



Corvospongilla sekti

Cordylophora spp.

Corbicula spp.

Limnoperna fortunei

ORGANISMOS AQUÁTICOS INVASORES

Além de graves prejuízos ambientais, um desafio a mais para as geradoras de energia hidrelétrica

PARCERIA COPEL - UFPR - ALIANÇA

A ciência como base para a resolução de problemas e instrumento de desenvolvimento econômico e ambiental

DNA AMBIENTAL

Uma forma muito mais eficiente e rápida para monitorar as espécies aquáticas invasoras

DNA Ambiental - Espécies aquáticas Invasoras

Realização



Antonio Ostrensky (Coordenador Geral)
Márcio Roberto Pie (Coordenador de Genética)
Aline Horodesky (Pesquisadora)
Ana Paula Bertão (Pesquisadora)
André Olivotto Agostinis (Pesquisador)
Camila Duarte Ritter (pesquisadora)
Camila Tavares (Pesquisadora)
Diogo Junqueira Stevanatto (Pesquisador)
Fabrício Salvador Vidal (Pesquisador)
Paula Valeska Stica (Pesquisadora)
Raíssa Vitória Vieira Leite (Pesquisadora)
Ubiratã de Assis Teixeira da Silva (Fiscal do Projeto)



Otto Samuel Mädder Neto (Coordenador)
Ana Helena Ferreira Rohling (Técnica Administrativa)
Diego Junqueira Stevanato (Pesquisador)
Giorgi Dal Pont (Pesquisador)
Gisela Geraldine Castilho Westphal (Pesquisadora)
Nathieli Cozer (Pesquisadora e Administradora)



Fabiano Henrique R. da Cruz (Gestor)



Thiago Luis Zanin (Gerente do Projeto)
João Adalberto Pereira (Gerente do Programa de P&D)
Carlos Victor Casagrande Gianini (Pesquisador)
Éder Gomes (Pesquisador)
Diego Orlando de Bortoli (Pesquisador)
Eliseu Esmanhoto (Assistente Técnico)

A Revista do GIA

O Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais (GIA) tem como missão assumir um papel direto na interação entre o setor acadêmico, a iniciativa privada e a sociedade civil em geral, transpondo os muros universitários e aplicando, com excelência e eficiência, métodos técnico-científicos na resolução de problemas ambientais, sociais e econômicos.

Neste contexto, a Revista do GIA é uma das ferramentas utilizadas para divulgar os resultados alcançados nos projetos realizados. A Revista é escrita em uma linguagem muito menos técnica ou acadêmica que a utilizada em relatórios ou em trabalhos científicos, estimulando e facilitando a leitura e permitindo que o conhecimento gerado pelo GIA chegue a um maior número possível de pessoas, dando transparência e publicidade aos resultados alcançados.

Na Revista do GIA No 5 apresentamos os resultados do Projeto PD 6491-0383/2015, intitulado **"Desenvolvimento de métodos moleculares de última geração para identificação, quantificação e monitoramento da presença de espécies exóticas invasoras em reservatórios de usinas hidrelétricas"**.

O nosso projeto, uma parceria entre o GIA/UFPR, a Aliança Prestadora de Serviços LTDA, com apoio administrativo da FUNPAR e financiamento da COPEL Geração e Transmissão S.A., no âmbito do Programa de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico do Setor Elétrico, regulamentado pela Agência Nacional de Energia Elétrica (ANEEL), começou a ser executado em julho de 2018 e se encerra agora, três anos depois, com todos os objetivos originalmente traçados devidamente concluídos e com sucesso.

Convidamos todos a conhecer um pouco do nosso trabalho.

GIA/UFPR



R. dos funcionários, 1540 Juvevê,
Curitiba, PR, 80035-050.
Fones: (41) 3350-5634 - 3353-3861
contato@gia.org.br
www.gia.org.br/portal

ÍNDICE

- 01** Apresentação.
- 03** Editorial.
- 04** Sob a luz da ciência.
- 05** Espécies exóticas ou invasoras? Quais suas principais diferenças?
- 07** Os superpoderes das principais espécies aquáticas invasoras incrustantes que impactam usinas hidrelétricas.
- 11** Esponjas de água doce: Biologia, impactos ambientais e econômicos.
- 14** Os caminhos da ciência para não precisar reinventar a roda.
- 17** As relações perigosas envolvendo espécies aquáticas invasoras incrustantes.
- 20** Impactos ecológicos causados por invasores incrustantes límnicos.
- 24** Impactos econômicos e operacionais causados pelos organismos invasores incrustantes em usinas hidrelétricas.
- 30** Como as espécies são detectadas a partir do eDNA?
- 32** Uma comparação entre métodos convencionais e moleculares de monitoramento de fauna.
- 35** Decifrando a degradação do eDNA.
- 39** Mas qual é mesmo a pergunta?
- 43** Os novos rumos do monitoramento e controle de espécies aquáticas invasoras incrustantes através do eDNA.
- 46** A criação de uma startup: mais um importante legado do projeto.
- 49** Método molecular x método convencional - Comparando resultados.
- 53** Os invasores descobertos.
- 56** O projeto de P&D em números e resultados.
- 57** Curtas.
- 58** O futuro do DNA ambiental.
- 60** Além do DNA o RNA...
- 61** O Projeto em Fotos.
- 66** Sobre os autores.



Editorial

Quando, ainda nos primeiros meses de 2015, iniciamos as tratativas com a COPEL para desenvolvermos um projeto de P&D voltado à utilização de métodos moleculares para identificação de espécies invasoras em usinas hidrelétricas, muito poucas pessoas tinham ouvido falar em tais métodos ou mesmo de PCR em tempo real.

Seis anos depois e após o surgimento da maior pandemia dos últimos 100 anos, muita gente não apenas ouviu falar, como milhões de brasileiros fizeram testes laboratoriais utilizando rt-PCR para saber se estavam ou não infectados pelo temível Sars-CoV-2, que ficaria mais conhecido como o "novo coronavírus".

A pandemia trouxe para o dia a dia de parte da população a discussão sobre os índices de acerto dos testes baseados em rt-PCR (muito próximos a 100%), em comparação com os testes sorológicos de laboratório (em torno de 84%) ou de farmácia (que, quando muito, apresentam 50% de acerto).

O que pouca gente continua sem saber é que os métodos moleculares podem ser utilizados em uma série muito maior de áreas do conhecimento humano, como na biologia, ecologia, biotecnologia, bioquímica, genética, engenharia ambiental, além, é claro, da própria área da saúde.

Nós, do GIA/UFPR, da Aliança e da COPEL, dedicamos os últimos três anos pesquisando, adaptando, desenvolvendo e validando técnicas e métodos moleculares direcionados à detecção de organismos aquáticos invasores incrustantes em rios, lagos e reservatórios através do DNA ambiental que esses organismos liberam.

Os organismos vivos, sejam eles invisíveis vírus, microscópicas bactérias, pequenas plantas, imensos

elefantes ou gigantescas baleias, liberam continuamente DNA em seus habitats naturais, por exemplo, através de esporos, pólen, folhas, fezes, muda, secreções, mucosas, pele, gametas e até mesmo através do seu cadáver, consumido por outros organismos. Essas "pistas" deixadas no ambiente (chamadas de DNA ambiental) já podem ser detectadas, identificadas e até mesmo quantificadas. E quanto mais organismos de uma mesma espécie existe em um determinado local, maior o número de "pistas" (DNA) deixadas por eles no ambiente.

Organismos invasores, na maioria das vezes, não são nativos de uma determinada área ou região, embora seja preciso deixar claro que organismos nativos podem se tornar ou vir a se comportar como invasores por interferência humana (por exemplo, quando organismos de topo de cadeia são extintos de uma determinada região, provocando reações ecológicas em cadeia). O fato é que organismos invasores costumam causar graves problemas ecológicos e econômicos.

No caso que nós estudamos, os problemas econômicos mais diretos estão relacionados ao entupimento de sistemas hidráulicos de usinas hidrelétricas, o que pode aumentar os custos com a manutenção desses sistemas ou mesmo do tempo que as turbinas ficam paradas, sem gerar energia, enquanto as tubulações e equipamentos possam ser devidamente desobstruídos. Em tempos de apagões, crises hídricas e aumento dos custos de energia para todos os consumidores, esse acaba sendo um problema que não pode ser negligenciado, pois a afeta a todos.

Ao longo desta revista falaremos mais sobre esses e outros temas e mostraremos, mais uma vez, a importância da ciência como caminho para a resolução dos problemas da sociedade.

Antonio Ostrensky
EDITOR



Sob a luz da ciência

Thiago Luis Zanin

Engenheiro Químico

Geração e Transmissão

“

Nossa incansável busca para melhorar o convívio com o mexilhão-dourado tem apresentado resultados que são compartilhados e aproveitados por toda a sociedade, direta ou indiretamente. Um exemplo é este projeto de P&D, que está melhorando a tecnologia para lidar com as espécies invasoras e poderá ser aplicado em todo o país

”



As usinas hidrelétricas contam com reservatórios que armazenam água para produção de energia e têm grande relevância para os ecossistemas locais. Quando espécies invasoras instalam-se nesses reservatórios, é preciso avaliar os efeitos e a eventual necessidade de intervenção para que não haja prejuízos ao equilíbrio ambiental e aos usos múltiplos da água.

Na ocorrência da infestação do mexilhão-dourado em reservatórios de usinas operadas pela Copel, por exemplo, a empresa sofre as consequências de um desequilíbrio que não foi provocado pela atividade de geração de energia, mas que pode afetá-la diretamente, demandando gastos adicionais à prestação desse serviço à população.

Mesmo sendo uma “vítima” deste desequilíbrio, a empresa precisa de mais informações e tecnologias para reduzir as consequências e custos decorrentes do mexilhão dourado para as usinas.

Esta busca tem mais de duas décadas, envolvendo instituições de públicas e privadas de pesquisa, com o apoio financeiro da Agência Nacional de Energia Elétrica, por meio do Programa de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação.

Como resultado, está sendo finalizado um projeto muito importante para nos permitir identificar e monitorar a presença do mexilhão-dourado nos rios e reservatórios de forma mais barata e precisa. Cabe destacar que a redução dos custos envolvidos na geração de energia reflete no final das contas na redução do preço da energia para toda a sociedade.



ESPECIES EXOTICAS OU INVASORAS? QUAIS SUAS PRINCIPAIS DIFERENÇAS?

MSc. Fabricio Salvador Vidal,
MSc. Ana Paula S. Bertao e
MSc. Raissa V. Vieira Leite

COMPARAÇÃO ENTRE ESPÉCIES

 NATIVAS	 EXÓTICAS	 EXÓTICAS INVASORAS
Encontram-se dentro da área de distribuição natural	São introduzidas em áreas onde não eram encontradas naturalmente	São introduzidas em áreas onde não eram encontradas naturalmente
Tendem a manter relação de equilíbrio com outras espécies nativas	Podem ou não competir por recursos com as espécies nativas	Afetam a biodiversidade local, podem causar extinção de espécies e perdas econômicas
Reproduzem-se naturalmente dentro da área de dispersão	Necessitam da intervenção humana para conseguirem se reproduzir e dispersar	Reproduzem-se de forma descontrolada e passam a invadir novos ambientes

ESPÉCIES EXÓTICAS X ESPÉCIES EXÓTICAS INVASORAS

Espécies exóticas são organismos que foram introduzidos fora da sua área de distribuição natural. Embora consigam se estabelecer na região onde foram introduzidos, eles não são considerados ameaças, pois dependem das intervenções humanas para se reproduzir ou se dispersar e não causam impactos negativos no meio onde são inseridos. O boi, o porco, a galinha e a soja são exemplos de espécies exóticas no Brasil. Já as **espécies exóticas invasoras**, quando introduzidas em outros territórios fora de sua área de distribuição natural, não apenas conseguem se estabelecer, mas passam a se reproduzir de forma incontrolável, causando perda de biodiversidade, gerando uma série de outros impactos ecológicos e econômicos negativos e colonizando novos ambientes, aumentando a sua área de distribuição. O vison-americano, a vespa gigante asiática e o mexilhão-dourado são exemplos de espécies invasoras pelo mundo.

BIOINVASÃO

Uma invasão biológica pode ter origem natural, mas, na maioria das vezes, é fruto de ações antrópicas (ações humanas), sendo elas intencionais ou não. Essas invasões podem ser facilitadas pela existência de corredores de dispersão (rotas aquáticas, terrestres ou aéreas), ou pela maior vulnerabilidade e menor resistência biótica apresentada por ambientes previamente alterados.



Uma vez que o ambiente natural é invadido por essas espécies, suas características físicas e biológicas são modificadas. As espécies invasoras geralmente, por não encontrarem predadores em número suficiente e por se adaptarem rapidamente aos ambientes invadidos, estabelecem-se nesse ambiente e passam a se reproduzir massivamente, competindo por territórios e alimentos e afetando a biodiversidade nativa.

COMO OCORRE O PROCESSO DE BIOINVASÃO?

O processo de bioinvasão pode ser dividido em quatro etapas: i) entrada: quando efetivamente a espécie chega a um ou mais pontos do ecossistema; ii) estabelecimento: quando a espécie começa a se reproduzir e tenta evitar a sua extinção no novo ambiente; iii) dispersão: quando ela passa a ocupar os habitats disponíveis, e iv) impacto: quando a espécie se estabelece e passa a competir com outras em seu novo ambiente, causando prejuízos ambientais e econômicos.

As espécies invasoras são altamente adaptadas para ocupar e se estabelecer em novos ecossistemas. Algumas delas conseguem até mesmo modificar o ambiente em que estão invadindo, para que o mesmo se torne ainda mais favorável ao seu estabelecimento.

Impulsionadas pela intensificação das práticas de comércio, as espécies invasoras cada vez mais se espalham pelo mundo, trazendo consigo um rastro de impactos das mais diferentes ordens.

Exemplos de espécies invasoras pelo mundo



Vison-americano
Neovision vison

Carnívoro e originário da América do Norte, tornou-se uma espécie invasora na Europa. Afeta as populações de outros mamíferos e aves.



Vespa gigante
Vespa mandarinia

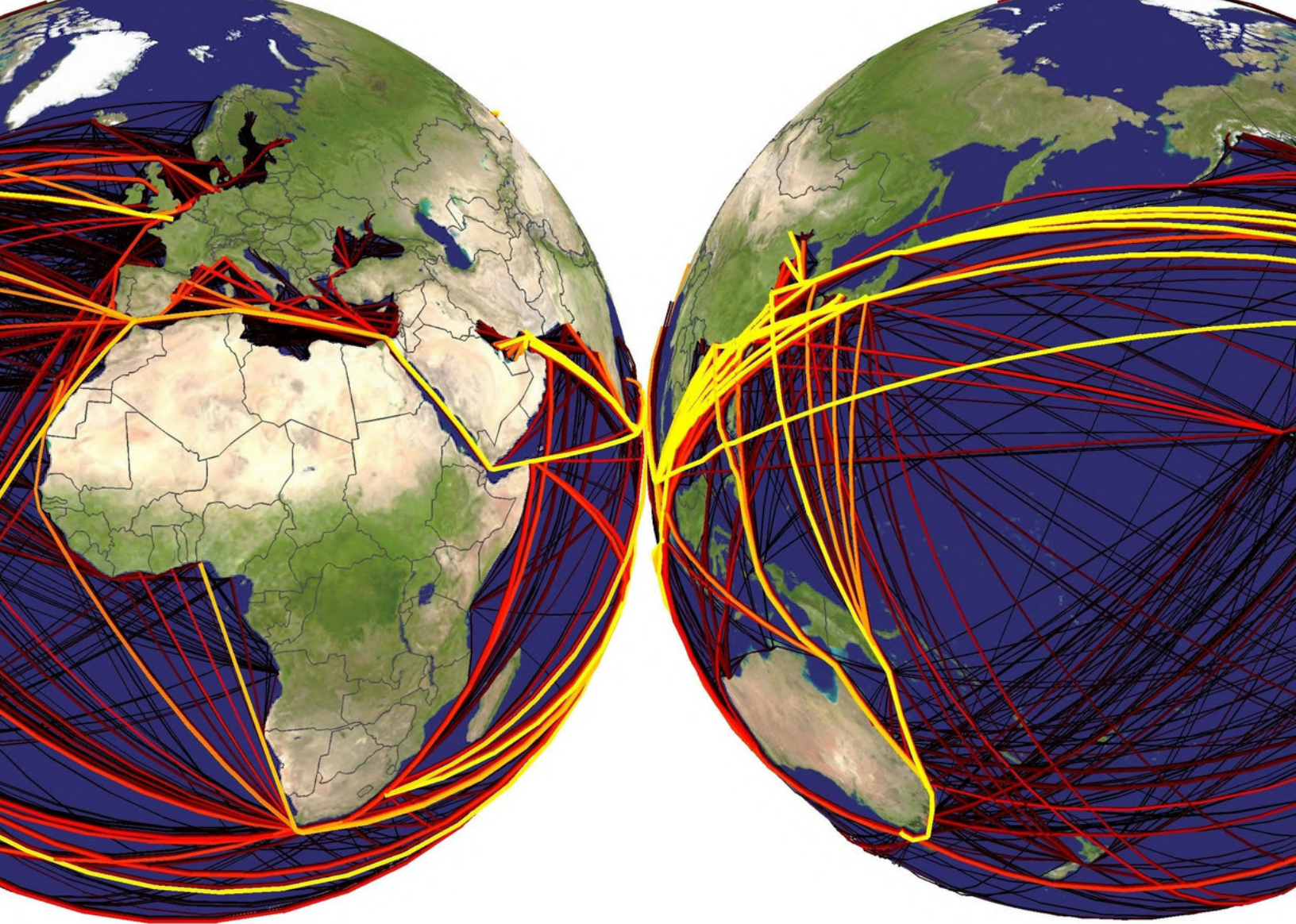
Essa vespa originária da Ásia, é uma séria ameaça às abelhas polinizadoras e outros insetos nativos na América do Norte.



Mexilhão-dourado
Limnoperna fortunei

Além de causar uma série de prejuízos às usinas hidrelétricas, este molusco asiático compete por recursos com as espécies nativas.





OS SUPERPODERES DAS PRINCIPAIS ESPÉCIES AQUÁTICAS INVASORAS INCRUSTANTES QUE IMPACTAM USINAS HIDRELÉTRICAS

Msc. Raíssa Vitória V. Leite, Msc. Ana Paula da S. Bertão e Dra. Aline Horodesky

Organismos invasores incrustantes límnicos

Entre as espécies consideradas invasoras, destacam-se as aquáticas incrustantes, que apresentam estruturas de adesão que facilitam sua fixação em substratos. E é exatamente isso que causa grandes dores de cabeça aos gestores de usinas hidrelétricas. São as crostas formadas por estes organismos - chamadas de bioincrustações - e por outros que se

associam e interagem com eles, é que vão entupir tubulações, acelerar o desgaste de equipamentos e exigir intervenções frequentes para se tentar manter os sistemas hidráulicos operacionais.

O processo de bioincrustação inicia através de uma película coberta por compostos orgânicos, facilitando a adesão de bactérias e de outros organismos microscópicos. Esse processo favorece a formação de um

Das 8 principais espécies invasoras que afetam as usinas hidrelétricas pelo mundo, 4 são encontradas no Paraná.

Entre as espécies invasoras, destacam-se principalmente as aquáticas incrustantes, que apresentam estruturas de adesão facilitando a fixação em substratos.

OITO GRANDES PROBLEMAS PARA AS USINAS HIDRELÉTRICAS AO REDOR DO MUNDO

Briozoário (*Plumatella fungosa*)

Esse briozoário tem origem na Europa e tem causado impactos na América do Norte.



Amêijoia-asiática (*Corbicula fluminea*)

Originária, como sugere o próprio nome, da Ásia, tem causado impactos na América do Norte, Oceania, América do Sul e Europa.



Mexilhão-quagga (*Dreissena bugensis*)

Possui sua origem na Ásia e tem causado impactos na América do Norte e Europa.



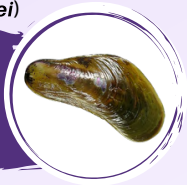
Mexilhão-zebra (*Dreissena polymorpha*)

Mais um molusco que possui sua origem na Ásia e tem causado severos impactos a usinas hidrelétricas na América do Norte.



Mexilhão-dourado (*Limnoperna fortunei*)

Espécie natural da Ásia, tem causado impactos significativos para indústrias, estações de tratamento de água e usinas hidrelétricas na América do Sul.



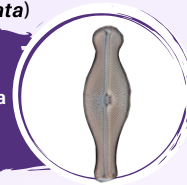
Hidrozoário (*Cordylophora caspia*)

Possui sua origem na Ásia e tem causado impactos na América do Norte, Oceania, América do Sul e Europa.



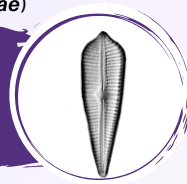
Diatomácea (*Didymosphenia geminata*)

Possui sua origem na Oceania e tem causado impactos na América do Sul.



Diatomácea (*Gomphonema tarraleahae*)

Originária da América do Norte, tem causado impactos na Oceania e Europa.



Legenda

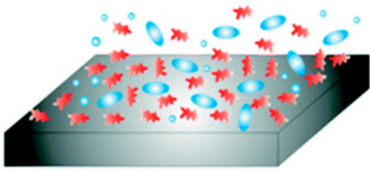
Vantagens competitivas

- Larva livre natante
- Elevada tolerância ambiental
- Latência
- Reprodução precoce e alta fertilidade
- Regeneração

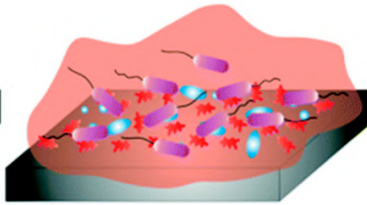
Estrutura de Fixação

- Bisco
- Fio Mucoso
- Hidrorriza
- Pedúnculo
- Célula de adesão

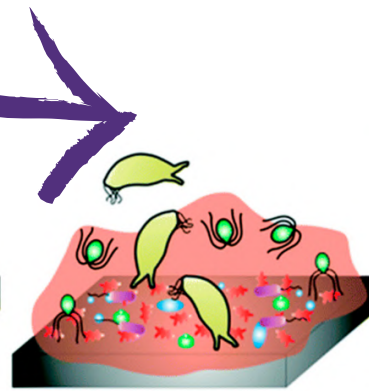
**Étapas do processo de
colonização de substratos**



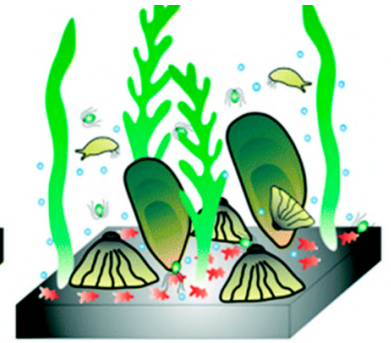
**Partículas de
matéria orgânica**



**Biofilme
bacteriano**



**Diatomáceas, microalgas e outros
microrganismos**



**Comunidade macroscópica de
organismos incrustantes**

biofilme (composto por comunidades de bactérias, envoltas por substâncias, principalmente açúcares, produzidos pelas próprias bactérias, que conferem à comunidade proteção contra diversos tipos de agressões), facilitando a fixação de organismos macroscópicos como microalgas, protozoários, mexilhões e cnidários.

Superpoderes

As oito principais espécies aquáticas invasoras incrustantes de ambientes de água doce estão distribuídas por todos os continentes, com exceção da Antártica. Apresentam estratégias que facilitam a sua sobrevivência e dispersão nos ambientes invadidos e utilizam diferentes estruturas de fixação para se aderir às estruturas hidráulicas de Usinas.

Estratégias

- **Larvas livres natantes:** estágio larval que apresenta um tamanho microscópico e os animais podem ser levados pela correnteza, dispersando-se por quilômetros de distância do local de origem, facilitando assim o seu processo de expansão;

O grupo de espécies aquáticas invasoras incrustantes que causa prejuízos em usinas hidrelétricas em todo o mundo é composto basicamente por quatro espécies de moluscos (*Corbicula fluminea*, *Limnoperna fortunei*, *Dreissena bugensis* e *Dreissena polymorpha*), um cnidário (*Cordylophora caspia*), duas diatomáceas (*Didymosphenia geminata* e *Gomphonema tarraleahae*) e um briozoário (*Plumatella fungosa*).

- **Tolerância ambiental:** essa tolerância pode ser considerada a resistência que certos organismos apresentam, como, por exemplo, amplas faixas de temperaturas e de salinidade, baixa concentração de oxigênio e de nutrientes;
- **Latência:** também chamado de estado de dormência, acontece quando o organismo desenvolve uma fina capa protetora que o envolve quando o ambiente está desfavorável para o seu desenvolvimento;
- **Rápida reprodução e alta fertilidade:** alguns organismos realizam este processo de forma muito

rápida. A reprodução praticamente acontece durante o ano todo e com alta fertilidade dos gametas produzidos, o que facilita seu estabelecimento, crescimento da população e disseminação entre os ambientes invadidos;

- **Regeneração:** acontece a partir de tecidos ou partes deles, sendo possível regenerar um animal intacto dentro de alguns dias e dar origem a um organismo inteiramente novo.

Estrutura de fixação

Organismos invasores incrustantes possuem diversas estratégias para invadir um novo ambiente. Uma delas é a forma de se fixar e manter-se aderidos a qualquer substrato.

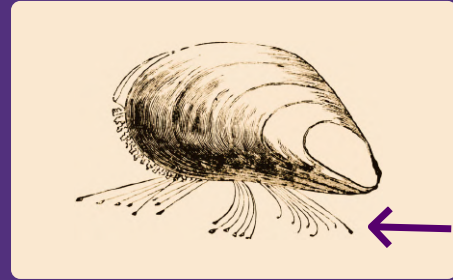
A fixação facilita a sobrevivência no novo ambiente, bem como o protege da correnteza e facilita sua alimentação e reprodução. As principais formas de fixação relacionadas às espécies límnicas incrustantes invasoras são bisso, fio mucoso, hidrorrizas, pedúnculo e células de adesão.

MECANISMOS DE FIXAÇÃO: A PRINCIPAL ARMA DOS ORGANISMOS INCRUSTANTES

BISSO

Esses mexilhões têm em comum entre si o fato de se fixarem em substratos sólidos através dos fios de bisso. Essa estrutura é composta por um complexo conjunto de fios protéicos, com características rígidas, de rápida regeneração quando rompida, que pode ter até o dobro do comprimento da concha do animal. Esses pequenos filamentos ainda permitem que os mexilhões tenham certa mobilidade, o que facilita a alimentação e reprodução desses organismos.

Mexilhões (dourado, zebra e quagga)



FIO MUCOSO

Ao entrar em contato com diferentes superfícies, a larva (pediveliger) de *C. fluminea* produz uma estrutura parecida com o bisso, chamada de "fio mucoso", produzido por uma glândula elástica que se localiza no pé desses bivalves. Ele, possui função de adesão e auxilia na locomoção dos indivíduos. Este fio não é tão resistente quanto o bisso. Contudo, em suas fases iniciais de desenvolvimento, essa estrutura permite a fixação da amêijoia-asiática em diferentes tipos de substratos. Quando os indivíduos alcançam a fase juvenil, medindo cerca de 5 mm, o fio mucoso desaparece e o indivíduo deixa de ser incrustante.

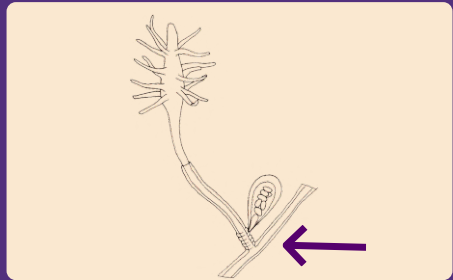
Amêijoia -asiática



HIDRORRIZA

As hidrorrizas permitem que a *Cordylophora* se fixe em qualquer substrato. É uma estrutura que fica localizada na base (estolão) do indivíduo, que, por sua vez, é caracterizado por talos de coloração parda escura, que chegam a medir 5 cm de altura.

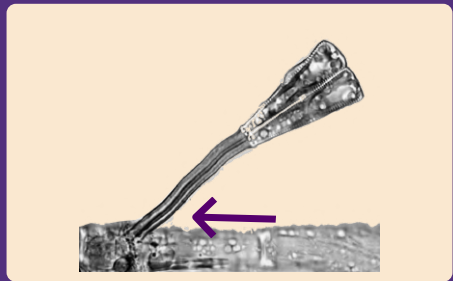
Hidrozoários



Pedúnculo

As incrustações formadas por essas diatomáceas invasoras ocorrem a partir da produção de mucilagem, uma substância semelhante a uma gelatina de coloração marrom. A estrutura peduncular, em conjunto com a mucilagem, possibilita a fixação dos organismos mesmo em substratos sujeitos a fluxos elevados de água.

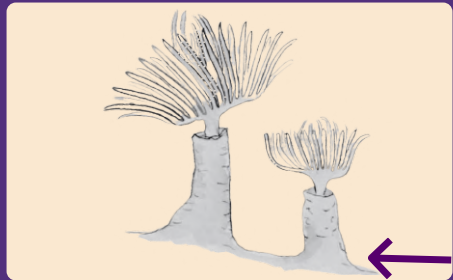
Diatomáceas



Células de adesão

Os briozoários possuem uma estrutura chamada cenozoóides, formando discos de fixação (células de adesão), estruturas radiculares e outras partes vegetativas da colônia. As células de adesão permitem a adesão das colônias a qualquer tipo de substrato.

Briozoários



ESPONJAS DE ÁGUA DOCE:

Biologia, Impactos Ambientais e Econômicos

DR. ULISSES PINHEIRO

BIÓLOGO
PROFESSOR ASSOCIADO,
DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO
81 999629567,
ulisses.pinheiro@ufpe.br)

Quem são elas?

As esponjas são organismos incrustantes considerados os animais mais antigos e simples existentes. Podemos dizer que literalmente é um bicho “sem pé nem cabeça”, pois não possuem órgãos ou tecidos verdadeiros e todo seu funcionamento é em nível celular. Além disso, possui grande quantidade de células com capacidade de se transformar em qualquer tipo celular.

Essas características conferem às esponjas uma alta capacidade de regeneração. **Um indivíduo fragmentado pode resultar em novos indivíduos a partir de cada fragmento.**

Seu tamanho corporal varia bastante, com esponjas do tamanho de um grão de arroz até indivíduos com mais de 1 metro de altura ou que recobrem vastas áreas de substrato. Sua fisiologia está completamente ligada ao seu sistema de canais de águas, responsável por sua alimentação, respiração e reprodução. Desta forma, são animais filtradores capazes de reter partículas muito pequenas (> 0,05 mm) funcionando como filtros naturais. Seu corpo normalmente é sustentado por um esqueleto mineral composto por espículas de sílica em conjunto com colágeno (espongina). Estas espículas têm alto valor na diagnose das espécies, sendo fundamentais no processo de identificação.

Interação entre esponja e o mexilhão-dourado



De onde elas vieram?

As esponjas são originalmente marinhas, sendo conhecidas cerca de 9400 espécies para o mundo. Destas, menos de 3% são espécies de água doce (Ordem Spongillida). Para o Brasil, são conhecidas 61 espécies distribuídas em todas as bacias hidrográficas. A maioria das espécies de água doce possui gêmulas, estrutura de reprodução assexuada que também serve como corpo de resistência e propágulo de dispersão. São produzidas pelas esponjas tanto em condições normais como em condições adversas. Quando submetidas a essa condição de estresse ambiental, algumas espécies produzem uma grande quantidade de gêmulas. Esta estratégia é bastante interessante para organismos que vivem em um ambiente com a possibilidade de seca, congelamento ou salinização. Como exemplo podemos citar esponjas que vivem em ambientes intermitentes, ou com variações do nível da água como a Amazônia por exemplo. Já nas regiões temperadas os ambientes estão sujeitos ao congelamento, assim como lagoas costeiras estão vulneráveis à invasão marinha. Quando o ambiente volta a ser propício, novas esponjas são produzidas a partir das gêmulas. **Essa capacidade de resistência faz com que as gêmulas tornem possível a dispersão por ambientes descontínuos.**

Impactos ambientais

Esse mecanismo de dispersão é potencializado pela presença de espículas nas gêmulas com espinhos ou em forma de gancho, fazendo com que esta estrutura funcione como um carrapicho.

Neste sentido, qualquer organismo que entre em contato com as esponjas em seu ambiente natural pode ter aderido em seu corpo as gêmulas. Por exemplo, as aves podem transportá-las em sua plumagem, assim como mamíferos em sua pelagem. Alguns peixes se alimentam de esponjas e por meio de seus dejetos liberam as gêmulas. Outra possibilidade é o transporte eólico, já que as gêmulas são estruturas leves e pequenas (em média 0,5 mm).

Apesar deste grande potencial de dispersão, a distribuição das espécies parece ter alguma limitação. A maioria das espécies da América do Sul está restrita ao continente com alto grau de endemismo (mais de 90%). As poucas espécies com ocorrência mais ampla provavelmente fazem parte de complexos de espécies. Isso significa que estes registros são duvidosos e carecem de uma melhor análise na identificação. Por isso, **as espécies que ocorrem no Brasil são consideradas nativas da Região Neotropical, não ocorrendo registros de espécies invasoras.**

A condição *sine qua non* para que uma esponja ocorra ou se desenvolva é a presença de água. Dito isso, todo ambiente aquático, seja natural ou artificial, está sujeito ao aparecimento delas. **Elas incrustam todos os tipos de substratos consolidados** além de algumas espécies terem a capacidade de se incrustar em outros organismos. Já foram encontradas sobre plantas aquáticas, bivalves e cracas.

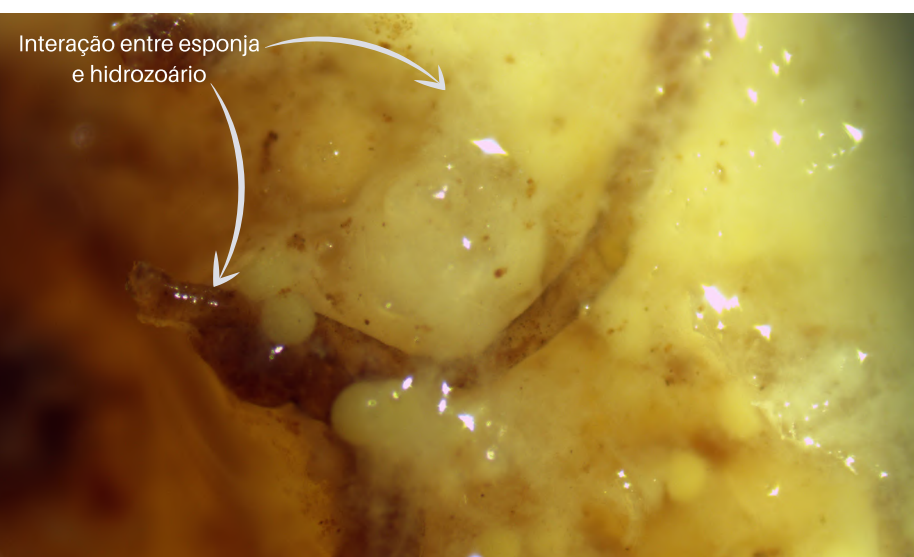
Em trabalho realizado no Reservatório de Itaipu, no Rio Paraná, Volkmer-Ribeiro et. al 2010 observaram duas espécies de esponjas, *Corvospongilla seckti* Bonetto & Ezcurra de Drago, 1966 e *Tubella repens* (Hinde, 1888), competindo pelo substrato com o invasor mexilhão-dourado *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857).

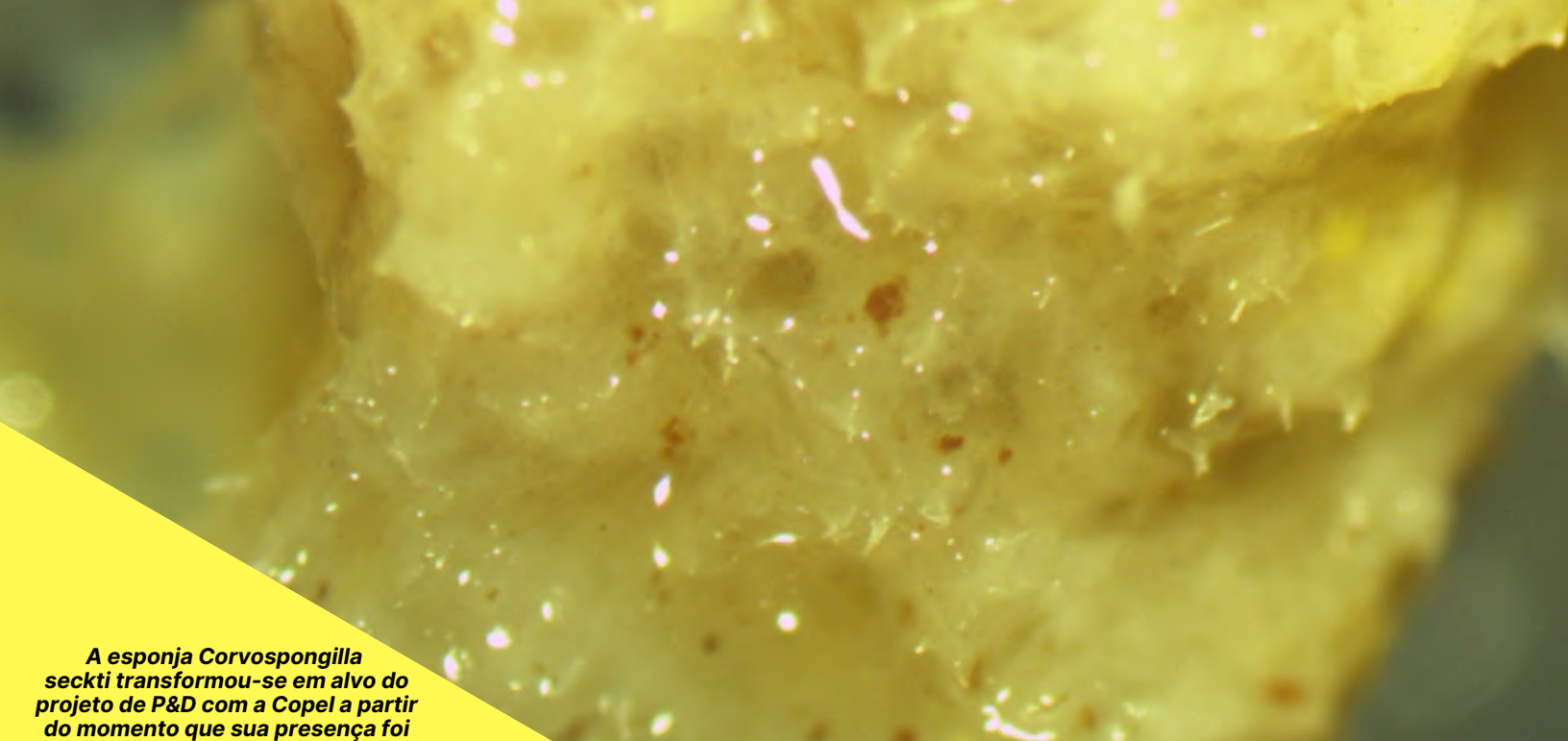
Até o presente, não foi registrado nenhum dano ambiental pela presença das esponjas, mesmo quando suas populações ocorriam com grande biomassa. Por serem organismos filtradores as esponjas exercem um grande impacto sobre a microbiota, retirando microrganismos do ambiente. Laport et al. (2019) identificaram uma grande diversidade microbiana na esponja *Tubella variabilis* (Bonetto & Ezcurra de Drago, 1973) sendo inclusive superior a microbiota das esponjas marinhas.

Muito pouco se conhece sobre a ecologia e diversidade das esponjas de água doce. Quais são os fatores limitantes de sua presença, seu ciclo de vida. Isso resulta do pequeno número de especialistas estudando estas espécies bem como da difícil identificação da população de uma forma geral da ocorrência destas esponjas. Portanto, se você souber da ocorrência destas esponjas entre em contato comigo. Com certeza você estará dando uma ajuda fundamental para construção do conhecimento sobre estes organismos.

Ulisses Pinheiro

Parte destes microrganismos associados às esponjas é capaz de produzir compostos de interesse farmacológico. Muitos medicamentos foram produzidos a partir de esponjas marinhas, mas a investigação das espécies de água doce ainda é bastante preliminar. Por outro lado, as esponjas podem apresentar alguns inconvenientes para populações humanas. Uma esponja conhecida “espinhos de pedra” (*Sterastrolepis brasiliensis* Volkmer-Ribeiro & de Rosa-Barbosa, 1978), tem sido a causa de acidentes com banhistas ao pisá-la nos rios. Esta esponja, que só é conhecida na Bacia do Paraná, **tem o esqueleto extremamente duro, dando a ela uma consistência parecida com a da rocha.** Isto é resultado de um esqueleto com espículas grandes e densas com muito pouco colágeno.





A esponja *Corvospongilla seckti* transformou-se em alvo do projeto de P&D com a Copel a partir do momento que sua presença foi registrada nas grades da tomada de água da UHE Salto Caxias. Ela, de fato, pode se transformar em um risco em potencial para a manutenção e operação da usina.

Impactos econômicos

Não são raros também os relatos de ocorrência de esponjas em tanques-rede e gaiolas de piscicultura e outros cultivos aquáticos, podendo comprometer a circulação de água e a disponibilidade de oxigênio para os organismos cultivados.

Já em usinas hidrelétricas, sua presença pode significar riscos de entupimento de tubulações hidráulicas. Algumas espécies como a *Drepanospongia uruguayensis* (Bonetto & Ezcurra de Drago, 1969) e a *Metania reticulata* (Bowerbank, 1863) possuem o esqueleto bastante rígido e podem provocar ferimentos por contato nas pessoas que a manipularem durante processos de limpeza.

Corvospongilla seckti (Bonetto e Ezcurra de Drago, 1966) foi identificada como a espécie presente

no reservatório e na UHE José Richa/PR (Salto Caxias), em interação com espécies invasoras (com o hidrozóario *Cordylophora* sp. e o mexilhão-dourado),

Além dos riscos físicos e dos custos associados à sua limpeza, as esponjas podem liberar espículas. Quando na água, tais espículas podem causar dermatite de contato. Em espaços internos e fechados da usina, as espículas quando secas podem se dispersar pelo ar e, caso, inaladas, causar sérios problemas respiratórios e oculares.

Os fragmentos e gêmulas de esponjas podem permitir uma nova recolonização tornando a eliminação da esponja apenas temporária, sendo necessária a manutenção regular.

O acúmulo de espículas no sedimento é conhecido já de longa data no Brasil, sendo capazes de causar dermatite e até cegueira em populações que entrem em contato com essas águas com grande concentração de espículas. Um caso conhecido foi um surto de acidentes oculares na cidade de Araguatins no Tocantins, onde na época de seca foram registradas

dermatites e cegueiras na população que fazia acesso ao rio. Após exames histológicos das córneas foram verificadas as presenças de espículas (Vasconcelos-Santos et al., 2009). Já na Amazônia são conhecidas as lagoas de coceiras, provocadas pelo “cauxi” resultante de espículas acumuladas de uma grande biomassa de esponjas. Populações indígenas faziam uso do cauxi misturado com barro para fabricação de cerâmicas.

Até o presente momento não foi desenvolvida alguma metodologia específica para a prevenção ou eliminação definitiva das esponjas nestas estruturas artificiais. O que normalmente é feito é a raspagem dos animais, em uma operação que exige tempo e recursos. Além das gêmulas produzidas por estas esponjas que foram raspadas, existem ainda as larvas que podem ser encontradas no corpo d'água, e que podem ser responsáveis por nova colonização.

O alerta que precisa ser feito é que quem for efetuar a manipulação das esponjas esteja precisa fazê-lo usando equipamentos completos de segurança individual, principalmente para os olhos, mãos e vias aéreas (boca e nariz).

OS CAMINHOS DA CIÊNCIA PARA NÃO PRECISAR REINVENTAR A RODA

Dra. Nathieli Cozer

REVISÃO >

A IMPORTÂNCIA DE UMA REVISÃO

Nos "tempos estranhos" em que vivemos, nos quais o obscurantismo tem sido usado cotidianamente como ferramenta de combate à ciência, é importante que reafirmemos a lógica e as etapas do processo científico.

A ciência não vive de reinventar a roda ou da individualidade de um ou outro pesquisador. A ciência parte sempre do conhecimento acumulado, devidamente testado e validado, para que seja possível, como em um jogo de videogame, evoluir para a fase seguinte.

Nesse contexto, as revisões de literatura, também conhecidas como revisões bibliográficas, assumem importante função, uma vez que possibilitam identificar tudo aquilo que já foi estudado e publicado sobre um determinado tema. Mais que apenas permitir uma visão geral sobre o estado da arte desse tema, as revisões possibilitam identificar quais instituições e pesquisadores estão também estudando o mesmo tema; avaliar as eventuais contradições de resultados (afinal, a ciência não vive de dogmas e nem os aceita); identificar quais métodos de pesquisa foram e são mais utilizados em uma área e quais caíram em desuso; quais ideias estão ganhando força e, principalmente, quais são as atu-

ais fronteiras do conhecimento científico sobre aquele tema.

Dessa forma, as revisões bibliográficas servem como um norte para o desenvolvimento de novos projetos; tornam possível um melhor planejamento do projeto atual de estudo; evita que erros já cometidos sejam repetidos, permitindo que o pesquisador otimize seus experimentos, seu tempo, os insumos e todos os recursos utilizados em um no-

vo projeto de pesquisa.

Adicionalmente, as revisões permitem melhorar processos, reduzir erros, aumentar a confiabilidade dos resultados obtidos e podendo, inclusive, mudar completamente os rumos de um projeto de pesquisa.

Neste artigo, vamos apresentar uma visão geral sobre a construção de uma revisão bibliográfica.

Para que serve uma Revisão Bibliográfica?

- Auxiliar na delimitação do foco da pesquisa;
- Evitar abordagens infrutíferas, otimizando tempo e recursos;
- Evitar de se fazer mais do mesmo;
- Orientar e estruturar as ações da investigação científica;
- Identificar lacunas existentes e as fronteiras do conhecimento;
- Identificar os achados de outras pesquisas;
- Facilitar a análise, discussão, entendimento e os próprios resultados, permitindo sua comparação com os de outros autores.

ETAPAS >

DA HIPÓTESE AOS RESULTADOS

Uma pesquisa científica parte sempre de uma hipótese ou de uma pergunta, que leva ao estabelecimento dos objetivos gerais e específicos do trabalho a ser realizado. Esses objetivos servem como base para a definição da metodologia a ser empregada e, obviamente, é essa metodologia que levará aos resultados a serem obtidos e ao alcance ou não dos objetivos inicialmente traçados. Portanto, a revisão bibliográfica qualifica-se como uma etapa crítica e indispensável da pesquisa científica, devendo ser realiza-

da assim que a hipótese do trabalho for levantada e antes mesmo que os objetivos sejam estabelecidos.

Via de regra, a revisão começa com a definição precisa e criteriosa das palavras-chave e, a partir delas, pela busca exaustiva por todas as fontes de informação relevantes, seguida de uma seleção crítica e da leitura dos documentos reunidos. Mas, não existe apenas um único tipo ou forma de se fazer revisões bibliográficas, como discutiremos a seguir.

FORMAS DE SE FAZER REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Ainda que seja possível afirmar que os princípios apresentados anteriormente sejam universais, há peculiaridades nos métodos usados para revisões de literatura, de acordo com seu propósito, abrangência, função, tratamento, abordagem e método de elaboração. Assim, as revisões podem ser classificadas em:

- Narrativas,
- Integrativas,
- Sistemáticas e meta-análise.

A **“revisão narrativa”** não utiliza obrigatoriamente critérios explícitos e sistemáticos para a busca e análise crítica da literatura. Neste caso, a busca pelos estudos não precisa esgotar as fontes de informações. Não aplica estratégias de busca sofisticadas e exaustivas e a seleção dos estudos, bem como a interpretação das informações pode estar sujeita à subjetividade dos autores, que usam esse tipo de método para conduzir e suportar sua lógica em um determinado texto. É um tipo de revisão que, apesar de suas óbvias limitações, tem sua utilidade na fundamentação teórica de trabalhos de conclusão de cursos, dissertações, teses, em artigos e até mesmo no presente texto.

Com o aumento exponencial das informações e dados científicos gerados a cada ano, a **“revisão integrativa”** surgiu como alternativa para possibilitar a combinação de estudos com abordagens metodológicas diversas (por exemplo, delineamento experimental e não

experimental), e conseguir integrar os resultados. Tem potencial para ser aplicada em diversas áreas do conhecimento, mantendo o rigor metodológico das revisões sistemáticas. O método de revisão integrativa permite a combinação de dados da literatura empírica e teórica que podem ser direcionados à definição de conceitos, identificação de lacunas nas áreas de estudos, revisão de teorias e análise metodológica dos estudos sobre um determinado tema. A combinação de pesquisas com diferentes métodos combinados na revisão integrativa amplia as possibilidades de análise da literatura.



A **“revisão sistemática”** é, por si só, um tipo de investigação científica. Essas revisões são consideradas estudos observacionais retrospectivos ou estudos experimentais de recuperação e análise crítica da literatura. Testam hipóteses e têm como objetivo levantar e avaliar criticamente a metodologia da pesquisa. Busca responder perguntas claramente formuladas. Utiliza métodos sistemáticos e explícitos para recuperar, selecionar e avaliar os resultados de estudos relevantes. Reúne e sistematiza os dados dos estudos primários (unidades de análise). É considerada a evidência científica de maior grandeza e são indicadas na tomada de decisão e até na gestão pública. Foi esse o tipo de revisão utilizada ao longo deste projeto de P&D. Cada vez que uma dúvida surgia ou cada vez que precisamos delinear um novo experimento, esse processo de revisão sistemática foi empregado.

As revisões sistemáticas geralmente envolvem um grande número de refe-

rências que precisam ser analisadas criteriosamente. Há uma série de aplicativos de gerenciamento de referências que ajudam - e muito - nessa tarefa. Os poderosos aplicativos permitem armazenar, revisar e organizar essas referências de forma organizada e padronizada. Além disso, possibilitam economia de tempo, pois evitam que cada referência tenha que ser digitada manualmente. Assim, há menos espaço para erros e otimização do trabalho. Entre os aplicativos mais utilizados para organizar as referências encontram-se o EndNote, Mendeley e Zotero.

Além dos softwares de gerenciamento de referências, há cada vez mais pacotes de código aberto para softwares livres, em diferentes linguagens, para pesquisa quantitativa em bibliometria, infometria, cienciometria e outras métricas e que inclui os principais métodos de análise. Esse é, por exemplo, o caso do Bibliometrix, usado em nosso projeto. A partir de uma base de centenas e até milhares de referências, o pacote realiza análises automáticas, disponibilizando várias rotinas para importação de dados bibliográficos do SCOPUS, Clarivate Analytics 'Web of Science, PubMed, Digital Science Dimensions e bancos de dados Cochrane, realizando análises bibliométricas e construindo matrizes de dados para cocitação, acoplamento, análise de colaboração científica e análise de co-palavras. O pacote sintetiza os dados em diferentes tabelas e formatos gráficos, inclusive em nuvens de palavras.

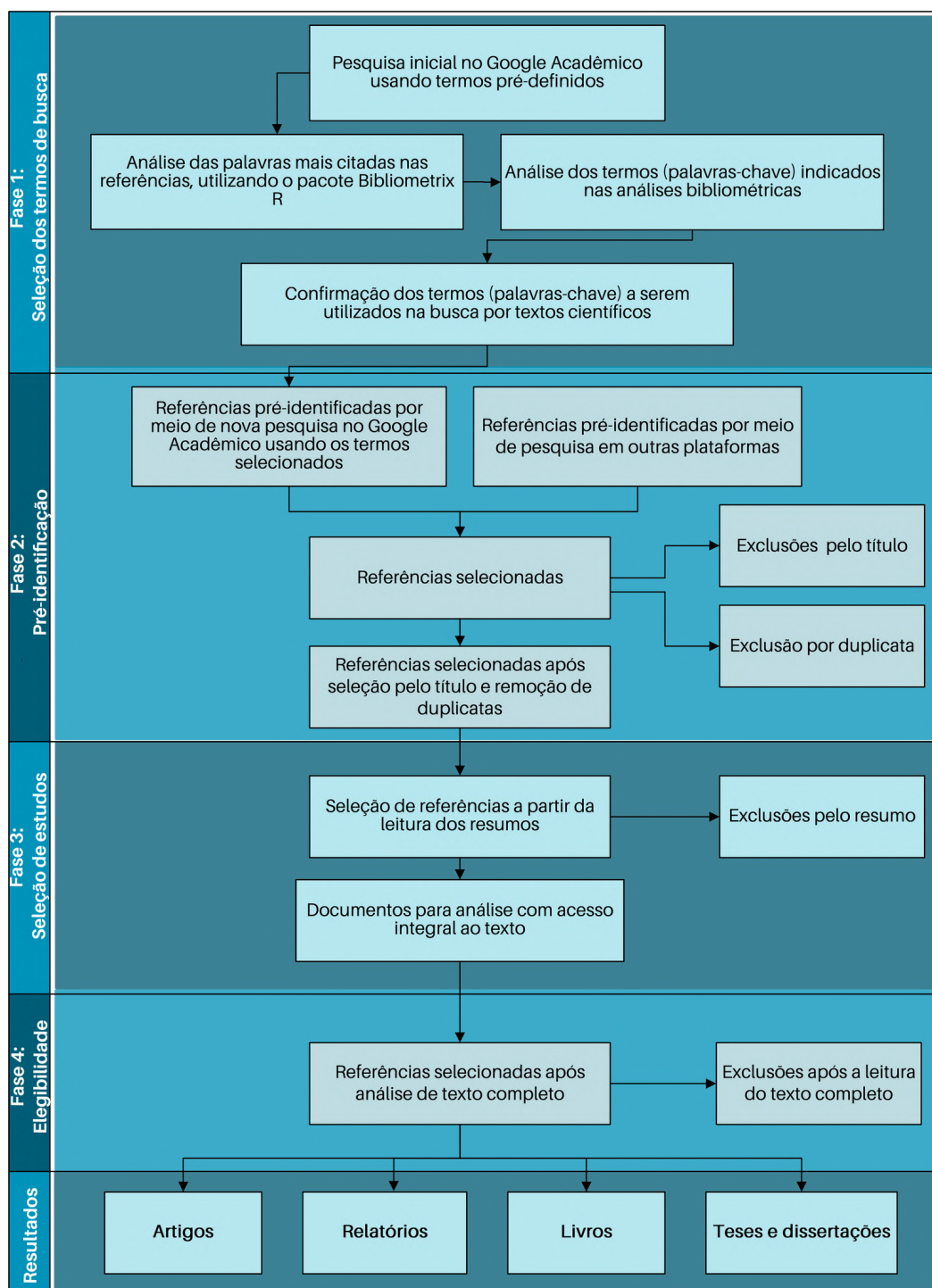


METODOLOGIAS DE ANÁLISE DE DADOS BIBLIOGRÁFICOS

O número de pesquisas e dados científicos gerados a cada ano é de tal ordem elevado que seria virtualmente impossível para qualquer pesquisador se manter constantemente atualizado sobre todas ou mesmo sobre as informações mais relevantes geradas em sua área de atuação ao longo do tempo. As revisões sistemáticas também ajudam (e muito) nisso.

Além das métricas, softwares e pacotes discutidos anteriormente, ao elaborar um texto científico, é preciso que os pesquisadores também lancem mão de métodos para seleção das informações mais relevantes existentes sobre aquele tema, e aí o trabalho humano ainda não pode ser inteiramente substituído pela inteligência artificial.

Essa etapa de identificação das referências mais importantes sobre o tema estudado precisa ser feita com muita organização e, principalmente, método. Há diferentes modelos conceituais que podem ser adotados. No nosso caso, optamos por usar um modelo conhecido como PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses), que envolve quatro fases e 15 etapas. Só depois de percorrermos cada uma delas é que chegamos à identificação dos artigos, relatórios, livros, teses e dissertações contendo as informações que usaremos para discutir e interpretar nossos próprios resultados.



Fluxograma representativo das etapas de uma revisão bibliográfica empregando o método Prisma

CONCLUSÃO >

NINGUÉM FAZ CIÊNCIA SOZINHO

Este texto foi aqui apresentado com a intenção de mostrar que todo o trabalho que realizamos neste projeto, inclusive o de revisão bibliográfica, envolve métodos científicos sistemáticos, sintéticos, completos, críticos, com estrutura consistente, atualizada e imparcial. Assim, quando alguém ler nossos artigos poderá ter a certeza que os resultados e conclusões apresentados foram discutidos e interpretados sob a luz do que há de mais completo e atual sobre aquele tema na ciência mundial e que ele é uma continuidade dos esforços e das ações de pesquisadores de todo o mundo, de hoje e do passado.

Competição entre o hidrozóário e o mexilhão-dourado

Juvenis de mexilhão-dourado assentando sobre o hidrozóário

Epibiose de hidras sobre o mexilhão-dourado

INTERAÇÕES ECOLÓGICAS

AS RELAÇÕES PERIGOSAS ENVOLVENDO ESPÉCIES AQUÁTICAS INVASORAS INCRUSTANTES

MSc. ANA PAULA DA SILVA BERTÃO

Interações ecológicas podem acontecer entre os indivíduos de uma mesma espécie (intraespecíficas) ou entre indivíduos de diferentes espécies (interespecíficas). Tais relações podem ser classificadas como harmônicas e desarmônicas, dependendo das consequências positivas ou negativas que elas trazem aos envolvidos.

Os organismos que vivem juntos em um mesmo ecossistema na maioria das vezes dependem, pelos mais variados motivos, uns dos outros. Para isso estabelecem diversas formas de interação

Neste estudo foram avaliadas as interações ecológicas entre os principais grupos de indivíduos identificados em corpos de prova instalados no reservatório da UHE Gov. José Richa.

As interações observadas ao longo do trabalho foram classificadas segundo seus efeitos positivos e diretos (mutualismo), positivos e indiretos (comensalismo), negativos e diretos (competição), negativos e indiretos (epibiose, canibalismo e predação).

Tabela 1 Exemplos de interações e seus efeitos ecológicos.

Interações ecológicas	Efeitos	
	Espécie 1	Espécie 2
Mutualismo	+	+
Competição	-	-
Epibiose	+	-
Canibalismo	+	-
Predação	+	-
Comensalismo	+	○

Interações ecológicas

Mutualismo	Interação Intraespecífica e harmônica que ocorre quando diferentes espécies interagem para aumentar suas chances de sobrevivência. Ambas ofertam e recebem benefícios (que pode ser um serviço ou um produto que seu parceiro não pode conseguir sozinho).
Competição	Interação que pode ocorrer de forma Intraespecífica ou Interespecífica. A competição pode acontecer em uma disputa por território, alimento, nicho ecológico e até mesmo por parceiros sexuais.
Epibiose	É um tipo de interação Interespecífica. O basibionte se adere a um substrato a fim de se estabelecer, crescer ou, alguns casos, reproduzir-se. Já o epibionte se assenta sobre o basibionte durante o início da fase sésil do seu ciclo biológico.
Canibalismo	Nesse tipo de interação, os indivíduos podem se alimentar de outros organismos da mesma espécie. Essa relação acaba contribuindo para eliminação de larvas e juvenis menos aptos, além de poder ter um efeito sobre o número de indivíduos na população.
Predação	É uma relação que se caracteriza como Interespecífica desarmônica. Os organismos de uma espécie (predadora/caçadora), obtém seu alimento a partir da captura de organismos de outra espécie.
Comensalismo	Relação ecológica em que duas espécies estão associadas, mas, enquanto uma delas é claramente beneficiada pela associação, a outra não tem nenhum ganho ou prejuízo significativo.

O mutualismo foi observado entre indivíduos adultos e jovens de mexilhão-dourado, bem como entre a *Cordylophora* e o mexilhão-dourado.

O comensalismo ocorreu entre o mexilhão-dourado e larvas de insetos.

A competição por alimento e espaço foi observada entre a *Cordylophora*, o mexilhão-dourado e a uma espécie de hydra marrom, especialmente quando o espaço disponível para incrustação no substrato era mais limitado.

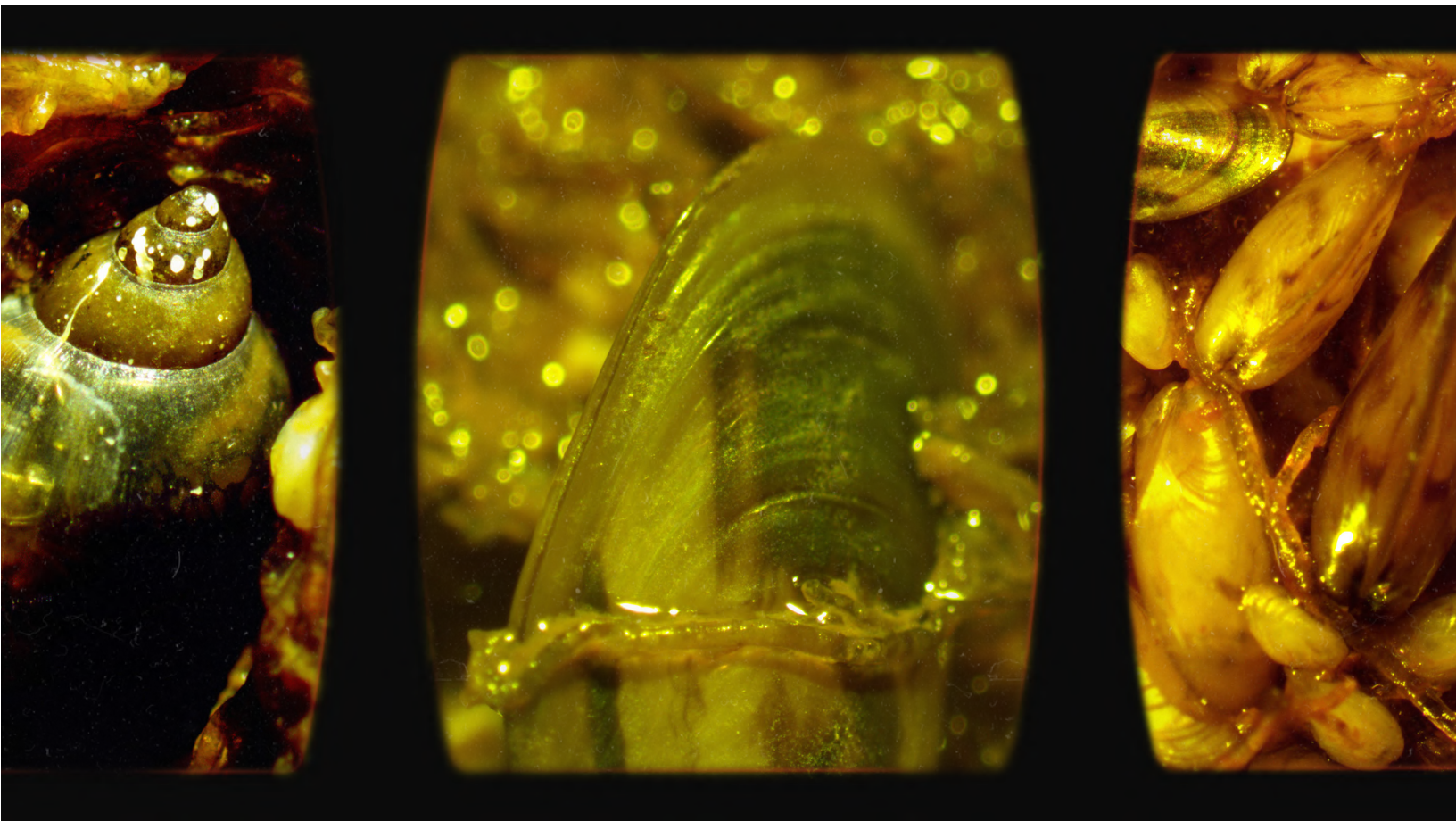
O canibalismo foi identificado apenas envolvendo o mexilhão-dourado. Nesse caso, adultos alimentando-se de larvas da mesma espécie.

A epibiose foi caracterizada pelo uso de organismos de certos grupos como basibiontes. Por exemplo, indivíduos da hydra marrom foram utilizados como substrato pela *Cordylophora*, pelo mexilhão-dourado e por amebas. A própria *Cordylophora*, foi registrada hospedando hydras, amebas e o mexilhão-dourado. A relação entre a *Cordylophora* e o mexilhão-dourado foi a mais evidente e frequente, tendo sido registrada em diversas ocasiões.

A predação ocorreu com hydras predando larvas de insetos, microcrustáceos (copépodes e cladoceras). Cnidários podem se alimentar de larvas de mexilhão-dourado, bem como de microcrustáceos nas fases juvenil e adulta. O mexilhão-dourado pode se alimentar de protozoários (Vaginicolidae e Centropyxidae) e de microcrustáceos na fase juvenil.

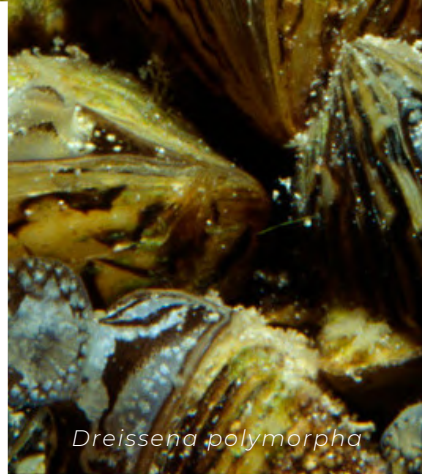


Competição entre o hidrozoário e o mexilhão-dourado



Saiba Mais!!

- Neste estudo, a maior ocorrência de assentamento de mexilhão-dourado ocorreu na primavera de 2018 e no verão de 2019, coincidindo com os picos de reprodução já relatados em vários outros estudos.
- *Limnoperna fortunei* e a *Cordylophora*, foram as espécies predominantes no processo de bioincrustação ao longo dos 15 meses de experimento.
- Relações aparentemente insignificantes entre indivíduos de uma mesma espécie ou interações entre diferentes espécies invasoras incrustantes podem ser decisivas para o início e para o próprio sucesso de processos biológicos que terminam invariavelmente acarretando em impactos econômicos e ecológicos de grande magnitude em usinas hidrelétricas.
- Recomenda-se que a manutenção e limpeza das estruturas hidráulicas, realizadas com o objetivo de remover incrustações biológicas de filtros, tubulações e trocadores de calor, seja realizada preferencialmente no **final da primavera ou início do verão**. Se a limpeza for feita nessa época, os organismos incrustantes terão mais dificuldades em recompor suas populações e os sistemas hidráulicos serão mantidos em condições operacionais por mais tempo.



Dreissena polymorpha



Limnoperna fortunei



Cordylophora caspia

IMPACTOS ECOLÓGICOS CAUSADOS POR INVASORES INCRUSTANTES LÍMNICOS

MSC. RAÍSSA VITÓRIA VIEIRA LEITE E
MSC. ANA PAULA DA SILVA BERTÃO

Desestabilizadores Ambientais

As espécies invasoras são uma das principais causas de perda de biodiversidade global, sendo superadas apenas pela destruição de habitats (desmatamento, assoreamento de rios, queimadas, drenagem de ambientes úmidos, etc.).

As espécies aquáticas invasoras incrustantes, por sua vez, aproveitam-se de suas características biológicas, de sua grande capacidade de adaptação às mais diferentes condições ambientais e uma série de interações ecológicas para aumentar seu poder de sobrevivência, e dispersão para conquistar novos habitats.

Os principais organismos aquáticos invasores incrustantes incluem espécies de moluscos, cnidários, briozoários e esponjas, mas são os moluscos os maiores vilões ambientais.

I-Moluscos

Esse grupo apresenta o maior número de espécies entre os organismos invasores incrustantes em ambientes de água doce, com destaque para o mexilhão-dourado (*Limnoperna fortunei*), o mexilhão-zebra (*Dreissena polymorpha*), a ameijoia asiática (*Corbicula fluminea*) e o mexilhão-quagga (*Dreissena bugensis*).

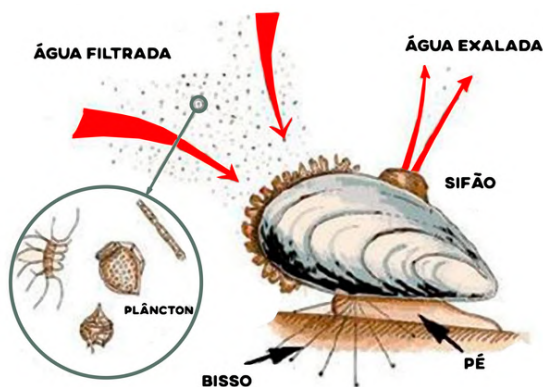
Entre essas espécies, o mexilhão-dourado é a que mais impactos causa em ambientes aquáticos sul americanos. Ele possui alta fertilidade, grande tolerância ambiental (com amplos limites de temperatura, pH, salinidade e nutrientes), larvas livres natantes, formando colônias com até 150.000 indivíduos/m².

Por serem organismos filtradores, os moluscos se alimentam de plâncton (bacterioplâncton, fitoplâncton e zooplâncton). Assim, a filtração excessiva causada pelo mexilhão-dourado pode impactar localmente nas concentrações e a diversidade de plâncton, reduzindo a disponibilidade de alimento para outras espécies e desorganizando as cadeias alimentares aquáticas. Menos plâncton na água significa ambientes com maior transparência da água, o que favorece o crescimento de macrófitas, que podem até mesmo alterar os padrões locais de circulação de água. Obviamente que tudo isso significa ainda mais alterações ambientais e ecológicas.

Ameijoia asiática



O mexilhão-dourado é um organismo tão resistente e tão adaptado à conquista de novos ambientes que já foram observados dezenas de indivíduos intactos na porção final do trato digestório de peixes predadores, como o armado (*Pterodoras granulosus*)^{*}. Não se sabe, porém, se os peixes poderiam atuar como o veículo de dispersão da espécie.



Dinâmica alimentar de moluscos bivalves.

Fonte: neinvasive.com

*

Cantanhêde, G., Hahn, N.S., Gubiani, É.A. and Fugi, R. (2008), Invasive molluscs in the diet of *Pterodoras granulosus* (Valenciennes, 1821) (Pisces, Doradidae) in the Upper Paraná River floodplain, Brazil. Ecology of Freshwater Fish, 17: 47-53.



Mexilhões dourados intactos na porção final do trato digestório de armado (*Pterodoras granulosus*).

Fonte: ebanataw.com.br/mexilhaodourado/mexilhaodourado.php

Outra característica bastante marcante nas espécies de mexilhões é a presença de uma estrutura proteica, chamada de bisso, que os animais utilizam para se fixarem em praticamente todo e qualquer tipo de substratos (madeira, pneu, pedra, plantas, outros animais, lixo presente na água, embarcações, etc).

II-Cnidários

Os cnidários são um grupo de animais encontrados em ambientes marinhos, estuários e límnicos e constituído por águas-vivas, corais, anêmonas-do-mar, hidras e caravelas. Os cnidários apresentam um tipo específico de célula em seus tentáculos, chamado de cnidócito. Essas células lançam o nematocisto, uma espécie de cápsula que contém um filamento com espinhos e um líquido urticante. O nematocisto é responsável por injetar substâncias tóxicas que auxiliam na captura de presa e na defesa.

A principal espécie de cnidário invasora de ambientes aquáticos de água doce é a *Cordylophora caspia* que, assim como os moluscos citados anteriormente, tem grande potencial de gerar impactos ecológicos. Esse hidrozóário apresenta estruturas de fixação semelhantes a “fios de cabelo”, que o permite aderir-se a diversos tipos de substratos (que, muitas vezes, são essenciais para o desenvolvimento de espécies locais) e até mesmo a outros organismos, podendo causar seu rápido sufocamento.

III-Briozoários

Os briozoários são amplamente distribuídos nos ambientes marinho e límnicos. Algumas espécies límnicas desse grupo apresentam características comuns aos outros invasores, como ampla tolerância às condições ambientais, crescimento rápido, facilidade de adaptação e estabelecimento em diversos tipos de habitats. Algumas espécies de briozoário podem ainda produzir toxinas letais a outros organismos, inclusive para certas espécies de peixes.



Hidrozóário incrustado sobre o mexilhão-dourado.



Colônia de briozoário do gênero *Plumatella*
Fonte: usgs.gov

Essa toxina é expelida como mecanismos de defesa pelo organismo invasor como forma de proteger suas colônias da predação. Há relatos de competição de briozoários com algumas espécies de moluscos, uma vez que as colônias de ambos os organismos podem reduzir as superfícies de assentamento, causando dificuldade no processo de filtração e alimentação dos oponentes.

IV - Esponjas

As esponjas são animais sésseis, filtradores, que vivem fixados a substratos. Suas principais estratégias de bioinvasão incluem uma reprodução precoce e intensa, a presença de gêmulas (estruturas de disseminação de novos indivíduos em épocas de condições ambientais desfavoráveis) e adaptação às mudanças ambientais.

Normalmente esses organismos crescem sobre algum tipo de substrato e podem se incrustar em qualquer superfície, incluindo macrófitas aquáticas, rochas e conchas de bivalves. Ao aderirem a essas conchas, elas se beneficiam de partículas de alimentos atraídas pela corrente sifonal (região responsável pela respiração e alimentação dos mexilhões). Em certos casos, chegam até mesmo a utilizar essas estruturas como substrato para a colonização e impedindo a sobrevivência desses animais.



Esponjas incrustadas sobre o mexilhão-dourado

Fonte: GIA

Impactos econômicos e operacionais causados pelos organismos invasores incrustantes em usinas hidrelétricas

MSc. Raíssa Vitória Vieira Leite



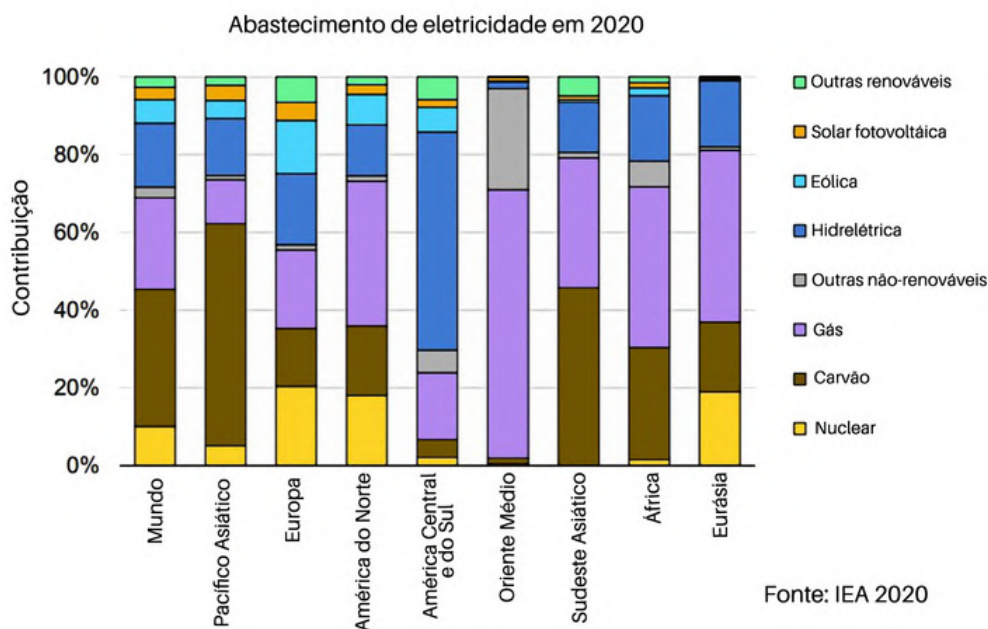
*Escada de acesso às estruturas internas à UHE Salto
Caxias completamente tomada de mexilhões*

Os problemas

As usinas hidrelétricas (UHE) são hoje a terceira principal fonte de energia da matriz elétrica mundial, só superadas em importância pelas usinas térmicas, a carvão e a gás, respectivamente. Em 2020, a energia gerada a partir de UHE representava cerca de 16% da matriz elétrica mundial e, a despeito do crescimento das fontes energéticas consideradas mais limpas, como a eólica e a fotovoltaica, a projeção é que até 2035 essa participação

atinja 20% da energia elétrica produzida no mundo. Na América Central e do Sul, a energia hidrelétrica já contribui com mais de 54% da energia elétrica gerada.

Um dos problemas enfrentados durante o processo de geração de energia pelas UHE é a crescente incidência de incrustações biológicas, que se apresentam como uma contínua ameaça ao pleno funcionamento das estruturas hidráulicas e, mais especificamente, dos sistemas de resfriamento das usinas. Esses sistemas dissipam o calor gerado durante o funcionamento de bombas, geradores,

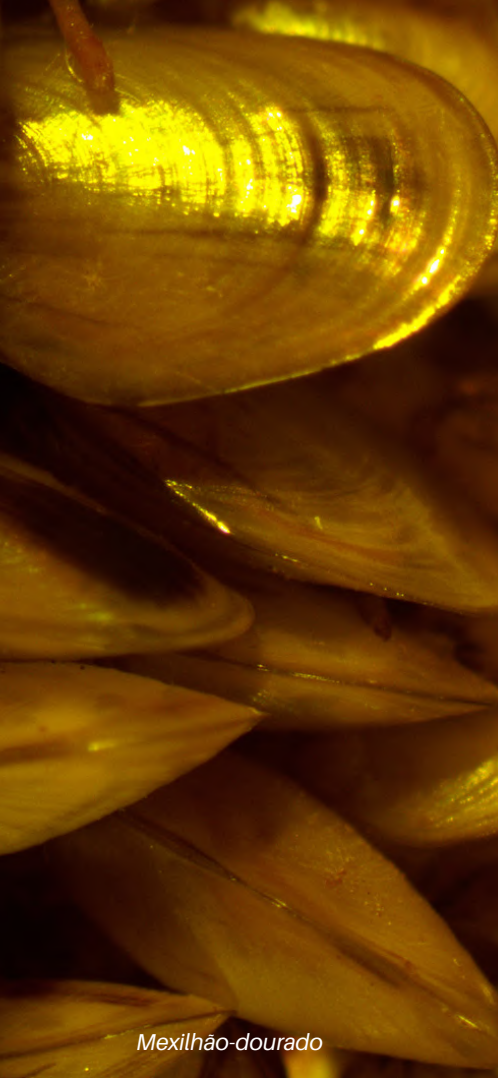


turbinas e vários outros equipamentos elétricos e hidráulicos. A diminuição da eficiência e o aumento da temperatura pela ocorrência de incrustações afetam não apenas a vida útil desses equipamentos, gerando uma maior demanda por energia, mas também diminui os intervalos entre as limpezas dos sistemas hidráulicos, conseqüentemente, aumentando os custos operacionais associados. Em casos extremos, o sobreaquecimento desses equipamentos pode, em casos extremos, provocar blackouts.

Os maiores problemas causados pelas bioincrustações em sistemas hidráulicos acontecem devido ao processo de colonização e crescimento de bactérias, algas e/ou invertebrados sesséis. Neste último caso, as conseqüências costumam ser particularmente danosas quando relacionadas à ocorrência de espécies invasoras, como, entre outros, o mexilhão-dourado, o hidrozoário de água doce e até diatomáceas. Esses organismos se fixam em estruturas que estejam submersas ou em contato com a água, elevam as taxas de corrosão e de sedimentação, entupindo-as e aumentando o peso extra que elas precisam suportar.

Incrustação por hidrozoário e pelo mexilhão-dourado nas estruturas do sistema de resfriamento na UHE Gov. José Richa





Mexilhão-dourado



Filtro entupido



Limpeza do sistema de resfriamento

O mexilhão-dourado

O principal organismo invasor incrustante em estruturas hidráulicas de usinas hidrelétricas no Brasil.

A parada, forçada ou mesmo programada, de turbogeradores para limpeza de incrustações ocasiona uma cascata de prejuízos financeiros, nem sempre fáceis de serem calculados ou estimados.

O fato é que uma máquina parada deixa de gerar energia e, conseqüentemente, receitas para o operador da usina. Cada MWh não produzido significa um custo de oportunidade que varia de US\$ 50,00-300,00. A parada forçada pode ainda exigir que a energia deixada de ser gerada seja compensada pelo acionamento de uma usina térmica, que é mais cara e poluente.

Somam-se a isso: a) os custos com as intervenções para lim-

O mexilhão-dourado, *Limnoperna fortunei*, pode ocasionar danos estruturais irreversíveis aos equipamentos hidráulicos de uma UHE. Os moluscos vão crescendo sobre si mesmos e formando aglomerados cada vez maiores, de modo que mesmo tubulações muito grandes podem ser completamente ocluídas pela presença do mexilhão.

Usinas antigas estão menos preparadas para lidar com as incrustações que as novas. O problema é que a maioria das usinas no Brasil tem mais de 40 anos de operação.

peza de grades, devido à descida de mergulhadores de unidades adjacentes ou em tomadas d'água, e aos custos com limpezas de tubulações e equipamentos internos, como os filtros dos trocadores de calor; b) custos com as intervenções necessárias a ensaios nos sistemas de auto restabelecimento da central geradora; c) restrição de potência em razão de queda útil.

A energia não gerada pelas usinas saltou de 3,4%, em 2007, para 6,6%, em 2018, o que significa custos de oportunidade de quase US\$ 2 bilhões/ano. O mexilhão-dourado, o hidrozoário, bem como os demais organismos invasores incrustantes são um dos fatores responsáveis por isso.

Colônia de *Cordylophora* retirada do sistema de resfriamento da UHE Gov. José Richa



Cordylophora spp.

Um hidrozoário invasor de água doce que já está presente em reservatórios de quase todos os continentes

Geralmente associado ao mexilhão-dourado em alguma fase da sua bioinvasão em um determinado ambiente, este animal se incrusta formando colônias em filtros, trocadores de calor e nas tubulações do sistema de resfriamento de usinas.

Ao reduzir a circulação de água nesses sistemas, provoca o aumento da temperatura dos equipamentos, colocando em risco o funcionamento da usina.



Entupimento de estruturas hidráulicas por *Cordylophora*

Diatomáceas incrustantes

Apesar de microscópicas, essas algas unicelulares ocasionam bioincrustações que chegam a várias toneladas em canais hidrelétricos na Tasmânia

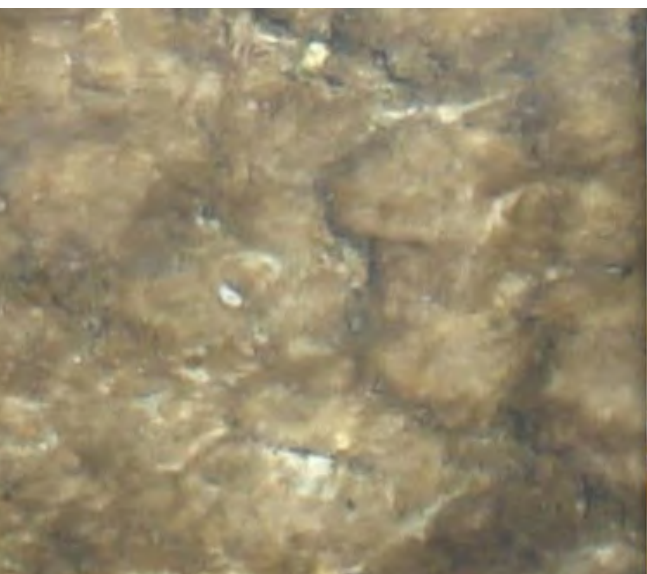
As diatomáceas caracterizam-se pela presença de um tipo específico de parede celular, designado por frústula, composta por sílica opalina. Algumas das mais de 20.000 espécies de diatomáceas apresentam estruturas pedunculares que, juntamente com a produção de mucilagem, possibilitam a sua fixação em diferentes substratos sujeitos a fluxos elevados de água. A medida que as incrustações aumentam, forma-se uma camada compacta e dura de sílica, que é capaz de obstruir as mais diversas estruturas hidráulicas.

As espécies *Didymosphenia geminata* e *Gomphonema tarraleahae* foram observados por pesquisadores em 2010 formando bioincrustações em 20 Km de hidrocanais na UHE de Tarraleahae, na Tasmânia/Oceania. Mais de 17,6 toneladas de material tiveram que ser retirados desses canais para não comprometer a geração de energia.

Inúmeras espécies do gênero *Gomphonema* já foram registradas em reservatórios paranaenses. No entanto, até aqui não há indícios de problemas operacionais ou econômicos causados por esses organismos nas usinas brasileiras. Mas o “sinal de alerta” deve ser acionado.



Didymosphenia geminata



Aspecto da incrustação ocasionada por *Didymosphenia geminata* na Oceania.
Fonte: Cathy Kilroy.

O mexilhão-zebra

Cientificamente denominado *Dreissena polymorpha*, é considerado uma das pragas aquáticas invasoras mais impactantes do mundo.

Apesar de compartilhar muitas características biológicas com o mexilhão-dourado, tais como sua biologia, tipos de impactos ambientais e, principalmente, econômicos causados, essas duas espécies não compartilham as mesmas rotas de dispersão, não havendo (ainda) do mexilhão-zebra no Brasil.

Uma única fêmea dessa espécie pode liberar até 5 milhões de ovos por ano, o que permite que as populações atinjam rapidamente tamanhos imensos.

Essa é uma das características que ajudaram o mexilhão-zebra a se dispersar pela Ásia, invadir a Europa e a América do Norte. Os impactos ocasionados nesses continentes são gigantescos, afetando sistemas de transporte, de distribuição e armazenamento de água, setores de geração de energia e até mesmo o turismo.



Tubos mantidos submersos por 4 e 6 meses em lago infestado pelo mexilhão-zebra nos EUA

*O mexilhão-zebra *Dreissena polymorpha**



A Universidade Duluth, de Minnesota, estima que a espécie cause prejuízos econômicos da ordem US\$ 1 bilhão anualmente nos EUA. Cerca de 80% desse valor estaria relacionado aos setores de tratamento de água e de geração de energia hidrelétrica.

Os custos com manutenção de sistemas hidráulicos tomados pelos mexilhões-zebra nos EUA variam de US\$ 6.700,00 por hora, para um sistema de 200 megawatts, a US\$ 127 milhões anuais, no caso das usinas existentes nos Grandes Lagos.

As estimativas apontam que as 46 usinas hidrelétricas existentes ao longo dos Grandes Lagos (USA) investiram pelo menos US\$ 800 milhões para tentar impedir a parada frequente de máquinas em função da presença da espécie.

Em 17 usinas localizadas no rio Rio Niagara, no Canadá, foram gastos cerca de US\$ 280 milhões apenas para adaptar os sistemas hidráulicos à convivência com o mexilhão-zebra após a chegada da espécie à região.

Uma eventual chegada dessa espécie ao território nacional seria potencialmente desastrosa, pois o mexilhão-zebra apresenta enorme potencial de invasão, devido a sua ampla tolerância às condições ambientais características de rios e reservatórios brasileiros.

COMO AS ESPÉCIES SÃO DETECTADAS A PARTIR DO eDNA? OS CÓDIGOS DE BARRAS DA VIDA.

MSc ANDRÉ OLIVOTTO AGOSTINIS, Dr. MARCIO ROBERTO PIE & Dra Aline Horodesky



Um dos principais conceitos que permite que seja possível atribuir códigos de barras às espécies é a evolução molecular. O nome pode parecer intimidador, mas ele simplesmente quer dizer que o DNA muda ao longo do tempo. Essa mudança, mais especificamente, acontece entre as gerações dos organismos, e normalmente ela fica presa dentro de uma linhagem. Se o DNA muda ao longo das gerações e essas mudanças não passam para outras espécies, isso significa que com o tempo, será acumulada uma variação que é espécie-específica. Dessa forma, o DNA se transforma em um código de barras gigantesco que é único para cada espécie. Mas, como ele é muito maior que um código de barras do supermercado, não é possível (e nem necessário) lê-lo por completo de uma só vez. Para tornar o processo mais prático e viável, os pesquisadores identificam uma região do genoma (que é o conjunto completo de DNA de uma espécie) que é exclusiva daquela espécie e adotam essa região como o **código de barras** que será usado para identificá-la no futuro.

Se o eDNA é um conjunto de material genético de todos os organismos que se acumula na água, como é possível descobrir se uma espécie de interesse está presente ali ou não?

A resposta é o uso de marcadores moleculares. Quando você vai ao supermercado e quer conferir o preço de um produto, uma das possibilidades é passar o código de barras do produto em um leitor e ele vai indicar a identidade do produto e o preço. Mas como o equipamento sabe isso? A resposta está nos próprios códigos de barras. Eles são identificadores únicos, e cada produto tem o seu código específico. Dessa forma, quando o leitor lê o código de barras, ele retorna um número ou código, e compara com uma referência interna, que diz que tal número é equivalente a tal produto.

A identificação de espécies em amostras de eDNA funciona de uma forma semelhante: O DNA de cada espécie tem um código único. Quando esses códigos de barras são detectados, é possível conhecer a que espécie pertence. Mas neste caso, o leitor (que é o método de detecção) é um método de amplificação e o código de barras é o DNA.





Parece complicado? Sim, é! Mas, os resultados finais obtidos, quer seja pela sua alta confiabilidade, sensibilidade e rapidez analítica, valem todo o esforço.

Uma vez que essa sequência é conhecida, o próximo passo é usar ferramentas (ou seja, o nosso leitor) que possam detectá-lo no meio do DNA de todos os organismos presentes em uma determinada amostra. A amostra, no caso de organismos aquáticos é um pequeno volume (de até 1 L) de água coletada no ponto que se pretende analisar.

A detecção acontece através de um método chamado de Amplificação em Cadeia pela Polimerase (ou PCR, em inglês). Essencialmente, este é um método que permite seletivamente copiar uma sequência de DNA milhares de vezes e aumentar geometricamente a sua quantidade naquela amostra. Como a PCR só copia uma região específica (que nós indicamos previamente), fica fácil detectá-la na amostra, porque o seu número fica desproporcionalmente grande em relação a outras moléculas de DNA que não são de interesse.

Se essa amplificação acontece e o DNA código de barras é detectado, então a espécie estava efetivamente representada naquela amostra. Caso não ocorra amplificação, então a espécie seguramente não estava lá.

Porém, para que essa amplificação ocorra, é necessário delimitar o ponto onde ela deve começar e onde ela deve parar. Esta delimitação é feita através de pequenas moléculas de DNA sinalizadoras (que são sintetizadas artificialmente). Elas se ligam ao DNA na amostra e indicam que a amplificação deve ocorrer naquele intervalo específico. Esse DNA sinalizador é chamado de primer, e o conjunto desses primers e o DNA código de barras (que está entre os primers) é chamado de marcador molecular.

Um dos problemas é que a maioria das espécies ainda não possui marcadores moleculares desenvolvidos. Para desenvolver um, é necessário sequenciar o DNA da espécie-alvo, e depois compará-lo com o DNA de espécies que são evolutivamente próximas, bem como com espécies que sabidamente serão encontradas no ambiente alvo em questão. Essa comparação é feita através de um método chamado de alinhamento, que compara as posições das bases do DNA a partir de uma referência.

Ao fazer essa comparação é possível identificar regiões que são exclusivas do organismo que estamos procurando. Existem muitas pequenas regiões no genoma de um organismo que são exclusivas (lembramos que cada base do DNA tem 4 possibilidades, A-T-G-C) e que o número de combinações cresce rapidamente conforme o tamanho da sequência cresce). Por outro lado, nem todas as regiões são bons marcadores moleculares para a técnica de PCR. Dessa forma, é necessário fazer testes no computador com modelos físico-químicos para avaliar parâmetros bioquímicos das moléculas. Só depois disso o marcador potencial é sintetizado e testado em condições de laboratório contra o DNA puro de espécies-alvo, espécies próximas e outras espécies de interesse.

Por último, o marcador é testado contra amostras de DNA ambiental. Esse é um teste de sensibilidade (que indica o quanto ele é capaz de detectar). Após isso, o marcador está pronto para ser publicado e utilizado nas pesquisas para detectar as espécies-alvo de interesse. Parece complicado? Sim, é! Mas, os resultados finais obtidos, quer seja pela sua alta confiabilidade, sensibilidade e rapidez analítica, valem todo o esforço.

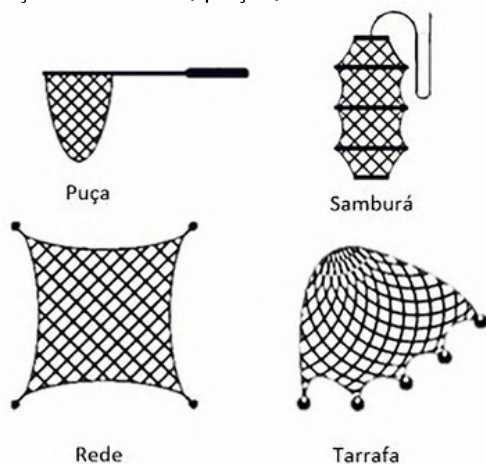
UMA COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS CONVENCIONAIS E MOLECULARES DE MONITORAMENTO DE FAUNA.

COMO É >

MÉTODOS CONVENCIONAIS DE COLETA

Antes do emprego das tecnologias baseadas em DNA, o monitoramento de espécies dependia apenas dos métodos tradicionais de coleta. Para saber se uma determinada espécie estava presente em uma área específica, era preciso ir até o local e procurar pelo organismo.

Por muito tempo, a comunidade científica fez uso de técnicas tradicionais de monitoramento para entender como os organismos de interesse são coletados e identificados. Os métodos tradicionais utilizados costumam ser caros, demorados, pouco precisos e muito invasivos podendo, até mesmo, causar impactos negativos sobre as próprias populações estudadas. Para o monitoramento de peixes, por exemplo, são utilizadas diversas técnicas de pesca, dentre elas a aplicação de tarrafas, puças, rede e samburá.



Mas, é preciso lembrar que diferentes espécies de animais, plantas e microrganismos possuem suas próprias metodologias de coleta, processamento de amostras, identificação e análise de resultados, o que torna monitoramentos abrangentes uma tarefa quase sempre difícil, cara, ineficiente e, principalmente, descoordenada.

Por exemplo, o monitoramento da diversidade biológica de um estuário necessitaria de protocolos de amostragem, coleta, processamento e identificação completamente distin-

Biol. Paula Valeska Stica, MSc. Raíssa Vitória Vieira Leite, Msc. Ana Paula da Silva Bertão e Dra. Aline Horodesky

tintos entre si no caso de peixes, fitoplâncton e crustáceos (apenas para citar três grupos). Isso faz com que os custos associados à contratação de múltiplas equipes independentes para o monitoramento de cada grupo de organismos tornem-se proibitivos. Além disso, cada pesquisador faz seu trabalho individualmente, levando a um desafio complementar de integrar todos os diferentes dados gerados sem que ocorra perdas significativas de informações durante esse processo.

Assim, não raro, o gerenciamento de atividades potencialmente danosas ao ambiente acaba sendo baseado no que é factível, ainda que a assertividade das decisões tomadas possa vir a ser limitada pela qualidade dos dados gerados.



Para a identificação e quantificação de organismos aquáticos em estágios microscópicos, como, moluscos (larvas), peixes (ovos e larvas) e crustáceos (larvas e adultos), por exemplo, os organismos - já mortos - são analisados em microscópio estereoscópico.

O eDNA >

MÉTODO MOLECULAR (DNA AMBIENTAL - EDNA)

Em função de suas vantagens intrínsecas sobre métodos convencionais de coleta, as tecnologias baseadas em DNA têm ganhado espaço nas pesquisas e no monitoramento de espécies. Entre várias ferramentas genéticas de nova geração, o **DNA ambiental - eDNA** - têm se provado uma ferramenta extremamente útil, tanto em ambientes terrestres

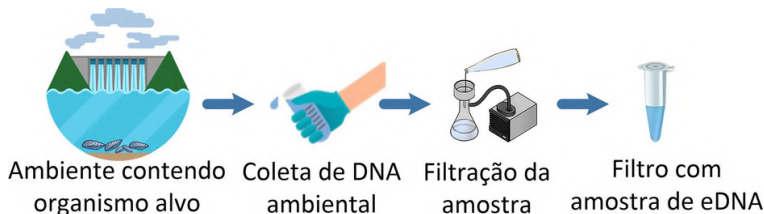
quanto aquáticos. Enquanto vivem e realizam suas atividades biológicas (alimentação, respiração, excreção, reprodução), os organismos liberam constantemente DNA no ambiente através de muco, pele, escamas, fezes, ovos, sangue e outras fontes. Quando a coleta é realizada em ambientes aquáticos, esse DNA pode ser detectado a partir da coleta de água, sendo possível realizar a quantificação e monitoramento das espécies presentes sem a necessidade de contato direto com as mesmas. Para isso, algumas técnicas precisam ser incorporadas e aplicadas como: filtração, extração, identificação e quantificação de DNA.

Filtração

O processo de filtração acontece quando amostras de água são coletadas para a obtenção do eDNA da espécie ou dos grupos-alvos. Essa etapa acontece geralmente assim que a amostragem da água é realizada. Para isso é necessário uma bomba à vácuo, um kit de filtração e membranas filtrantes.



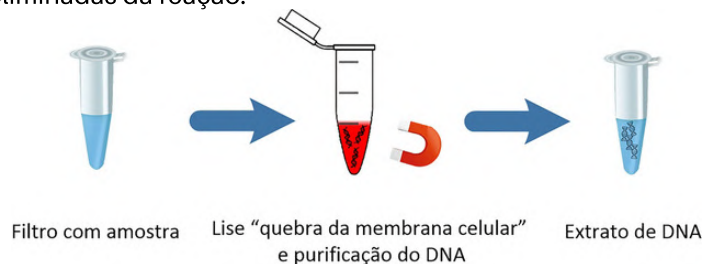
A água coletada é adicionada em frascos estéreis, em seguida ocorre a filtração da amostra (sendo o DNA retido em membranas filtrantes), seguida da preservação do filtro em álcool 99%.



Extração

A **extração**, que é dividida em duas etapas (**Lise** e **Purificação**) é realizada com o intuito de isolar e purificar a molécula de DNA. O extrato gerado deve estar com qualidade aceitável para que não venha inibir as etapas seguintes de identificação e quantificação do DNA. O processo de lise, também conhecido como quebra da parede celular, ocorre para que o DNA localizado no interior da célula seja liberado para o meio. Já a etapa de purificação é realizada para que impurezas do ambiente presentes na amostra, materiais intracelulares ou bactérias indesejáveis sejam eliminadas. Essa limpeza é realizada com o auxílio de microesferas

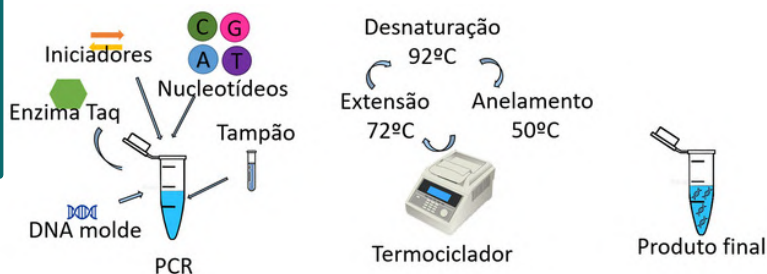
(beads) que possuem propriedades magnéticas. Nesse procedimento as beads se ligam ao DNA presente na amostra e as impurezas ficam livres no meio, sendo eliminadas da reação.



PCR

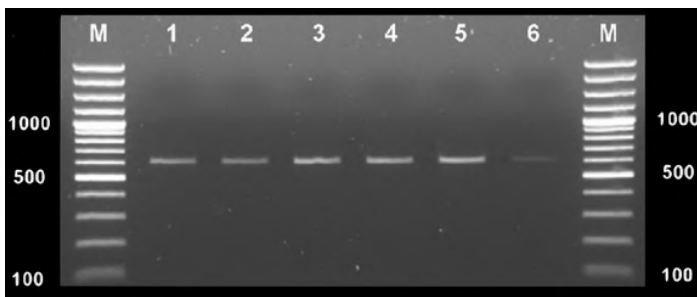
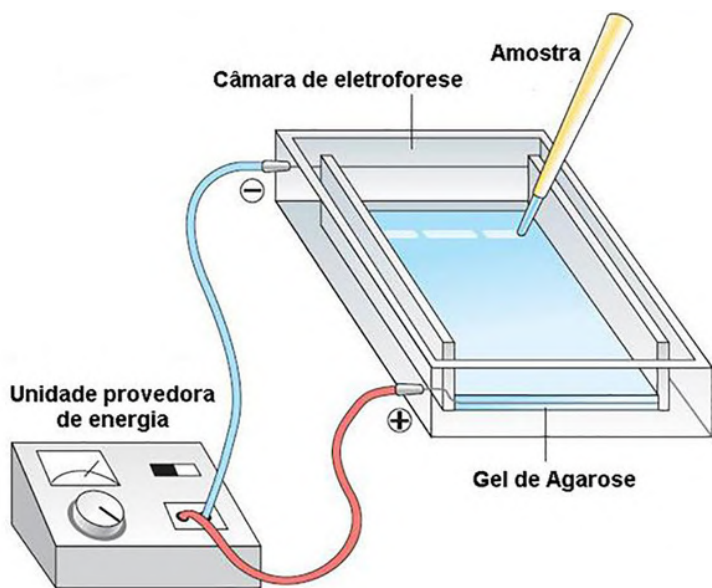
Antes do desenvolvimento da **PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)** os métodos utilizados para analisar o DNA eram demorados e trabalhosos. Essa técnica permite realizar várias análises de um segmento específico de DNA com rapidez e precisão em um tempo muito menor. A PCR é utilizada para se obter milhares de cópias de determinada região alvo do DNA, isso é realizado para avaliar se uma espécie está presente ou ausente em uma amostra específica.

Na análise de PCR, como primeira etapa, são adicionados alguns reagentes, como: **iniciadores** (são sequências conhecidas de um pedaço do DNA do organismo alvo); **enzima taq** (responsável por amplificar a região de interesse do DNA); **DNA molde** (amostra contendo o DNA alvo); **nucleotídeos** (são moléculas que servem como blocos de construção do DNA, usados pela Taq para gerar as cópias); e o **tampão** (uma solução que contém sais responsáveis por garantir a manutenção do pH e das concentrações iônicas adequadas à reação). Na segunda etapa, o tubo contendo amostra e os reagentes vão para o termociclador (equipamento que automatiza o processo de amplificação), em três etapas com temperaturas diferentes: **desnaturação** (a reação é aquecida para que as fitas de DNA se separem); **anelamento** (a reação é resfriada para que os iniciadores possam se ligar às suas sequências complementares no DNA molde de fita simples; e a **extensão** (a temperatura é elevada para que a Taq polimerase estenda os iniciadores, sintetizando novas fitas de DNA).



Para visualizar os resultados da PCR, é realizada a eletroforese em gel de agarose (a agarose é aquecida em um tampão e forma um gel). As amostras que passaram pelo termociclador são inseridas em uma cuba, também chamada de câmara (recipiente com o tampão), ligada a um eletrodo com cargas negativas e positivas.

Para visualizar os resultados da PCR, é realizada a eletroforese em gel de agarose (a agarose é aquecida em um tampão e forma um gel). As amostras que passaram pelo termociclador são inseridas em uma cuba, também chamada de câmara (recipiente com o tampão), ligada a um eletrodo com cargas negativas e positivas.

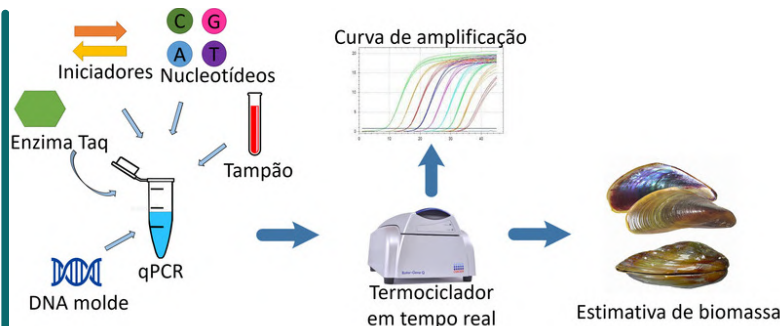


As moléculas de DNA possuem carga negativa devido aos seus compostos. Por isso, o DNA começa a se mover através da matriz de gel, para o polo positivo. Uma vez que os fragmentos tenham sido separados, é possível visualizar os mesmos em diferentes pontos da extensão do gel.

PCR quantitativa - qPCR

A PCR quantitativa (qPCR) é uma técnica de multiplicação do DNA assim como a PCR convencional, porém com vantagens de fornecer estimativa da quantidade de DNA presentes nas amostras. Por exemplo, conhecendo a biologia da espécie-alvo e as características do ambiente, podemos estimar o tamanho da população.

Para a realização da qPCR, o procedimento é o mesmo para a reação de PCR, o que muda são os reagentes que são específicos para cada caso, e o termociclador (a reação é analisada por ciclos alternando entre as temperaturas e a análise ocorre em tempo real). Os resultados da análise são apresentados em concentrações de DNA, o que possibilita se fazer estimativas da biomassa do organismo-alvo presente em uma determinada região.



Como ficará >

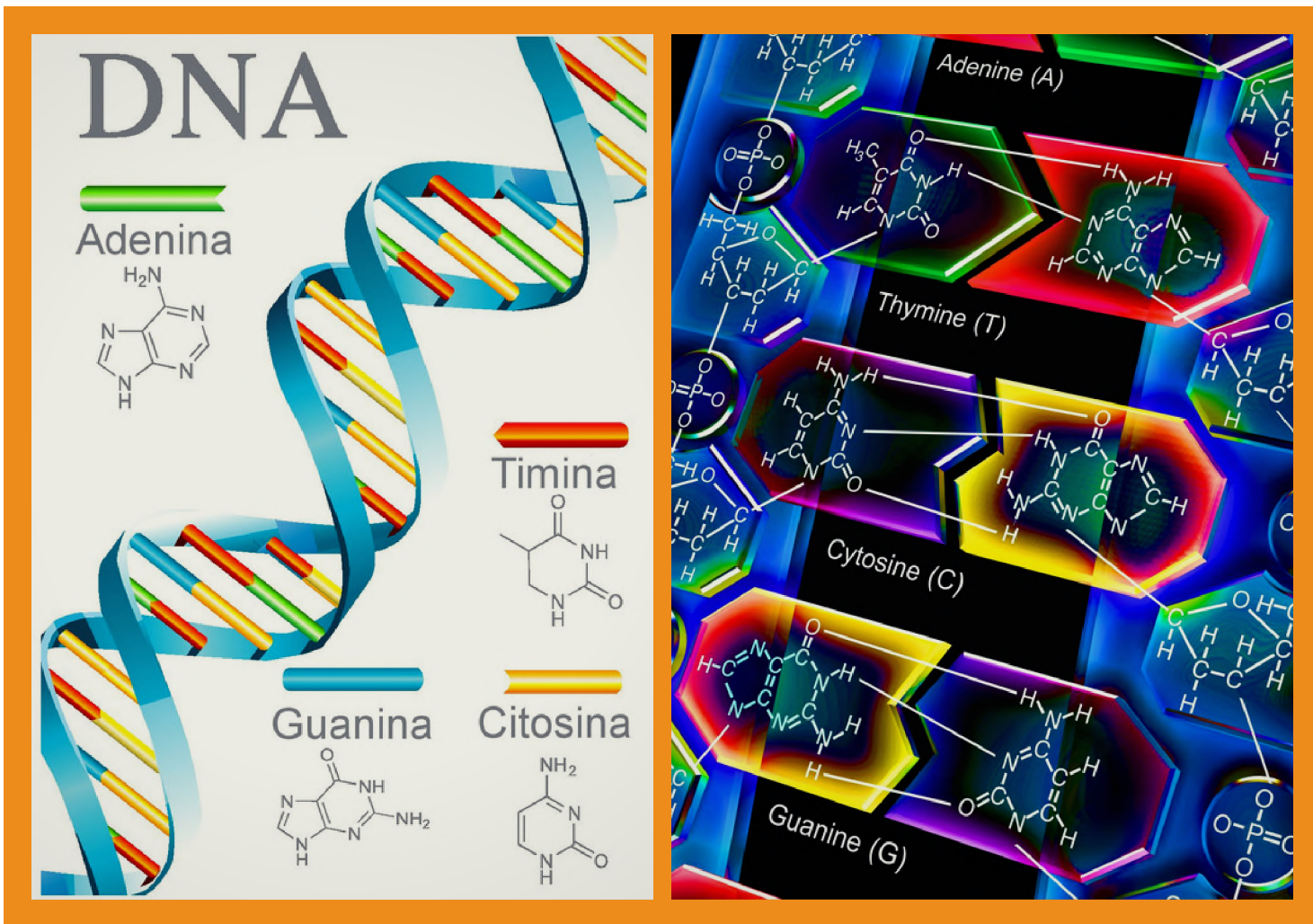
O FUTURO DOS MONITORAMENTOS BIOLÓGICOS

Um dos estudos realizado pelo GIA em parceria com a Copel, concluiu que o método de eDNA é extremamente sensível, tendo sido capaz de detectar um único indivíduo de mexilhão-dourado no equivalente a 920 mil litros de água. É literalmente como achar uma agulha em um palheiro, mais especificamente, em um palheiro de 15 m de comprimento x 15 m de largura x 4 m de altura. A técnica é tão sensível que o maior risco associado a ela é a de contaminação genética das amostras, o que acaba exigindo uma equipe bastante bem treinada, equipamentos sofisticados e reagentes de qualidade e pureza molecular para obter os resultados otimizados.

O fato é que, ao contrário da maioria das técnicas convencionais de monitoramento de fauna, as técnicas genéticas ambientais têm muito espaço para evoluir e ainda não é sequer possível pensar na substituição integral dos métodos tradicionais a curto prazo. Contudo, em um futuro não muito distante, coletar (e muitas vezes, sacrificar) organismos, principalmente aqueles raros ou em risco de extinção, para poder estudá-los, será algo tão absurdo e impensável como é hoje o uso de telegramas, cartas ou fax para a comunicação cotidiana entre as pessoas. As ferramentas genéticas moleculares vieram para ficar e revolucionarão, de modo irreversível, a forma como monitoramos os ambientes, comunidades e organismos.

Decifrando a degradação do eDNA

MSc. Ana Paula Silva Bertão
MScRaíssa Vitória Vieira Leite



A Importância de se estudar a degradação das moléculas de eDNA

Nas últimas décadas, o uso de eDNA (DNA ambiental) tornou-se uma das formas mais inovadoras e precisas de monitoramento biológico, inclusive de espécies invasoras ou até mesmo em processo de extinção. As análises baseiam-se no fato de que todos os organismos liberam fragmentos de DNA nos ambientes em que vivem, deixando “rastros” da sua presença naquele local. Esses rastros ou pistas podem ser compostos por seus corpos em decomposição, sangue, pele, escama, fezes, muco, gametas sexuais e vários outros tecidos que contêm amostras do DNA dos organismos a que pertenciam.

A cada ano a tecnologia evoluiu significativamente, tornando cada vez mais “fácil” e confiável a utilização do eDNA para monitoramento de espécies a partir de amostras ambientais (de água ou solo, por exemplo). Ainda assim, a

tecnologia, que parece ter saído de filmes de ficção científica, ainda está longe de estar completamente dominada.

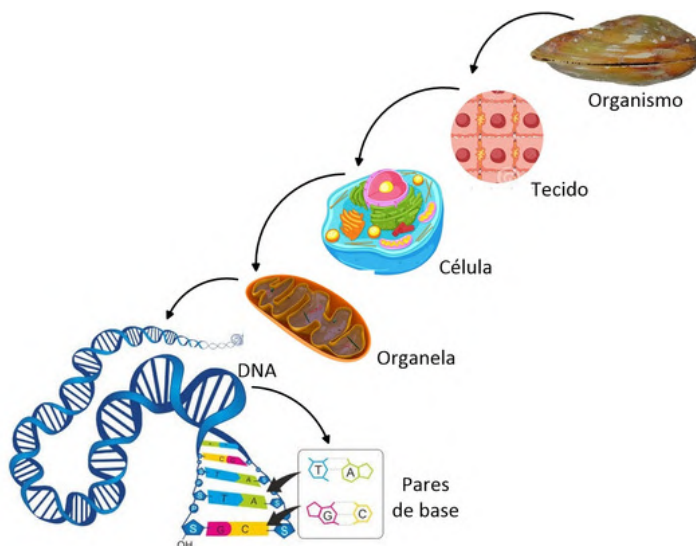
Dois dos grandes obstáculos a serem superados dizem respeito à compreensão e ao domínio dos fatores que levam à degradação do DNA ambiental, tanto no ambiente, após a sua liberação, quanto nas amostras coletadas, desde o campo até o momento em que será analisada em laboratório.

O fato é que o DNA ambiental está em constante processo de degradação e é preciso compreender como os fatores naturais o afetam após sua liberação e frear este processo, após a coleta de amostras. Dessa forma, as informações contidas em uma determinada amostra não se perderão

por problemas de conservação.

Sabe-se que a degradação de material biológico inicia-se tão logo ele é liberado, começando pelos fragmentos de tecidos, depois por células inteiras, organelas (por exemplo, mitocôndrias) e, por último, a degradação da própria molécula de DNA.

Essa degradação é acelerada por microrganismos, por enzimas exógenas, por reações químicas espontâneas e por vários fatores físicos, como temperatura e incidência luminosa/radiação UV. Esses fatores podem atuar no ambiente, no período compreendido entre a liberação do DNA e as coletas, e também diretamente sobre as amostras, caso não sejam adotados procedimentos metodológicos adequados após a coleta.



Uma das primeiras respostas obtidas com base nos dados gerados durante a realização deste projeto é que, em função da rápida degradação, não seria possível coletar uma amostra de eDNA e enviá-la para análise sem filtrá-la e conservá-la ainda em campo.

I- RADIAÇÃO UV

A incidência solar em habitats aquáticos costuma variar enormemente de um ambiente para outro, em diferentes épocas do ano e em diferentes latitudes. Quanto maior a incidência de raios ultra violetas (UV) sobre a superfície do corpo d'água, mais rápido será o processo de degradação das moléculas de eDNA ali presentes. Por outro lado, materiais em suspensão e alguns compostos, como o material inorgânico particulado, o carbono orgânico dissolvido e o carbono orgânico particulado, reduzem a ação direta da radiação solar sobre as moléculas de DNA e, conseqüentemente, os efeitos sobre sua degradação.

Os fótons (partículas elementares mediadora da força eletromagnética) presentes na luz UV são facilmente absorvidos por moléculas biológicas, entre elas, os ácidos nucléicos, sendo o DNA uma das principais "vítimas" dos raios UV. Isso porque a radiação UV induz à ocorrência de lesões na molécula de DNA, fazendo com que as ligações entre as bases nitrogenadas sejam quebradas.

II- MICRORGANISMOS

Existem diversos organismos bacterianos presentes em ambientes límnicos, e normalmente eles utilizam como suas fontes primárias de nutrientes as bases nitrogenadas presentes nas moléculas de DNA. A abundância bacteriana encontrada em rios e lagos variam de 10^7 a 10^9 células/g de sedimento úmido.

A abundância bacteriana geralmente resulta em altas taxas de degradação do eDNA. Uma maior atividade das bactérias também está associada ao aumento da temperatura, que faz com que a atividade metabólica desses organismos aumente, gerando um rápido crescimento de suas colônias. Estudos mostram que a alta temperatura associada à alta abundância bacteriana pode acelerar significativamente a degradação do eDNA mesmo em períodos inferiores a 24h após a coleta de amostras ambientais.

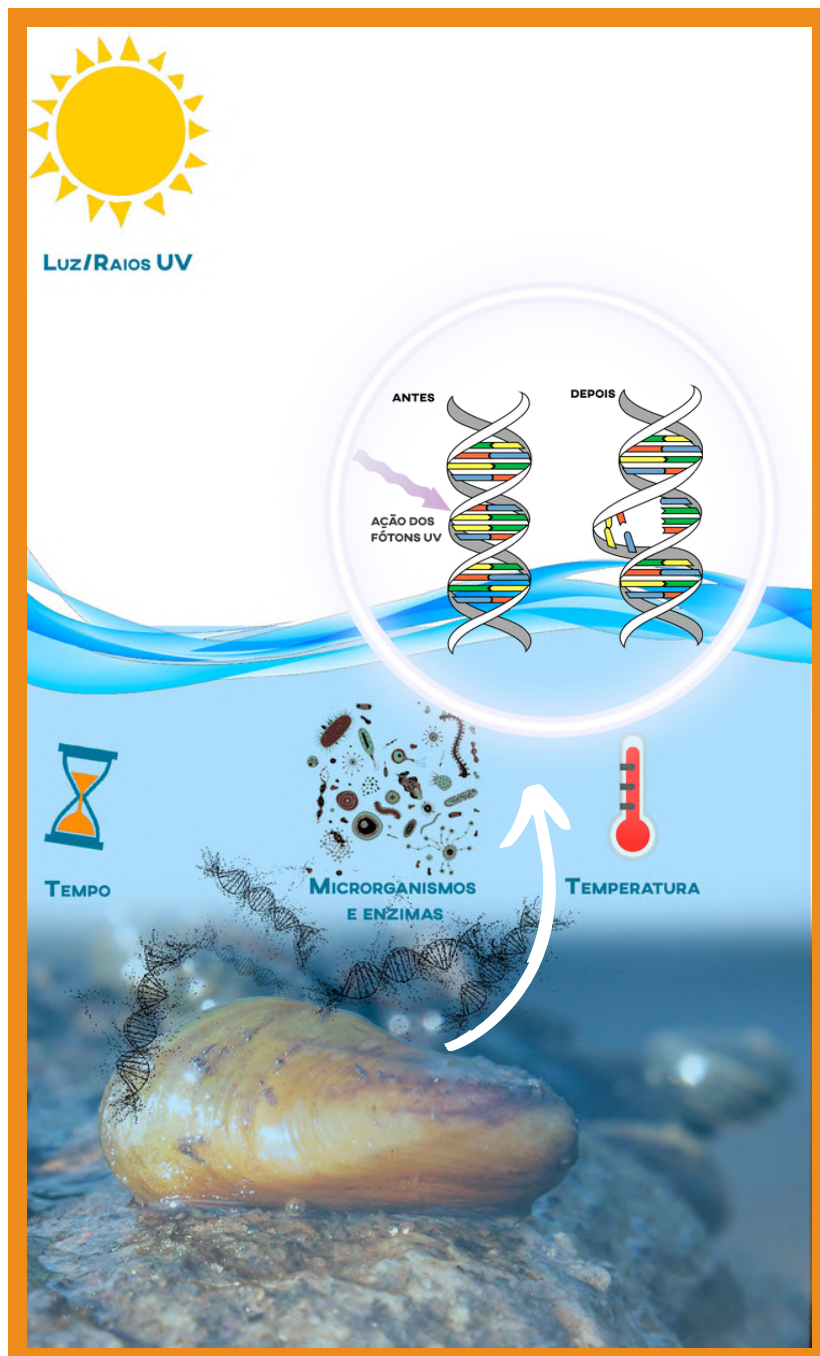
Informações sobre degradação do eDNA referentes à temperatura, radiação ultravioleta e comunidade bacteriana devem ser consideradas e aplicadas em protocolos de armazenamento de amostras de água e em projeto de amostragem de campo. O objetivo é diminuir a degradação de DNA em amostras ambientais, o que foi efetivamente levado em consideração no conjunto de métodos que desenvolvemos ao longo deste projeto.

III- TEMPERATURA

Quanto maior a temperatura da água, mais rapidamente e de forma mais intensa haverá a degradação do eDNA presente no ambiente. Altas temperaturas favorecem a quebra da molécula de DNA (desnaturação), provocando a separação do DNA de fita dupla (dsDNA) em duas fitas simples (ssDNA). Isso ocorre devido ao rompimento das pontes de hidrogênio entre os pares de bases individuais (Adenina, Timina, Guanina e Citosina). Essa quebra interfere na integridade das amostras contendo eDNA (que precisam estar o mais íntegras possível para serem analisadas, especialmente quando o objetivo for a realização de análises quantitativa).

O DNA é naturalmente propenso à degradação, pois

é uma molécula de baixa estabilidade, que pode se separar completamente em pedaços muito pequenos. A degradação do DNA é geralmente indesejável em experimentos, programas de monitoramento ambiental ou em análises baseadas em eDNA e, por isso, é tão importante filtrar e conservar as amostras tão logo elas sejam coletadas.



MAS QUAL É MESMO A PERGUNTA?

A importância de se delimitar bem a questão científica para a escolha do método

Biol. Paula Valeska Stica & Dra. Camila Duarte Ritter

Os desafios do método

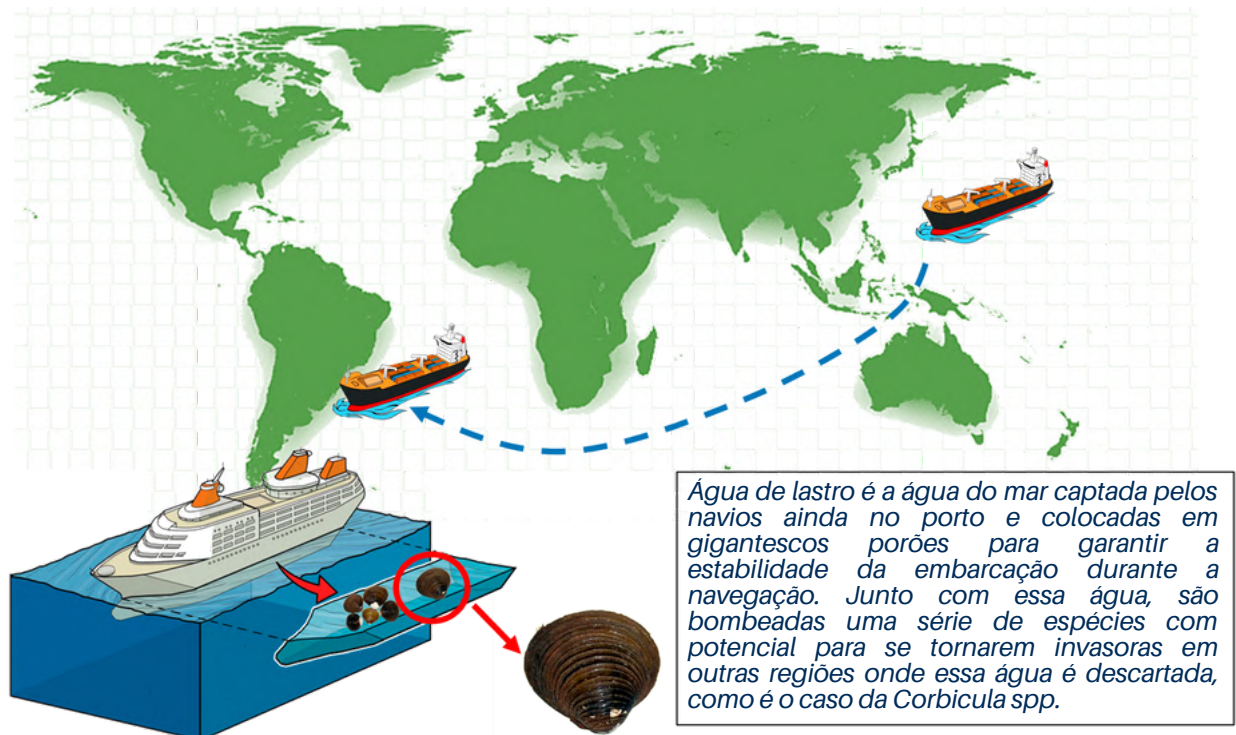
As ferramentas moleculares revolucionaram o estudo científico de grupos de organismos difíceis de amostrar ou identificar e hoje em dia os dados de sequências de DNA são uma fonte importante de informações sobre a presença e distribuição de espécies. Porém, como qualquer estudo, definir a questão a ser respondida é o primeiro e mais importante passo para delinear os métodos que serão utilizados, como já explicado por Douglas Adams em seu livro O guia do mochileiro das galáxias. Usaremos aqui, como exemplo, o caso de uma das espécies invasoras com potencial de causar danos econômicos estudadas neste projeto de P&D.

As *Corbicula* spp. são moluscos aquáticos nativos da Ásia, mas invasores nas Américas do Norte e do Sul e Europa. Esses moluscos foram introduzidos devido ao transporte de larvas via água de lastro em navios cargueiros.

Espécies de *Corbicula* spp. são encontradas nos reservatórios da Copel há muitos anos. Seu potencial de causar danos à operação de usinas hidrelétricas é inquestionavelmente menor que o do mexilhão-dourado, por exemplo, uma vez que a espécie só é incrustante nos primeiros momentos após o assentamento das larvas.

Seu monitoramento é feito através de uma metodologia tradicional, que envolve a identificação e contagem, por microscopia, de larvas presentes em amostras de água. O problema é que as larvas de *Corbicula* spp. confundem-se morfológicamente com as do mexilhão-dourado e até com larvas de espécies nativas de moluscos bivalves.

Agora, a partir do projeto de Pesquisa e Desenvolvimento, executado pelo GIA/UFPR, foi proposto o monitoramento da espécie através do DNA ambiental (eDNA), que é o material genético liberado no ambiente em pequenas quantidades através de muco, fezes, sangue e outras fontes.

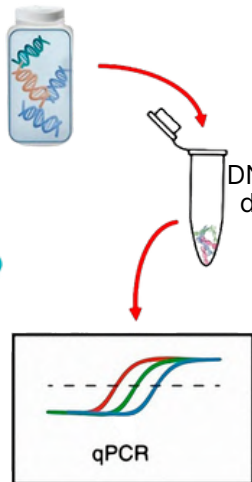
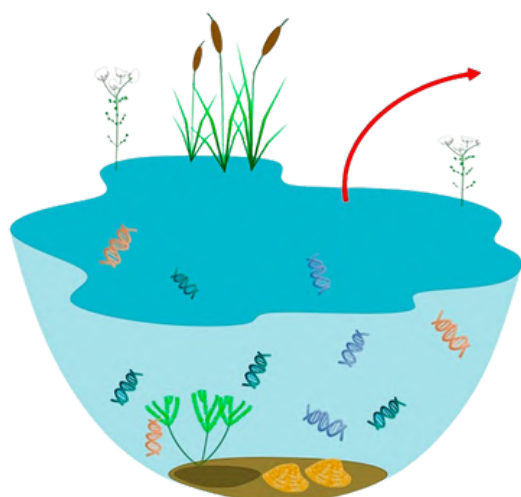


Água de lastro é a água do mar captada pelos navios ainda no porto e colocadas em gigantescos porões para garantir a estabilidade da embarcação durante a navegação. Junto com essa água, são bombeadas uma série de espécies com potencial para se tornarem invasoras em outras regiões onde essa água é descartada, como é o caso da *Corbicula* spp.

Lago fictício com a presença de *Corbicula sp.* e seu DNA liberado na água.

Garrafa contendo uma amostra de água com a presença de DNA

Representação esquemática do processo de coleta de DNA ambiental da(s) espécie(s) alvo(s) presente(s) na água e sua posterior extração e amplificação em tempo real



DNA extraído da amostra

PCR quantitativo em tempo real mostrando a presença das regiões-alvo.

Para a detecção de uma espécie utilizando amostras de eDNA, foi desenhado marcadores moleculares baseado em PCR quantitativa (qPCR). A qPCR é aplicada em amostras de água coletadas em reservatórios da Copel, podendo o eDNA ser detectado e quantificado caso o organismo esteja presente. Este projeto, também visou o mapeamento da ocorrência da espécie em todo o estado do Paraná.

A metodologia por trás da detecção de espécies invasoras

A análise de qPCR combina a metodologia de amplificação de DNA convencional (PCR, do inglês Polymerase Chain Reaction) com um mecanismo de detecção e quantificação por fluorescência. Um par de iniciadores (também conhecidos como primers) são desenhados para a detecção do táxon alvo e esse par de iniciadores é combinado com uma sonda para a emissão de fluorescência.

Assim, é possível detectar o DNA do organismo alvo através da quantificação do DNA amplificado em tempo real, agilizando a obtenção de resultados, diminuindo o risco de contaminação da amostra e conferindo maior precisão.

Os iniciadores são moléculas de DNA com cerca de vinte pares de base que correspondem a um pedaço da sequência do DNA alvo. Juntamente com a sonda, essas moléculas são o coração do ensaio de qPCR e precisam ser desenhadas cuidadosamente de acordo com o objetivo do ensaio. Primeiro, são obtidas as sequências de DNA que serão o alvo de detecção do ensaio. Em muitos casos, é possível recorrer a bases de dados disponíveis na internet como o Genbank®, que é um banco de sequências genéticas onde pesquisadores podem depositar suas sequências para uso de toda a comunidade de forma livre. Em outros casos, é necessário fazer um sequenciamento genético do organismo alvo. Em seguida, iniciadores são desenvolvidos com o uso de ferramentas de bioinformática que analisam diversos critérios para selecionar as melhores regiões do DNA.

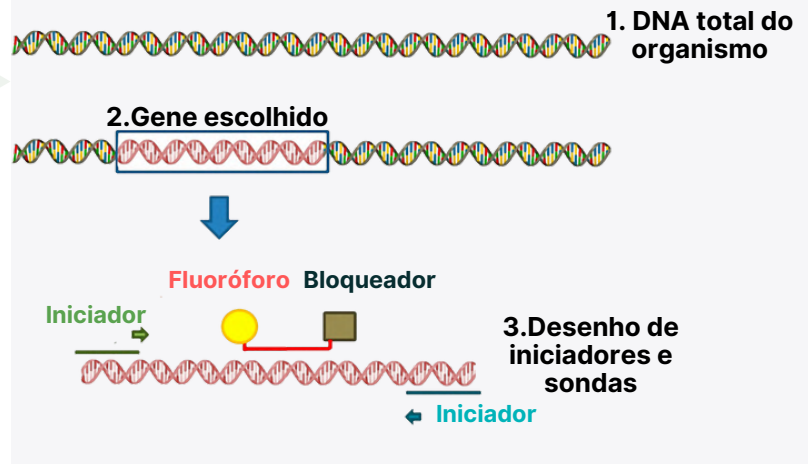


Corbicula fluminea



Reservatório da Usina Hidrelétrica Gov. José Richa, onde é possível encontrar a espécie

Processo simplificado do desenho de iniciadores e sonda para qPCR. Enquanto os iniciadores têm o papel de determinar a região do DNA que será amplificada na qPCR, a sonda é responsável pela emissão de fluorescência, que é captada pelo equipamento.



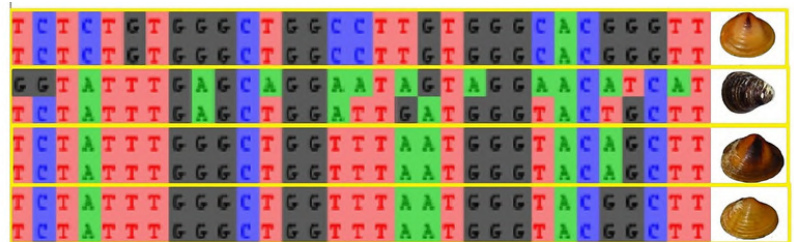
O peso das escolhas

Cada grupo da árvore da vida possui uma organização única do seu genoma, mas existem alguns genes presentes em todos os organismos, capazes de informar a identidade do portador. Para identificar se determinada espécie está presente ou não na amostra, é preciso escolher um gene cuja sequência exista em todos os membros daquela espécie e ausente em todas as demais, de forma que ao detectar tal sequência na amostra seja possível concluir que aquela espécie, e somente ela, está presente na amostra.

Em alguns casos é possível diferenciar até mesmo genótipos diferentes dentro da mesma espécie! Esses iniciadores altamente espécie-específicos amplificarão somente a espécie alvo, nos informando com certeza a identidade da espécie. A principal vantagem é que eles nos permitem saber a ocorrência da espécie, como pode ser o caso de uma espécie ameaçada ou uma espécie invasora, e não a ocorrência de outras espécies do mesmo gênero ou família.

Porém, se houver alta variação genética intraespecífica (dentro da espécie) ou se o interesse é descobrir a presença de todas as espécies dentro de um gênero, iniciadores específicos não serão adequados. Aqui, ganha-se em resolução do ensaio, mas perde-se em abrangência.

Por outro lado, no caso de um ensaio que busque identificar todo um gênero ou família, é preciso escolher uma sequência que seja igual entre todos os membros. Iniciadores generalistas amplificarão todos os organismos com a sequência-alvo, sendo possível detectar todo um grupo de organismos, mas sem a capacidade de diferenciar entre eles. Nesses casos, ganha-se em abrangência do ensaio, mas perde-se em resolução.



Fragmento de sequências de DNA de diferentes espécies de *Corbicula*. Cada base tem uma cor diferente para facilitar a visualização. Os retângulos amarelos delimitam as sequências de cada espécie (duas sequências por espécie). É possível observar a variação genética entre espécies e também a variação genética que ocorre na segunda espécie.

O caso da *Corbicula fluminea*

Durante o processo de identificação das espécies, indivíduos de *Corbicula sp.* foram coletados em um dos reservatórios de ocorrência, para identificação por um profissional taxonomista. Assim que a espécie foi identificada como *C. fluminea*, foram buscadas no Genbank sequências do gene COI (Citocromo oxidase subunidade I) da espécie. Esse gene é frequentemente usado em análises de qPCR por sua capacidade de diferenciar espécies, e também por serem sequências fáceis de encontrar para muitos organismos. Essas sequências foram então usadas para desenhar iniciadores espécie-específicos.

A estratégia de iniciadores ultra-específicos foi escolhida porque espécies invasoras não costumam apresentar muita variação intraespecífica, então é razoável assumir que todos os organismos sejam parecidos.

Porém, após exaustivas análises, foi observado que, por alguma razão, o ensaio desenhado não era capaz de detectar a espécie nas amostras coletadas na maioria dos reservatórios, o que fez surgir diversas dúvidas: será que o organismo presente nos reservatórios seria realmente *C. fluminea*? Será que a identificação da sequência do Genbank estaria equivocada? Será que há algum outro problema com o ensaio?

Para responder cientificamente a essas perguntas, seria necessário realizar dezenas de testes, enviar os exemplares para outro taxonomista em busca de uma segunda avaliação, reavaliar os dados utilizados e, derradeiramente, redesenhar o ensaio. Como o tempo para a realização e finalização do projeto de P&D era bastante limitado, a equipe decidiu por uma mudança de foco.

A necessidade de monitorar a ocorrência de corbículas é meramente de detecção. Ou seja, neste caso não há evidências de que uma espécie seja mais prejudicial que outras do mesmo gênero. Assim, não há a necessidade de se identificar a espécie com precisão e diferenciá-la de organismos próximos, mas sim o método precisa ser capaz de monitorar a presença desse tipo (gênero) de animal nos reservatórios.

Pensando nisso, ficou claro que a melhor estratégia seria formular um ensaio generalista, no qual fosse possível detectar qualquer animal do gênero *Corbicula*. E é isso que foi realizado. Sequências de diversas espécies do gênero foram usadas para gerar iniciadores não-específicos, de forma a detectar indivíduos do gênero *Corbicula* presentes nos reservatórios.

Desta forma, o método desenvolvido permitirá o monitoramento da ocorrência desses organismos invasores, porém não possibilitará saber qual é a espécie que está ocorrendo, o que não chega a ser nenhum problema no caso da resposta que se busca neste caso.

Trecho do livro “O guia do mochileiro das galáxias” de Douglas Adams:

Durante muito, muito tempo, ninguém disse nada. Com o canto do olho, Phouchg via pela janela o mar de rostos cheios de expectativa na praça.

– Nós vamos ser linchados, não vamos? – sussurrou. – A pergunta não foi fácil – disse Pensador Profundo, com modéstia. – Quarenta e dois! – berrou Loonquawl. – É tudo que você tem a nos dizer depois de sete milhões e quinhentos mil anos de trabalho?

– Eu verifiquei cuidadosamente – disse o computador –, e não há dúvida de que a resposta é essa. Para ser franco, acho que o problema é que vocês jamais souberam qual é a pergunta.

– Mas era a Grande Pergunta! A Questão Fundamental da Vida, o Universo e Tudo o Mais – gritou Loonquawl. – É – disse Pensador Profundo, com um tom de voz de quem tem enorme paciência para aturar pessoas estúpidas –, mas qual é exatamente a pergunta?

Um silêncio de estupefação aos poucos dominou os homens, que olharam para o computador e depois se entreolharam.

– Bem, você sabe, é simplesmente tudo... tudo... – começou Phouchg, vacilante.

– Pois é! – disse Pensador Profundo. – Assim, quando vocês souberem qual é exatamente a pergunta, vocês saberão o que significa a resposta.

“ **A vida é feita de escolhas. Quando você dá um passo à frente, inevitavelmente alguma coisa fica para trás.** ”

Caio Fernando Abreu



OS NOVOS RUMOS DO MONITORAMENTO E CONTROLE DE ESPÉCIES AQUÁTICAS INVASORAS INCRUSTANTES ATRAVÉS DO eDNA.

MSC. OTTO SAMUEL MÄDER NETTO
ACAD. ANA HELENA FERREIRA ROHLING

Uma espécie exótica pode ser considerada invasora quando entra em um novo ambiente e passa a dominá-lo, reproduzindo-se de forma descontrolada, causando impactos econômicos, ambientais e sociais. A introdução de espécies em um ambiente pode ocorrer de forma natural, porém, na maioria dos casos tem grande relação com as atividades humanas e, em especial, com a expansão e a globalização do comércio. A navegação marítima, antigamente pela incrustação em cascos de navios e atualmente pela descarga de água de lastro, é a maior responsável pelo transporte de espécies de plantas e animais, de um lugar a outro do planeta.

Há um conjunto de fatores ecológicos que podem tornar as espécies exóticas em invasoras abundantes e persistentes. Estes fatores incluem a falta de controle de inimigos naturais, o desenvolvimento de novas associações entre invasores e as espécies nativas, a ausência de predadores eficazes no novo ecossistema, além de habitats já perturbados que se tornam ecossistemas favoráveis à invasão. O efeito da introdução de espécies invasoras no ambiente, de forma intencional ou acidental, é reconhecido como a segunda maior causa de declínio da biodiversidade, ficando atrás apenas da destruição de habitats naturais.

Limnoperna fortunei, conhecido como mexilhão-dourado, foi desde sua introdução, considerado uma espécie de grande potencial invasor devido suas características biológicas.

Os impactos ecológicos causados por esta espécie na América do Sul são similares àqueles causados por *Dreissena polymorpha* (mexilhão-zebra) na América do Norte. Esses impactos vão desde a variação na composição da comunidade bêntica, com a remoção de moluscos nativos e aumento na abundância e distribuição de outros grupos, até nas modificações da cadeia trófica. Assim como ocorre com o mexilhão-zebra, *L. fortunei* é encontrado fixado sobre substratos vivos, representados por espécies nativas de bivalves e crustáceos.

Dentre as características que tornam o mexilhão-dourado uma espécie de grande potencial invasor está a sua grande resistência a condições ambientais e sua alta fecundidade, com a capacidade de colonizar uma grande variedade de habitats. Suas colônias chegam a atingir densidades de mais de 150.000 indivíduos/m²

Os organismos aquáticos invasores são um problema não somente para os ecossistemas, mas também para as atividades econômicas, afetando sistemas industriais e produtivos. Os prejuízos associados às espécies exóticas invasoras nos Estados Unidos são da ordem de US\$ 120 bilhões/ano, sendo cerca de US\$ 1 bilhão/ano apenas para monitorar e controlar o mexilhão-zebra.

Os sistemas de resfriamento das usinas hidrelétricas são essenciais para dissipar o calor gerado durante o funcionamento de diversos equipamentos necessários

para que uma usina funcione. As bioincrustações nestes sistemas geram perda na eficiência nas trocas térmica, podendo causar inúmeros problemas, desde aumento da demanda e dos custos com mão-de-obra e exigindo até mesmo a parada de máquinas (unidades inteiras) para manutenção.

Em 2001, o mexilhão dourado foi reportado pela primeira vez no reservatório da Usina de Itaipu, causando grandes problemas à empresa. Hoje o molusco invasor já está presente em diversas usinas do Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil, causando além, de impactos ambientais, uma série de impactos econômicos.

Desde a entrada do mexilhão no Brasil, as metodologias de controle de incrustações mais utilizadas nas usinas envolvem o uso de produtos químicos a base de cloro, sais quaternários de amônio e hidróxido de sódio. Tais metodologias foram importantes no início, quando a presença do mexilhão fez com que algumas unidades geradoras chegassem a parar de funcionar por superaquecimento do sistema de resfriamento. Agora, há necessidade de uma evolução das metodologias de controle para que se possa reduzir os impactos dos próprios produtos de controle sobre o ambiente e sobre os materiais que compõe os sistemas de resfriamento das usinas, reduzir custos e até mesmo aumentar a eficiência do controle.

Nesse cenário, os resultados do presente projeto de P&D irão descortinar novas oportunidades para o monitoramento de diversas espécies aquáticas invasoras em larga escala utilizando a metodologia de eDNA. Criará também, e pela primeira vez, bases científicas e tecnológicas suficientemente consistentes para a implantação de um Plano Nacional de Prevenção, Controle e Monitoramento do Mexilhão-dourado no Brasil (www.ibama.gov.br/component/phocadownload/file/8205-mexilhao-dourado-limnoperna-fortunei-plano-nacional-de-prevencao-controle-e-monitoramento-no-brasil).

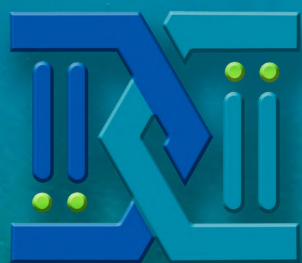
O acompanhamento das invasões biológicas poderá ser realizado de maneira rápida, padronizada, precisa e em larga escala, não só para avaliar a presença ou ausência, mas também para monitorar a densidade desses organismos, possibilitando a adoção de medidas e ações mais efetivas pelos setores afetados pelo problema.

Além do monitoramento, informações precisas e rápidas sobre a evolução da densidade de organismos em uma determinada usina ou em seu reservatório permitirá que os operadores injetem a quantidade mínima necessária de produto para controlar as taxas instantâneas de fixação dos organismos que estão passando pelo sistema. Isso dará sobrevida a tais métodos de controle, que futuramente deverão ser substituídos por métodos físicos que não causem impactos ambientais e nem danos aos materiais dos sistemas industriais.

Estruturas de sistemas hidráulicos de usinas hidrelétricas entupidos pelo mexilhão-dourado e pelo hidrozoário *Cordylophora caspia*



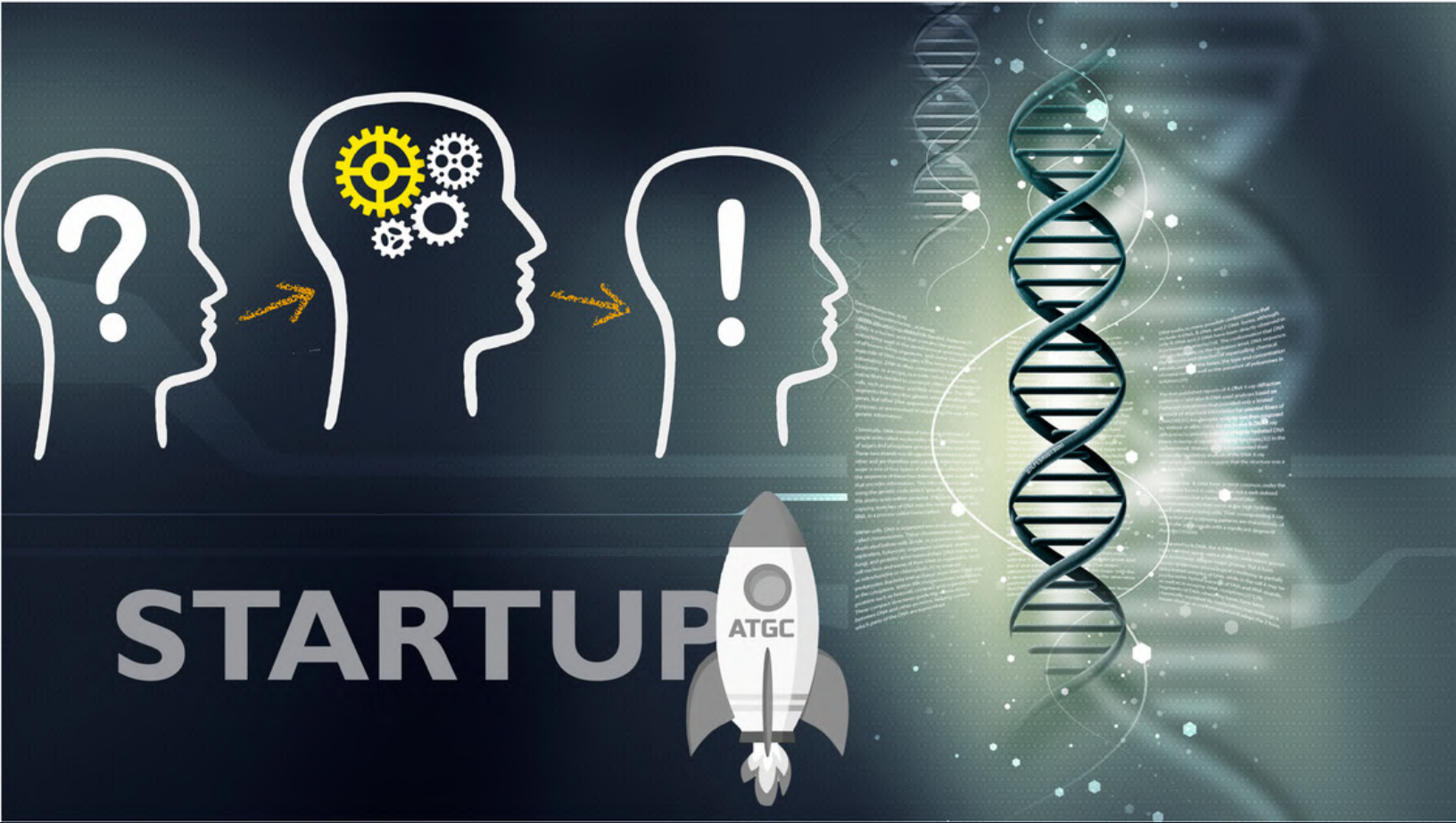
Unidos pela Ciência



ATGC



O ano de 2021 marca a oficialização, pela Agência de Inovação da UFPR, da incubação da ATGC - Genética Ambiental Ltda., pelo Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais. A parceria criada entre empresa e universidade irá levar o que há de mais moderno nas ciências ambientais para a melhoria de processos, o monitoramento de ações e a resolução de problemas que, direta ou indiretamente, afetam o dia a dia das empresas e da sociedade brasileira.



A CRIAÇÃO DE UMA STARTUP: MAIS UM IMPORTANTE LEGADO DO PROJETO

DR. ANTONIO OSTRENSKY

HISTÓRICO

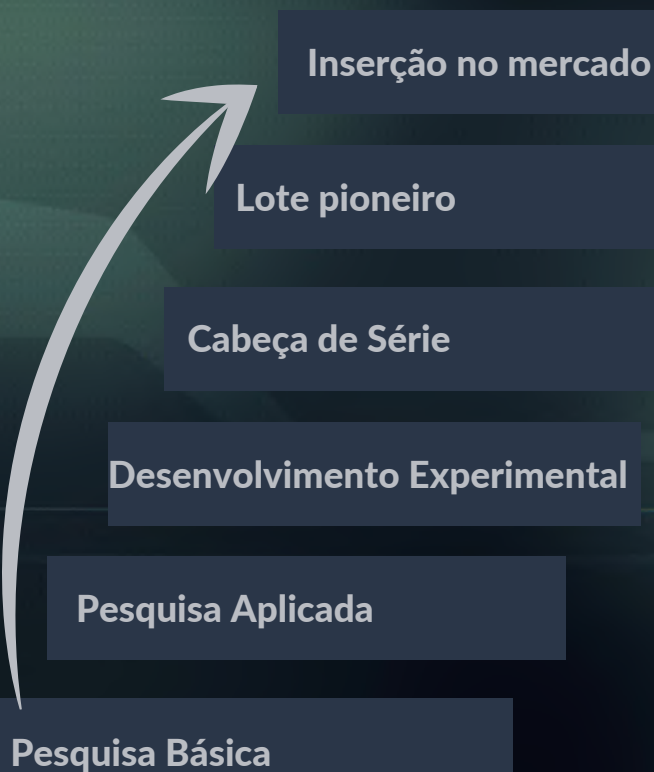
O projeto "*Desenvolvimento de métodos moleculares de última geração para identificação, quantificação e monitoramento da presença de espécies exóticas invasoras em reservatórios de usinas hidrelétricas*" (PD 6491-0383/2015) começou a ser gestado em 2014. As primeiras conversas sobre a proposta nasceram da vivência neste tema de três professores da Universidade Federal do Paraná (Marcio Roberto Pie, Carlos Eduardo Belz e Antonio Ostrensky) e de um profissional (Otto Samuel Mäder Netto) com longo histórico no mercado de produtos usados no combate ao mexilhão-dourado em usinas hidrelétricas.

Todos os quatro possuíam larga experiência técnica e científica envolvendo o uso de ferramentas genéticas moleculares em estudos e programas de monitoramento de espécies exóticas invasoras. Além disso, Otto e Carlos havi-

am desenvolvido vários projetos de P&D com a COPEL durante a passagem de ambos como pesquisadores do Lactec, uma instituição de referência em estudos e prestação de serviços direcionados ao setor elétrico. E foi a partir dos contatos profissionais que eles haviam estabelecidos ao longo do tempo que surgiu a oportunidade de apresentarmos um primeiro esboço de projeto à COPEL.

Um dos primeiros desafios, foi estruturar o projeto. Como Otto, embora egresso do curso de mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais, não possuía mais nenhum vínculo formal com a UFPR, a melhor solução encontrada para viabilizar a participação de todos foi formalizar uma proposta envolvendo o GIA/UFPR, a FUNPAR (como interveniente) e a empresa Aliança Prestadora de Serviços Ltda, de propriedade de Otto, como coexecutora.

Fases da cadeia de inovação de um projeto de P&D ANEEL



Isso aconteceu em 2015. Contudo foi apenas o primeiro passo de uma longa jornada de discussões, ajustes e aprovações, que só foi encerrada com a assinatura do contrato, em 25 de junho de 2018. Ou seja, mais de quatro anos se passaram entre as primeiras conversas para apresentação de uma proposta e a assinatura do contrato.

O início do projeto coincidiu com o afastamento de Carlos Eduardo Belz para a realização de seu pós-doutorado na USP. Assim, embora tenha sido um dos "pais" da proposta, Carlos não chegaria a participar efetivamente do projeto.

O restante da história encontra-se devidamente narrado ao longo desta Revista do GIA, mas um "detalhe" em especial merece ser citado: a criação da **ATGC Genética Ambiental Ltda.**

NASCE UMA STARTUP



Todo projeto de P&D do setor elétrico precisa estar devidamente posicionado em uma das seis fases da cadeia de inovação, que pode partir de uma pesquisa básica até desembocar na inserção de produtos ou serviços no mercado. Nosso projeto, por exemplo, enquadra-se como Pesquisa Aplicada. Ainda assim, sempre enxergamos o imenso potencial de inserção e uso comercial dos resultados almejados.

Ocorre que o GIA é um grupo de pesquisa ligado à UFPR. A Aliança Prestadora de Serviços Ltda é uma empresa que historicamente dedicou-se a uma série de atividades ligadas à prestação de serviços. Restava evidente, portanto, que para que todo o trabalho desenvolvido ao longo dos 36 meses de projeto pudesse continuar prosperando, seria necessário encontrar um novo modelo de gestão, ou dificilmente os resultados do nosso trabalho teriam um dia a oportunidade de atingir a fase de Inserção no Mercado.

Coincidentemente, ao mesmo tempo em que iniciamos o projeto, a UFPR passou a fomentar de forma mais incisiva sua Agência de Inovação que, apesar de criada em 2008, nunca teve uma visibilidade interna como a que passou a ter a partir de 2018 e 2019. Estava estabelecido o cenário ideal para a criação de uma empresa a ser incubada no GIA/UFPR, aproveitando não apenas todo o know how



A Universidade Federal do Paraná possui um ambiente denominado Agência de Inovação, que foi criado para que a inovação se consolide em seu papel de geração de novos conhecimentos para agregar melhorias sociais e econômicas e que tem como alguns de seus objetivos: dar suporte à comunidade interna nas demandas de proteção do conhecimento; orientar os procedimentos, em conjunto com outras unidades administrativas, sobre transferência de tecnologia; definir planos de capacitação e eventos para empreendedorismo e projetos de geração de negócios inovadores.

adquirido durante o projeto em parceria com a COPEL, mas também todo o universo de possibilidades que se abriu a partir deste projeto.

O mercado é ávido por soluções tecnológicas em todas as áreas do conhecimento, inclusive na área ambiental. A genética ambiental, embora para alguns possa parecer ficção científica, em função das suas "assombrosas" alternativas, não é mais apenas uma possibilidade. É para já. É real. É tecnicamente viável. Fornece respostas rápidas e precisas. Expande o leque de investigações. Oferece respostas robustas a problemas complexos.

Foi nesse contexto que foi criada a ATGC Genética Ambiental Ltda, uma empresa que nasceu sob o DNA da inovação, den-

tro do GIA/UFPR, tendo como sócios Otto Samuel Mäder Netto e a bióloga e doutora Aline Horodesky, egressa do curso de pós-graduação em Zoologia da UFPR, sob a tutoria dos professores Marcio Pie e Antonio Ostrensky.

Paralelamente à assinatura do contrato de incubação, assinado em 09 de fevereiro de 2021, a ATGC fechou seu primeiro contrato para realização de um novo projeto de P&D com o setor elétrico: *Desenvolvimento e aplicação de ferramentas genéticas no monitoramento da ictiofauna de reservatórios de usinas hidrelétricas.*

Essa é uma garantia que os benefícios diretos e indiretos de nosso projeto com a COPEL continuarão a gerar frutos para todos os envolvidos e, principalmente, para a sociedade.



Benefícios para a COPEL

- *A empresa cumpre com sucesso suas responsabilidades junto ao Programa de P&D da ANEEL, contribuindo com o desenvolvimento da ciência e da tecnologia do país;*
- *Fomenta, indiretamente, a criação de uma startup que continuará desenvolvendo pesquisas científicas e tecnológicas e que ofertará serviços altamente especializados para resolução dos problemas enfrentados pelas usinas da própria COPEL e de outras empresas do setor elétrico;*
- *Reforça sua imagem moderna e suas ações inovadoras em prol da sociedade e do país.*



Benefícios para a ATGC

- *Recebe apoio e suporte qualificado na fase em que as empresas geralmente mais precisam: nos primeiros anos após sua criação;*
- *Tem à sua disposição a infraestrutura física da UFPR e o know-how de professores e pesquisadores, que oferecerão orientação e suporte técnico e científico para que a empresa possa desenvolver ideias inovadoras e transformá-las em um empreendimento de sucesso;*
- *Recebe auxílio e apoio gerencial da Agência de Inovação da UFPR para resolução de problemas e para estruturação do empreendimento ;*
- *Tem a própria UFPR como endereço e pode, usar a marca UFPR durante o período de incubação.*



Benefícios para a UFPR

- *A UFPR recebe uma percentagem da receita bruta mensal da ATGC durante todo o período de incubação;*
- *A parceria abre um leque de novas oportunidades para financiamento de projetos de pesquisa e garante recursos para pagamento de bolsas a alunos de graduação e de pós-graduação ;*
- *Os alunos da UFPR têm a oportunidade de contato com tecnologias inovadoras e com um ambiente da vida profissional que não pode nunca ser proporcionada apenas em sala de aula;*
- *Os alunos terão contato com os mais diversos players dos setores em que a ATGC atuará, o que cria novas oportunidades no mercado de trabalho para esses futuros profissionais.*



MÉTODO MOLECULAR X MÉTODO CONVENCIONAL

Dr. Antonio Ostrensky
Dra. Débora Pestana da Silva

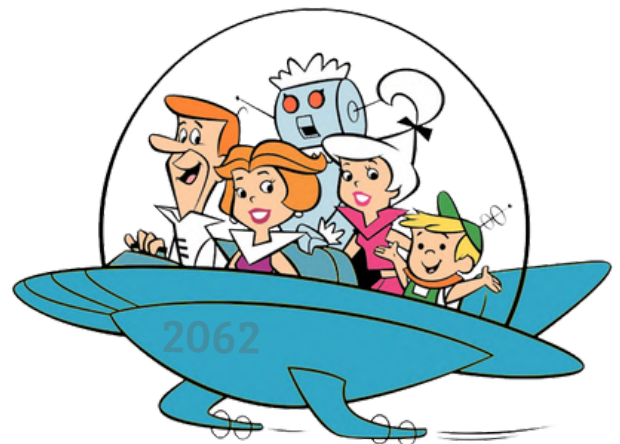
Ficção científica ou realidade?

Nossas infâncias foram vividas na época da TV em preto e branco, onde fazia muito sucesso um desenho animado, criado em 1962, em que as casas e edifícios eram suspensos sobre o chão e tinham colunas ajustáveis. A empregada doméstica era um robô. O personagem principal um empregado típico de sua era, que trabalhava uma hora por dia, dois dias por semana, que ia ao trabalho em um carro aéreo (que lembra um disco voador com uma bolha transparente fazendo o papel de "teto solar"). Apesar dessas *facilidades*, todos reclamavam de esgotamento no trabalho e das dificuldades em viver naquele distante ano de 2062.

Obviamente, ainda não chegamos nesse ano, mas já estamos mais perto dele do que dos tempos em que assistíamos a Os Jetsons. Apesar de não termos conquistado ainda nenhum dos benefícios sociais ou tecnológicos descritos acima, nossa tecnologia atual definitivamente em nada lembra a existente no final dos anos 1960 e início dos 70.

Não é necessário falar de smartphones, notebooks, drones, gps... pois muita gente até acredita que esses *gadgets* já existiam desde os tempos em que nossa espécie dava os primeiros passos para conquistar a tão sonhada casa própria fora das cavernas. Mas, o que muita

gente ainda sequer imagina é que hoje já é possível se fazer o monitoramento preciso de organismos tão pequenos como vírus ou bactérias, ou tão grandes quanto elefantes e baleias sem precisar coletar nenhum deles. Não sabe que já começa a ser possível se monitorar a presença e até a abundância relativa de organismos aquáticos em mares, rios, lagos e reservatórios coletando-se um misero litro de água ou até menos que isso. Mas será que isso realmente funciona ou seria apenas ficção científica?



Os Jetsons. Criação: Hanna & Barbera

Análises qualitativas (presença x ausência)

Para responder a essa pergunta, em paralelo ao trabalho de desenvolvimento das ferramentas genéticas moleculares, realizamos uma grande campanha de campo para coleta de água nas 16 bacias hidrográficas existentes no estado do Paraná. A ideia era obtermos essas amostras para analisarmos a presença de organismos invasores tanto pelo método convencional (analisando amostras de plâncton em microscópico) como pelo método molecular. O primeiro problema encontrado foi a dificuldade de monitoramento por métodos tradicionais. Precisaríamos arrumar um especialista para analisar cada uma das fases planctônicas das quatro espécies estudadas (o hidrozóario *Cordylophora* spp., a esponja *Corvospongilla seckti*, os moluscos *Corbicula* spp. e *Limnoperna fortunei*).

Porém, com uma pandemia se expandindo a todo o vapor por mais de um ano e meio (dos três que teríamos para realizar o projeto), logo ficou claro que não haveria prazo suficiente para isso no contrato. Por isso, decidimos analisar através do método convencional apenas o mexilhão-dourado (método que envolve a busca, sob a luz de uma lupa estereoscópica, de larvas originalmente presentes em 1.000 litros de água, coletados em cada ponto amostral, que depois eram filtrados e concentrados).

A campanha de campo envolveu ao todo 45 pontos amostrais. Destes, em 3 não foi possível realizar análises moleculares por um problema de inibição da reação de amplificação (por características intrínsecas da água nesses três pontos, que precisamos ainda compreender melhor).

Tabela 1. Mexilhão-dourado. Avaliação comparativa dos resultados qualitativos obtidos através do método molecular e convencional.

Parâmetro	Número	%
Total de análises coincidentes	40	100
Resultados idênticos	29	72,5
Molecular Positivo x Convencional Negativo	6	15,0
Molecular Negativo x Convencional Positivo	5	12,5
Convencional Positivo + Molecular Negativo x <i>Corbicula</i> Positivo	4	10,0
Resultados compatíveis	39	97,5
Diferenças não explicáveis	1	2,5

Por outro lado, em dois outros pontos não foi possível realizar a análise pelo método convencional por excesso de sedimentos nas amostras. Assim, em 40 pontos foi possível comparar os resultados obtidos através dos dois métodos (Tabela 1 e Figura 1).

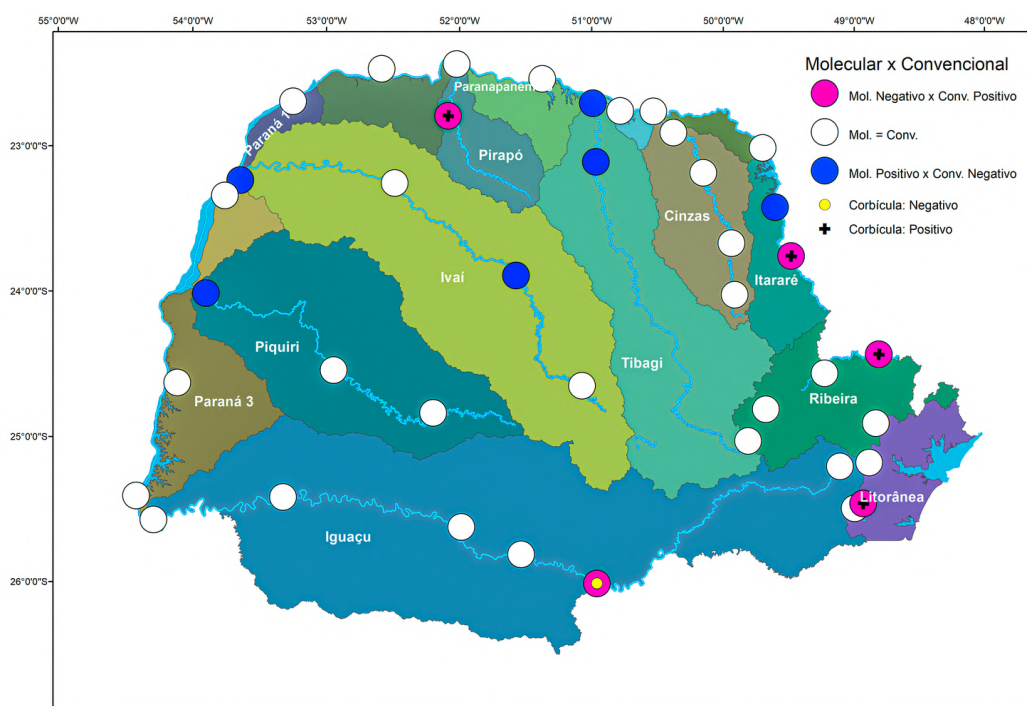


Figura 1. Mexilhão-dourado: comparação entre os resultados qualitativos obtidos através dos métodos molecular e convencional.

Em 72,5% desses 40 casos houve coincidência integral entre os métodos (positivo ou negativo simultaneamente). Isso significa que um ou outro método erra em 27,5% dos casos? Não obrigatoriamente. Senão vejamos:

Observamos que em 15,5% dos casos, os resultados foram positivos pelo método molecular e negativos pelo método convencional. Aqui, precisamos lembrar que o método molecular é seguramente mais sensível, pois não depende da presença de uma só larva que seja na amostra, basta apenas um pedaço do seu DNA. Aliás, não precisa nem haver larvas, o DNA ambiental pode ser originado de larvas, mas também de gametas, ovos, de juvenis ou de indivíduos adultos. Portanto, não há nenhuma contradição em relação ao resultado obtido através das análises realizadas pelo método convencional, o que elevaria um possível nível de compatibilidade entre os resultados para a casa dos 87,5%.

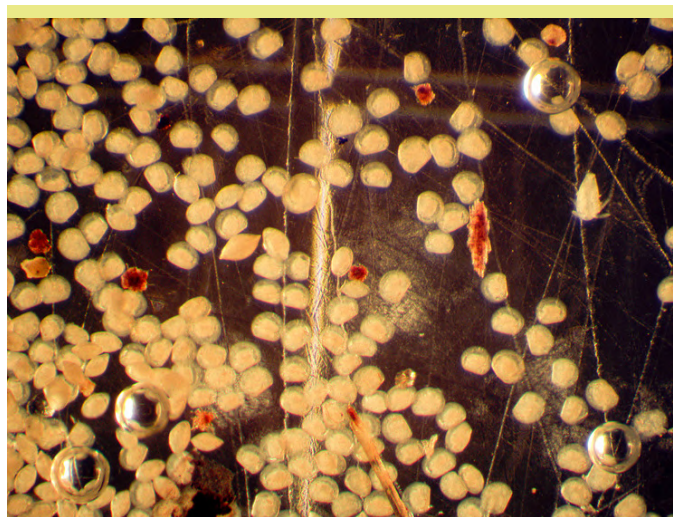


Figura 2. Larvas de moluscos presentes em uma amostra obtida durante o projeto e observadas em lupa estereoscópica.

Observamos também que em 12,5% dos casos, os resultados foram negativos pelo método molecular e positivos pelo método convencional. Seria esse um possível erro do método molecular? Talvez não! Ocorre que as larvas de mexilhão-dourado são incrivelmente semelhantes às de corbícula (Figuras 2 e 3) e, mesmo um especialista em mexilhão-dourado pode ter dificuldades para identificá-las de forma inequívoca em certas ocasiões.

Quando analisamos os resultados das análises moleculares de corbícula constatamos, que em 10% dos casos eles foram negativos para mexilhão pelo método molecular, positivos pelo método convencional e, ao mesmo tempo positivos para corbícula. Ou seja, em 39 das 40 amostras analisadas (97,5% do total) há bases técnicas e científicas bastante plausíveis para se atestar a compatibilidade entre os resultados. Em apenas uma amostra (2,5%), tais explicações não poderiam ser aplicadas. No entanto, mesmo neste caso é preciso con-

siderar que outros organismos zooplânctônicos podem eventualmente apresentar formato muito parecido com o das larvas de moluscos, o que poderia explicar o caso desse ponto amostral anômalo, em que dois organismos (em 1.000 L de água) foram identificados como sendo larvas de mexilhão-dourado em estágio de véliger. Por outro lado, em quatro das amostras convencionais identificamos a presença de fragmentos de *Cordylophora* e, em duas outras, fragmentos de conchas de corbícula. Em todas elas as análises moleculares testaram positivo para tais organismos. Ou seja, qualitativamente o método molecular é indiscutivelmente robusto e confiável.

Análises quantitativas (concentração de organismos x DNA)

Como comentado anteriormente, em termos quantitativos tivemos que enfrentar um desafio inesperado e que não pode ser integralmente superado no prazo disponível para

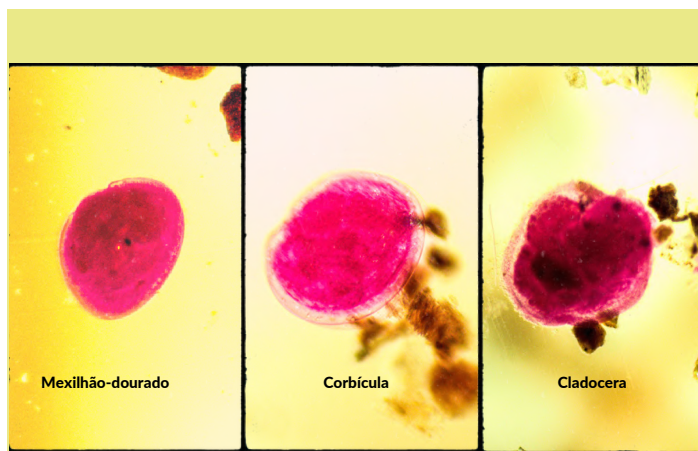


Figura 3. Diferentes organismos, corados com o rosa de Bengala para facilitar a visualização. Observa-se a semelhança morfológica entre eles.

este projeto: a presença de inibidores naturais da reação de PCR em algumas das amostras ambientais.

Nos testes e experimentos realizados em condições controladas de laboratório, conseguimos resultados altamente precisos nas análises moleculares quantitativas. Por exemplo, conseguimos detectar o DNA ambiental equivalente ao liberado por um único mexilhão em 920.000 L de água. Porém, em função da presença desses inibidores nas amostras de campo, no início das nossas análises não conseguimos resultados sequer minimamente satisfatórios. Realizamos então uma série de estudos complementares e conseguimos minimizar consideravelmente esse problema da inibição. Ainda assim, a comparação com o método convencional indica que ainda precisamos avançar nesses estudos para termos produtos (metodologias analíticas) que se apliquem indistintamente a todo e qualquer tipo de água encontrado em território nacional.

Como as análises quantitativas envolvem unidades diferentes entre si (indivíduos/m³, nas análises convencionais, e ng/L de eDNA, nas análises moleculares), elas não podem ser diretamente comparadas entre si.

Mas, colocando os resultados em escalas proporcionais (Figura 4) observamos que **em 50% dos casos os resultados quantitativos obtidos através dos métodos molecular e convencional foram semelhantes entre si. Em 12,5%, foram maiores nas análises moleculares e em 37,5% das amostras maiores nas análises convencionais. Dessa forma, podemos inferir que os resultados foram considerados "explicáveis" (ou esperados) em 62,5% dos casos e "não explicáveis" em outros 37,5%** (Tabela 3).

No entanto, há que se ressaltar que, neste caso, a relação pode não ser tão linear assim, pois o DNA ambiental está sujeito a uma série de processos de interação e degradação (principalmente por fatores ambientais e microbiológicos). Pode também ter ocorrido a ação de inibidores da reação de amplificação da PCR que, embora tenham sido em grande parte neutralizados, não podemos descartar que, sob certas circunstâncias, podem ainda estar afetando a acurácia dos resultados quantitativos.

O que sabemos?

Parafrazeando uma citação atribuída a Confúcio: **"Querem que vos ensine o modo de chegar à ciência verdadeira? Aquilo que se sabe, saber que se sabe; aquilo que não se sabe, saber que não se sabe; na verdade, é este o saber"**.

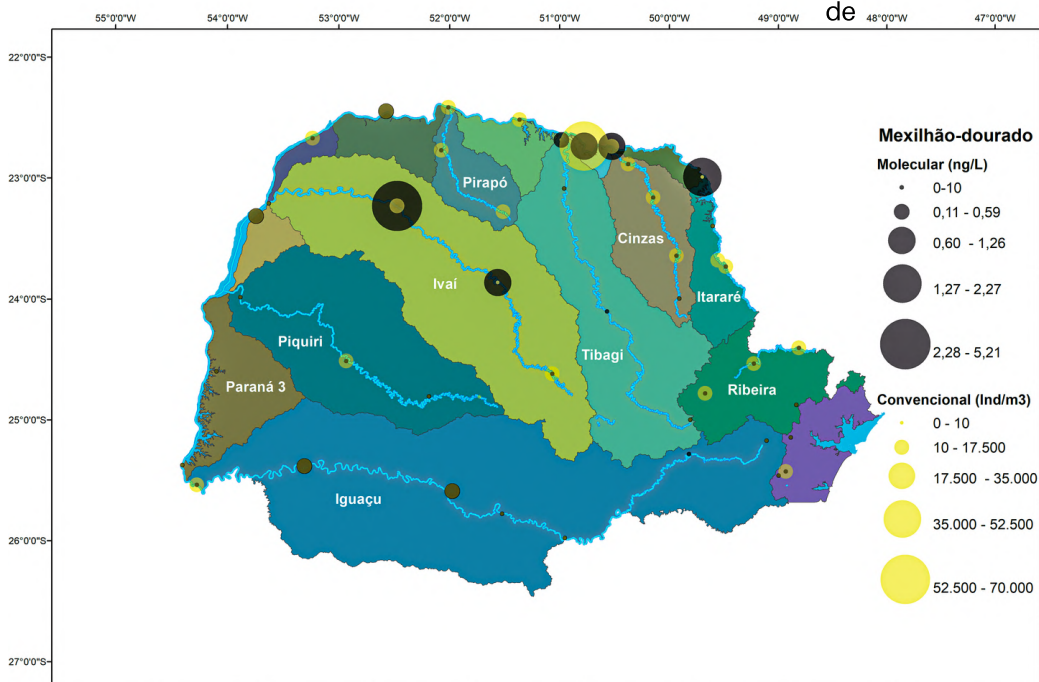


Figura 4. Mexilhão-dourado: resultados qualitativos obtidos através dos métodos molecular e convencional nos 40 pontos amostrais comparados.

Tabela 3. Mexilhão-dourado. Avaliação comparativa dos resultados quantitativos obtidos através do método molecular e convencional.

Parâmetro	Número	%
Total de análises coincidentes	40	100
Resultados semelhantes	20	50
Molecular maior que o convencional	5	12,5
Molecular menor que o Convencional	15	37,5
Resultados explicáveis	25	62,5
Diferenças não explicáveis	15	37,5

Pois bem, sabemos que o método quantitativo desenvolvido é uma grande evolução, tanto em resolução como em precisão, em relação ao método molecular qualitativo que nosso próprio grupo de pesquisa havia desenvolvido em 2006. Sabemos que o método molecular funciona e que é muito eficiente. Sabemos que ele é mais sensível que o método convencional. Sabemos que ele envolve análises muitas vezes mais rápidas que as possibilitadas pelo método convencional. Sabemos que não precisamos ser especialistas em mexilhão, corbícula, esponja ou hidrozoário para aplicá-lo. Sabemos que ele não é ainda (embora quase seja) um produto cabeça série. Não sabemos exatamente contra quais inibidores da reação de PCR que estamos lutando e talvez não tenhamos conseguido neutralizá-los integralmente. Sabemos que estamos apenas engatinhando no conhecimento e na interpretação do DNA ambiental e que o caminho é longo e desafiador. Sabemos que ainda precisamos de mais pesquisas para que o método molecular possa ser indiscriminadamente utilizado em qualquer ambiente aquático, sob qualquer condição ambiental...

Mas, acima de tudo, **sabemos que o que fazemos é ciência e não onisciência** e que, em relação ao nosso trabalho, 2062 é logo ali. Estamos chegando!

Os invasores descobertos

O DNA ambiental revela a mais nítida fotografia das espécies invasoras incrustantes já registrada no estado do Paraná

Dr. Antonio Ostrensky

A meta principal do trabalho realizado nesse projeto de P&D era chegar, ao final de três anos, tendo desenvolvido ferramentas analíticas, baseadas em genética ambiental, devidamente testadas e validadas, para o monitoramento das principais espécies invasoras incrustantes de água doce do estado do Paraná.

Desde o início do projeto, três das espécies-alvo já eram conhecidas: o mexilhão-dourado (*Limnoperna fortunei*), um outro molusco (*Corbicula fluminea*) e um hidrozóario (*Cordylophora caspia*). Os estudos, porém, revelaram que chegar à verdadeira identidade dessas duas últimas espécies poderia ser um pouco mais complexo do que esperávamos.

Os marcadores moleculares desenvolvidos a partir de dados disponíveis em um banco de dados genético global (o GenBank) apontaram uma série de incompatibilidades com os dados que eram coletados no ambiente. Mais especificamente, é bastante provável que haja mais de uma espécie de cada gênero já presente nos rios e reservatórios paranaenses. Como o que realmente importa para as companhias geradoras de energia hidrelétrica é o fato de que, independentemente da identificação da espécie, esses organismos são igualmente incrustantes, decidimos então não trabalhar em nível de específico, mas sim de gênero (*Corbicula* sp. e *Cordylophora* sp.).

Em pouco tempo, e respaldados pela experiência adquirida ao longo do projeto, refizemos os estudos e, bingo (!), os resultados apareceram.

Quase no final do projeto, durante uma reunião com os técnicos responsáveis pela manutenção da UHE José Richa, fomos apresentados a algumas imagens de um provável quarto organismo invasor, que fora detectado em grande concentração nas grades da tomada d'água da usina. Mais uma vez, voltamos à bancada do laboratório para, primeiro, descobrir com que tipo de organismo estávamos lidando e, em seguida, qual era a espécie. Com a ajuda de um especialista (o Dr. Ulisses Pinheiro, da Universidade Federal de Pernambuco), descobrimos que se tratava de uma esponja de água doce, *Corvospongilla sekti*.

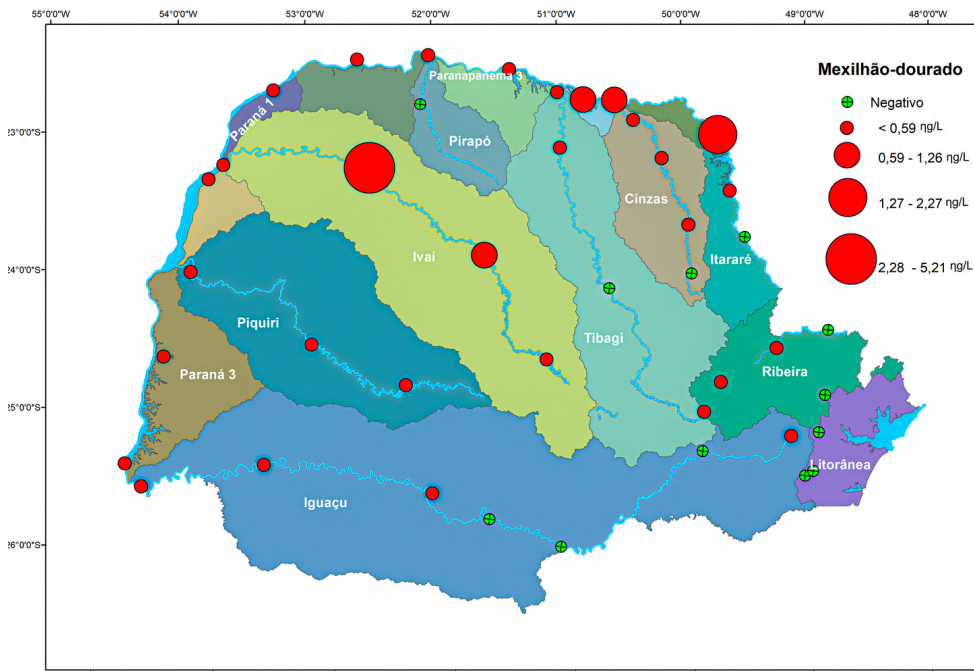
Em um tempo recorde, conseguimos desenvolver, testar e validar marcadores moleculares também para esse quarto organismo.

Assim, a meta traçada estava totalmente atingida. Faltava agora aplicar os métodos analíticos em condições de campo.

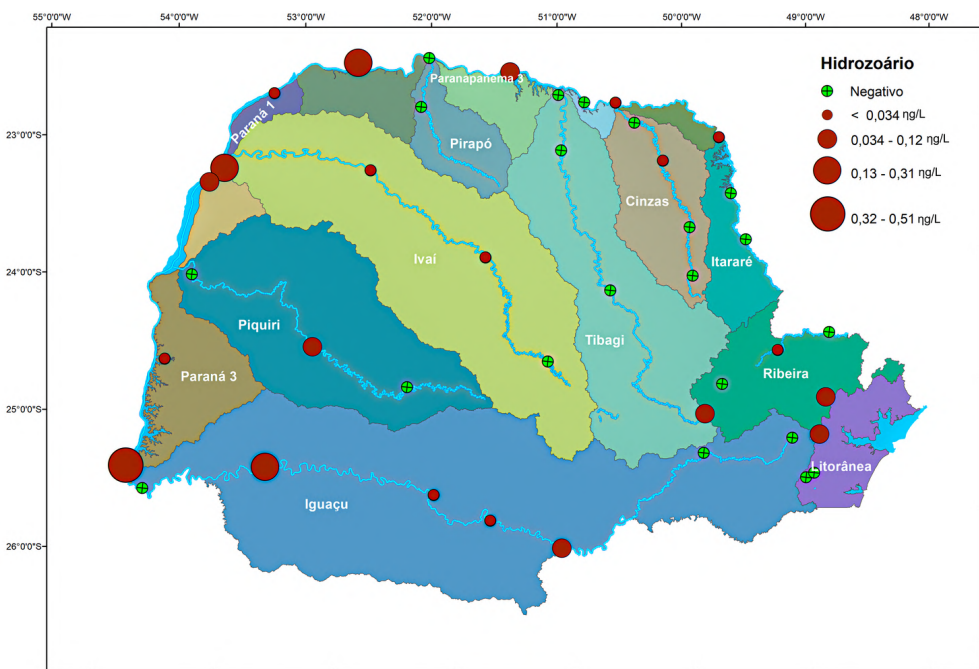
Decidimos então testá-los em todas as 16 principais bacias hidrográficas paranaenses (Litorânea, Iguaçu, Paraná 1, 2 e 3, Parapanema 1, 2, 3 e 4, Piquiri, Ivaí, Pirapó, Tibagi, Cinzas e Itararé) e enfrentamos então mais um problema. Os marcadores funcionavam perfeitamente em condições de laboratório, mas havia algo inibindo as análises em vários pontos amostrais. Tivemos que voltar à bancada e estudar métodos para evitar a inibição da reação de PCR. Vários testes foram realizados e, ao final, em apenas três dos 45 pontos amostrais não conseguimos reverter integralmente esse problema. Ou seja, os métodos funcionaram perfeitamente em quase 95% dos casos testados, um inequívoco atestado de sucesso, ainda que nos aprofundaremos nesse tema para chegarmos a 100% de eficiência em métodos que poderão revolucionar a forma de se promover estudos de monitoramento ambiental.



As análises de DNA ambiental possibilitaram o painel mais completo já feito até hoje sobre a bioinvasão dos ambientes límnicos do estado do Paraná por organismos incrustantes. Os resultados mostram um padrão de bioinvasão de oeste para leste e que a região metropolitana de Curitiba encontra-se em risco eminente de colonização pelas quatro espécies estudadas.

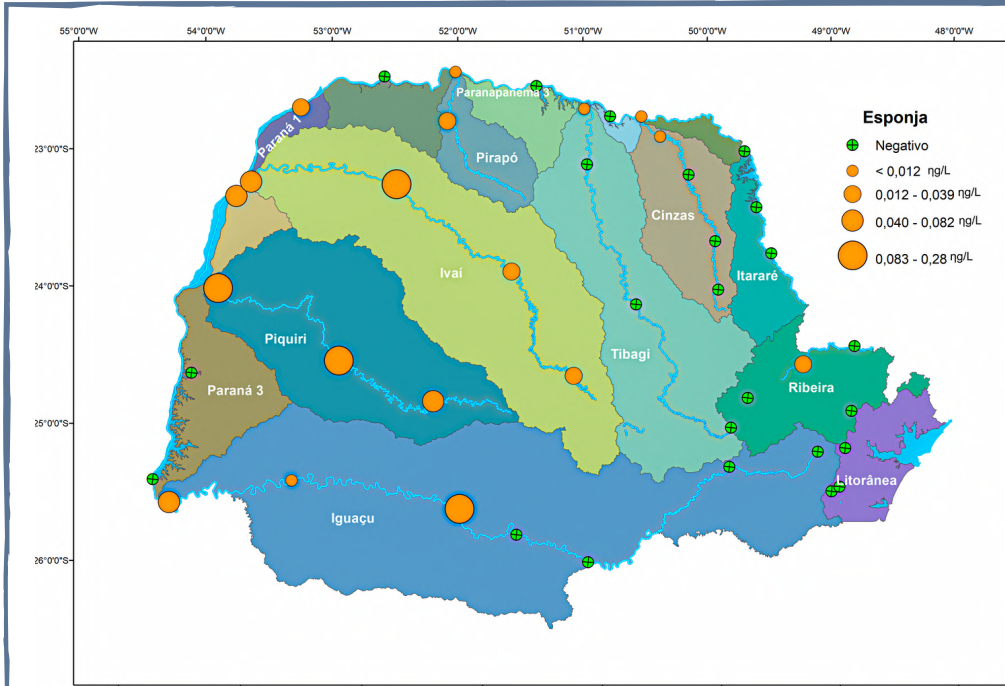


O **mexilhão-dourado** está presente em todas as bacias hidrográficas paranaenses, com exceção da bacia Litorânea. Ele foi identificado em 70% dos pontos amostrais e foi também a espécie que apresentou as maiores concentrações de DNA ambiental, que chegaram a quase cinco vezes da segunda mais abundante, a *Corbicula* sp. Embora a usina de Salto-Caxias seja a que enfrente os maiores problemas causados pela espécie, é na região noroeste do estado (bacia do rio Ivai) e Norte (bacia do Paranapanema), que as maiores concentrações de eDNA foram identificadas. A espécie já é encontrada próxima à Curitiba e poderá a se transformar em um problema sério para a SANEPAR e para diversos setores industriais que captam água bruta superficial.

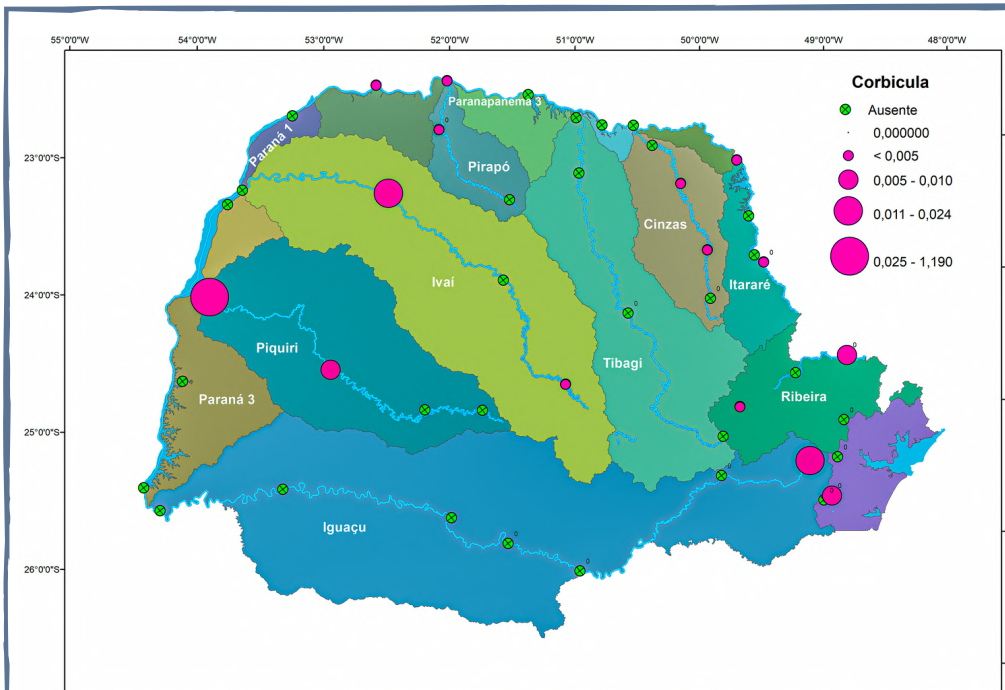


O **hidrozoário** estabelece relações ecológicas muito próximas com o mexilhão-dourado, facilitando a sua colonização em novos ambientes. Por isso, ele é particularmente prejudicial aos sistemas hidráulicos incrustados. Embora sua presença tenha sido confirmada em um número menor de pontos amostrais que o mexilhão, a *Cordylophora* esteve presente em todas as bacias hidrográficas do estado. Outro dado que chama a atenção é que a concentração máxima de DNA ambiental do hidrozoário foi apenas um décimo da concentração máxima quantificada de mexilhão-dourado.

Os métodos de análise baseados em DNA ambiental são de tal ordem sensíveis que no caso da corbícula a sua detecção ocorreu mesmo em concentrações inferiores a 0,005 ng de DNA por litro de água. Um (1) nanograma corresponde a 0,00000001g e equivale ao peso de uma única entre as cerca de 100 trilhões de células que nosso corpo possui. Equivale ainda ao peso de uma fatia de um grão de arroz dividido em 25 milhões de partes iguais.



A **esponja** foi detectada em 45% dos pontos amostrais, não estando presente apenas nas bacias do Itararé e Litorânea. Também foram os organismos detectados em menor concentração entre as quatro espécies investigadas. Mas, considerando que a própria identificação como um potencial problema à operação da UHE José Richa só aconteceu em 2019, pode-se supor que a espécie esteja em processo de expansão. Seus eventuais impactos e mecanismos de controle são ainda desconhecidos, de forma que o monitoramento da espécie em reservatórios é recomendado.



Embora encontrada em apenas 37,5% dos pontos amostrais monitorados, a concentração máxima de DNA de **corbícula** foi superior à concentrações máximas quantificadas para o hidrozóario e para a esponja. Além de não estar presente na grande maioria dos locais monitorados, esse organismo invasor é o que menos afeta a operação das usinas hidrelétricas, posto que sua fase incrustante é temporária e ocorre logo após o assentamento das larvas.

O PROJETO DE P&D EM NÚMEROS E RESULTADOS

No início, o projeto tinha como alvo a identificação dos principais organismos aquáticos invasores que afetam a operação de UHEs operadas pela COPEL no PR e o desenvolvimento de marcadores moleculares de segunda geração, baseados na tecnologia de DNA ambiental, para monitoramento quali-quantitativo desses organismos em reservatórios, mas os números mostram que fomos além.




35 CAMPANHAS DE CAMPO

Realizadas ao longo de 36 meses de projetos.



42.640 KM

percorridos pela equipe de campo. O equivalente a irmos e voltarmos de carro de Curitiba até Fairbanks, no Alasca.



16 BACIAS HIDROGRÁFICAS MONITORADAS

Foram coletadas amostras em todas as principais bacias hidrográficas paranaenses.



1.650 ANÁLISES GENÉTICAS

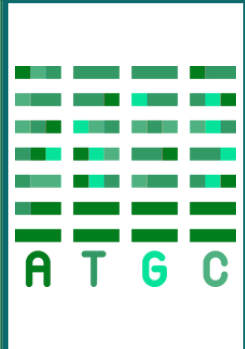
realizadas durante a execução de experimentos e ao longo do processo de desenvolvimento e validação da metodologia.

4 POSSÍVEIS DEPÓSITOS DE PATENTES

Uma para cada espécie estudada e método desenvolvido.


1 STARTUP CRIADA E INCUBADA

A ATGC - Genética Ambiental Ltda. foi criada no âmbito do projeto e incubada na UFPR.




METÓDOS ANALÍTICOS DESENVOLVIDOS

- Metodologia de coleta, preparação, transporte e análise de amostras de água contendo o DNA ambiental de espécies aquáticas;
- Métodos de detecção e quantificação de 4 espécies aquáticas invasoras incrustantes;
- Identificação específica de uma esponja incrustante, presente no reservatório da UHE Governador José Richa, com alto potencial para causar danos operacionais.



12 POSSÍVEIS PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

- 1 artigo já aceito para publicação
- 4 artigos já submetidos à publicação em revistas científicas internacionais;
- Pelo menos mais 7 artigos científicos em preparação.



4 TESES E DISSERTAÇÕES

- Uma dissertação de mestrado concluída;
- Uma tese de doutorado em conclusão;
- Duas teses de doutorado em desenvolvimento;

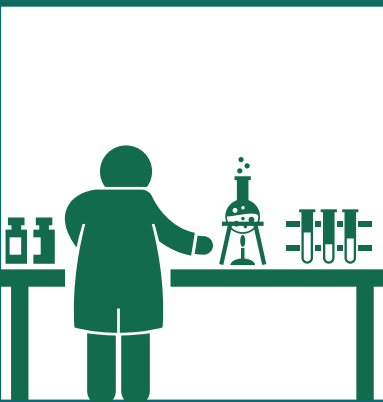
4 ESPÉCIES INCRUSTANTES ESTUDADAS

- *Limnoperna fortunei*
- *Corbicula* sp.
- *Corvospongilla seckti*
- *Cordylophora* sp.



18 PESQUISADORES MULTIDISCIPLINARES ENVOLVIDOS

- 1 Oceanógrafo
- 1 Engenheira química
- 1 Tecnóloga em aquicultura
- 3 Zootecnistas
- 2 Engenheiras de pesca
- 2 Médicos veterinários
- 8 Biólogos



UMA SOPA DE LETRINHAS

Os processos de amplificação de ácidos nucleicos envolvem uma série de termos que, embora, guardem semelhanças de significado entre si, indicam coisas distintas:

- **PCR** = Polimerase Chain Reaction (reação em cadeia da polimerase).
- **qPCR** = Quantitative PCR (PCR quantitativa, em tempo real).
- **RT-PCR** ou **rtPCR** = Reverse Transcriptase PCR (PCR com uma etapa que usa a transcriptase reversa para transformar RNA viral em cDNA).
- **RT-qPCR** = Reverse Transcriptase Quantitative PCR (PCR quantitativa com transcriptase reversa)



O termo *“real time”* refere-se ao fato de que podemos acompanhar o progresso da amplificação em tempo real pelo computador. Mas, o que realmente faz a diferença dessa PCR é que ela indica a quantidade inicial de RNA/DNA presente na amostra, daí o termo *“quantitativa”*.

PCR X LAMP

O **GIA**, em parceria com a **ATGC**, pretendem ampliar o leque de possibilidades analíticas para oferecer aos seus parceiros e clientes através da amplificação isotérmica mediada por loop (Loop-mediated isothermal amplification - LAMP). A técnica LAMP é uma variação da PCR convencional. Ela utiliza enzimas que permitem amplificação isotérmica, apresenta alta especificidade, sensibilidade, rapidez e custo reduzido, podendo ser utilizada em análises de eDNA, mesmo em campo, pois dispensa o uso de uma série de equipamentos complexos e caros. Esse será nosso próximo passo no estudo de espécies aquáticas invasoras.

PCR

- Processo envolve três passos.
- A amplificação envolve variação de temperatura em cada passo: entre 48 e 72 °C.
- A temperatura variável e específica para cada fase requer o uso de equipamentos especializados e caros.

RT-LAMP

- Processo envolve um só passo.
- A amplificação acontece em temperatura constante: 60-65 °C.
- A temperatura constante permite a simplificação de processos e de equipamentos.



CERTIFICAÇÃO

A **ATGC**, em incubação nos laboratórios do **GIA**, está passando pelo processo de certificação pela norma ABNT NBR ISO/IEC 17025 - *Requisitos Gerais para Competência de Laboratórios de Ensaio e Calibração*. Referência mundial, essa norma possibilita que os laboratórios produzam resultados altamente confiáveis e, dessa forma, demonstrem que são tecnicamente competentes. A norma estabelece uma base para aumentar a eficácia do sistema de gestão, alcançar melhores resultados e prevenir efeitos negativos. Por fim, facilita a aceitação de resultados entre países.

PARCERIAS COM O SETOR ELÉTRICO



Após o início do projeto com a **COPEL** o **GIA** e a **ATGC** fecharam parceria com a **Engie** e a **Itaipu**, em uma evidente demonstração de que as ferramentas genéticas moleculares interessam ao setor elétrico como um todo.

NOVO LABORATÓRIO



Graças à parceria entre o **GIA** e **ATGC**, um novo laboratório de Genética Ambiental está sendo construído. Ele terá três vezes a área do laboratório atual e é apenas mais um dos legados que parceria deixará para a **UFPR**.

O FUTURO DO DNA AMBIENTAL

DR. MARCIO R. PIE

Para leigos, a tecnologia do DNA ambiental (eDNA) pode soar como ficção científica. Afinal, desde a época dos grandes naturalistas dos séculos XVIII e XIX, os métodos mais comuns para detectar e monitorar organismos como peixes, aves, plantas e insetos envolviam um árduo trabalho de campo, utilizando armadilhas, avistamentos, ou vestígios como pegadas e fezes.

Apesar de importantes inovações, que vieram depois, como armadilhas fotográficas, o acúmulo de informações sobre a presença de diferentes organismos ainda permanecia um processo lento, caro e relativamente impreciso. Em particular, nos métodos tradicionais há a necessidade de profissionais treinados e altamente especializados para saber como coletar os organismos de interesse e identificá-los. Por exemplo, em diferentes tipos de insetos comumente é necessária a expertise de um taxonomista para cada família (em alguns casos, cada subfamília!), um pesquisador interessado em felídeos normalmente não é capaz de identificar morcegos, e assim por diante.

E foi nesse contexto que o advento do eDNA representou um avanço substancial em relação às abordagens anteriores. Com o desenvolvimento e aprimoramento dos protocolos de sequenciamento de DNA, tornou-se possível o uso da amplificação de eDNA para monitorar espécies invasoras ou ameaçadas, além de permitir o monitoramento de faunas inteiras pelo uso de métodos de sequenciamento de nova geração.

A primeira área na qual avanços são esperados é a chamada "ecologia do eDNA": o entendimento dos mecanismos de liberação, dispersão e degradação de eDNA. Uma vez liberadas pelos seus organismos respectivos, as partículas contendo eDNA imediatamente começam a se dispersar pelo meio onde eles vivem.

A velocidade dessa dispersão depende do tipo de ambiente (ex. terrestre/aquático, marinho/dulcícola, lótico/léntico) e da velocidade de sua degradação. Entender a dinâmica desses mecanismos é fundamental para melhor mapear os organismos que estão sendo estudados.

Por exemplo, se uma molécula de DNA é liberada em um ambiente léntico cujas características físicas, químicas e biológicas favorecem a sua degradação, uma amostra de água para o sequenciamento de eDNA representará uma condição consideravelmente pontual, não sendo representativa de regiões próximas ou da fauna que estava presente semanas antes, mas não está presente atualmente.

Por outro lado, em um ambiente lótico e em condições sob as quais o DNA se degrada mais lentamente (ex.: locais com temperatura mais baixa da água), há a oportunidade para o DNA se dispersar por uma grande área a partir do ponto onde foi inicialmente liberada.

Nestas condições, uma amostra de eDNA seria representativa da composição das espécies presentes ao longo de uma escala muito maior no tempo e no espaço. Assim, ainda se conhece pouco sobre a ecologia do eDNA, particularmente em ambientes tropicais/subtropicais. Será preciso estudos de campo e laboratório para isolar e quantificar o efeito da degradação e da dispersão para melhor interpretar os resultados de amostragens de eDNA.



Uma segunda área em que se espera um grande avanço nas próximas décadas é a portabilidade dos equipamentos. Assim como muitas áreas relacionadas à computação, os equipamentos de sequenciamento têm se tornado cada vez mais potentes e miniaturizados. Em particular, a tecnologia de nanoporos permite o sequenciamento de larga escala de DNA em um equipamento menor que um telefone celular. Com isso, brevemente será possível obter resultados diretamente no campo, em uma escala correspondente à uma fração do tempo atual de processamento e amplificação das amostras. Ao combinar a portabilidade do sequenciamento de DNA com tecnologias de transmissão remotas de dados (4G/5G) e uma maior capacidade computacional, há a perspectiva no futuro próximo de monitoramento remoto e em tempo real.

A terceira área em que avanços são esperados será a otimização do uso em larga escala de sequenciamento. Por exemplo, o equipamento de sequenciamento de maior escala atualmente, o NextSeq 2000 da empresa Illumina, é capaz de gerar em uma única corrida 330 giga bases em 48 horas. Para que se tenha uma perspectiva do quão astronômico é este número, um genoma humano tem 3 giga bases e levou 20 anos para ser sequenciado. Esta escala de geração de dados genéticos essencialmente eliminou um gargalo importante na geração de dados e permitirá custos cada vez menores de sequenciamento.

Em consequência, as outras etapas de obtenção e preparação de amostras por sua vez tornaram-se atualmente os passos onde esforços devem ser concentrados para se tirar proveito dos avanços no sequenciamento.

Em particular, protocolos mais simples, rápidos e baratos e a automatização na coleta e preparação laboratorial de amostras (ex. robôs de pipetagem) poderão aumentar consideravelmente a escala possível de implementação de amostragem de eDNA.

Em suma, a tecnologia de eDNA já é uma realidade em estudos de manejo e conservação de fauna e flora e na detecção de espécies invasoras e patógenos. Contudo, está claro que ainda estamos arranhando a superfície do potencial dessa metodologia, particularmente no seu uso em larga escala.

Sequenciador portátil MinION, utilizando a tecnologia inovadora da Oxford Nanopore Technologies. Estudos em andamento pela ATGC estão buscando adaptar essa tecnologia para o estudo de eDNA no Brasil.

Avanços como esse, reduzindo tempo e custos, provavelmente serão comuns nos próximos anos. Uma analogia pode ser útil para entender esse potencial.

Ao contrário do que comumente se acredita, o empresário norte-americano Henry Ford não inventou a linha de montagem. Ao contrário, praticamente todos os elementos necessários para a construção do "Model T", o seu famoso automóvel, já eram conhecidos desde 1908. Contudo, em 1913, Henry Ford introduziu a linha de montagem móvel através de esteiras. Somente esse avanço fez com que um carro que antes levaria 12 h para ser construído agora pudesse ser montado em apenas 1h e 33 min.

Além do DNA, o RNA...

USO DA TÉCNICA DE eDNA PARA DETECTAR E MONITORAR PATÓGENOS VIRAIS

MSc. Camila Tavares



O GIA

também está explorando a técnica de DNA ambiental (eDNA) para detectar e monitorar a prevalência de patógenos virais de RNA, que causam mortalidade em crustáceos de interesse comercial, como os siris-azuis.



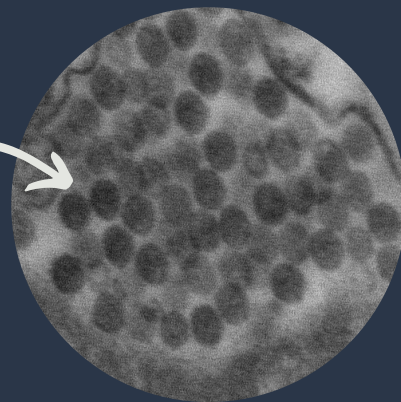
PRINCIPAIS AÇÕES

O GIA realiza o rastreamento da presença de vírus em amostras ambientais de água marinha ao longo da costa brasileira, por meio do desenvolvimento de um sistema altamente sensível de ensaios através de PCR em tempo real (RT-qPCR).

SOLUÇÕES DESENVOLVIDAS

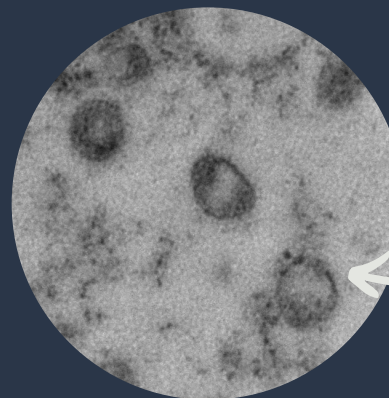
O conhecimento gerado servirá para o melhor entendimento da prevalência natural de vírus letais de siris no Brasil. Além disso, o estudo também deverá gerar subsídios relevantes para o desenvolvimento de estratégias de manejo, pesca e cultivo sustentável do siri-azul.

CsRV2



Um dos principais vírus rastreados pelo GIA é o *Callinectes sapidus* Reovirus 2 (CsRV2). O CsRV2 é um vírus de dupla fita de RNA, pertencente a família Reoviridae. O reovírus foi recentemente identificado pela nossa equipe em alta prevalência (78%) em siris da espécie *Callinectes danae*.

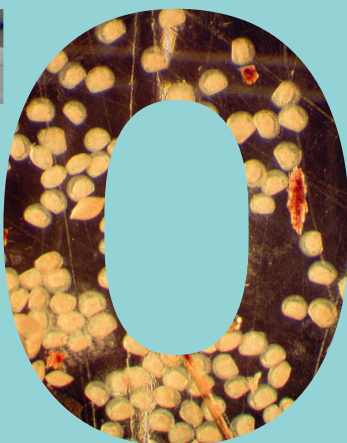
CdPBV1



Recentemente, outro vírus foi descoberto e tem sido rastreado pela nossa equipe: o *Callinectes danae* Portunibunyavirus 1 (CdPBV1). O CdPBV1 é um vírus de fita simples de RNA, pertencente família Cruliviridae. Nos experimentos em laboratório, a infecção por CsRV2 e CdPBV1 causou mortalidade de até 70% dos siris em apenas duas semanas.



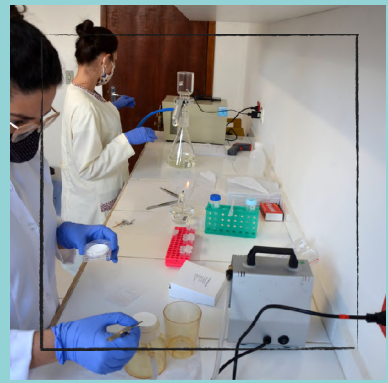
O PROJETO EM



Coletas em rios e reservatórios

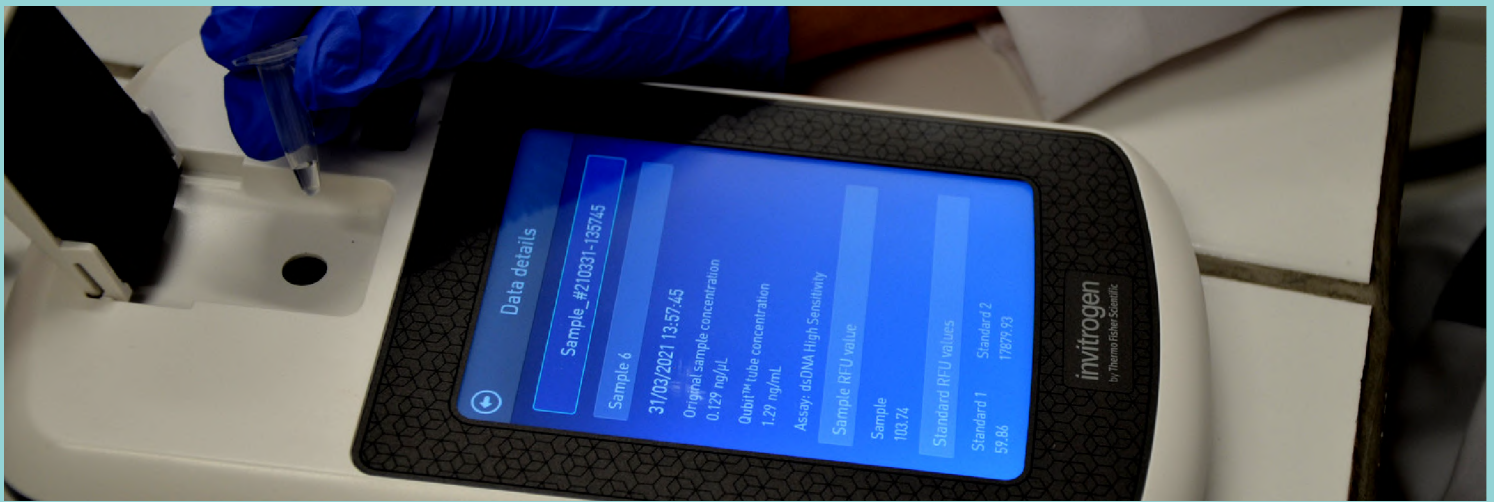


Experimentos em laboratório

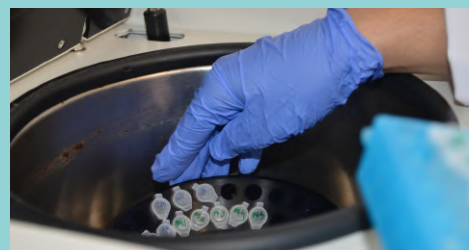
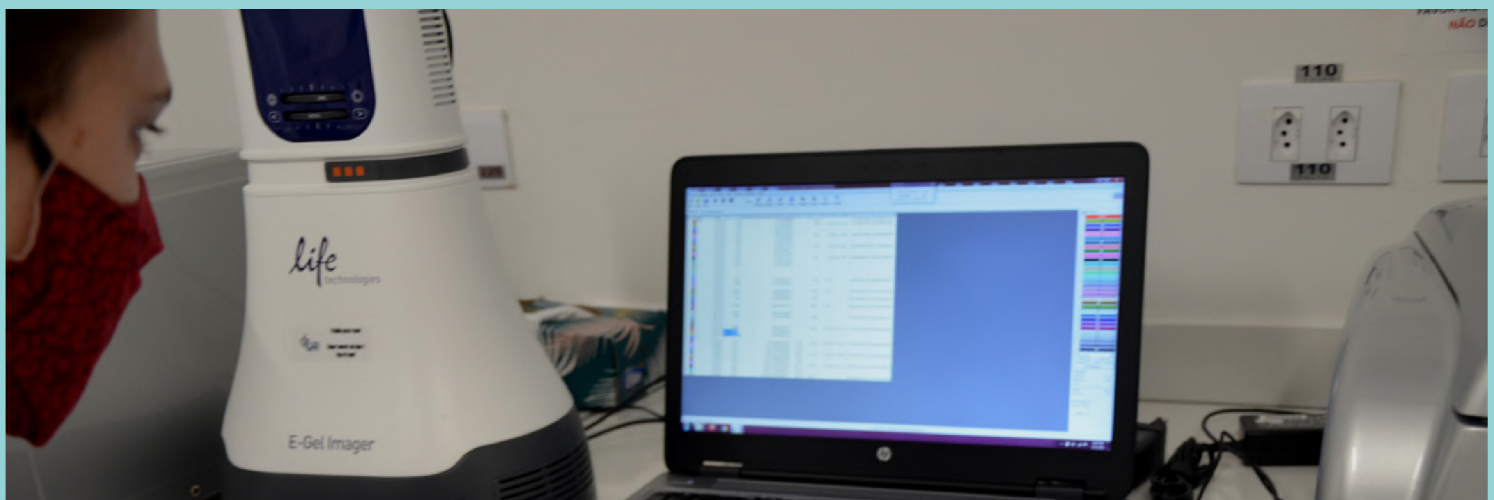




Experimentos em campo



Análises em laboratório





ALINE HORODESKY

Bióloga, mestre e doutora em Zoologia. É uma das sócias da ATGC - Genética Ambiental Ltda. Foi responsável pela coordenação de equipes e pelas atividades de campo.



ANA HELENA ROHLING

Graduada em Administração atuou na gestão administrativa e financeira da Aliança - Prestadora de Serviços Ltda.



ANA PAULA S. BERTÃO

Engenheira de Pesca, com mestrado em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca. Doutoranda em Zootecnia, realizou experimentos de campo e laboratório.



ANDRÉ O. AGOSTINIS

Biólogo e mestre em Zoologia, Ecologia Molecular, participou das atividades relacionadas ao sequenciamento de DNA de próxima geração e aos marcadores moleculares.



ANTONIO OSTRENSKY

Oceanólogo, mestre e doutor em Zoologia, é professor titular da UFPR. Atuou como coordenador geral do projeto pelas instituições executoras e como interlocutor junto à Copel.



CAMILA DUARTE RITTER

Bióloga, mestre em Biologia e doutora em Ciências Biológicas e Ambientais. Foi a última integrante a se juntar à equipe e contribuiu com sua experiência em biologia molecular.



CAMILA P. S. TAVARES

Tecnóloga em Aquicultura, mestre e doutora em Zoologia. Desenvolveu sua tese de doutorado em paralelo ao projeto e integrou a equipe do GIA/Aliança.



DÉBORA PESTANA

Bióloga, mestre e doutora em Zoologia, especialista em espécies invasoras. Foi responsável pelas análises quantitativas de larvas de mexilhão-dourado pelo método convencional.



FABRÍCIO S. VIDAL

Biólogo, mestre e doutorando em Zootecnia, desenvolve sua tese baseada na realização de experimentos com eDNA em sistemas de mesocosmos.



GIORGI DAL PONT

Zootecnista, mestre em Ciências Veterinárias e doutor em Zootecnia, coordenou as atividades e a equipe de laboratório. Sua atuação foi fundamental para o sucesso do projeto.



MARCIO ROBERTO PIE

Biólogo, mestre em Ecologia e doutor em Ecologia, Comportamento e Evolução, professor da UFPR. Coordenou as atividades relacionadas aos conceitos e métodos de biologia molecular.



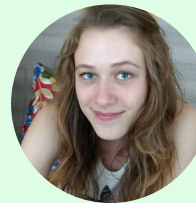
NATHIELI COZER

Engenheira de Pesca, mestre em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca e doutora em Zootecnia. Foi responsável por toda a logística e gestão administrativa e financeira do projeto.



OTTO S. MÄDER NETTO

Engenheiro Químico, mestre em Engenharia e Ciência dos Materiais. Sócio proprietário da ATGC. Atuou como responsável pela Aliança e participou em experimentos e atividades de campo.



PAULA VALESKA STICA

Bióloga com vasto conhecimento em biologia molecular, teve um papel fundamental na adequação dos métodos analíticos e na realização das análises laboratoriais.



RAÍSSA V. VIEIRA LEITE

Bióloga, realizou seu mestrado e agora o doutorado tendo como base experimentos utilizando eDNA em condições laboratoriais. Participou também das atividades de campo.



THIAGO LUIS ZANIN

Engenheiro e mestre em Engenharia Química, é funcionário da Copel. Atuou, com grande equilíbrio e habilidade, como gestor do contrato e fiscal do projeto.



ULISSES PINHEIRO

Biólogo, mestre e doutor em Zoologia, é professor da Universidade Federal de Pernambuco. Foi o responsável pela identificação da *esponja Corvospongilla sekti*.

