, p. 384-385, 2002

JALIHAI, D.R.; SANKOLLI, K.N.; SHENOY, S. Evolution of larval developmental patterns and the process of freshwaterization in the prawn genus *Macrobrachium* Bate, 1868 (Decapoda, Palaemonidae). **Crustaceana**, v.65, n.3, p. 365-376, 1993.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v.16, p. 111-120, 1980.

KOETSCHAN, C. et al. The ITS2 database III – sequences and structures for phylogeny. **Nucleic Acid Research**, v 38, p. 275-279, 2010.

KUHL, F. P.; GIARDINA, C. R. Elliptic Fourier features of a closed contour. *Computer Graphics and Image Processing*. 18, p. 236-258, 1982.

LANDA, G.G.; RAMOS, A. C. S. Isoenzymes studies in natural populations of *Thermocyclops decipiens* (Kiefer, 1929) (Crustacea- Copepoda- Cyclopoida) in the Pampulha Reservoir – Belo Horizonte (MG) – Brazil. **Revista Sinapse Ambiental**. p. 34-53, 2009.

LAGE, M.J. Análise transcricional da dominancia nucleolar em híbridos interespecíficos obtidos de cruzamentos entre *Drosophila mulleri* E *D. Arizonae*. **IBILCE/UNESP, Campus de São José do Rio Preto**. (Tese mestrado), 2005.

LEE, C.E. Evolutionary genetics of invasive species. **Trends Ecol. Evol.**, v. 17, n. 8, p. 386-391, 2002.

LIMA, A. V. B; GUERRA, A. L.; ALMEIDA, E. A.; TADDEI, F. G; CASTIGLIONI, L. Characterization of esterase patterns in hepatopancreas of three species of *Macrobrachium* (Palaemonidae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 47, p. 132-138, 2013.

LINARES, A. R.; BOWEN, T.; DOVER, G. Aspects of nonrandom turnover involved in the concerted evolution of intergenic spacers within the ribosomal DNA of *Drosophila melanogaster*. **J. Mol. Evolution**, v. 39, p. 151-159, 1994.

LUCCHINI, S. D.; ANDRONICO, F.; NARDI, I. Molecular structure of the rDNA Intergenic spacer (IGS) in *Triturus*; implications for the hypervariability of rDNA loci. **Chromosoma**, v. 106, p. 315-326, 1997.

MACHADO, C.E.M. Estações experimentais de Biologia e Piscicultura em represas da CESP. **Technical Report**, 12 pp, 1966.

MAGALHÃES, C. Desenvolvimento larval obtido em laboratório de palaemonídeos da Região Amazônica (*Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Crustacea, Decapoda). **Amazoniana**, 9(2), p. 247-274, 1985.

MAGALHÃES, C.; WALKER, I. Larval development and ecological distribution of central Amazonian palaemonid shrimps (Decapoda, Caridea). **Crustaceana**, n. 55, p. 279-292, 1988.

MAGALHÃES, C. Crustáceos Decápodos. In: Ismael D., Valenti W.C., Matsumura-Tundisi T. and Rocha O. (eds), **Invertebrados de Água Doce**, Vol. 4. Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil, Síntese do Conhecimento ao Final do Século XX (Joly C.A. and Bicudo C.E.M.(eds)) FAPESP, São Paulo, pp. 127–133, 1999.

MAGALHÃES, C. Abbreviated development of *M. jelskii* (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) from the Rio Solimões floodplain, Brazil, reared in the laboratory. **Nauplius**, v. 8, p. 1-14, 2000.

MAGALHÃES, C.; RODRÍGUEZ, G. The systematic and biogeographical status of *Fredius reflexifrons* (Ortmann, 1897) and *Fredius fittkaui* (Bott, 1967) (Crustacea: Brachyura: Pseudothelphusidae) from the Amazon and Atlantic Guianas river basins. **Acta Amazonica**, v. 34(2), p. 677-689, 2002.

MAGALHÃES, C.; BUENO, S.; BOND, G.; VALENTI, W.C.; SILVA, H.M.; KIYOARA, F.; MOSSOLIN, E.C.; ROCHA, S. Exotic species of freshwater decapod crustaceans in state of São Paulo, Brasil: records and causes of their introduction. **Biod. and Conserv.**, v. 14, p. 1929-45, 2005.

MARTIN, J.W.; DAVIS, G.E. An updated classification of the recent Crustacea. **Nat Hist Mus**. Los Angeles, n.39, p.1-124, 2001.

MELO, G. A. S. Famílias Atyidae, Palaemonidae e Sergestidae. In: MELO, G. A. S. (Ed.), **Manual de identificação dos Crustacea Decapoda de água doce do Brasil**. São Paulo: Loyola, p. 289-415, 2003.

MONTOYA, J.V. Freshwater shrimps of the Genus *Macrobrachium* Associated with roots of *Eichhornia crassipes* (Water Hyacinth) in the Orinoco Delta (Venezuela). **Caribbean Journal of Science**, vol. 39, no. 1, p. 155-159, 2003.

MORAIS-VALENTI, P.; VALENTI, W. C. Culture of the Amazon river prawn *Macrobrachium amazonicum*. In: NEW, M., B.; VALENTINI, W. C.; TIDWELL, J. H.; D'BRAMO, L. R. **Freshwater prawns: biology and farming**. Oxford, Wiley-Blackwell. p. 485-501, 2010.

MOSSOLIN, E.C.; BUENO, S.L. Relative Growth of the second pereopod in *Macrobrachium olfersi* (Wiegmann, 1836), (Decapoda, Palaemonidae). **Crustaceana**, v. 76, n. 3, p. 363-376, 2003.

MULLER, T. et al. Distinguishing species. **RNA**, v. 13, p. 1469-1472, 2007.

MURPHY, N.P.; AUSTIN, C.M. Phylogenetic relationships of the globally distributed freshwater prawn genus *Macrobrachium* (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae): biogeography, taxonomy and the convergent evolution of abbreviated larval development. **Zoologica Scripta**, v.34, p.187–197, 2005.

NAVAJAS, M.; COTTON, D.; KREITER, S. A.; GUTIERREZ, J. Molecular approach in spider mites (Acari: Tetranychidae): Preliminary data on ribosomal DNA sequences. **Experim.Appl. Acarol.** 15:211, 1992.

NEW, M. B. Farming freshwater prawns: a manual for the culture of the giant river prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). **FAO Fisheries Technical Paper**, n.428, p.212, 2002.

NUNES, M. L.; CIRILO, A.T.O.; SANTOS, M.C Caracterização física e nutricional do camarão “saborica” (*Macrobrachium jelskii*, Miers, 1877) e de produtos derivados. **Scientia Plena**, v.7, n.7, 2011.

ODINETZ-COLLART, O.; MOREIRA, L. C. Migração vertical nictemeral das larvas de *Macrobrachium amazonicum* num lago de várzea na Amazônia Central, Ilha do Careiro, Brasil. **Amazoniana**, v.3, n.4, p. 385-389, 1993.

ORTMANN, A. The geographical distribution of freshwater decapods and its bearing upon ancient geography. *Proc. Am. phil. Soc.*, v. 41, p. 267-400, 1902.

PAIVA, M. P.; BARRETO, V.A. Notas sobre a biologia do camarão “sossego” *Macrobrachium jelskii* (Miers, 1877) Chace & Holthuis, 1948; numa pequena bacia potamográfica do nordeste brasileiro. **Revista Brasileira de Biologia**, vol.20, no.2, p. 121-129, 1960.

PANTALEÃO, J.A.F.; GREGATI, R.A.; TADDEI, F.G.; COSTA, R.C. Morphology of the first larval stage of *Macrobrachium brasiliense* (Heller, 1868) (Caridea: Palaemonidae). **Nauplius**, v.19, n.1, p. 79-85, 2011.

PEREIRA, S. G.A.; GARCÍA, D. J.V. Larval Development of *Macrobrachium reyesi* Pereira (Decapoda: Palaemonidae), with a Discussion on the Origin of Abbreviated Development in Palaemonids. **Journal of Crustacean Biology**, v.. 15,n. 1, p. 117-133, 1995.

PILEGGI, L. G.; MANTELATTO, F. L. Taxonomic revision of doubtful Brazilian freshwater shrimp species of genus *Macrobrachium* (Decapoda, Palaemonidae). **Iheringia : Série Zoologia**, v. 102, n. 4, p. 426-437, Dez. 2012.

POLANCO, C.; GONZALEZ, A. I.; la FUENTE, A.; DOVER, G. A. Multigene Family of Ribosomal DNA in *Drosophila melanogaster* Reveals Contrasting Patterns of Homogenization for IGS and ITS Spacer Regions: A Possible Mechanism to Resolve This Paradox. **Genetics**, v.149, p. 243-256, 1998.

POLJAROEN, J.; VANICHVIRIYAKIT, R.; TINIKUL,Y.; PHOUNGPETCHARA, I.; LINTHONG, V.; WEERACHATYANUKUL, W.; SOBHON, P. Spermatogenesis and distinctive mature sperm in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879). **Zoologischer Anzeiger - A Journal of Comparative Zoology**, v. 249, n. 2, p. 81–94, ago. 2010.

PRENTIS, P.J.; WILSON, J.R.U; DORMONTT, E.E.; RICHARDSON, D.M.; LOWE, A.J. “Adaptive evolution in invasive species”. **Trends in Plant Science**.v.16(6):288–294. 2008.

PYSEK, P.; RICHARDSON, D.M.; PERGL, J.; JAROSIK, V.; SIXTOVA, Z.; WEBER, E. “Geographical and taxonomic biases in invasion ecology”. **Trends in Ecology and Evolution**. v.23(5), p.237–244, 2008.

QUADROS, M.L.A; MACIEL, C.; BASTOS, S.; SAMPAIO, I. Reprodução do Camarão Canela - *Macrobrachium acanthurus* em Condições Controladas de Laboratório e Montagem de um Atlas para Identificação de Estágios Larvais. **Revista Científica da UFPA**<http://www.ufpa.br/revistaic>, v. 4, 2004.

QING-YI, Z.; QI-QUN, C.; WEI-BING, G. Mitochondrial COI Gene Sequence variation and taxonomic status of three *Macrobrachium* species. **Zoological Research**, v. 30, p. 613-619.2009.

RATCOV, V.; VILELA, C. R. A new Neotropical species of spot-thoraxed *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae). **Rev. Bras. entomol.**, São Paulo , v. 51, n. 3, Sept. 2007

RAUPACH, M.J.; MAYER, C; MALIUTYNA, M.; WAGELE, J-W. Multiple origins of deep-sea *Asellota* (Crustacea: Isopoda) from shallow waters revealed by molecular data. **Proceedings the Royal Society**, v. 276, p. 799-808, 2009.

SANKOLLI, K. N.; SHENOY, S.; JALIHAI, D. R.; ALMELKAR, G. B. Crossbreeding experiment with the giant fresh-water prawn *Macrobrachium rosenbergii* and *M. malcolmsonii*. In: New, M. B. (Ed.), **Developments in Aquaculture and Fisheries Science 10: Giant Prawn Farming**. Elsevier, Amsterdam, p. 91-98, 1982.

SBORDONI, V.; DE MATTHAEIS, E.; SBORDONI, M. C.; LA ROSA, G.; MATTOCCIA, M. Bottleneck effects and the depression of genetic variability in hatchery stocks of *Penaeus japonicus* (Crustacea, Decapoda). **Aquaculture**, v. 57, p. 239-251, 1986.

SCOTTO, L.E. Studies on Decapod Crustacea from the Indian River Region of Florida. XIV. a Method for Rapid Preparation of Brachyuran Larvae for Scanning Electron Microscopy. **Crustaceana**, v. 38, n. 1, p. 99-101, 1980.

SHIELDS, C.R.; ORTON, T.J.; STUBER, C.W. An outline of general resource needs and procedures for the electrophoretic separation of active enzymes from plant tissue. In: TANSKLEY, S.D.; ORTON, T.J., ed. **Isozymes in plant genetics and breeding**. Amsterdam: Elsevier, Part A, p.443-468, 1983.

SHOKITA, S. Larval development of interespecific hybrid between *Macrobrachium asperulum* from Taiwan and *Macrobrachium shokitai* from the Ryukus. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**, v. 44, n.11, p. 1187-1195, 1978.

SHORT, J. W. A revision of Australian river prawns, *Macrobrachium* (Crustacea:Decapoda: Palaemonidae). **Hydrobiologia**, n.525, p. 1–100, 2004.

STAMHUIS, E.J.; VIDELER, J.J. Burrow ventilation in the tube-dwelling shrimp *Callinassa subterranea* (decapoda: thalassinidea) I. MORPHOLOGY AND MOTION OF THE PLEOPODS, UROPODS AND TELSON. **The Journal of Experimental Biology**, v.201, p. 2151–2158, 1998.

STAMHUIS, E. J.; DAUWE, B.; VIDELER, J. J. How to bite the dust: morphology, motion pattern and function of the feeding appendages of the deposit-feeding thalassinid shrimp *Callinassa subterranea*. **Marine Biology**, v. 132, n. 1, p. 43–58, 28 ago. 1998.

STREELMAN, J. T.; GMYREK, S.L.; KIDD, M.R.; ROBINSON, R.L.; HERT, E.; AMBALI, A.J.; KOCHER, T.D. Hybridization and contemporary evolution in an introduced cichlid fish from Lake Malawi National Park. **Mol. Ecol.**, v.13, n. 8, p. 2471–2479, 2004.

TADDEI, F. G. Biologia populacional: crescimento e reprodução dos camarões palemonídeos *Macrobrachium jelskii* (Miers, 1877) e *Macrobrachium brasiliense* (Heller, 1868) na região noroeste do Estado de São Paulo. **IB/UNESP**, Câmpus de Botucatu. (Tese de Doutorado), 2006.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, S.; KUMAR, S. Mega 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution** 30, p. 2725-2729, 2013.

TARTAROTTI, E.; CERON, C.R. Ribosomal DNA ITS-1 intergenic spacer polymorphism in Triatomines. **Bioch. Genet.**, v. 43, p. 365-373, 2005.

TELLIER, R. et al. Innovative endpoint determination system for antifungal susceptibility testing of yeasts. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.36, p.1619-1625, 1992.

THOMPSON, J. D; GIBSON, T. J; PLEWNIAK, F.; JEAMNOUGIN, F.; HIGGIS, D. G. The CLUSTAL X Windows Interface: Flexible Strategies for Multiple Sequence Alignment Aided by Quality Analysis Tools. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 4876-4882, 1997.

TIWARI, K. K. Distribution of Indo-Burmese freshwater prawns of the genus *Palaemon* Fabr., and its bearing on the Satpura hypothesis. **Bull. natn. Inst. Sci.** India, v.7, p. 230-239, 1955.

TORLONI, C.E.C.; SANTOS, J.J.; CARVALHO, A.A.Jr.; CORREA, A.R.A. A pescada-do-piauí *Plagioscion squamosissimus* (Heckel, 1840) (Osteichthyes, Perciformes) nos reservatórios da Companhia Energética de São Paulo- CESP. **Série Pesquisa e Desenvolvimento (CESP: São Paulo)**, v. 84, p. 1- 23, 1993.

TOVAR, F. J. ; SILVA, L. A. F.; RODARTE, R. S.; LEONCINI, O. Characterization of ribosomal DNA (rDNA) in *Drosophila arizonae*. **Genetics and Molecular Biology**. v. v. 23, p. 331-333, 2000.

TUAN, R.; SANTOS, P. ITS2 variability of *Biomphalaria* (Mollusca, Planorbidae) species from the Paranapanema Valley (São Paulo State, Brazil): diversity patterns, population structure and phylogenetic relationships. **Gen. Mol. Biol.**, v. 30, p. 139 -144, 2007.

UNO, Y.; FUJITA, M. Studies on the experimental hybridization of freshwater shrimp, *Macrobrachium nipponense* and *M. formosense*. Abstract of the Second International **Ocean Development Conference**, 5-7 October, Tokyo, Japan, 1972.

VALENTI, W.C. Estudo populacional de camarões de água doce *Macrobrachium acanthurus* (Linnaeus, 1758) do Rio Ribeira de Iguape (Crustacea, Palaemonidae). **Instituto de Bociências/UNESP, Campus de Jaboticabal**. (Dissertação de Mestrado), 1984.

VALENTI, W.C. Carcinicultura de água doce. São Paulo. **IBAMA/FAPESP**, 383p., 1998.

WORMHOUDT, A. V.; BOURREAU, G.; LE MOULLAC, G. Amylase polymorphism in Crustacea Decapoda: Electrophoretic and Immunological studies. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 23, n. 2, p. 139-149, 1995.

WU, Z.; FENG, J.; CHEN, J.; XU, S.; DAI, Z. Phylogenetic analysis and species identification of popular shrimp species in southeast China using the first internally transcribed spacer of ribosomal DNA. **Aquac. Res.**, v. 40, p. 1251-1259, 2009.

XIA, X. H.; XIE, Z. DAMBE: Software Package for Data Analysis in Molecular Biology and Evolution. **Journal of Heredity**, v. 93, p. 371-373, 2001.

ANEXOS

ANEXO 1: Autorização para atividades com finalidade científica



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 37930-1	Data da Emissão: 31/01/2013 16:28	Data para Revalidação*: 02/03/2014
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2007, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: ALESSANDRO GARCIA LOPES	CPF: 169.745.418-64
Título do Projeto: DIFERENCIAÇÃO MOLECULAR E ULTRAESTRUTURAL DE CAMARÕES DULCÍCOLAS DO GÊNERO Macrobrachium, Bate 1868	
Nome da Instituição: UNESP CAMPUS S. J. R. PRETO	CNPJ: 48.031.918/0011-04

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Projeto de Mestrado	01/2013	02/2014

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA nº 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Alexandre Vidotto Barboza Lima	Coleta e identificação dos espécimes	337.446.748-27	346865243 SSP-SP	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	MENDONÇA	SP	Represa	Fora de UC Federal
2	SALES	SP	Represa	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 54684547



Página 1/4



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 37930-1	Data da Emissão: 31/01/2013 16:28	Data para Revalidação*: 02/03/2014
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: ALESSANDRO GARCIA LOPES	CPF: 169.745.418-64
Título do Projeto: DIFERENCIAÇÃO MOLECULAR E ULTRAESTRUTURAL DE CAMARÕES DULCÍCOLAS DO GÊNERO <i>Macrobrachium</i> , Bate 1868	
Nome da Instituição : UNESP CAMPUS S.J. R. PRETO	CNPJ: 48.031.918/0011-04

#	Atividade	Taxons
1	Captura de animais silvestres in situ	<i>Macrobrachium amazonicum</i> , <i>Macrobrachium jelskii</i>
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Macrobrachium amazonicum</i> , <i>Macrobrachium jelskii</i>
3	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	<i>Macrobrachium jelskii</i> (*Qtde: 200); <i>Macrobrachium amazonicum</i> (*Qtde: 200)

* Qtde. de indivíduos por espécie/localidade/unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

1	Método de captura/coleta (Invertebrados Aquáticos)	Peneira, Outros métodos de captura/coleta(peneira)
---	--	--

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNESP CAMPUS S.J. R. PRETO	

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 54684547



Página 2/4



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 37930-1	Data da Emissão: 31/01/2013 16:28	Data para Revalidação*: 02/03/2014
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: ALESSANDRO GARCIA LOPES	CPF: 169.745.418-64
Título do Projeto: DIFERENCIAÇÃO MOLECULAR E ULTRAESTRUTURAL DE CAMARÕES DULCÍCOLAS DO GÊNERO Macrobrachium, Bate 1868	
Nome da Instituição: UNESP CAMPUS S.J. R. PRETO	CNPJ: 48.031.918/0011-04

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Taxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 54684547



Página 3/4



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 37930-1	Data da Emissão: 31/01/2013 16:28	Data para Revalidação*: 02/03/2014
-----------------	-----------------------------------	------------------------------------

* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

Dados do titular

Nome: ALESSANDRO GARCIA LOPES	CPF: 169.745.418-64
Título do Projeto: DIFERENCIAÇÃO MOLECULAR E ULTRAESTRUTURAL DE CAMARÕES DULCÍCOLAS DO GÊNERO <i>Macrobrachium</i> , Bate 1868	
Nome da Instituição : UNESP CAMPUS S.J. R. PRETO	CNPJ: 48.031.918/0011-04

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 54684547



Página 4/4

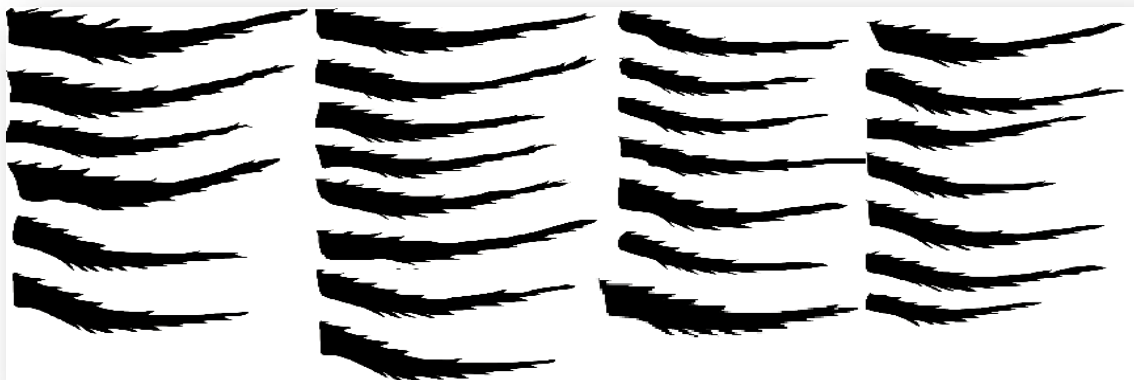
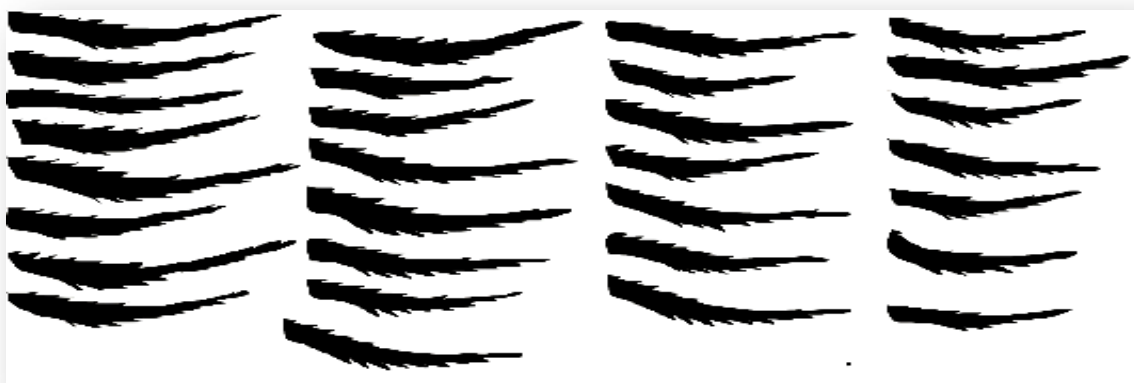
ANEXO 2: Tabelas contendo as medidas em mm dos télsons e espinhos caudais internos obtidas pela análises morfométricas.

TÉLSON – SALES/SP (medidas em mm)		
<i>Macrobrachium amazonicum</i>	<i>Macrobrachium jelskii</i>	Indivíduo intermediário
6,5625	4,875	3
6,5625	4,0625	4,0625
7,5	4,1875	5
6,25	3,875	4,25
6,6875	4	5,25
5,75	3,5625	5,125
6,25	3,875	3,8125
7,0625	2,1875	3,875
7,5	4,3125	4,6875
5,9375	4,4375	5,4375
6,75	3,6875	4,4375
6,0625	3,9375	4,25
6,25	4,75	4,0625
6,5625	5,3125	4,0625
6,125	3,4375	4,375
6,8125	4,0625	4,625
6,5625	4,375	5
6,4375	3,8125	4
7,5	4,0625	5
6,3125	4	4,375
6,5625	4,3125	4
6,25	4,25	5,4375
7,1875	4,0625	4,0625
6,0625	3,5625	4,5
5,9375	4	4,0625
7,5	3,875	4,875
7,375	2,5	4,0625
7,375	4,25	4,75
5,9375	4,0625	4,8125
6,625	3,4375	4,75
5,9375	3,8125	4,375
5,875	3,6875	5,1875
7,3125	4,6875	5,875
6,6875	4,4375	5,0625
7,125	3,9375	5,125
6,625	3,375	5,3125
6,5625	4,0625	5,5
7,0625	4,4375	5,0625
7	3,75	4,6875
6,5625	3,125	6,0625

TÉLSON - MENDONÇA/SP (medidas em mm)		
<i>Macrobrachium amazonicum</i>	<i>Macrobrachium jelskii</i>	Indivíduo intermediário
6,5625	5,625	5
6,5	4,625	5,0625
5,25	3,75	5
5,6875	4,875	4
5,5	4,0625	3,4375
6,875	3,75	5,3125
5,8125	3,625	4
6,0625	3,125	4
5,625	3,75	4,0625
5,625	3,3125	4,625
5,3125	2,8125	4
7,4375	3,75	3,9375
6,25	4	3,4375
7,5	3,1875	4,4375
6,3125	3,3125	5
6,375	2,625	5
6,25	3,4375	5,6875
5,4375	3,1875	5,75
5,4375	2,6875	5,75
7,5	3,75	4,0625
5,375	3,75	4,6875
5	3,125	6,25
5,625	3,3125	3,75
6,125	3,375	4,8125
6,5625	3,3125	4,0625
5,6875	3,3125	5,8125
5,9375	3,3125	4,25
7,5	3,125	5,0625
5,3125	3,0625	4,5
5,9375	3,25	4,625
5,0625	4	4,4375
5,625	3,375	3,9375
7,1875	3,5	4,1875
6,5625	2,875	4,75
7,5	3,5	4,875
7,0625	3,9375	6,5625
5,4375	4	5,4375
7,0625	4,4375	4,5625
6,8125	3,9375	5,1875
5,5625	3,75	4,75

ESPINHOS CAUDAIS INTERNOS– SALES/SP (medidas em mm)		
<i>Macrobrachium amazonicum</i>	<i>Macrobrachium jelskii</i>	Indivíduo intermediário
0,3	0,5	0,34
0,24	0,46	0,44
0,24	0,46	0,46
0,34	0,46	0,4
0,4	0,52	0,4
0,34	0,44	0,38
0,4	0,46	0,34
0,4	0,4	0,38
0,4	0,48	0,5
0,28	0,4	0,44
0,4	0,66	0,32
0,36	0,56	0,46
0,28	0,36	0,4
0,36	0,46	0,4
0,32	0,46	0,36
0,3	0,46	0,44
0,3	0,48	0,34
0,34	0,42	0,38
0,36	0,48	0,42
0,36	0,52	0,38
0,24	0,48	0,34
0,38	0,48	0,4
0,3	0,48	0,38
0,24	0,52	0,46
0,28	0,52	0,46
0,26	0,52	0,38
0,4	0,5	0,38
0,3	0,86	0,44
0,3	0,56	0,42
0,3	0,4	0,4
0,42	0,5	0,32
0,34	0,52	0,36
0,3	0,4	0,38
0,48	0,52	0,4
0,4	0,46	0,4
0,32	0,44	0,44
0,3	0,48	0,44
0,34	0,46	0,42
0,32	0,54	0,42
0,38	0,4	0,36

ESPINHOS CAUDAIS INTERNOS– MENDONÇA/SP (medidas em mm)		
<i>Macrobrachium amazonicum</i>	<i>Macrobrachium jelskii</i>	Indivíduo intermediário
0,3	0,52	0,34
0,28	0,58	0,44
0,3	0,56	0,42
0,36	0,5	0,32
0,3	0,5	0,32
0,4	0,56	0,44
0,3	0,56	0,32
0,34	0,48	0,44
0,36	0,5	0,28
0,38	0,5	0,38
0,28	0,48	0,38
0,28	0,44	0,32
0,4	0,4	0,36
0,28	0,46	0,38
0,3	0,42	0,44
0,32	0,44	0,44
0,32	0,42	0,42
0,28	0,46	0,42
0,26	0,46	0,5
0,26	0,48	0,44
0,36	0,5	0,38
0,4	0,56	0,52
0,32	0,46	0,38
0,38	0,48	0,44
0,24	0,46	0,32
0,42	0,36	0,44
0,32	0,44	0,36
0,26	0,44	0,4
0,3	0,46	0,38
0,36	0,44	0,36
0,38	0,48	0,38
0,3	0,5	0,38
0,4	0,48	0,48
0,32	0,5	0,46
0,4	0,46	0,4
0,32	0,4	0,4
0,24	0,38	0,42
0,32	0,5	0,44
0,4	0,46	0,42
0,32	0,46	0,4

ANEXO 3: Imagens dos rostros processadas no programa ADOBE PHOTOSHOP CS6.**1. *Macrobrachium amazonicum*****2. Indivíduos de padrão intermediário****3. *Macrobrachium jelskii***

ANEXO 4: Tabelas apresentando os valores dos coeficientes dos PCs. Dados gerados através da análise realizadas com o pacote de programa SHAPE v. 1.3

Valores dos PCS para <i>Macrobrachium amazonicum</i> (A)			
INDIVÍDUOS	PC1	PC2	PC3
A_01_1	728180e-02	581453e-03	346898e-02
A_02_1	598151e-02	10787e-02	505235e-02
A_03_1	575781e-02	45302e-03	793160e-02
A_04_1	285002e-02	14300e-02	391726e-03
A_05_1	447343e-02	00888e-02	082737e-03
A_06_1	094482e-02	77039e-02	08598e-02
A_07_1	942277e-02	62638e-02	193329e-02
A_08_1	772694e-02	19982e-02	306118e-02
A_09_1	.491836e-03	93856e-02	96266e-03
A_10_1	574249e-02	175599e-02	460117e-03
A_11_1	863219e-03	78370e-02	31805e-02
A_12_1	157220e-02	61743e-02	55079e-03
A_13_1	.039642e-02	67663e-02	864366e-03
A_14_1	452436e-03	60505e-02	64534e-03
A_15_1	.504172e-02	62236e-02	118003e-03
A_16_1	338840e-02	24708e-02	285373e-02
A_17_1	.555906e-02	45195e-02	293531e-02
A_18_1	193654e-02	43984e-03	484037e-02
A_19_1	193654e-02	43984e-03	484037e-02
A_20_1	.648970e-02	25116e-02	372276e-03
A_21_1	.421576e-02	47778e-02	054161e-02
A_22_1	.811391e-02	40726e-02	750837e-02
A_23_1	.521099e-02	16464e-02	423468e-02
A_24_1	.242511e-02	27600e-03	353718e-02
A_25_1	133232e-02	11531e-02	919849e-02
A_26_1	.674282e-02	48934e-02	31573e-02
A_27_1	.532698e-02	306901e-02	338654e-02
A_28_1	.213829e-02	30202e-02	573836e-02
A_29_1	925104e-03	43671e-03	530912e-02
A_30_1	.620969e-02	34740e-02	335787e-02

Valores dos PCS para <i>Indivíduos intermediários (H)</i>			
INDIVÍDUOS	PC1	PC2	PC3
H_01_1	5.880875e-02	-7.514033e-03	-9.185191e-04
H_02_1	5.608818e-03	3.814147e-02	-2.537839e-02
H_03_1	2.242323e-02	4.551614e-02	-7.320158e-03
H_04_1	2.928201e-02	2.282308e-02	-2.890574e-03
H_05_1	2.492526e-02	1.749255e-03	1.162906e-02
H_06_1	9.033413e-02	1.363517e-02	-2.380734e-02
H_07_1	9.067944e-03	3.996708e-03	2.535800e-02
H_08_1	-1.993770e-02	-3.108926e-02	1.291749e-02
H_09_1	3.153540e-02	8.006273e-03	4.387221e-03
H_10_1	4.798808e-02	-1.623678e-02	-1.150860e-02
H_11_1	-5.254031e-02	-5.843566e-02	2.058072e-02
H_12_1	-3.741113e-02	2.536654e-02	-4.344115e-03
H_13_1	3.555815e-02	-4.572667e-02	1.553200e-02
H_14_1	-4.625265e-02	-3.324459e-02	-1.220216e-02
H_15_1	-5.036982e-02	-4.304891e-02	-1.946003e-02
H_16_1	-4.051456e-03	1.053641e-02	-1.346083e-04
H_17_1	-3.564439e-02	8.595022e-03	-6.043208e-03
H_18_1	-4.223983e-02	2.275969e-02	2.259913e-03
H_19_1	-6.836762e-02	-7.855410e-02	9.203039e-04
H_20_1	-6.836762e-02	-7.855410e-02	9.203039e-04
H_21_1	1.507770e-02	-4.785097e-02	-1.303227e-02
H_22_1	-4.398450e-02	-5.064289e-03	-7.570231e-03
H_23_1	1.161484e-02	5.078418e-03	-1.684384e-02
H_24_1	-1.003964e-02	-7.689182e-02	-1.133880e-02
H_25_1	6.174917e-02	1.726141e-02	-5.763019e-03
H_26_1	-1.813844e-02	-1.457734e-02	-4.029623e-02
H_27_1	-1.039154e-01	-5.422606e-02	1.952091e-02
H_28_1	-4.382031e-02	1.333676e-02	-1.370578e-02
H_29_1	-6.527964e-02	3.223999e-02	9.748207e-03
H_30_1	-7.639517e-04	-4.833064e-02	-7.897582e-03

Valores dos PCS para <i>Macrobrachium jelskii</i> (J)			
INDIVÍDUOS	PC1	PC2	PC3
J_01_1	8.270404e-02	8.030443e-03	1.660959e-02
J_02_1	2.985073e-02	1.433605e-03	2.210696e-02
J_03_1	4.540352e-02	-6.228126e-02	2.607771e-02
J_04_1	7.658772e-02	-1.711603e-02	6.547746e-03
J_05_1	4.432193e-02	1.382316e-02	8.899034e-04
J_06_1	4.641908e-02	-7.371878e-04	-2.259505e-03
J_07_1	2.273876e-02	4.869579e-02	2.011397e-02
J_08_1	-4.391265e-02	-3.158710e-02	1.267157e-02
J_09_1	6.088665e-02	-5.520063e-02	-5.004805e-03
J_10_1	7.330034e-02	-5.101328e-02	5.175550e-03
J_11_1	9.281389e-02	-3.060210e-02	1.386721e-02
J_12_1	9.891431e-03	-1.382928e-03	-1.900429e-02
J_13_1	-1.795434e-02	1.065156e-02	4.798969e-03
J_14_1	-5.648173e-03	-2.075462e-04	-2.715940e-03
J_15_1	1.277059e-02	7.307387e-03	1.653137e-02
J_16_1	3.033948e-02	-4.070724e-02	5.092205e-02
J_17_1	1.653853e-02	-1.193536e-02	-7.148449e-03
J_18_1	3.071423e-02	-3.594878e-02	2.972057e-02
J_19_1	-1.158913e-02	-2.122983e-02	-1.431025e-02
J_20_1	3.768238e-03	2.140127e-02	1.056421e-02
J_21_1	2.020066e-02	-3.129884e-03	1.886867e-02
J_22_1	1.332305e-02	-3.729344e-02	-2.293549e-03
J_23_1	-4.848488e-02	4.397297e-03	-1.762432e-02
J_24_1	-4.848488e-02	4.397297e-03	-1.762432e-02
J_25_1	-5.876304e-02	-1.736806e-02	-5.602867e-03
J_26_1	-7.951077e-02	-3.777532e-02	-2.339686e-02
J_27_1	9.024268e-02	-5.006261e-02	4.565157e-03
J_28_1	-8.820857e-02	7.566490e-04	1.005691e-02
J_29_1	-1.070988e-01	-5.508292e-02	1.632134e-02
J_30_1	7.178464e-02	-1.649930e-02	1.663706e-02

ANEXO 5: EXTRAÇÃO DE DNA UTILIZANDO-SE A TÉCNICA DE FENOL-CLOROFÓRMIO

1 – Preparação do tampão de extração com uréia

	500 ml	100 ml
URÉIA 7M	210 g	42 g
NaCl 5M	35 ml	7 ml
TAMPÃO TRIS-HCl 1M pH 8.0	25 ml	5 ml
EDTA 0,5M pH 8.0	20 ml	4 ml
N-LAURIL SARCOSINATO 20%	25 ml	5 ml (ou 1g em pó)
H ₂ O DESTILADA	completar para 500 ml	completar para 100 ml

2 – Preparação da solução fenol-clorofórmio (1:1) 50 ml

- primeiro prepare uma mistura de clorofórmio e álcool isoamílico na seguinte proporção (24:1):

clorofórmio	24 ml
álcool isoamílico	1 ml
totalizando -----	25 ml

- adicionar 25 ml de fenol e 25 ml da solução clorofórmio mais álcool isoamílico (como descrito acima) em um frasco escuro, misturar e manter na geladeira.

3 – Extração

- pesar aproximadamente 50 mg de tecido em um microtubo estéril de 1,5 ml;
- adicionar 100 µl do tampão de extração com uréia e macerar com a ponta de uma ponteira;
- adicione mais 400 µl do tampão de extração com uréia;
- agite no vortex por 5 segundos;
- incube a 37° C por 30 minutos;

- após a incubação, adicione 500 µl da solução de fenol-clorofórmio (1:1)
- agite no vortex por 10 a 20 segundos;
- incube novamente a 37° C por 20 minutos;
- centrifugue a 14.000 rpm por 5 minutos;
- colete o sobrenadante (aproximadamente 400 µl) para um novo microtubo de 1,5 ml estéril;
- adicione 1/10 volume de NaCl a 3 M e 1 volume de álcool isopropílico, na seguinte proporção: 40 µl de NaCl 3 M e 400 µl de álcool isopropílico;
- misture e centrifugue novamente a 14.000 rpm por 5 minutos;
- descarte o sobrenadante com cuidado mantendo o pellet no fundo do tubo, se for necessário utilize micropipetadores e ponteiros;
- lave o pellet com 500 µl de etanol a 70%
- descarte o etanol e seque o pellet a temperatura ambiente;
- dissolva o DNA em H₂O ultrapura (água MILI-Q autoclavada) na concentração desejada, ex: 100 µl de água ultrapura.

ANEXO 6: Resultados dos testes de Kruskal-Wallis (teste de Dunn como *post hoc*) para as análises dos télsons e espinhos caudais internos.

		Multiple Comparisons p values (2-tailed): Medidas em mm (Spreadsheet1)		
		Independent (grouping) variable: télson Sales/SP		
		Kruskal-Wallis test: H (2, N= 120) =88,67507 p =0,000		
Depend.:	M. am	P. In	M. jel	
Medidas em mm	R:100,29	R:52,925	R:28,288	
M. am		0.000000	0.000000	
P. In	0.000000		0.004612	
M. jel	0.000000	0.004612		

		Multiple Comparisons p values (2-tailed): Medidas em mm (Spreadsheet1)		
		Independent (grouping) variable: Espinhos caudais Sales/SP		
		Kruskal-Wallis test: H (2, N= 120) =70,91833 p =,0000		
Depend.:	M. am	P. In	M. jel	
Medidas em mm	R:29,212	R:58,000	R:94,287	
M. am		0.000644	0.000000	
P. In	0.000644		0.000009	
M. jel	0.000000	0.000009		

		Multiple Comparisons p values (2-tailed): Medidas em mm (Spreadsheet1)		
		Independent (grouping) variable: télson Mendonça/SP		
		Kruskal-Wallis test: H (2, N= 120) =85,78829 p =0,000		
Depend.:	M. am	P. In	M. jel	
Medidas em mm	R:96,737	R:60,025	R:24,738	
M. am		0.000007	0.000000	
P. In	0.000007		0.000017	
M. jel	0.000000	0.000017		

		Multiple Comparisons p values (2-tailed): Medidas em mm (Spreadsheet1)		
		Independent (grouping) variable: Espinhos caudais Mendonça/SP		
		Kruskal-Wallis test: H (2, N= 120) =72,90018 p =,0000		
Depend.:	M. am	P. In	M. jel	
Medidas em mm	R:27,850	R:59,638	R:94,013	
M. am		0.000131	0.000000	
P. In	0.000131		0.000030	
M. jel	0.000000	0.000030		

Resultados do teste ANOVA One Way (teste de Tukey como *post hoc*) e Kruskal-Wallis (teste de Dunn como *post hoc*) dos coeficientes dos PCs dos rostros.

PC1 AM-H-JM - Tukey HSD test; variable MEDIDAS (Spreadsheet1)

Tukey HSD test; variable MEDIDAS (Spreadsheet1)
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests
Error: Between MS = ,00235, df = 87,000

Cell No.	PC3	{1}	{2}	{3}
1	AM	-.0006	0.786605	0.565473
2	HIB	0.786605		0.217676
3	JM	0.565473	0.217676	

PC2 AM-H-JM - Multiple Comparisons p values (2-tailed); MEDIDAS (Spreadsheet1)

Multiple Comparisons p values (2-tailed); MEDIDAS (Spreadsheet1)
Independent (grouping) variable: PC2
Kruskal-Wallis test: H (2, N= 90) =25,83712 p =,0000

Depend.: MEDIDAS	AM	HIB	JM
AM	R:65,000	R:38,700	R:32,800
HIB	0.000290		1.000000
JM	0.000005	1.000000	

PC3 AM-H-JM - Multiple Comparisons p values (2-tailed); MEDIDAS (Spreadsheet1)

Multiple Comparisons p values (2-tailed); MEDIDAS (Spreadsheet1)
Independent (grouping) variable: PC3
Kruskal-Wallis test: H (2, N= 90) =5,364821 p =,0684

Depend.: MEDIDAS	AM	HIB	JM
AM	R:41,867	R:40,167	R:54,467
HIB	1.000000		0.102025
JM	0.185308	0.102025	

APÊNDICE

APÊNDICE: EXTRAÇÃO DA QUITINA E OBTENÇÃO DE QUITOSANA DE *Macrobrachium amazonicum*

Lopes, A.G; Ceron. C.R. Departamento de Química e Ciências Ambientais, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP, Câmpus de São José do Rio Preto.

Introdução

O cultivo de camarões de água doce no Brasil iniciou-se na década de 1970, mas somente nos últimos anos essa atividade ganhou destaque em nível profissional, requerendo uma considerável mão-de-obra (VALENTI, 1998). Estima-se que, em 2003, a carcinocultura tenha gerado aproximadamente 56.000 empregos (LIMA, 2003), concentrando-se principalmente na região Nordeste do país, onde os índices apontam um domínio de 95% da produção nacional, devido às condições ambientais favoráveis dessa região (LIMA, 2003; SILVEIRA; ROCZANSKI, 2005).

Na atividade de carcinocultura, o objetivo básico é a produção de carne, mas atualmente têm ganhado destaque a utilização dos dejetos após o processamento industrial, que chegam a somar 40% do peso do animal, correspondendo principalmente às carapaças do abdome e cefalotórax. A composição desses dejetos pode variar, mas gira em torno de 40% de proteínas, 50% de carbonato de cálcio e até 40% de quitina (GREEN; KRAMER, 1984; PETER, 1995). Um dos usos desse material é na produção de ração animal (CARRANCO et al., 2003). Por outro lado, a quitina pode ser isolada e posteriormente transformada em quitosana, um produto de considerável valor comercial.

A quitina é um polissacarídeo estrutural biodegradável de massa molecular de aproximadamente 10^6 daltons, formado por uma cadeia linear composta por unidades de N-acetil-2-amino-2-deoxi-D-glicopirranose, interligadas por ligações glicosídicas do tipo β (1 $\rightarrow$ 4), que constitui os exoesqueletos de crustáceos insetos e fungos, estando, nessa condição, associada às proteínas. Pode também associar-se a outras moléculas como taninos fenólicos e minerais (este último destaca-se na composição da carapaça de crustáceos, PETER

(1995)). A desacetilação da quitina produz a quitosana, que apresenta grupos amino livres, tornando-a um polímero catiônico solúvel em meio aquoso ácido devido à protonação desses grupos. Esse polímero, biodegradável e atóxico, tem sido utilizado no desenvolvimento de novos produtos para as áreas médica, farmacêutica e química. Derivados anfífilos da quitosana tem sido sintetizados e utilizados como fungicidas (BARBOSA, 2013) ou testados como agentes de transfecção no processo de terapia gênica não viral (PICOLA, 2013).

A desacetilação da quitina para a produção da quitosana pode ser realizada por vários procedimentos, sendo a hidrólise básica dos grupos acetoamidas o procedimento mais comumente utilizado. A quitina já é considerada quitosana quando a molécula apresenta no mínimo 50% de desacetilação, chegando a um grau de 85% de desacetilação em nível de quitosana comercial (Figura 1) (SOUZA, 2012). Quando processadas em laboratório pode chegar a um grau de mais de 90% de desacetilação. Quanto maior for o grau de desacetilação, maior será a possibilidade de degradação durante este processo, levando a uma dispersividade dos tamanhos moleculares do polímero de quitosana.

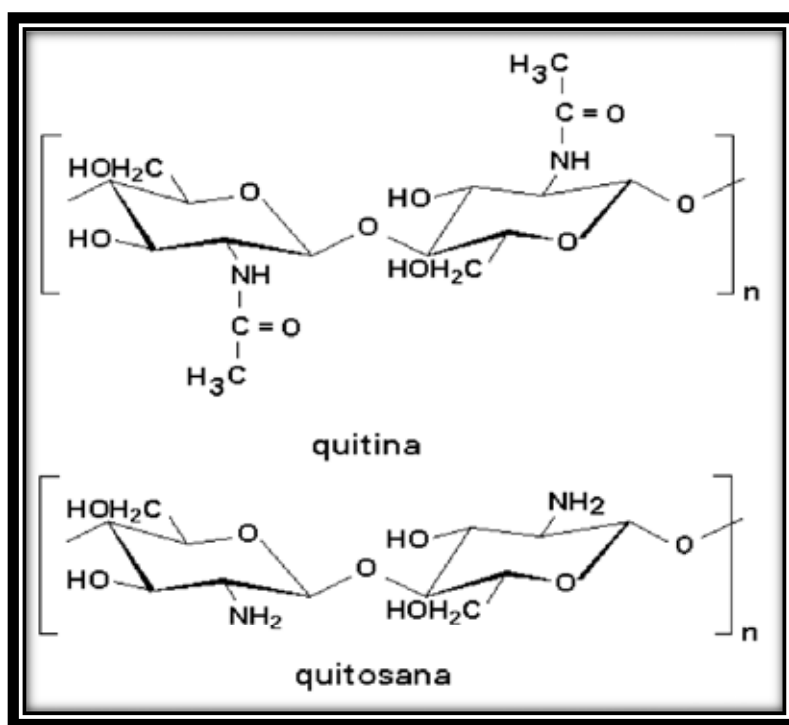


Figura 1: Estrutura primária da quitina e quitosana, na qual o n corresponde ao grau de polimerização. Se $\text{CH}_3\text{CONH} > 50\%$ o polímero é denominado quitina. Se $\text{NH}_2 \geq 50\%$ o polímero é denominado quitosana, (Modificado de ASSIS; BRITO, 2008).

O objetivo deste trabalho ateu-se à extração de quitina e sua conversão em quitosana a partir de exoesqueletos de *Macrobrachium amazonicum*, seguida de caracterização desses compostos por técnicas espectroscópicas específicas.

Materiais e Métodos

Processamento inicial da matéria-prima

O processamento do material, desde a fase inicial até a obtenção final da quitosana, seguiu-se o protocolo descrito por Assis e Britto (2008).

A quitina foi extraída a partir de exoesqueletos do camarão *Macrobrachium amazonicum* coletado nas represas do Cervinho (21°21'38"S e 49°28'59"W) e Barra Mansa (21°14'27"S e 49°56'28"W), pertencentes aos municípios de Sales/SP e Mendonça/SP respectivamente. Um total de 8 gramas de exoesqueletos, compreendendo partes como cefalotórax, quelípodos e abdomens, foram lavados para a remoção total de resíduos, tais como tecido muscular, vísceras e ovas. Após esta etapa o material foi fervido em um bquer a uma temperatura de 100° C por 2 horas e 30 minutos, mantendo-se o nível da água constante. Após a fervura, o material foi submetido à secagem em estufa à temperatura de 30° C por um período de 24 horas. O material seco, pesando 5 gramas, foi moído até restarem pequenas partículas.

Desmineralização

Para a desmineralização, foram adicionados 40 ml de HCl a 1M a 5 gramas do material seco e moído. Essa solução foi permaneceu à temperatura ambiente por 2 horas, mantida em agitação. A matéria-prima desmineralizada foi filtrada a vácuo e lavada com água destilada até a remoção total do ácido e obtendo-se a neutralidade do filtrado. Novamente o material foi levado à estufa a uma temperatura de 30° C para secagem total.

Desproteinação

Para a desproteinação, foram adicionados 50 ml de solução de NaOH a 15% ao material seco e desmineralizado. Em seguida a mistura foi aquecida a 65° C mantendo-se sob agitação por um período de 3 horas. Após esta etapa, o material foi filtrado a vácuo e lavado em água destilada até a remoção total de NaOH e obtenção da neutralidade do filtrado. Uma nova secagem em estufa a 30° C foi realizada.

Despigmentação

O processo de despigmentação ocorreu em extrator Soxhlet, contendo 100 ml de etanol puro por um período de 6 horas. Após essa etapa, houve uma nova lavagem à vácuo do

material com água destilada, obtendo-se, assim, a quitina.

Obtenção da quitosana a partir da quitina

Para a obtenção da quitosana, a quitina foi adicionada a uma solução de NaOH a 40 %, contendo 0,5 g de NaBH₄. Esta mistura foi fervida a uma temperatura de 115° C e mantida sob agitação por um período de 6 horas. Ao final desta etapa, o material foi novamente lavado com água destilada até a remoção total da base e obtenção da neutralidade. Em seguida o filtrado foi lavado com metanol e seco à temperatura ambiente.

Caracterização da quitina e quitosana através de técnicas de Espectroscopia

Espectroscopia no Infravermelho (FTIR)

Nesse trabalho utilizou-se a técnica de Espectroscopia no Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). Amostras de quitina e quitosana com 1,5 mg foram secas em estufa a 60° C por um período de 24 horas, para a remoção total de água.

Os espectros de infravermelho foram obtidos em Espectrofotômetro Perkin Elmer Spectrum 100, no laboratório de Sucroquímica e Química Analítica do Departamento de Química e Ciências Ambientais do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - IBILCE/UNESP. Os espectros foram obtidos na faixa de 4000 a 1000 cm⁻¹, região do infravermelho fundamental ou médio.

Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Próton (RMN-H)

Na Espectroscopia de RMN-H, um composto químico contendo átomos de hidrogênio em sua composição molecular é submetido a um forte campo magnético, assim os átomos de hidrogênio do composto vão absorver energia através de um processo denominado ressonância magnética. A absorção de energia é quantificada, fornecendo um espectro específico para cada composto analisado, pois a radiação eletromagnética e o campo magnético são também específicos, dependendo do composto. Em um composto, os átomos de hidrogênio estão dispostos em regiões de diferentes densidades eletrônicas, assim, os prótons absorvem a energia proveniente de campos magnéticos diferentes, gerando, como resultado, sinais em formas de picos que se situam em regiões diferentes no espectro de ressonância magnética. Na leitura do espectro, as áreas abaixo dos picos correspondem a átomos de hidrogênios responsáveis por cada sinal, assim sendo possível caracterizar a

estrutura da molécula (SOLOMONS; FRYHLE, 2001).

Para a espectroscopia de RMN-H foi utilizada uma amostra de 7 mg de quitosana. Essa amostra foi solubilizada em 1 ml de água deuterada juntamente com 10 µl de cloreto de deutério. A solução foi mantida sob agitação até a completa solubilização da quitosana e, em seguida, transferida para um tubo específico de RMN-H. Os espectros de RMN-H foram realizados no Centro Multiusuário de Inovação Biomolecular do Departamento de Física do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - IBILCE/UNESP, em um espectrômetro Bruker de 400 MHz a temperatura de 70 °C.

Resultados e Discussão

A quitina tem sido extraída principalmente de carapaças de caranguejos, lagostas e camarões, destacando-se o camarão marinho *Pandalus borealis*. O Japão, atualmente, é o maior produtor mundial de quitina. No Brasil, a obtenção da quitina é feita a partir de cefalotórax de camarões de água salgada, destacando-se a espécie *Panulirus argus* (TANUTA; ZUCAS, 1985; KNORR, 1991; ASSIS; BRITTO, 2008). Entretanto, não há na literatura informações relevantes relacionadas à extração de quitina de crustáceos dulcícolas, destacando-se apenas os trabalhos de Battisti (2002) e Assis; Britto (2008) com a espécie *Macrobrachium rosenbergii*.

Nesse trabalho obteve-se a extração da quitina e sua posterior transformação em quitosana a partir de cefalotórax e abdome de *M. amazonicum*, um camarão dulcícola recentemente introduzido e encontrado abundantemente nos reservatórios aquáticos da região Noroeste do Estado de São Paulo. A partir de 8 gramas de material inicial foram obtidas 2 gramas de quitina, o que corresponde a 25% da massa inicial utilizada, o que está de acordo com os resultados obtidos por Battisti (2002) em *M. rosenbergii*.

A quitosana foi obtida pela reação de desacetilação da quitina, envolvendo a hidrólise dos grupos acetila dos monômeros de quitina, em meio alcalino concentrado. Cerca de 0,8 gramas de quitosana foram obtidas a partir do material de partida. Essa perda pode ser devida ao alto grau de alcalinidade e alta temperatura empregada na reação de desacetilação, tornando esta etapa bem agressiva.

Os espectros de FTIR da quitina e quitosana estão apresentados na Figura 2. As bandas situadas na região 3400 cm^{-1} , são bandas que representam as vibrações do estiramento axial dos grupos hidroxilas, as quais estão sobrepostas ao estiramento das ligações N-H

(GABRIEL, 2013). Essa região, entretanto, não é informativa para a diferenciação entre quitina e quitosana.

O pico intenso que aparece em 1660 cm^{-1} corresponde às vibrações da carbonila do grupo acetamida, o qual poder ser utilizado para a diferenciação de quitina e quitosana, ou entre polímeros de quitosana entre si. Quanto maior for a quantidade dos grupamentos acetamida, maior é a intensidade deste pico. Em relação à quitina, a quitosana apresenta este pico bem mais discreto nesse ponto (GABRIEL, 2013).

Uma outra região relevante para a caracterização e diferenciação destes dois polímeros está situada na região entre 1450 cm^{-1} a 1300 cm^{-1} . O pico em 1375 cm^{-1} refere-se à deformação axial da ligação C-N do grupo acetamida, sendo assim apresentando um pico mais intenso no espectro da quitina.

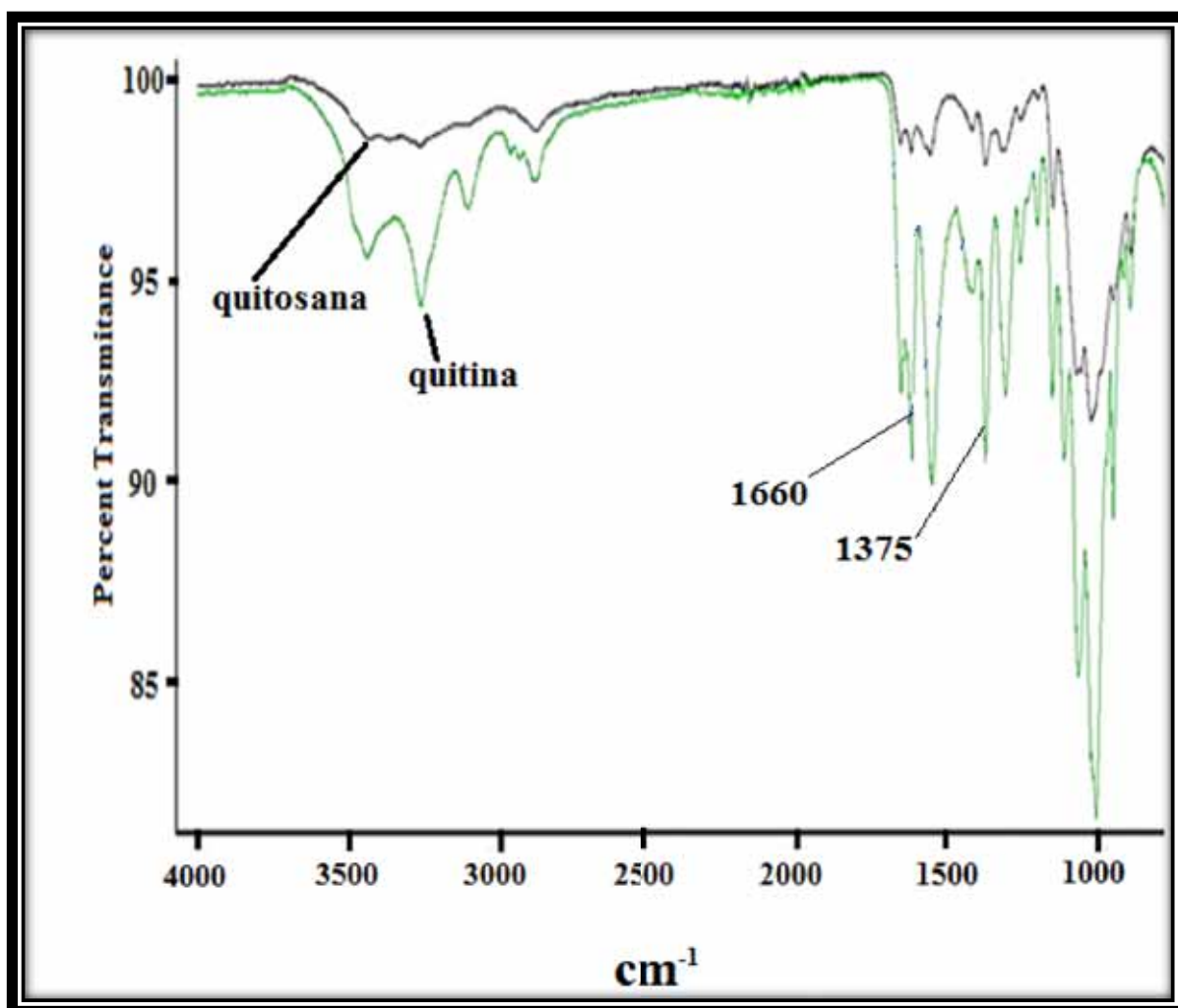


Figura 2: Espectros de Infravermelho (FTIR) para a quitina e quitosana.

A Figura 3 apresenta o espectro de RMN-H da quitosana desacetilada. Não é possível a obtenção do espectro para a quitina devido a sua insolubilidade em água. A área dos hidrogênios referentes aos carbonos anoméricos (C1) dos monômeros desacetilados localiza-se em 5,4 ppm. São os carbonos anoméricos que realizam as ligações glicosídicas entre os monômeros do polímero. A região compreendida entre 4,2 a 4,5 ppm correspondem aos sinais dos hidrogênios ligados aos carbonos 3,4,5 e 6 do polímero de quitosana. O sinal localizado na região 3,7 ppm, corresponde ao hidrogênio ligado ao carbono 2 do anel. Os hidrogênios dos grupos acetamidas apresentam seus sinais na região 2,5 ppm.

Através da integração dos picos presentes em 5,4 ppm e 2,5 ppm, correspondendo aos hidrogênios dos carbonos anoméricos e hidrogênios dos grupos acetamidas respectivamente, foi possível determinar o grau de desacetilação da quitosana, atingindo 84,4 %, semelhante às quitosanas comerciais (85%). Esse resultado indica a possibilidade de extração da quitina de *M. amazonicum* e sua conversão em quitosana de boa qualidade.

Dentre os inúmeros empregos e utilidades da quitosana e seus derivados, destaca-se a ação antimicrobiana, a qual provoca a inibição do crescimento de inúmeras bactérias e fungos. Os grupos amínicos da quitosana reagem com os fluídos fisiológicos, levando à aglutinação de células microbianas (SILVA et al., 2006; GABRIEL, 2013).

Este trabalho mostra a potencialidade de obtenção da quitina e quitosana a partir de *M. amazonicum*, um camarão dulcícola largamente disseminado nos reservatórios aquáticos da região Noroeste do Estado de São Paulo.

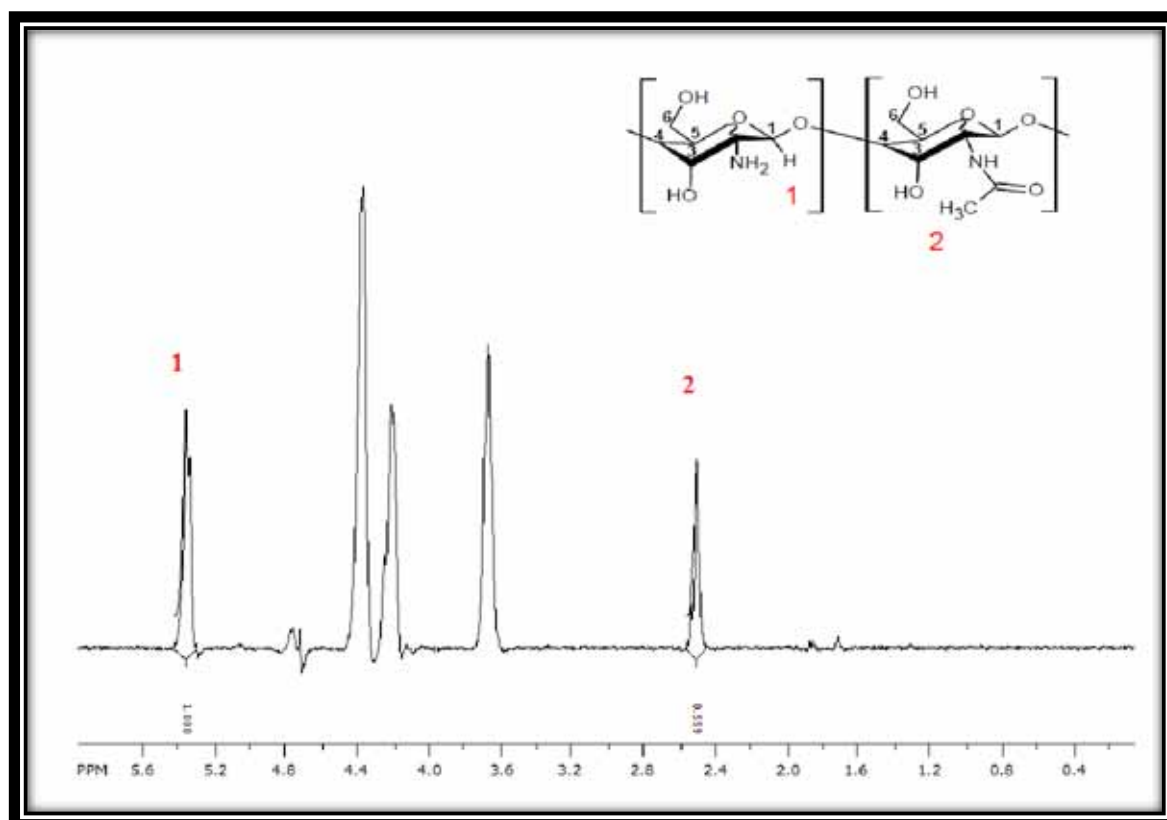


Figura 3: Espectro de RMN-H da quitosana desacetilada.

Referências

ASSIS, O.B.G.; BRITTO, D. Processo básico de extração de quitinas e produção de quitosana a partir de resíduos da carcinocultura. **R. Bras. Agrociência**, Pelotas, v.14, n.1, p. 91-100, jan-mar 2008.

BARBOSA, H.F.G. Síntese, caracterização e estudo da associação de derivados anfifílicos zwiteriônicos de quitosana. **Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Câmpus de São José do Rio Preto, Universidade Estadual Paulista** (Dissertação de Mestrado), 2013.

BATTISTI, M. V. Obtenção e caracterização de quitina e quitosana de *Macrobrachium rosenbergii*. **Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo**, São Carlos (Dissertação Mestrado), 2002.

CARRANCO, M. E.; CALVO, C.; ARELLANO, L.; PÉREZ-GIL, F.; ÁVILA, E.; FUENTE, B. Inclusión de la harina de cabezas de camarón *penaeus* sp. en raciones para gallinas ponedoras. efecto sobre la concentración de pigmento rojo de yema y calidad de huevo. **Interciencia : Una Revista De Ciencia Y Tecnología Para El Desarrollo**, Caracas, v. 28, no. 6, p. 328-333, 2003.

GABRIEL, J.S. Síntese, caracterização e atividade antifúngica de derivados anfifílicos de dietilaminoetil-quitosana contra os fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. **Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Câmpus de São José do Rio Preto, Universidade Estadual Paulista** (Dissertação de Mestrado), 2013.

GREEN, J.H.; KRAMER, A. Food Processing Waste Management. **Westport, CT: AVI publishing**, p. 214, 1984.

KNORR, D. Recovery and utilization of chitin and chitosan in food processing waste management. **Food Technology**, Chicago, v. 45, n. 1, p. 114-123, 1991.

LIMA, I.S.; AIROLDI, C. Interaction of copper with chitosan and succinic anhydride derivate – a factorial design evaluation of the chemisorption process. **Colloids Surf**, v.229, p. 129-136, 2003.

PETER, M. G. Applications and environmental aspects of chitin and chitosan. **Journal Of Macromolecular Science. Pure And Applied Chemistry**, New York, v. 32, p. 629-640, 1995.

PICOLA, I.P.D. Síntese e caracterização de derivados de quitosana e sua aplicação como agentes de transfecção para a terapia gênica não viral. **Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Câmpus de São José do Rio Preto, Universidade Estadual Paulista** (Dissertação de Mestrado), 2013.

SILVA, H.S.R.C.; SANTOS, K.S.C.R.; FERREIRA, E.I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Quim. Nova**, v.29, n.4, p. 776-785, 2006.

SILVEIRA F. S.; ROCZANSKI, M. Desempenho da pesca e da aquicultura In: Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina 2004 – 2005. **Epagri/Cepa. Secretaria de Estado e Desenvolvimento Rural e da Agricultura**, Florianópolis, p. 255-262, 2005.

SOLOMONS, T. W. G; FRYHLE, C. B., **Química Orgânica**, ed. 7ª, LTC, v.1, cap. 9, p. 313 - 333, 2000.

SOUZA, R. H. F.V. Síntese, caracterização e estudo de derivados anfifílicos que quitosana. Estudo *in vitro* contra os fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. **Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Câmpus de São José do Rio Preto, Universidade Estadual Paulista** (Dissertação de Mestrado), 2013.

TANUTA FILHO, A.; ZUCAS, S. M. Cefalotórax de camarão-rosa. IV- Recuperação e avaliação química da proteína. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 5, n. 2, p. 78-85, 1985.

VALENTI, W. C. Carcinicultura de água doce no Brasil: mitos, realidade e perspectivas. In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DE AQUICULTURA, 1.; SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, 10.; SIMPÓSIO 5.,1998, Recife. **Anais...** [S. l.:s. n.], p.199-206, 1998.

Autorizo a reprodução xerográfica para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 22/03/2014



Assinatura

