

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO

LEONARDO WILLIAN GONÇALVES FERREIRA OLÍMPIO

**DETECÇÃO DE *Alouatta belzebul* POR DNA AMBIENTAL E DNA
DERIVADO DE INVERTEBRADOS NO CENTRO DE ENDEMISMO
PERNAMBUCO**

SÃO CARLOS - SP
2024

LEONARDO WILLIAN GONÇALVES FERREIRA OLÍMPIO

**DETECÇÃO DE *Alouatta belzebul* POR DNA AMBIENTAL E DNA DERIVADO DE
INVERTEBRADOS NO CENTRO DE ENDEMISMO PERNAMBUCO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, da Universidade Federal de São Carlos, para obtenção do título de mestre em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

Área de concentração: Genética e Evolução

Orientadora: Prof.^a Dra. Patrícia Domingues de Freitas

São Carlos - SP
2024

Olímpio, Leonardo Willian Gonçalves Ferreira

Detecção de Alouatta belzebul por DNA ambiental e DNA derivado de invertebrados no Centro de Endemismo Pernambuco / Leonardo Willian Gonçalves Ferreira Olímpio -- 2024.
96f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, campus São Carlos, São Carlos
Orientador (a): Patrícia Domingues de Freitas
Banca Examinadora: Mercival Roberto Francisco, Sônia Cristina da Silva Andrade
Bibliografia

1. Fragmentação de habitat . 2. Genética da conservação . 3. Modelagem de distribuição de espécies. I. Olímpio, Leonardo Willian Gonçalves Ferreira. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática (SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Arildo Martins - CRB/8 7180



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Leonardo Willian Gonçalves Ferreira Olímpio, realizada em 28/08/2024.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Patrícia Domingues de Freitas (UFSCar)

Prof. Dr. Mercival Roberto Francisco (UFSCar)

Profa. Dra. Sônia Cristina da Silva Andrade (USP)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

AGRADECIMENTO

Primeiramente, agradeço a minha orientadora Prof.^a Dra. Patrícia Domingues de Freitas pela confiança e persistência desde meu primeiro contato, ainda durante a pandemia, até o momento de finalização desse ciclo. Agradeço por me guiar, me desafiar e me tornar o profissional que sou hoje.

Agradeço aos meus amigos e parceiros de trabalho do LabBMC (Laboratório de Biodiversidade Molecular e Conservação), que dividiram comigo pipetas, linhas de comando, risadas, almoços e muitas reclamações. Dr. Bruno H. Saranholi, obrigado por guiar com toda paciência e didática cada passo do meu trabalho. Dra. Carla C. Gestich, agradeço por me ouvir e me guiar de maneira profissional e pessoal. Anderson P. Coimbra, obrigado pela parceria desde a campanha de campo até a 6h em Interlagos. Ma. Nathalia Bulhões Javarotti, obrigado por tudo, tudo mesmo, desde os e-mails e aulas em Rio Claro, até as enormes viagens para congressos, não sei como teriam sido esses dois anos sem sua presença ali do meu ladinho na salinha de estudos. Dra. Marina E. de Oliveira e Dra. Camila F. Gonçalves, agradeço por sempre estarem dispostas a ajudar com o que pudessem e sempre estarem disponíveis para nos ouvir e aconselhar.

Agradeço ao Prof. Dr. Pedro M. Galetti Junior pelo apoio e interesse no meu trabalho e minha formação.

Quero agradecer aos meus parceiros do CPB-ICMBio, Dr. Leandro Jerusalinsky, Dra. Mônica M. Valença-Montenegro, Dra. Amely M. Branquinho, pela confiança e por viabilizarem e nos apoiarem de perto não só na campanha à campo, mas também em todo o processo de geração de resultados.

Agradeço ao Dr. Thiago da C. Dias por possibilitar o desenvolvimento de todo um capítulo dessa dissertação, seu auxílio foi preponderante para que fosse possível gerar resultados importantes no tempo que tínhamos.

Agradeço às agências de fomento pelo financiamento concedido: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de mestrado (130862/2022-3), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do projeto temático “Avaliação, Recuperação e Conservação da Fauna Ameaçada de Extinção do Centro de Endemismo

Pernambuco” (ARCA-CEP, 2017/23548–2), coordenado pelo Prof. Dr. Luís Fábio Silveira, ao qual também agradeço.

Agradeço à Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e ao Programa de Pós-graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular (PPGGEv) pela oportunidade de realizar o mestrado.

Agradeço às instituições e empresas que viabilizaram as coletas no CEP: Usina Utinga-Leão, Usina Serra Grande, Açúcar Monte Alegre, Grupo Farias, Caeté Florestal, Açúcar e Álcool Japungu Agroindustrial, Associação de Plantadores de Cana da Paraíba, ESEC de Murici, ESEC do Pau-Brasil e REBIO Guaribas.

Obrigado aos membros da banca, Prof. Dr. Mercival Roberto Francisco e Prof.^a Dra. Sônia Cristina da Silva Andrade, pela disponibilidade em contribuir com esse trabalho.

Quero agradecer a uma grande amiga, Ma. Maria Catarina de Alencar, desde a graduação sempre fez questão de se manter por perto, mesmo morando longe, esteve presente em toda essa jornada entre risadas, jogos e desesperos, obrigado por sempre estar comigo.

Por fim agradeço as peças mais importantes desse jogo, meus pais. Meu pai, José Olímpio Neto, por sempre incentivar minha curiosidade com nossas viagens a Minas Gerais e com os domingos assistindo Planeta Terra, obrigado pelas brincadeiras, brinquedos e músicas. Minha mãe Prof.^a Marlene Ferreira Pires, obrigado por me ensinar a sempre ser o melhor que eu puder, por me incentivar em todas as decisões que escolhi tomar, mas sempre me mantendo com os pés no chão da maneira mais responsável possível, obrigado por ser o meu porto seguro e meu farol. Tudo que conquistei até hoje devo a vocês, sei o quanto se sacrificam para que eu consiga alcançar meus sonhos, vocês são minha base e minha inspiração, obrigado por serem vocês.

“Há sempre algo para ver se apenas abrir seus olhos!”

Peter Grinwade, Doctor Who

RESUMO GERAL

A espécie *Alouatta belzebul*, conhecida como guariba-de-mãos-ruivas, espécie Vulnerável à extinção, ocorre na Amazônia e no Centro de Endemismo Pernambuco (CEP), trecho da Mata Atlântica altamente devastado, localizado ao norte da foz do rio São Francisco. A fragmentação do habitat é uma das principais ameaças à conservação deste primata, afetando sua distribuição e comportamento, como vocalização e movimentação. Um dos principais objetivos desta pesquisa foi validar métodos não invasivos para detecção da espécie em fragmentos florestais do CEP, localizados nos estados de Alagoas, Paraíba e Rio Grande do Norte, usando amostras de água e do conteúdo estomacal de moscas e mosquitos, através do emprego das abordagens de DNA ambiental (eDNA) e DNA derivado de invertebrados (iDNA), respectivamente. Além disso, uma análise de modelagem de distribuição de espécies (SDM) foi empregada para prever áreas potenciais de ocorrência da espécie, usando variáveis ambientais relevantes, como precipitação, temperatura e cobertura do solo. O uso combinado de tais metodologias se mostrou uma alternativa eficaz para identificar a espécie e prever áreas de sua ocorrência, contribuindo efetivamente para o monitoramento e conservação da espécie. Os resultados mostraram que o iDNA possibilitou a detecção de *A. belzebul* na área de estudo, revelando novas áreas de ocorrência da espécie em Alagoas e Pernambuco. As análises de modelagem indicaram que áreas com maior altura do dossel e cobertura arbórea são essenciais para a conservação da espécie. A relação entre a presença da espécie e variáveis ambientais destaca a importância da integridade do habitat para a sobrevivência de *A. belzebul*. Esses achados podem auxiliar a identificar áreas mais propícias à criação de corredores ecológicos e áreas críticas ou prioritárias para a conservação da espécie, contribuindo para apoiar políticas públicas voltadas a conservação da espécie no CEP. Desta forma, os resultados deste trabalho acrescentam não apenas informações relevantes sobre a distribuição atual e potencial de *A. belzebul* no CEP, mas se mostram úteis para orientar ações de manejo e monitoramento da espécie. Adicionalmente, o uso combinado de métodos alternativos de detecção de espécies, como eDNA e iDNA, com análises de modelagem de distribuição de espécies, empregado neste estudo, se constitui um modelo relevante que pode ser aplicado a outras espécies ameaçadas em regiões fragmentadas, similares à estudada. Este trabalho, portanto, avança não apenas no conhecimento sobre a distribuição e ecologia de *A. belzebul*, mas também fornece ferramentas práticas voltadas ao monitoramento e conservação da biodiversidade.

Palavras-chave: Fragmentação de habitat; Mata Atlântica, Genética da conservação; Modelagem de distribuição de espécies; Novas ocorrências.

ABSTRACT

The species *Alouatta belzebul*, known as the red-handed howler monkey, is classified as Vulnerable to extinction and occurs in the Amazon and the Pernambuco Endemism Center (PEC), a highly devastated segment of the Atlantic Forest located north of the São Francisco River mouth. Habitat fragmentation is one of the main threats to the conservation of this primate, affecting its distribution and behavior, such as vocalization and movement. One of the primary objectives of this research was to validate non-invasive methods for detecting the species in forest fragments of the PEC, located in the states of Alagoas, Paraíba, and Rio Grande do Norte, using water samples and the stomach content of flies and mosquitoes, through the employment of environmental DNA (eDNA) and invertebrate-derived DNA (iDNA) approaches, respectively. Additionally, a species distribution modeling (SDM) analysis was employed to predict potential occurrence areas of the species, using relevant environmental variables, such as precipitation, temperature, and land cover. The combined use of these methodologies proved to be an effective alternative for identifying the species and predicting its occurrence areas, contributing to the effective monitoring and conservation of the species. The results showed that iDNA enabled the detection of *A. belzebul* in the study area, revealing new areas of occurrence in Alagoas and Pernambuco. Modeling analyses indicated that areas with higher canopy height and tree cover are essential for the conservation of the species. The relationship between the species' presence and environmental variables highlights the importance of habitat integrity for the survival of *A. belzebul*. These findings can help identify areas most suitable for the creation of ecological corridors and critical or priority areas for the conservation of the species, supporting public policies aimed at the conservation of the species in the PEC. Thus, the results of this study not only add relevant information about the current and potential distribution of *A. belzebul* in the PEC but also prove useful for guiding management and monitoring actions for the species. Additionally, the combined use of alternative methods for species detection, such as eDNA and iDNA, with species distribution modeling analyses employed in this study constitutes a relevant model that can be applied to other threatened species in fragmented regions similar to the one studied. This work, therefore, advances not only the knowledge about the distribution and ecology of *A. belzebul* but also provides practical tools aimed at the monitoring and conservation of biodiversity.

Keyword: Habitat Fragmentation; Atlantic Forest; Conservation Genetics; Species Distribution Modeling; New records.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.1** - Espécime de *Alouatta belzebul*. Fonte: Alex Da Riva, CC BY-SA 3.0 <<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/>>, via Wikimedia Commons. 24
- Figura 1.2** - Mapa do Centro de Endemismo Pernambuco. Em cinza a área original coberta por vegetação e em verde os fragmentos florestais atuais que formar a vegetação do CEP. Pernambuco (PE), Rio Grande do Norte (RN), Paraíba (PR) e Alagoas (AL). Fonte: Modificado de Roda; Pereira; Albano, 2011. 24
- Figura 1.3** - Mapas das áreas e pontos de coleta de eDNA e iDNA no Rio Grande do Norte, Paraíba e Alagoas. A – RPPN Mata Estrela, B – Mata ASPLAN, C – ESEC do Pau Brasil, D – REBIO Guaribas, E – RPPN Fazenda Pacatuba, F – RPPN Engenho Gargaú, G – Mata Sucupira, H – Mata do Cedro. 29
- Figura 1.4** - Quantidade de *reads* geradas pelo sequenciamento *metabarcoding* e porcentagem de *reads* mantidas ao longo das etapas de processamento de dados e filtragem. Levando em consideração que os *contigs* são formados pela concatenação das *reads forward* e *reverse*, a partir da etapa de concatenação foram contabilizadas a quantidades de *reads* utilizadas para formar os *contigs* de forma a permitir a comparação da quantidade mantida com as *reads* originais geradas no sequenciamento *pairwise*. 33
- Figura 1.5** - Áreas do Centro de Endemismo Pernambuco (CEP, Brasil), nas quais foi detectada a presença de *Alouatta belzebul*, com a utilização de eDNA (água) e iDNA derivado de moscas e/ou mosquitos. 35
- Figura 1.6** - Comparação dos números de (A) detecções e de (B) *reads* geradas pelo sequenciamento. 39
- Figura 1.7** - Relações do número de áreas em que a espécie *Alouatta belzebul* foi detectada por (A) *mini-barcode*: 12SrRNA (12S) e 16SrRNA (16S) e por (B) amostrador: mosquitos e moscas. 39
- Figura 2.1** - Fluxograma de funcionamento do programa eDNAAnalyzer, evidenciando as principais ações do programa: o fluxograma à direita ilustra a primeira etapa do programa, aplicação do *threshold* à tabela de atribuição taxonômica e retirada das OTUs que não possuírem número de *reads* acima desse limite; à esquerda está ilustrado a segunda etapa de funcionamento do eDNAAnalyzer, mostra a entrada de dados com a tabela de táxons definitivos, escolhas dos filtros, denominação de amostradores, os dados serão analisados e filtrados de acordo com as opções escolhidas gerando as tabelas com o resultado definitivo. 52
- Figura 2.2** - Interface de interação com o usuário mostrando a opção de seleção de idioma do programa eDNAAnalyzer 53
- Figura 2.3** – Interface de interação com o usuário mostrando a opção de acesso ao manual de instruções e as duas principais tarefas executadas pelo programa eDNAAnalyzer..... 53

Figura 2.4 – Interface de interação com o usuário mostrando a opção de acesso à tarefa “processamento inicial e aplicação do <i>threshold</i> ” disponível no programa eDNAAnalyzer.....	55
Figura 2.5 - Interface de interação com o usuário mostrando a opção de acesso à tarefa “Processamento da inicial a aplicação do <i>threshold</i> ” indicando função de inserção de arquivo de entrada.....	56
Figura 2.6 - Interface de interação com o usuário mostrando o arquivo de entrada disponível para análise.	56
Figura 2.7 - Interface de interação com o usuário mostrando a opção de acesso à tarefa “Processamento da inicial a aplicação do <i>threshold</i> ” indicando caixa de texto para inserir <i>threshold</i>	56
Figura 2.8 - Tela do “Processamento da inicial a aplicação do <i>threshold</i> ” indicando botão para rodar a primeira etapa de processamento.	57
Figura 2.9 – Interface de interação com usuário indicando a opção “construção das tabelas de resultados consolidados” do programa eDNAAnalyzer.	58
Figura 2.10 - Interface de interação com usuário indicando a opção de inserção do arquivo de entrada para a tarefa “construção das tabelas de resultados consolidados”.	58
Figura 2.11 - Interface de interação com usuário indicando o arquivo de entrada carregado e a opção de filtros para seleção de dados de interesse no programa eDNAAnalyzer.....	59
Figura 2.12 - Interface de interação com usuário indicando a opção “Construção das tabelas de resultados consolidados” para seleção dos filtros de Amostrador, Área.	59
Figura 2.13 - Interface de interação com usuário indicando a opção “Construção das tabelas de resultados consolidados” para inserção da denominação dada aos amostradores no arquivo de entrada.	60
Figura 2.14 - Interface de interação com usuário indicando a opção “Construção das tabelas de resultados consolidados” para rodar esta tarefa no eDNAAnalyzer.	60
Figura 3.1 - Mapa de uso do solo do Centro de Endemismo Pernambuco.	70
Figura 3.2 - Matriz de correlação mostrando o valor do <i>r</i> de Pearson para as variáveis ambientais pré-definidas para as modelagens de distribuição de espécies.	79
Figura 3.3 - Avaliação por TSS dos modelos gerados por cada um dos algoritmos isoladamente e do modelo gerado pelo <i>ensemble</i> desses modelos. Linha pontilhada representa TSS = 0,8.....	80
Figura 3.4 - Importância média das variáveis ambientais para previsão da distribuição de <i>Alouatta belzebul</i> no Centro de Endemismo Pernambuco.	80
Figura 3.5 - Curvas resposta para a distribuição de <i>Alouatta belzebul</i> para a cada variável ambiental selecionada para a modelagem.....	81

Figura 3.6 - Mapas de probabilidade e mapa binário da modelagem da distribuição de <i>Alouatta belzebul</i> no Centro de Endemismo Pernambuco.	85
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 - Áreas de estudo do Centro de Endemismo Pernambuco (CEP), localizadas nos estados de Alagoas (AL), Paraíba (PB) e Rio Grande do Norte (RN), indicando o registro para presença ou ausência de <i>Alouatta belzebul</i> em estudos prévios, o método utilizado e o ano de registro. NA: área não avaliada previamente para ocorrência da espécie. ND: área avaliada em que a espécie não foi detectada.	27
Tabela 1.2 - Área em hectares e número de pontos de coletas de água e de armadilhas de mosquitos e de moscas por fragmento. * Tamanho de área aproximado, estimado usando o software de geoprocessamento QGIS.	28
Tabela 2.1 - Modelo de tabela de entrada em inglês para executar a tarefa inicial para estabelecimento do <i>threshold</i> e tabelas filtradas para este dado no eDNAlyzer.	54
Tabela 2.2 - Modelo de tabela de entrada em inglês para executar a tarefa final para estabelecimento das tabelas filtradas com os resultados consolidados no eDNAlyzer.	57
Tabela 3.1 - Ocorrência de <i>Alouatta belzebul</i> segundo a literatura e bancos de dados públicos.	71
Tabela 3.2 - Variáveis escolhidas para a modelagem de distribuição de espécie ...	75
Tabela 3.3 - Valores de VIF para as variáveis, VIF inicial e VIF final depois da remoção da variável com maior multicolinearidade.	79

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

µL – microlitro

12S – 12SrRNA

16S – 16SrRNA

ANN – *artificial neural networks*

ASPLAN - Associação de Plantadores de Cana da Paraíba

CDC – *Centers for Disease Control and Prevention*

CEP – Centro de Endemismo Pernambuco

CITES - Convenção sobre o Comércio Internacional de Espécies Ameaçadas de Fauna e Flora Silvestres

CTA – *classification and regression trees*

ddPCR – *droplet digital PCR*

DNIT - Departamento Nacional de Infraestrutura de Transportes do Brasil

dPCR – PCR digital

eDNA – DNA ambiental

EM – *ensemble modeling*

ESEC – Estação Ecológica

FDA – *flexible discriminant analysis*

GEE – Google Earth Engine

gHM – *Global Human Modification*

GLM – *generalized linear models*

ha – hectare

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

iDNA – DNA derivado de invertebrados

INPI – Instituto Nacional de Propriedade Industrial

IUCN – *International Union for Conservation of Nature and Natural Resources*

km – quilômetro

m – metro

MARS – *multivariate adaptative regression splines*

MB – MegaBytes

mg – miligrama

ml – mililitro

mm – milímetro

°C – graus Celsius

OTU – Unidade Taxonômica Operacional

PAN PRINE - Plano de Ação Nacional para Conservação de Primatas do Nordeste

pb – par de bases

PCR – *Polymerase chain reaction*

qPCR – *Quantitative polymerase chain reaction*

RF – *random forests*

RPPN – Reserva Particular do Patrimônio Natural

SALVE-ICMBio - Sistema de Avaliação do Risco de Extinção da Biodiversidade –

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

SDM – *Species distribution model*

SISBIO – Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

SRE – *surface range envelopes*

TSS – *True Skill Statistic*

TTT – TaxonTableTools

UC – Unidade de Conservação

VIF – Fator de Inflação de Variância

XGBOOST – *eXtreme Gradient Boosting Training*

SUMÁRIO

I INTRODUÇÃO GERAL	17
I.1 CONTEXTUALIZAÇÃO DA PROBLEMÁTICA	17
I.2 OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS E HIPÓTESE DE TRABALHO	19
II MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
CAPÍTULO 1 – NOVOS REGISTROS DE ÁREAS DE OCORRÊNCIA PARA <i>Alouatta belzebul</i> (Linnaeus, 1766) (GUARIBA-DE-MÃOS-RUIVAS) NO CENTRO DE ENDEMISMO PERNAMBUCO (CEP)	21
1.1 INTRODUÇÃO	22
1.2 MATERIAIS E MÉTODOS	26
1.2.1 Área de Estudo e Coleta das Amostras de eDNA e iDNA	26
1.2.2 Extração de DNA, Amplificação e Sequenciamento	29
1.2.3 Análise das Sequências e Atribuição Taxonômica	31
1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
1.3.1 Detecção de <i>Alouatta belzebul</i>	33
1.3.2 Comparação entre os <i>mini-barcodes</i> e entre os amostradores de iDNA	38
1.4 REFERÊNCIAS	41
CAPÍTULO 2 – eDNAlyzer: UMA FERRAMENTA RÁPIDA E AMIGÁVEL PARA O PROCESSAMENTO DE DADOS MASSIVOS DE ATRIBUIÇÃO TAXONÔMICA EM ESTUDOS DE DNA AMBIENTAL	48
2.1 INTRODUÇÃO	48
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS	50
2.3 RESULTADOS	53
2.3.1 Obtendo e Instalando o eDNAlyzer	53
2.3.2 Usando o eDNAlyzer	54
2.3.2.1 Processamento inicial e aplicação do <i>threshold</i>	54
2.3.2.2 Construção de tabelas de resultados consolidados	57

2.4 DISCUSSÃO	61
2.5 REFERÊNCIAS	63
CAPÍTULO 3 – MODELAGEM DE DISTRIBUIÇÃO DE ESPÉCIES PARA <i>Alouatta belzebul</i> NO CENTRO DE ENDEMISMO PERNAMBUCO E IMPLICAÇÕES PARA SUA CONSERVAÇÃO.....	67
3.1 INTRODUÇÃO.....	67
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	68
3.2.1 Área de Estudo.....	68
3.2.2 Dados de Ocorrência de <i>Alouatta belzebul</i>	70
3.2.3 Variáveis Ambientais	74
3.2.4 Modelagem de Distribuição de Espécies	77
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
3.3.1 Projeção dos Modelos	83
3.4 REFERÊNCIAS	86
III CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES	93
REFERÊNCIAS	95

I INTRODUÇÃO GERAL

I.1 CONTEXTUALIZAÇÃO DA PROBLEMÁTICA

As espécies pertencentes ao gênero *Alouatta* (Família Atelidae) são popularmente conhecidas como bugio, guariba, macaco-uivador ou barbudo. Os bugios são primatas neotropicais (Parvordem Platyrrhini) de grande porte que possuem cauda preênsil, além de um aparato ósseo hioide desenvolvido e modificado em um complexo de ressonância responsável pela grave vocalização, audível a longas distâncias (Corrêa, 2012). Este gênero ocorre desde o estado de Vera Cruz, no México, até o estado do Rio Grande do Sul, no Brasil, e em Corrientes, na Argentina, ocupando distintos biomas na América do Sul e América Central, incluindo florestas primárias e secundárias e habitats degradados devido à interferência humana, tais como fragmentos florestais de poucos hectares (Bicca-Marques, 2003; Gregorin, 2006).

É sabido que a fragmentação do habitat provoca a diminuição no tamanho da área de distribuição das espécies de *Alouatta*, podendo promover mudanças na composição vegetal e conseqüentemente na dieta alimentar desses animais, aumentando, por exemplo, o consumo de folhas em detrimento de frutos. Assim, os bugios podem recorrer preferencialmente às folhas em ambientes fragmentados, nos quais há falta de frutos carnosos, e, dessa forma, aumentar sua densidade populacional nos estágios iniciais de fragmentação do habitat (Arroyo-Rodríguez & Dias, 2010; Bicca-Marques, 2003). No entanto, com o passar do tempo, a perda de capacidade de suporte do ambiente fragmentado, em geral, causa redução populacional (Arroyo-Rodríguez & Dias, 2010).

Um exemplo de sucesso de intervenção para conservação do gênero foi a criação da Reserva Biológica Guaribas, na Paraíba, em 1990 e reintrodução da espécie *Alouatta belzebul* (Linnaeus, 1766) (IBAMA, 2003). O programa de reintrodução da espécie se deu a partir de 1998 com diversas ações de translocações ao longo dos anos, totalizando cerca de 24 indivíduos translocados até 2017, com evidências de reprodução (Coimbra; Buss; Bocorny de Azevedo, 2022).

Em ambientes fragmentados, a frequência e o tipo de vocalização realizada pelos bugios também podem se modificar. Considerando que as vocalizações mais altas e audíveis a longas distâncias são usadas, na maioria das vezes, para defesa

territorial em relação a outros grupos, estas perdem sua relevância em ambientes fragmentados, uma vez que encontros entre grupos competidores tendem a diminuir, devido à ausência de conectividade entre os fragmentos (Gaspar, 1997; Steinmetz, 2000). Neste cenário, os rugidos característicos do gênero perdem sua utilidade e passam a ser menos frequentes, o que pode causar a falsa impressão de que esses primatas não estão presentes na região, comprometendo o levantamento de dados de ocorrência das espécies via métodos tradicionais, baseados, por exemplo, em entrevistas às comunidades locais, as quais passam a relatar que não mais escutam os animais na região.

Considerando que a fragmentação de habitats tem sido um dos principais fatores responsáveis pelo aumento de extinções locais de distintas espécies de primatas (Arroyo-Rodriguez *et al.*, 2013), incluindo bugios (Arroyo-Rodriguez & Dias, 2010; Bicca-Marques *et al.*, 2019), o desenvolvimento de novas tecnologias que permitam detectar a presença de uma espécie de forma eficaz em ambientes fragmentados se torna relevante para o monitoramento e levantamento da biodiversidade local. Dentre as tecnologias atuais que facilitam e aumentam o poder de detecção de espécies, e consequentemente seu monitoramento, as análises genético-moleculares de dados gerados pelo emprego das abordagens de DNA ambiental (eDNA) e DNA derivado de invertebrados (iDNA) têm se mostrado eficientes, especialmente, no caso do estudo de espécies raras e/ou com hábitos elusivos (Banerjee *et al.*, 2021).

Além dos estudos de eDNA e iDNA, análises de modelagem de distribuição de espécies podem auxiliar a prever possíveis habitats adequados à ocorrência de uma espécie (Larson; Millspaugh; Thompson, 2009). Essa abordagem envolve relacionar as ocorrências conhecidas de uma espécie com as condições ambientais nesses locais e, em seguida, usar essa relação para estimar a distribuição potencial da espécie em uma paisagem mais ampla (Douglas *et al.*, 2016; Hefley e Hooten, 2016). Dessa forma, a modelagem de distribuição de espécies pode reduzir significativamente os requisitos de amostragem de campo, pois concentra os esforços em áreas mais promissoras (García-Roselló *et al.*, 2019; Hefley e Hooten, 2016).

I.2 OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS E HIPÓTESE DE TRABALHO

Considerando o contexto apresentado, o presente trabalho teve como objetivo geral avaliar a presença de *A. belzebul* no Centro de Endemismo Pernambuco (CEP), através do emprego das abordagens de eDNA e iDNA, por meio, respectivamente, de amostragens da água e do material ingerido por moscas e/ou mosquitos, realizadas em distintos fragmentos florestais, visando auxiliar o aprimoramento do levantamento da ocorrência atual da espécie na região, e colaborar com os órgãos responsáveis pelos programas de conservação de *A. belzebul*. Além disso, uma análise de modelagem ambiental foi conduzida, utilizando dados de ocorrência e ausência da espécie disponíveis na literatura e nos achados obtidos neste trabalho, a partir das análises de eDNA e iDNA, objetivando indicar áreas potenciais que a espécie preferencialmente poderia ocupar, visando auxiliar os órgãos competentes, através do fornecimento de dados relevantes para estabelecer estratégias de manejo e conservação como, por exemplo, a introdução ou reintrodução da espécie.

Com base nos resultados obtidos para as áreas onde foi confirmada a presença atual de *A. belzebul*, verificamos também se a ocorrência ou não da espécie está associada a variáveis relacionadas ao fragmento estudado, visando testar a seguinte hipótese de trabalho: Áreas de menor cobertura florestal e maior influência humana são mais propensas a promover extinções locais em populações de *A. belzebul*.

Para alcançar os objetivos gerais de trabalho e testar a hipótese levantada, os seguintes objetivos específicos foram estabelecidos:

Validar as metodologias baseadas em eDNA e iDNA como ferramenta para detecção de *A. belzebul*;

Comparar a eficiência de detecção da espécie-alvo por meio de eDNA/iDNA em amostras de água, moscas e mosquitos;

Realizar uma análise de modelagem de distribuição de espécies visando entender a influência de variáveis e atributos da paisagem para ocorrência da espécie e estabelecer áreas prioritárias para *A. belzebul*;

Gerar dados relevantes sobre a distribuição da espécie nos diferentes fragmentos do CEP, úteis aos programas de conservação e manejo de *A. belzebul*.

II MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando os objetivos propostos e a hipótese a ser testada, três capítulos, reportando os principais métodos empregados e resultados obtidos e discutidos são apresentados nesta dissertação no formato de possíveis manuscritos, a serem submetidos futuramente à publicação.

O primeiro capítulo apresenta os dados de detecção da espécie no CEP por DNA derivado de invertebrados (iDNA) e DNA ambiental (eDNA) de amostras de água. Já o segundo capítulo descreve o desenvolvimento de uma ferramenta computacional, nomeada eDNAAnalyzer, para processamento dos dados resultantes da atribuição taxonômica em análises de *metabarcoding*. Por fim, o terceiro capítulo trata das análises de modelagens de distribuição de espécies para *A. belzebul*, utilizando dados da literatura e os resultados obtidos nas análises de iDNA e eDNA, reportando a presença ou ausência da espécie. Os três capítulos apresentam uma breve revisão da literatura, material e métodos, resultados e discussão, além da lista de referências bibliográficas e de um resumo inicial, conforme descrito a seguir.

CAPÍTULO 1 – NOVOS REGISTROS DE ÁREAS DE OCORRÊNCIA PARA *Alouatta belzebul* (Linnaeus, 1766) (GUARIBA-DE-MÃOS-RUIVAS) NO CENTRO DE ENDEMISMO PERNAMBUCO (CEP)

RESUMO

É sabido que a fragmentação e a perda do habitat promovem diminuição no tamanho da área de distribuição das espécies, podendo alterar hábitos alimentares e comportamentais e promover extinções locais. Neste contexto, os métodos tradicionais de detecção de espécies se tornam ainda mais desafiadores e menos efetivos, especialmente para espécies raras e/ou com hábitos elusivos, como é o caso de *Alouatta belzebul*, um primata Neotropical categorizado como “Vulnerável” (VU), devido principalmente os drásticos declínios populacionais ocorridos nas últimas décadas. Endêmica do Brasil, esta espécie apresenta distribuição disjunta, ocorrendo na Amazônia e na Mata Atlântica. Na Mata Atlântica, as populações de *A. belzebul* estão restritas à fragmentos florestais com tamanhos reduzidos e/ou forte influência humana. No presente estudo, nós empregamos as abordagens de DNA ambiental (eDNA) e DNA derivado de invertebrados (iDNA) para inferir sobre a presença ou ausência desta espécie em 13 fragmentos remanescentes do Centro de Endemismo Pernambuco (CEP), uma área de Mata Atlântica de ocorrência atual e histórica da espécie, altamente impactada pelas atividades antrópicas. Para tal, foram realizadas coletas de água, moscas e mosquitos; e implementadas análises de *metabarcoding* utilizando *mini-barcodes* dos genes 12SrRNA e 16SrRNA. Após amplificação, sequenciamento e análise computacional dos dados, *A. belzebul* foi detectada em sete das 13 áreas estudadas, sendo que três delas representam registros inéditos para ocorrência da espécie. Não houve detecção da espécie em duas áreas com registro prévio de ocorrência da espécie. Os nossos achados revelaram que o uso do iDNA de moscas e do *mini-barcode* 16SrRNA foi a combinação mais eficiente para detectar *A. belzebul* no CEP. O 16SrRNA detectou a espécie em sete áreas, sendo três detecções exclusivas com este marcador e quatro detecções compartilhadas com o 12SrRNA. As moscas também detectaram a espécie em sete áreas, sendo cinco detecções exclusivas com este amostrador e duas detecções compartilhadas com os mosquitos. Não houve nenhuma detecção exclusiva com o 12SrRNA e/ou com mosquitos, indicando que o uso de ambos *mini-barcodes* e ambos amostradores parece ser desnecessário para detectar *A. belzebul*, ao menos nestas localidades, aumentando o custo e o esforço de coleta, sem benefícios adicionais. Este estudo demonstra a eficácia do iDNA como uma ferramenta relevante para detecção de *A. belzebul*, e fornece informações importantes para a elaboração de protocolos otimizados que visem o monitoramento da espécie, e também seu manejo e conservação, como previsto no Plano de Ação Nacional para Conservação de Primatas do Nordeste (PAN-PRINE).

Palavras-chave: *Metabarcoding*, ecologia molecular, genética da conservação.

1.1 INTRODUÇÃO

A técnica de DNA ambiental (eDNA) se refere à obtenção de material genético extraído a partir de amostras coletadas do ambiente de estudo, como por exemplo, de água, solo ou ar. Estas amostras podem conter vestígios das espécies e/ou subprodutos das atividades destas, tais como fezes, muco e saliva, que são deixados no ambiente e que podem conter DNA, o qual pode ser recuperado através do emprego de métodos apropriados (Howell; LaRue; Flanagan, 2021; Clare *et al.*, 2022).

Os primeiros trabalhos que utilizaram a abordagem de eDNA para monitoramento de fauna envolviam espécies aquáticas, principalmente peixes (Macher *et al.*, 2021). Entretanto, esta metodologia tem se mostrado cada vez mais valiosa para detecção também de espécies terrestres (Pedersen *et al.*, 2015). Análises de eDNA em amostras de água (Mena *et al.*, 2021; Ushio *et al.*, 2017; Williams *et al.*, 2018), solo (Clare *et al.*, 2022), e até mesmo ar (Pedersen *et al.*, 2015), já demonstraram a eficiência desta técnica para detectar distintas espécies de mamíferos, incluindo primatas (Abrams *et al.*, 2019; Coutant *et al.*, 2021; Ushio *et al.*, 2017). Apesar de seu enorme potencial, o emprego deste método em regiões neotropicais ainda é muito incipiente (Carvalho *et al.*, 2021).

Uma outra ferramenta para a amostragem indireta de DNA de espécies focais utiliza espécies de invertebrados como amostradores de material genético de vertebrados, incluindo mamíferos. Este método definido como iDNA, DNA derivado de invertebrados ou DNA ingerido, consiste na coleta de invertebrados, geralmente espécies hematófagas ou saprófagas, e extração de seu DNA total, juntamente com o conteúdo ingerido, o qual possui DNA das diferentes espécies das quais o invertebrado se alimentou (Abrams *et al.*, 2019). Dentre os principais invertebrados utilizados como amostradores estão os mosquitos, as moscas e os sanguessugas (Abrams *et al.*, 2019; Carvalho *et al.*, 2021; Ji *et al.*, 2022; Kocher *et al.*, 2017; Massey *et al.*, 2021). Estudos utilizando esta metodologia já demonstraram sua eficiência para detecção de primatas, incluindo os bugios (Lynggaard *et al.*, 2019; Rodgers *et al.*, 2017; Saranholi *et al.*, 2023).

No presente trabalho, nós empregamos ambas as abordagens de eDNA e iDNA para detectar a presença de um primata Neotropical endêmico do Brasil, categorizado como “Vulnerável (VU)”, segundo a União Internacional para Conservação da Natureza, IUCN (Valença-Montenegro *et al.*, 2021) e o Livro Vermelho da Fauna

Brasileira Ameaçada de Extinção, publicado pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, ICMBio (Valença-Montenegro *et al.*, 2018): *Alouatta belzebul* (Linnaeus, 1766).

De acordo com levantamentos recentes do ICMBio, há indícios de que a distribuição atual de *A. belzebul* está reduzida em relação à sua área de ocorrência histórica (Valença-Montenegro *et al.*, 2018), devido principalmente às atividades antrópicas relacionadas ao desmatamento, agricultura, pecuária, expansão urbana, assentamentos rurais e caça. Por conta disso, *A. belzebul* está listada também no Apêndice II da CITES (Convenção sobre o Comércio Internacional de Espécies Ameaçadas de Fauna e Flora Silvestres) e está inserida no Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Primatas Amazônicos (PAN Primatas Amazônicos, 2019) e no Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Primatas do Nordeste (PAN-PRINE, 2019).

Conhecida popularmente como bugio-de-mãos-ruivas ou guariba-de-mãos-ruivas, devido a coloração avermelhada de suas mãos (Figura 1.1), *A. belzebul* apresenta distribuição disjunta, com populações que ocorrem na Floresta Amazônica e na Mata Atlântica. As populações de *A. belzebul* da Amazônia ocorrem nos estados do Pará (PA), Tocantins (TO) e Maranhão (MA), e têm seu limite de distribuição na Mata dos Cocais, localizada no Maranhão e Tocantins, onde a distribuição geográfica coincide com os limites do bioma Amazônico. Ao norte, a espécie é limitada pelo rio Amazonas, e a oeste, o rio Xingu parece ser o limite de ocorrência das populações amazônicas. Grande parte da distribuição da espécie na região Amazônica está incluída no Arco do Desmatamento, área de intensa atividade agrícola localizada na região de transição entre Cerrado e Amazônia (Morandi *et al.*, 2016; Valença-Montenegro *et al.*, 2018).

Na Mata Atlântica, a área de ocorrência da espécie consiste no Centro de Endemismo Pernambuco (CEP), uma das áreas de Mata Atlântica mais devastadas do Brasil (Figura 1.2), com cerca de apenas 2% de sua área total conservada atualmente (Lima *et al.*, 2020; Pontes *et al.*, 2007; Tabarelli *et al.*, 2005), que incluem os estados de Pernambuco (PE), Rio Grande do Norte (RN), Paraíba (PR) e Alagoas (AL), na região nordeste do país, na qual a espécie está limitada ao sul pelo rio São Francisco e a leste pelo Oceano Atlântico (Coimbra-Filho; Câmara; Rylands *et al.*, 1995; Valença-Montenegro *et al.*, 2018).



Figura 1.1 - Espécime de *Alouatta belzebul*. Fonte: Alex Da Riva, CC BY-SA 3.0 <<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0>>, via Wikimedia Commons.

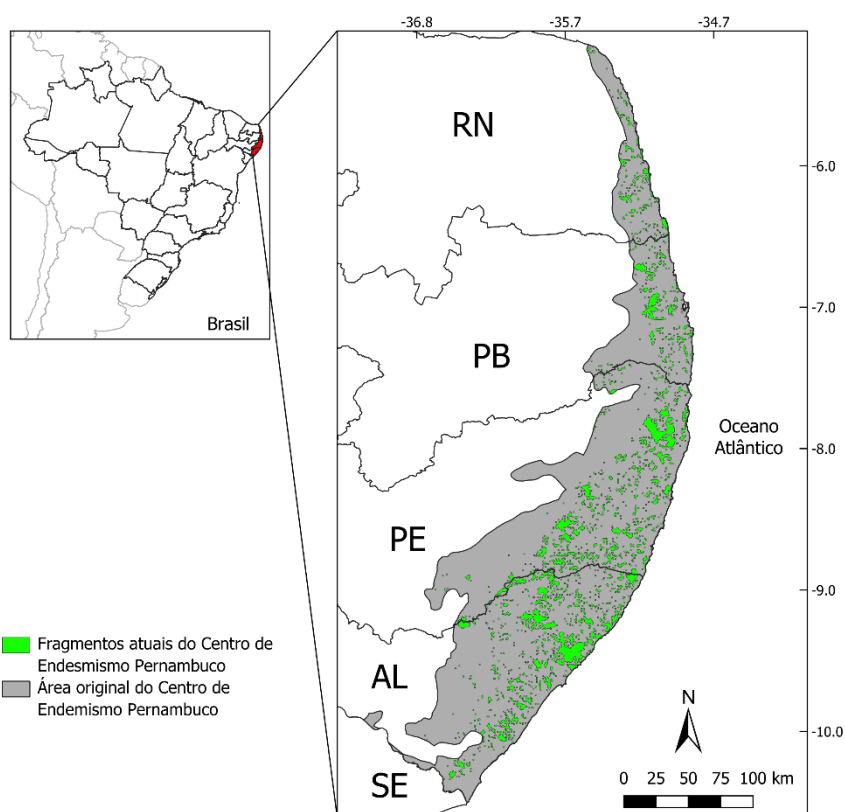


Figura 1.2 - Mapa do Centro de Endemismo Pernambuco. Em cinza a área original coberta por vegetação e em verde os fragmentos florestais atuais que formar a vegetação do CEP. Pernambuco (PE), Rio Grande do Norte (RN), Paraíba (PR) e Alagoas (AL). Fonte: Modificado de Roda; Pereira; Albano, 2011.

A perda de cobertura florestal no CEP ocorreu principalmente na época de implantação do Programa Proálcool pelo Governo Federal, no qual houve o maior índice de desmatamento em função da implementação das lavouras de cana-de-açúcar durante os anos de 1970 a 1980 (Grillo; Oliveira; Tabarelli, 2005). Por isso, atualmente, o CEP é composto por diversos pequenos fragmentos florestais e a área de ocupação desta espécie se restringe a apenas 18 fragmentos florestais, com tamanhos reduzidos, sendo um deles localizado em Pernambuco, um no Rio Grande do Norte, e 16 na Paraíba e em Alagoas (Valença-Montenegro *et al.*, 2018).

Apesar do alto nível de degradação atual do CEP, este abriga um número expressivo de espécies vegetais e animais, em sua maioria endêmicas (Lima *et al.*, 2017; Muylaert *et al.*, 2017), as quais vêm sendo relativamente pouco estudadas. Em relação à *A. belzebul*, sabe-se que a despeito do gênero apresentar boa resiliência em ambientes fragmentados, níveis elevados de fragmentação, como os observados no CEP, podem reduzir significativamente os tamanhos populacionais e consequentemente a diversidade genética e o potencial de persistência das populações (Arroyo-Rodríguez & Dias, 2010; Bicca-Marques *et al.*, 2019).

Em vista do contexto histórico e atual de desmatamento da Mata Atlântica, e as consequências prejudiciais que a fragmentação e a perda de habitat promovem em espécies dependentes de floresta, incluindo os bugios, esforços para sua conservação têm sido empenhados pelos órgãos responsáveis pela implementação de políticas públicas e de ações que visem assegurar a viabilidade de populações e persistência em longo termo de espécies-alvo. Especificamente no CEP, o Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Primatas Brasileiros (CPB) coordena o PAN-PRINE que inclui a espécie *A. belzebul*. Dentre as principais metas do PAN-PRINE estão a redução da caça e do tráfico em pelo menos 50%, o monitoramento das espécies de primatas e a manutenção da conectividade de áreas, visando o estabelecimento de populações viáveis (PAN-PRINE, 2019).

Para os bugios-de-mãos-ruivas, apenas o uso de abordagens tradicionais de detecção da espécie, baseadas em avistamentos diretos e entrevistas locais, no entanto, não tem sido suficiente, uma vez que, como já mencionado, mudanças comportamentais e declínios populacionais podem interferir na confirmação da presença ou ausência dessa espécie (Arroyo-Rodríguez & Dias, 2010; Bicca-Marques, 2003). Neste contexto, as técnicas de eDNA e iDNA se apresentam como ferramentas importantes para o monitoramento desta espécie na região do CEP.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo principal investigar a presença de *A. belzebul* no Centro de Endemismo Pernambuco, através do emprego das abordagens de eDNA e iDNA, por meio de amostragens da água e/ou do material ingerido por moscas e/ou mosquitos, realizadas distintos fragmentos florestais, visando auxiliar o aprimoramento do levantamento da ocorrência atual da espécie na região, e contribuir com informações relevantes ao monitoramento, manejo e conservação de *A. belzebul*.

1.2 MATERIAIS E MÉTODOS

1.2.1 Área de Estudo e Coleta das Amostras de eDNA e iDNA

As áreas de estudo deste trabalho consistem em 13 fragmentos florestais do Centro de Endemismo Pernambuco (CEP), localizados nos estados de Alagoas (AL), Pernambuco (PE), Paraíba (PB) e Rio Grande do Norte (RN), que incluíram unidades de conservação (UC), consideradas Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN), Reserva Biológica (REBIO) ou Estação Ecológica (ESEC). Ao todo foram coletadas amostras de água, moscas e mosquitos em 31, 56 e 59, pontos, respectivamente (Figura 1.3). No estado de Alagoas foram coletadas amostras em quatro áreas, sendo elas: RPPN Mata do Cedro, ESEC Murici, Usina Serra Grande (Mata Cachoeira e Mata de Coimbra) e Complexo Maceió-Paripueira (fragmentos de mata próximos à RPPN Apolinário e RPPN Senador Carlos Lyra). No estado da Paraíba foram amostradas sete áreas: RPPN Engenho Gargaú, RPPN Fazenda Pacatuba, REBIO Guaribas, ESEC Pau Brasil, Mata Sucupira e Mata Capitão (fragmentos de mata localizados no município de Santa Rita) e Mata da Estação Experimental do Camaratuba da ASPLAN (fragmento de mata localizados próximo à Associação de Plantadores de Cana da Paraíba). No Rio Grande do Norte foram coletadas amostras de água e insetos na RPPN Mata Estrela (Figura 1.3).

As áreas amostradas foram selecionadas usando dados disponíveis na literatura que indicavam (i) áreas prioritárias para a conservação da Mata Atlântica no CEP (Dias, 2023); (ii) áreas importantes para conservação de primatas do nordeste (AI-ICMBio, 2021); e (iii) áreas previamente avaliadas para detecção de *Alouatta belzebul*, reportando presença da espécie (Fialho *et al.*, 2014; Pontes *et al.*, 2007). Os estudos prévios que avaliaram estas áreas, utilizaram métodos tradicionais para detecção de espécie, que incluíram, por exemplo, entrevistas locais, visualização do

animal e/ou coleta de material biológico. Do total de áreas selecionadas, seis áreas indicavam a presença da espécie, cinco áreas indicavam a não detecção da espécie e duas áreas não possuíam estudos prévios realizados para detecção de *A. belzebul* (Tabela 1.1).

Tabela 1.1 - Áreas de estudo do Centro de Endemismo Pernambuco (CEP), localizadas nos estados de Alagoas (AL), Paraíba (PB) e Rio Grande do Norte (RN), indicando o registro para presença ou ausência de *Alouatta belzebul* em estudos prévios, o método utilizado e o ano de registro. NA: área não avaliada previamente para ocorrência da espécie. ND: área avaliada em que a espécie não foi detectada.

Área	Tipo de fragmento	Registro	Método	Referência
RPPN Mata do Cedro (AL) ^P	UC	NA	-	-
Complexo Maceió-Paripueira (AL) ^P	UCs e áreas particulares	NA	-	-
ESEC de Murici (AL) ^P	UC	Presente	Coleta	Langguth <i>et al.</i> , 1987
Mata Cachoeira (AL) ^P	Particular	ND	Visualização	Pontes <i>et al.</i> , 2007
Mata de Coimbra (AL) ^P	Particular	ND	Visualização	Pontes <i>et al.</i> , 2007
Mata Sucupira (PB) ^{IA}	Particular	Presente	Entrevista	Oliveira e Oliveira, 1993
RPPN Engenho Gargaú (PB) ^{IA}	UC	Presente	Entrevista e visualização	Oliveira e Oliveira, 1993
Mata Capitão (PB) ^{IA}	Particular	ND	Entrevistas e indícios diretos ou indiretos	Fialho <i>et al.</i> , 2014
RPPN Fazenda Pacatuba (PB) ^{IA}	UC	Presente	Coleta e visualização	Langguth <i>et al.</i> , 1987
REBIO Guaribas (PB) ^{IA}	UC	Presente	Reintrodução	Fialho <i>et al.</i> , 2014
ESEC do Pau-brasil (PB) ^{IA}	UC	ND	Entrevistas e indícios diretos ou indiretos	Fialho <i>et al.</i> , 2014
Mata da Asplan (PB) ^{IA} *	Particular	ND	Entrevistas e indícios diretos ou indiretos	Fialho <i>et al.</i> , 2014
RPPN Mata Estrela (RN) ^{IA}	UC	Presente	Entrevista e fotos	Gabriel <i>et al.</i> , 2005

A coleta de mosquitos foi feita utilizando-se armadilhas de luz do CDC (Center of Disease Control), seguindo as recomendações propostas por Thongsripong *et al.* (2013); e a de moscas foi feita usando armadilhas de garrafas PET, seguindo metodologia proposta por Rodgers *et al.* (2017). Ao todo foram instaladas 56 armadilhas para coleta de moscas e 59 para coleta de mosquitos. Um mínimo de quatro e um máximo de 11 armadilhas foi instalado em cada área, totalizando um mínimo de dois e máximo de seis pontos amostrais por área. Ao menos uma armadilha de cada amostrador foi instalada em cada ponto amostral, mantendo-se, dentro de cada área, a distância mínima de cerca de 1 km entre armadilhas de um mesmo amostrador, a fim de garantir a independência dos pontos amostrais (Tabela 1.2).

Para a coleta de água, seguimos o protocolo sugerido por Carim *et al.* (2016). Ao menos um litro de água foi coletado em cada corpo d'água encontrado próximo às áreas de estudo, totalizando 31 pontos amostrados (Figura 1.3). As amostras de água foram filtradas com filtro de 1,5 µm (Merck Millipore) usando uma bomba peristáltica manual (Hand-Operated Vacuum Pump, Nalgene). Os filtros foram armazenados em sílica-gel até o momento da extração de DNA. O número máximo de seis e mínimo de um corpo d'água por área de estudo foi amostrado. Detalhes sobre o número de corpos d'água amostrados em cada área estão descritos na Tabela 1.2.

Tabela 1.2 - Área em hectares e número de pontos de coletas de água e de armadilhas de mosquitos e de moscas por fragmento. * Tamanho de área aproximado, estimado usando o software de geoprocessamento QGis.

Área	Área (ha)	Nº de pontos de coleta de água	Nº de pontos de coleta de insetos	Nº de armadilhas de mosquitos	Nº de armadilhas de moscas	Nº de moscas sequenciadas	Nº de mosquitos sequenciados (x0,5ml)
RPPN Mata do Cedro	1064,76	6	5	5	5	47	35
Comp. Maceió-Paripueira	6591,18*	6	5	5	5	6	4
ESEC de Murici	6131,63	4	5	5	5	6	7
Mata Cachoeira	1540,6*	-	5	5	5	3	29
Mata de Coimbra	3778,59*	-	5	5	5	5	16
Mata Sucupira	2907,39*	5	6	6	5	18	15
RPPN Engenho Gargaú	1058,62	1	4	4	4	66	6
Mata Capitão	663,81*	2	5	5	5	127	11
RPPN Fazenda Pacatuba	266,53	1	2	2	2	1	9
REBIO Guaribas	4051.62	4	6	6	5	35	7
ESEC do Pau-brasil	90,92*	1	2	2	2	26	6
Mata da Asplan	85,46*	-	3	3	3	89	10
RPPN Mata Estrela	2039,93	1	6	6	5	119	10

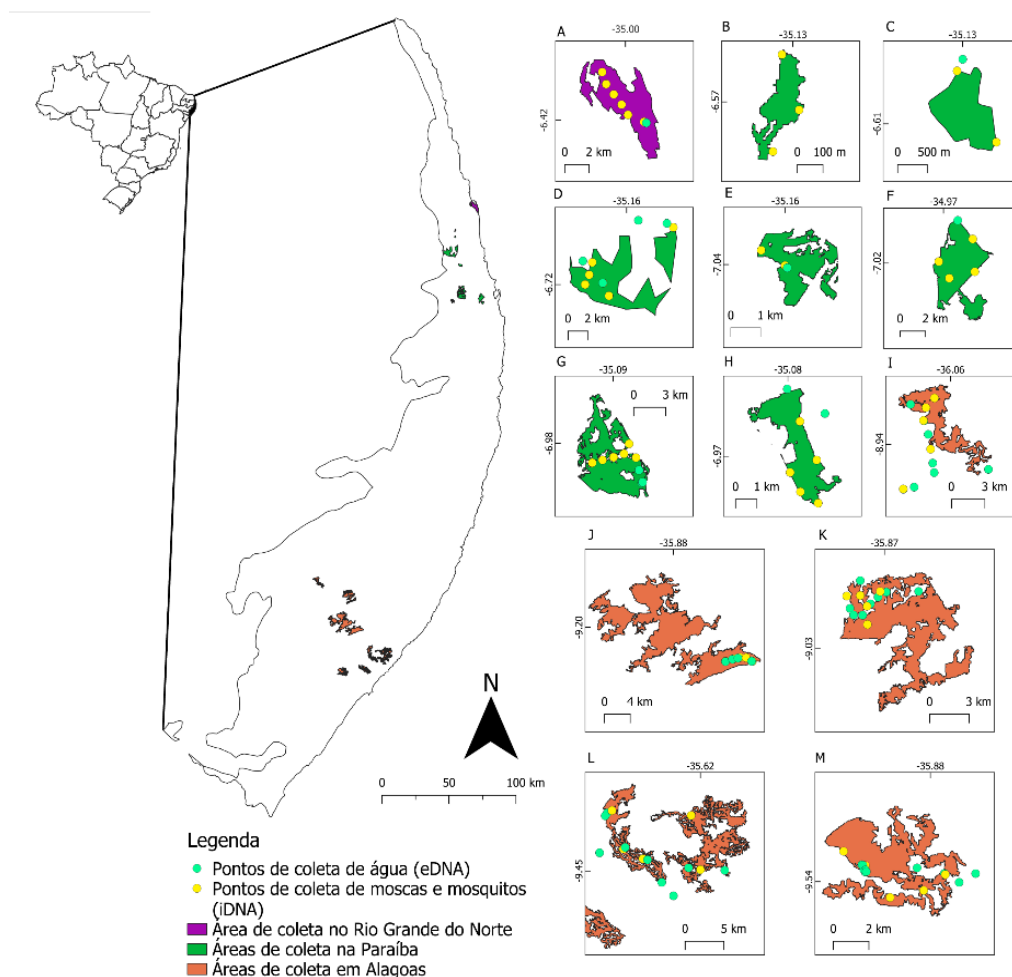


Figura 1.3 - Mapas das áreas e pontos de coleta de eDNA e iDNA no Rio Grande do Norte, Paraíba e Alagoas. A – RPPN Mata Estrela, B – Mata ASPLAN, C – ESEC do Pau Brasil, D – REBIO Guaribas, E – RPPN Fazenda Pacatuba, F – RPPN Engenho Gargaú, G – Mata Sucupira, H – Mata do Cedro.

1.2.2 Extração de DNA, Amplificação e Sequenciamento

O DNA das amostras biológicas obtidas a partir da água, após filtragem, foi extraído utilizando o *DNeasy Blood & Tissue Kit* (Qiagen, Hilden, Germany), com adaptações ao protocolo do fabricante, seguindo Carim *et al.* (2016). Para extração de DNA via iDNA dos mosquitos, inicialmente, foi feita uma triagem para retirar invertebrados não-alvo, como formigas, besouros e mariposas, coletados nas armadilhas de CDC. Em seguida, sub-álíquotas de 0,5 ml de mosquitos foram feitas para todos os pontos amostrais, até que todos os mosquitos coletados estivessem representados em conjuntos amostrais (*bulks*). *Bulks* de amostras de invertebrados são indicados em estudos de *metabarcoding* para acessar a comunidade de um grupo

taxonômico de interesse, no nosso caso os mamíferos (Lynggaard *et al.*, 2019). Para as moscas, também foi realizada uma triagem antes da extração de iDNA, visando a escolha de moscas saprófagas e coprófagas e separação de moscas com abdômes maiores e menores e agrupamento em alíquotas ou *bulks* de acordo com o tamanho destes. Assim, moscas com abdômes entre 3 mm e 8 mm foram agrupadas em pares, moscas com abdômes menores que 3 mm foram agrupadas entre si, e moscas com abdômes maiores que 8 mm foram individualmente submetidas à extração de DNA. Antes da extração de DNA, os abdômes das moscas foram perfurados com um pistilo de vidro para exposição do conteúdo ingerido em uma solução contendo 450 µl de Chelex (10%) e 30 ml de proteinase K (20mg/ml), sendo que os *bulks* de amostras consideraram os dados de acordo com seu tubo de coleta. Esta solução foi mantida em digestão por cinco horas a 56°C, sendo posteriormente centrifugada. Cerca de 50 µl do sobrenadante, contendo os DNAs ingeridos pelas moscas, foi recuperado e submetido a uma nova eluição de DNA usando o *DNeasy Blood & Tissue Kit*, seguindo o protocolo do fabricante, com exclusão da etapa de digestão inicial e inclusão de uma lavagem adicional com etanol 100% entre as lavagens com os tampões AW1 e AW2 do referido kit.

Para a amplificação dos DNAs obtidos de amostras de água e derivadas de invertebrados, foram realizadas Reações da Polimerase em Cadeia (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) usando *primers* para amplificação de fragmentos dos genes mitocondriais 12SrRNA e 16SrRNA, descritos, respectivamente, por Riaz *et al.* (2011) e Taylor (1996). As PCRs foram realizadas em triplicata para ambos os *mini-barcode*s, os quais são comumente utilizados para detectar vertebrados (12SrRNA) e mamíferos (16SrRNA). *Tags* moleculares foram acopladas aos *primers* para que, após o sequenciamento, fosse possível identificar a origem de cada amostra e a fonte do DNA (se derivado de mosca, de mosquito ou de água), seguindo Saranholi *et al.* (2023). O protocolo utilizado nas PCRs, com ambos os genes, seguiu as recomendações descritas por Rodgers *et al.* (2017). Todas as PCRs foram realizadas dentro de cabines previamente esterilizadas, em uma sala dedicada exclusivamente a experimentos de eDNA e iDNA. Os produtos de PCR foram sequenciados em plataforma Illumina iSeq (San Diego, Califórnia, EUA), usando o *iSeq 100 v2 300 Cycle Reagent Kit* (2 × 150 bp), para cobertura de 100.000 *reads* por amostra sequenciada.

1.2.3 Análise das Sequências e Atribuição Taxonômica

A verificação de qualidade das sequências foi feita no programa FastQC (Andrews, 2010), e os *outputs* dos dados foram agregados no programa MultiQC (Ewels *et al.*, 2016). As sequências foram individualizadas usando o *process_radtags* do programa Stacks 2.62 (Catchen *et al.*, 2011), no qual as *tags* moleculares são identificadas para recuperar as informações de cada amostra, incluindo o ponto de coleta. Regiões dos adaptadores e possíveis contaminantes e/ou sequências de baixa qualidade foram excluídas. Em seguida, as sequências *forward* e *reverse* foram concatenadas usando o programa PEAR (Zhang *et al.*, 2014), considerando os seguintes parâmetros: pontuação limite de qualidade mínima (-q) de 15, sobreposição mínima (-v) de 100 pb e comprimento mínimo (-n) de 100 pb. Posteriormente, os trechos que representavam os *primers* foram removidos no programa Cutadapt (Martin, 2011), considerando taxa máxima de erro (-e) de 0,2. A ferramenta VSEARCH (Rognes, *et al.*, 2016) foi utilizada para clusterização dos *contigs*, considerando o valor mínimo de 97% de similaridade. *Singletons* foram desconsiderados e as sequências consenso foram utilizadas para identificação das OTUs (Unidades Taxonômicas Operacionais).

As OTUs foram identificadas a partir da comparação com sequências disponíveis na base de dados genômicos GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), usando o critério de 98% a 100% de correspondência para considerar um táxon à nível de espécie. Para melhorar a resolução da identificação de *A. belzebul*, também comparamos as sequências obtidas com sequências de referência produzidas no Laboratório de Biodiversidade Molecular e Conservação (LabBMC) do Departamento de Genética e Evolução (DGE) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), campus São Carlos, SP (Olimpio *et al.*, in prep.), usando o programa Geneious (Kearse *et al.*, 2012).

1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi utilizada a abordagem de *metabarcoding* em detrimento de outras técnicas mais utilizadas para a detecção de uma espécie focal, como PCR em tempo real (qPCR), PCR digital (dPCR) ou, ainda, *droplet digital* PCR (ddPCR) (Banerjee *et al.*, 2021; Carvalho *et al.*, 2021; Langlois *et al.*, 2020; Wood *et al.*, 2019), pois essas

técnicas necessitam do desenvolvimento de *primers* e sondas específicas para a espécie alvo (Rodríguez *et al.*, 2015), o que necessitaria de mais tempo e mais recursos do que o disponível para o desenvolvimento deste trabalho. Portanto neste trabalho optou-se pela validação da metodologia *metabarcoding*, empregando *primers* desenvolvidos para detecção da mastofauna e de outras espécies de vertebrados, embora, a abordagem de qPCR seja uma perspectiva para detecção de *A. belzebul* em trabalhos futuros.

Foram geradas 3.970.792 *reads*, com média de 116.788 por amostra de sequenciamento, para o *mini-barcoding* 16SrRNA; e 2.567.892 *reads*, com média de 75.526,24 *reads* por amostra, para o 12SrRNA (Figura 1.4). Após a demultiplexagem, foram mantidos 88,95% das *reads* para 16SrRNA e 91,60% para o 12SrRNA.

A partir da concatenação foram gerados 3.051.334 de *contigs* para o 16SrRNA, sendo mantida a mesma quantidade após retirada da sequência dos *primers*. Após busca por *uniques* foram mantidos 95,60% dos *contigs* originais, e 95,34% após busca por *chimeras* e clusterização das sequências. Para o 12SrRNA, após a concatenação foram gerados 1.525.667 de *contigs*, sendo mantida a mesma quantidade após retirada da sequência dos *primers*. Após busca por *uniques* foram mantidos 93,70% dos *contigs* originais, e 92,84% após busca por *chimeras* e clusterização das sequências.

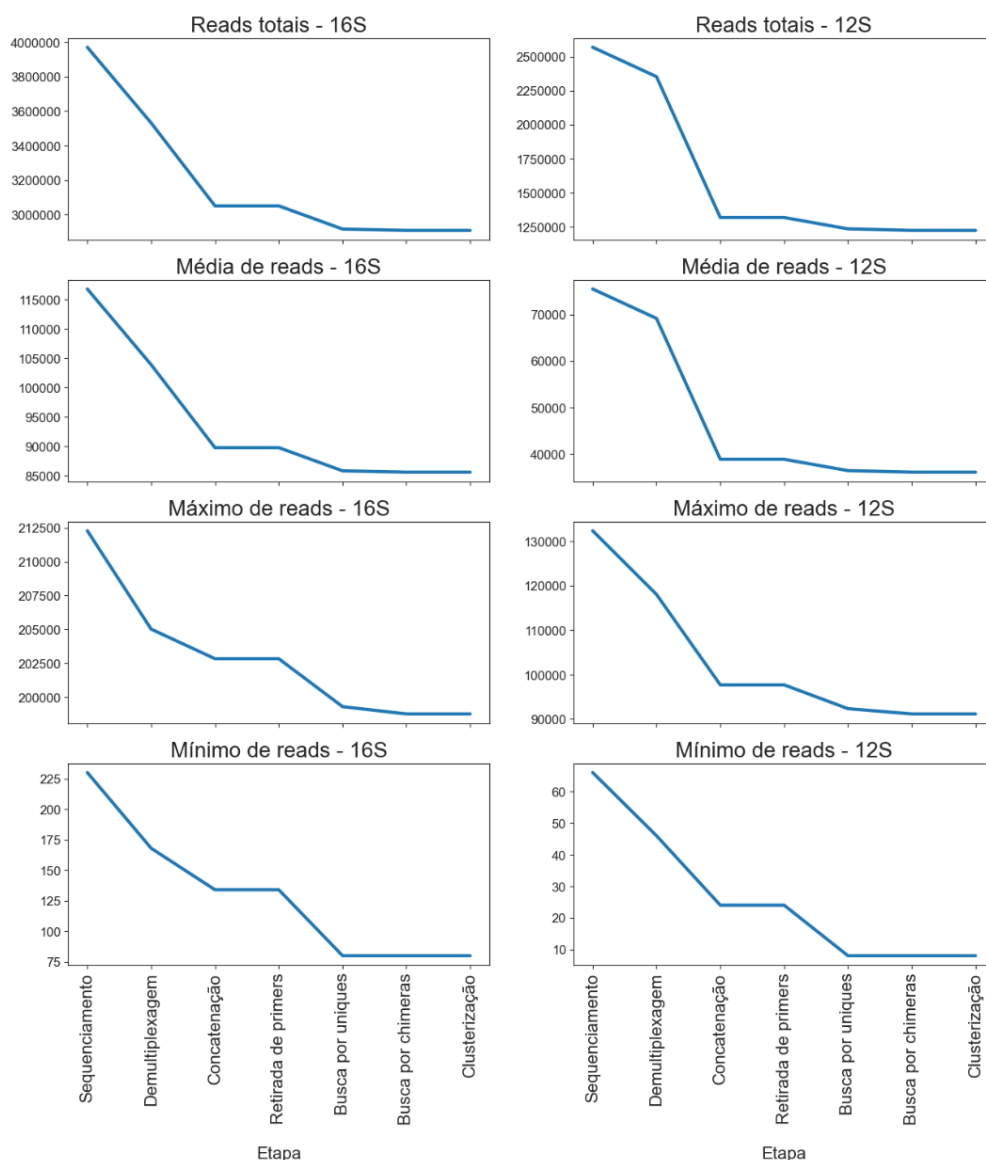


Figura 1.4 - Quantidade de *reads* geradas pelo sequenciamento *metabarcoding* e porcentagem de *reads* mantidas ao longo das etapas de processamento de dados e filtragem. Levando em consideração que os *contigs* são formados pela concatenação das *reads forward* e *reverse*, a partir da etapa de concatenação foram contabilizadas a quantidades de *reads* utilizadas para formar os *contigs* de forma a permitir a comparação da quantidade mantida com as *reads* originais geradas no sequenciamento *pairwise*.

1.3.1 Detecção de *Alouatta belzebul*

As análises de iDNA foram capazes de detectar *A. belzebul* em distintos fragmentos, com uma porcentagem de identidade com as sequências do GenBank entre 98,8% e 100%. Por outro lado, não houve nenhuma detecção da espécie nas amostras de água. De fato, a detecção de espécies arbóricolas parece ser menos eficaz usando esse tipo de abordagem, devido ao comportamento desses animais,

que não costumam estar frequentemente em contato direto com corpos d'água (Pozo-Montuy & Serio-Silva, 2007; Prates & Bicca-Marques, 2008; Ludwig *et al.*, 2020). Outro motivo que pode ter contribuído para não detecção de *A. belzebul* em amostras de água foi a condição climática durante o período em que ocorreram as coletas, que incluiu chuvas extremamente volumosas não esperadas para o mês de novembro nas áreas de estudo, as quais estão localizadas na região nordeste do Brasil, que costuma apresentar períodos chuvosos entre abril e julho (Oliveira; Santos e Silva; Lima, 2017; Rodrigues *et al.*, 2020). Tal fato pode ter acelerado o carreamento e degradação de amostras biológicas da espécie, eventualmente deixadas nos corpos d'água.

Pelo método de iDNA, a detecção de *A. belzebul* ocorreu em sete áreas, sendo que três áreas consistem em registros inéditos para a espécie, sendo elas Mata Capitão localizada no estado da Paraíba; e a Mata do Cedro e o Complexo Maceió-Paripueira, ambos localizados no estado de Alagoas. As outras áreas confirmam a presença da espécie, uma vez que a ocorrência de *A. belzebul* havia sido reportada em estudos prévios realizados nas décadas de 1990, 2000 e 2010 usando métodos tradicionais para detecção de espécies (Fialho *et al.*, 2014; Gabriel *et al.*, 2005; Oliveira e Oliveira, 1993). De todas as áreas estudadas, com registro prévio da espécie, não houve a confirmação para presença de *A. belzebul* apenas na ESEC de Murici e na RPPN Fazenda Pacatuba (Langguth *et al.*, 1987). Nas demais áreas, onde a espécie havia sido registrada usando métodos convencionais de busca, o iDNA foi capaz de detectar *A. belzebul*, indicando sua ocorrência atual nestas localidades (Figura 1.5).

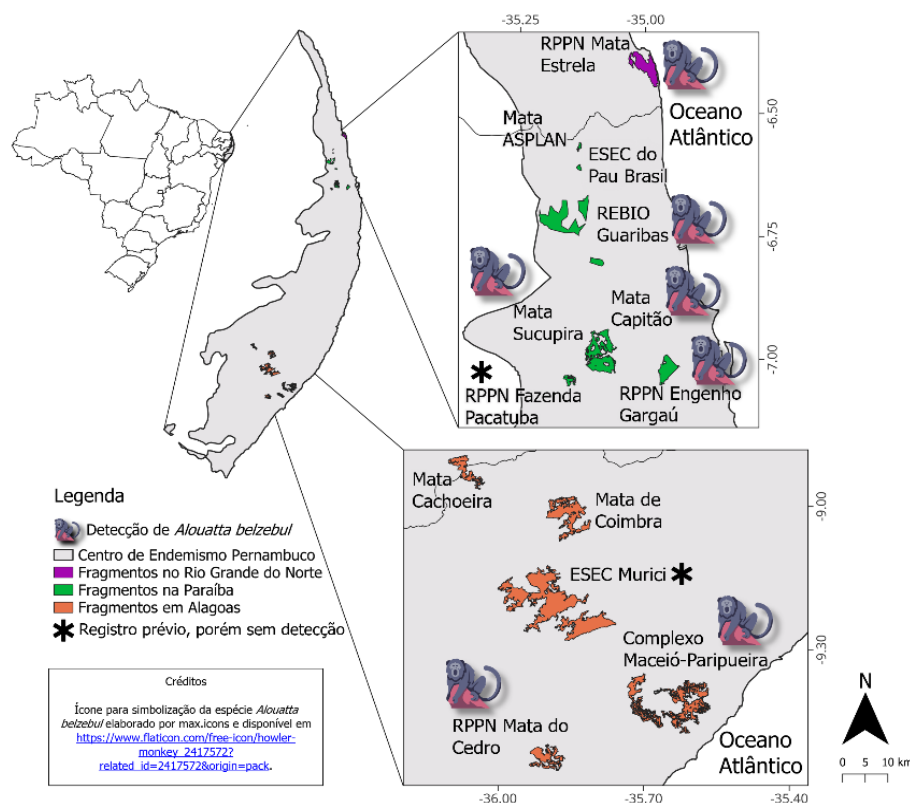


Figura 1.5 - Áreas do Centro de Endemismo Pernambuco (CEP, Brasil), nas quais foi detectada a presença de *Alouatta belzebul*, com a utilização de eDNA (água) e iDNA derivado de moscas e/ou mosquitos.

As áreas que representam novos registros da espécie consistem em duas áreas protegidas e uma mata particular da Usina Monte Alegre, a Mata Capitão. As áreas protegidas incluem a RPPN Mata do Cedro (-9,53277, -35,872651) e a RPPN Senador Carlos Lyra (-9,380813, -35,723776), que faz parte do conjunto de fragmentos nomeado neste trabalho como Complexo Maceió-Paripueira. Em ambas as áreas a espécie havia sido considerada extinta (M.M. Valença-Montenegro, comunicação pessoal), a despeito de não haver trabalhos na literatura que reportem estudos anteriores para detecção da espécie nestas localidades. Em relação a área particular da Usina Monte Alegre, a Mata Capitão representa uma área menos conservada que as RPPNs supracitadas, e estudos anteriores já haviam sido realizados para detectar *A. belzebul*, não detectando, porém, a espécie no local (Fialho *et al.*, 2014).

A Mata Capitão está relativamente próxima de áreas urbanizadas, e sofre com uma pressão de caça mais destacada. Esta área está posicionada ao lado de outra área pertencente à mesma usina, a Mata Sucupira, sendo que as duas matas estão

separadas por um trecho de rodovia. Na Mata Sucupira, a presença da espécie também foi confirmada pelo iDNA. Assim, apesar da proximidade destas áreas, se considerarmos a capacidade de voo das moscas (Saranholi, *et al.*, 2023), a detecção em uma área não pode ser atribuída ao fragmento vizinho neste caso, principalmente se considerarmos a armadilha mais distante. Assim, ambas as detecções se referem de fato à presença da espécie nos respectivos fragmentos.

Na ESEC de Murici, embora o último registro de avistamento de *A. belzebul* tenha sido reportado em 1987 (Langguth, 1987), ou seja, há cerca de 37 anos, até o ano de 2018 vocalizações da espécie tinham sido reportas pela comunidade local a pesquisadores que estudavam na área (P.G.A.S. Lins, comunicação pessoal). Assim, a ausência de detecção de *A. belzebul*, via iDNA pode se dever a uma coleta incipiente no local, já que foram amostrados poucos insetos, especialmente moscas, em comparação com as demais áreas estudadas. Por este motivo um número baixo de insetos amostrados em Murici foi sequenciado (ver Tabela 2). Esta baixa eficiência na coleta de insetos pode estar relacionada com as intensas chuvas ocorridas durante as coletas de material, particularmente nesta área, as quais podem ter inibido a atividade das moscas, já que estas tendem a procurar abrigo durante os períodos chuvosos (Lutz *et al.*, 2019).

Além dos aspectos já mencionados, na ESEC de Murici, a água da chuva entrou no tubo contendo moscas, diluindo o etanol e prejudicando a preservação dos insetos (Almeida; Marinoni; Clarkson, 2024). Por outro lado, o mesmo número de moscas foi sequenciado no Complexo Maceió-Paripueira, onde houve detecção da espécie. Nesta localidade, porém, não ocorreram chuvas fortes nos dias de coleta, e nem foi detectada a presença de água dentro dos tubos de coleta dos insetos. Em relação aos mosquitos, apesar destes estarem ativos durante as chuvas (Montarsi *et al.*, 2015), eles apresentaram menor poder para detecção da espécie, conforme a análise de nossos dados. Além disso, a ESEC de Murici consiste na segunda área de maior extensão estudada e possui locais muito afastados e de difícil acesso, os quais podem potencialmente ser habitats preferenciais para *A. belzebul* (Silvestre *et al.*, 2020). Entretanto, não foi possível acessar esses locais para realizar amostragens complementares, devido às condições climáticas já relatadas.

Já a não detecção de *A. belzebul* na RPPN Fazenda Pacatuba aponta claramente para um caso de falso negativo, já que a espécie foi avistada na área pelo nosso grupo de pesquisa, durante as campanhas à campo, mas não foi detectada via

iDNA. Este fragmento apresenta um tamanho médio (266,53 ha) em comparação com os demais, e está localizado muito próximo a uma comunidade rural, fato este que pode justificar a grande quantidade de OTUs e *contigs* de humanos e animais domésticos. Com o 12SrRNA foi detectada uma OTU com 9532 *contigs* de humanos e uma OTU de *Bos taurus* com 29420 *contigs*. Com esse marcador detectamos também *Gallus gallus* (galinha) e *Sus scrofa* (porco doméstico). Já o 16SrRNA evidenciou uma OTU com 4500 *contigs* de humanos e uma OTU com 43320 *contigs* de *Bos taurus*, além da detecção de *S. scrofa*. Tais amostras de DNA presentes em grande concentração neste fragmento provavelmente dificultaram o sequenciamento e a detecção de espécies com tamanhos populacionais mais reduzidos, como é o caso de *A. belzebul* (Valença-Montenegro *et al.*, 2018). Em áreas menores, a proximidade com a borda é mais evidente, como é o caso desse fragmento, fato este que também pode ter favorecido a detecção preferencial das espécies domésticas presentes na matriz. Estes dados podem refletir, portanto, um possível viés do método para áreas pequenas que estão muito próximas a comunidades rurais. Além disso, devido ao menor tamanho deste fragmento, um menor número de armadilhas foi instalado na RPPN Fazenda Pacatuba; e com as fortes chuvas ocorridas nos dias de coleta, apenas uma mosca foi coletada nessa localidade (ver Tabela 1.2).

Áreas de difícil acesso, e/ou que as comunidades locais não transitam frequentemente, de fato, constituem um gargalo para estudos de ocorrência de espécies que utilizam métodos tradicionais como entrevistas e avistamentos, os quais representam grande parte dos trabalhos de busca de primatas na região (Fialho *et al.*, 2014). Por outro lado, as coletas para iDNA e eDNA, embora, sejam mais eficazes nessas localidades, quando se considera esforço/tempo de amostragem, parecem depender das condições climáticas locais, sendo pouco eficientes em épocas de chuvas volumosas e frequentes. Além disso, fragmentos pequenos, próximos a comunidades rurais também podem gerar resultados falso-negativos. Assim, o estabelecimento de protocolos específicos para coletas em diferentes épocas do ano, com ampliação do esforço temporal e esforço amostral em áreas com particularidades poderão ajudar a contornar eventuais vieses relacionados com variações nas condições climáticas e na amostragem representativa do tipo preferencial de amostrador para a espécie-alvo (Hassan *et al.*, 2022; Fahmy *et al.*, 2023).

1.3.2 Comparação entre os *mini-barcodes* e entre os amostradores de iDNA

O *mini-barcode* 12SrRNA foi capaz de detectar *A. belzebul* em 14 dos 59 pontos de coleta, sendo seis pelo iDNA de mosquitos (2696 *contigs*) e oito de moscas (36961 *contigs*) (Figura 1.6), o que representa quatro (Mata Capitão, RPPN Engenho Gargaú, RPPN Mata Estrela, REBIO Guaribas) dos 13 fragmentos estudados. O *mini-barcode* 16SrRNA detectou a espécie em 26 dos 59 pontos de coleta, sendo dois pontos pelo iDNA de mosquitos (1927 *contigs*) e 24 de moscas (84168 *contigs*) (Figura 3.5), o que representa sete (Mata Capitão, RPPN Engenho Gargaú, Mata Estrela, Complexo Maceió-Paripueira, Mata do Cedro, REBIO Guaribas, Mata Sucupira) dos 13 fragmentos estudados.

Comparando o número de detecções (Figura 1.6A), considerando detecções por armadilha, é possível notar que o 12SrRNA teve desempenho similar com ambos os amostradores, com duas detecções a mais para moscas em relação a mosquitos. Para o 16SrRNA, porém, as moscas apresentaram eficiência 12 vezes maior que a de mosquitos, em relação ao número de *contigs* geradas; e 44 vezes maior em relação à detecção da espécie-alvo. Levando em conta a quantidade de *contigs* (Figura 1.6B), é possível notar uma grande diferença entre os amostradores, sendo que as moscas geraram 121.129 *contigs* e enquanto os mosquitos, 4.623 *contigs*. Este resultado é esperado, pois o primer utilizado para amplificação da região do gene 12SrRNA é universal para vertebrados (Riaz *et al.*, 2011), portanto há mais competição com DNA de não-mamíferos na amplificação e sequenciamento (Collins *et al.*, 2019). No entanto, mesmo com poucas *contigs* geradas pelo 12SrRNA via mosquitos, sua detecção foi similar a das moscas

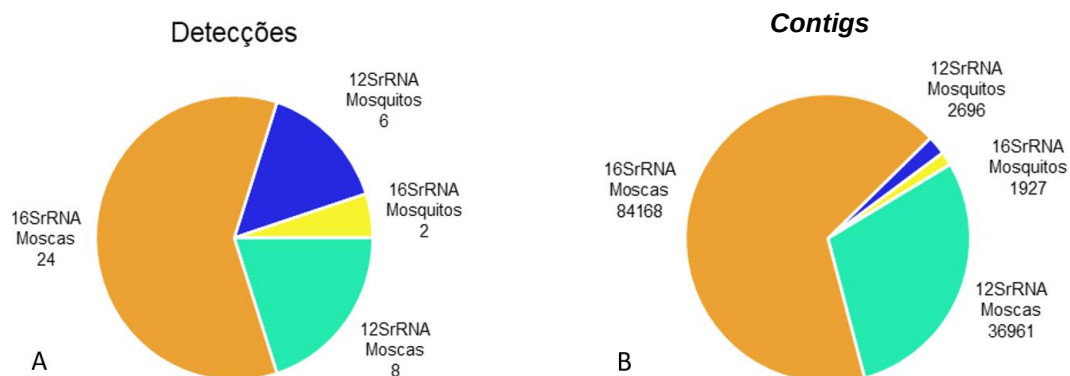


Figura 1.6 - Comparação dos números de (A) detecções e de (B) *contigs* gerados pelo sequenciamento.

Os *mini-barcode*s não apresentaram complementaridade para *A. belzebul* quanto ao número de áreas em que houve sua detecção. O 12SrRNA foi redundante ao 16SrRNA, pois não houve detecção exclusiva pelo 12SrRNA (Figura 1.7A). O 16SrRNA detectou a espécie em sete áreas, sendo três exclusivas e quatro de detecção compartilhada com o 12SrRNA. Assim como os *mini-barcode*s, os amostradores não apresentaram complementaridade para a espécie quanto ao número de áreas em que houve detecção da espécie-alvo. Também não houve detecção exclusiva pelos mosquitos (Figura 1.7B). As moscas, porém, detectaram a espécie nas sete áreas, sendo cinco exclusivas e duas de detecção compartilhada com os mosquitos.

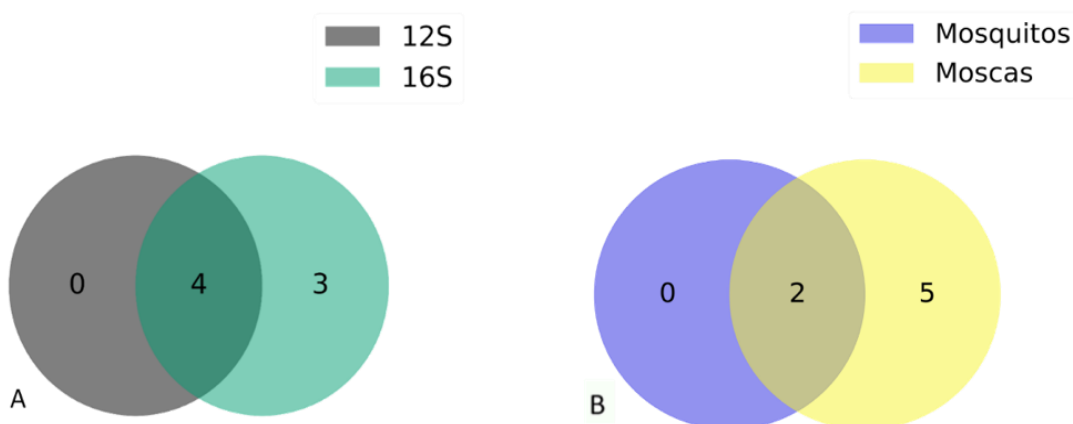


Figura 1.7 - Relações do número de áreas em que a espécie *Alouatta belzebul* foi detectada por (A) *mini-barcode*: 12SrRNA (12S) e 16SrRNA (16S) e por (B) amostrador: mosquitos e moscas.

No geral, o *mini-barcode* 16SrRNA usando amostras de DNA provenientes de moscas foi a melhor combinação para detectar *A. belzebul* no CEP, conforme evidenciado na Figura 1.7. Portanto, para as condições desse estudo, o uso combinado de dois marcadores e dois amostradores não seria necessário para detecção de *A. belzebul* por *metabarcoding*. Como os mosquitos necessitam de uma armadilha específica de maior custo e de manutenção mais difícil, pois necessita de troca de bateria a cada 24h e pode enfrentar problemas com seus componentes como sua lâmpada e seu ventilador, principalmente em ambientes tropicais, eles poderiam ser evitados, devido ao baixo sucesso. Por outro lado, o uso apenas de moscas como amostradores, cujas armadilhas de são artesanais, baratas, e não necessitam manutenção diária durante seu funcionamento, permitiria um maior investimento em esforço amostral, em novas áreas ou em réplicas temporais. O uso de apenas um marcador, também permitiria que pelo mesmo custo um maior número de pontos amostrais fosse sequenciado.

Sendo assim, os resultados desse trabalho apontam que para fins de monitoramento de *A. belzebul* a utilização do *mini-barcode* do gene 16SrRNA através do DNA ingerido por moscas é suficiente para detectar a espécie. Entretanto, em áreas próximas a borda, com maior influência antrópica e de animais domésticos, esforços amostrais precisam ser empenhados, dada a alta competitividade com sequências de animais domésticos e humanos nestes locais. Deste modo, sugerimos que a redução dos amostradores e dos marcadores possibilite ampliar o esforço amostral, sendo que a abordagem a ser adotada varie de acordo com o objetivo e orçamento disponível. Por exemplo, o número de áreas amostradas deverá ser ampliado se o objetivo for monitorar a espécie em uma ampla escala espacial, em que uma ou poucas coletas podem ser suficientes para uma caracterização geral (Civade *et al.*, 2016). Por outro lado, se o objetivo for confirmar a presença em um local específico, podem ser feitas mais coletas temporalmente dispersas, a fim de obter maior certeza da presença da espécie (Srivathsan *et al.*, 2023).

1.4 REFERÊNCIAS

ABRAMS, J. F.; HÖRIG, L. A.; BROZOVIC, R.; TAXTNER, J.; CRAMPTON-PLATT, A.; MOHAMED, A.; WONG, S. T.; SOLLMANN, R.; YU, D. W.; WILTING, A. Shifting up a gear with iDNA: From mammal detection events to standardised surveys. **Journal of Applied Ecology**, v. 56, n. 7, p. 1637–1648, 2019.

AI-ICMBio. **Áreas importantes para a conservação dos primatas do Nordeste**. Paraíba: ICMBio, 2021. Disponível em: <https://sites.google.com/view/areasimportantespanprine/Inicio?authuser=0> Acesso em: 05 de out. de 2022.

ALMEIDA, L. M.; MARINONI, L.; CLARKSON, B. Coleta, montagem, preservação e métodos para estudos. *In*: RAFAEL, J. A.; MELO, G. A. R.; CARVALHO, C. J. B.; CASARI, S. A.; CONSTANTINO, R. **Insetos do Brasil: Diversidade e Taxonomia**. 2. ed. Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 2024. cap. 7, p. 120-136. ISBN 978-65-5633-046-4.

ANDREWS, S. **FastQC**: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data [Online]. 2010. Disponível em: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> Acesso em: 23 mai. 2022.

ARROYO-RODRIGUEZ, V.; MORAL, E.C.; MANDUJANO, S.; CHAPMAN, C.A.; REYNA-HURTADO, R.; FAHRIG, L. Assessing Habitat Fragmentation Effects on Primates: The Importance of Evaluating Questions at the Correct Scale. *In*: MARSH, L.K.; CHAPMAN, C.A. **Primates in Fragments: Complexity and Resilience**. 2013. Developments in Primatology: Progress and Prospects. Series Editor: Louise Barrett. 537p.

ARROYO-RODRÍGUEZ, V.; DIAS, P.A.D. Effects of habitat fragmentation and disturbance on howler monkeys: a review. **Am J Primatol**, v. 72, p. 1–16, 2010.

BANERJEE, P.; DEY, G.; ANTOGNAZZA, C. M.; SHARMA, R. K.; MAITY, J. P.; CHAN, M. W. Y.; HUANG, Y.-H.; LIN, P.-Y.; CHAO, H.-C.; LU, C.-M.; CHEN, C.-Y. Reinforcement of environmental DNA based methods (*Sensu stricto*) in biodiversity monitoring and conservation: A review. **Biology**, v. 10, n. 12, p. 1–17, 2021.

BICCA-MARQUES, J. C. How do Howler Monkeys Cope with Habitat Fragmentation? *In*: MARSH, L. K. (eds) **Primates in Fragments**. Springer, Boston, MA. 2003.

BICCA-MARQUES, J. C.; CHAVES, Ó. M.; HASS, G. P. Howler monkey tolerance to habitat shrinking: Lifetime warranty or death sentence? **American Journal of Primatology**, v. 82, n. 4, p. 1–9, 2019.

CARIM, K. J.; WILCOX, T.; YOUNG, M. K.; MCKELVEY, K. S.; SCHWARTZ, M. K. **Protocol for collecting eDNA samples from streams** [Version 2.3]. Boise, ID: US Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station, Boise Aquatic Sciences Lab. 10 p. 2016.

CARVALHO, C. S.; OLIVEIRA, M. E.; RODRIGUEZ-CASTRO, K. G.; SARANHOLI, B. H.; GALETTI JUNIOR, P. M. Efficiency of eDNA and iDNA in assessing vertebrate diversity and its abundance. **Molecular Ecology Resources**, v. 22, n. 4, p. 1262–1273, 2021.

CATCHEN, J.; AMORES, A.; HOHENLOHE, P.; CRESKO, W.; POSTLETHWAIT, J. Stacks: building and genotyping loci de novo from short-read sequences. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v.1, p. 171-182, 2011. DOI 10.1534/g3.111.000240

CIVADE, R.; DEJEAN, T.; VALENTINI, A.; ROSET, N.; RAYMOND, J.-C.; BONIN, A.; TABERLET, P.; PONT, D. Spatial representativeness of environmental DNA *metabarcoding* signal for fish biodiversity assessment in a natural freshwater system. **PloS one**, v. 11, n. 6, p. e0157366, 2016. DOI 10.1371/journal.pone.0157366.

CLARE, E. L.; ECONOMOU, C. K.; BENNETT, F. J.; DYER, C. E.; ADAMS, K.; MCROBIE, B.; DRINKWATER, R.; LITTLEFAIR, J. E. Measuring biodiversity from DNA in the air. **Current Biology**, v. 32, n. 3, p. 693- 700, 2022.

COIMBRA-FILHO, A. F.; CÂMARA, I. G.; RYLANDS, A. B. On the geographic distribution of the redhanded howling monkey, *Alouatta belzebul*, in Northeast Brazil. **Neotropical Primates**, v.3, n.4, p.176-178, 1995.

COLLINS, R. A.; BAKKER, J.; WANGENSTEEN, O. S.; SOTO, A. Z.; CORRIGAN, L.; SIMS, D. W.; GENNER, M. J.; MARIANI, S. Non-specific amplification compromises environmental DNA *metabarcoding* with COI. **Methods in ecology and evolution**, v. 10, n. 11, p. 1985–2001, 2019. DOI 10.1111/2041-210x.13276.

CORRÊA, F. M. **Variação morfológica no crânio de *Alouatta clamitans* e *Alouatta caraya* (Primates, Atelidae)**. Trabalho de Pós-graduação Lato Sensu, na área de Diversidade e Conservação da Fauna - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Biociências: Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal Curso de Especialização em Diversidade e Conservação da Fauna, 2012.

COUTANT, O.; RICHARD-HANSEN, C.; THOISY, B.; DECOTTE, J. B.; VALENTINI, A.; DEJEAN, T.; VIGOUROUX, R.; MURIENNE, J.; BROSSE, S. Amazonian mammal monitoring using aquatic environmental DNA. **Molecular Ecology Resources**, v. 21, n. 6, p. 1875–1888, 2021.

DIAS, T. C. Endemic and threatened birds as proxies for identifying conservation priority areas and designing ecological corridors in America's most endangered habitat. In: DIAS, T. C. **Dinâmica espaço-temporal da cobertura de Mata Atlântica no Centro de Endemismo Pernambuco e uso do habitat pela avifauna ameaçada da região**. Orientador: Mercival Roberto Francisco. 2023. 121 f. Tese (Doutorado) - Curso de Doutorado em Ciências, Departamento de Ciências Ambientais, Universidade Federal de São Carlos (Campus Sorocaba), São Carlos, 2023.

EWELS, P.; MAGNUSSON, M.; LUNDIN, S.; KÄLLER, M. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. **Bioinformatics**, v. 32, n. 19, p. 3047-3048, 2016. DOI 10.1093/bioinformatics/btw354

FAHMY, M.; ANDRIANOELY, D.; WRIGHT, P. C.; HEKKALA, E. Leech-derived iDNA complements traditional surveying methods, enhancing species detections for rapid biodiversity sampling in the tropics. **Environmental DNA**, v. 5, n. 6, p. 1557–1573, 2023. DOI 10.1002/edn3.474.

FIALHO, M. S.; VALENÇA-MONTENEGRO, M. M.; SILVA, T. C. F.; FERREIRA, J. G.; LAROQUE, P. O. Ocorrência de *Sapajus flavius* e *Alouatta belzebul* no Centro de Endemismo Pernambuco. **Neotropical Primates**, v. 21, n. 2, p. 214–218, 2014. DOI 10.1896/044.021.0215

GABRIEL, D. W.; DANTAS, H. S.; ALBUQUERQUE, F. P. M. C.; ROCHA NETO, M. Inventário das espécies de primatas ocorrentes na RPPN Senador Antônio Farias, Mata Estrela, Baía Formosa, RN: resultados preliminares. In: BICCA-MARQUES, J. C. (org.). **Programa e Livro de Resumos do XI Congresso Brasileiro de Primatologia**, p. 104. Sociedade Brasileira de Primatologia, Porto Alegre.

GASPAR, D. A. **Ecologia e Comportamento do Bugio Ruivo, *Alouatta fusca* (Geoffroy, 1812, Primates:Cebidae), em Fragmento de Mata de Campinas, SP.** 1997. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1997.

GREGORIN, R. Taxonomia e variação geográfica das espécies do gênero *Alouatta* Lacépède (Primates, Atelidae) no Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 23, p. 64–144, 2006.

GRILLO, A.; OLIVEIRA, M.A.; TABARELLI, M. Árvores. In: PÔRTO, K. C.; ALMEIDA-CORTEZ, J. S.; TABARELLI, M. (Orgs.). **Diversidade Biológica biológica e conservação da floresta atlântica ao norte do rio São Francisco**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2005. p. 191-218.

HASSAN, S.; SABREENA; POCZAI, P.; GANAI, B. A.; ALMALKI, W. H.; GAFUR, A.; SAYYED, R. Z. Environmental DNA *metabarcoding*: A novel contrivance for documenting terrestrial biodiversity. **Biology**, v. 11, n. 9, p. 1297, 2022. DOI 10.3390/biology11091297.

HOWELL, L.; LARUE, M.; FLANAGAN, S. P. Environmental DNA as a tool for monitoring Antarctic vertebrates. **New Zealand Journal of Zoology**, v. 48, n. 3-4, p. 245-262, 2021.

JI, Y.; BAKER, C. C. M.; POPESCU, V. D.; WANG, J.; WU, C.; WANG, ZHENGYANG.; LI, Y.; WANG, L.; HUA, C.; YANG, Z.; YANG, C.; XU, C. C. Y.; DIANA, A.; WEN, Q.; PIERCE, N. E.; YU, D. W. Measuring protected-area effectiveness using vertebrate distributions from leech iDNA. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, p. 1–17, 2022.

KEARSE, M.; MOIR, R.; WILSON, A.; STONES-HAVAS, S.; CHEUNG, M.; STURROCK, S.; BUXTON, S.; COOPER, A.; MARKOWITZ, S.; DURAN, C.; THIERER, T.; ASHTON, B.; MEINTJES, P.; DRUMMOND, A. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 12, p. 1647–1649, 2012. DOI 10.1093/bioinformatics/bts199

KOCHER, A.; THOISY, B.; CATZEFLIS, F.; VALIÈRE, S.; BAÑULS, A. L.; MURIENNE, J. iDNA screening: Disease vectors as vertebrate samplers. **Molecular Ecology**, v. 26, n. 22, p. 6478–6486, 2017.

LANGGUTH, A.; TEIXEIRA, D. M.; MITTERMEIER, R. A.; BONVICINO, C. The red-handed howler monkey in northeastern Brazil. **Primate Cons**, v. 8, p. 36–39, 1987.

LANGLOIS, V. S.; ALLISON, M. J.; BERGMAN, L. C.; TO, T. A.; HELBING, C. C. The need for robust qPCR-based eDNA detection assays in environmental monitoring and species inventories. **Environmental DNA** (Hoboken, N.J.), v. 3, n. 3, p. 519–527, 2021. DOI 10.1002/edn3.164.

LIMA, F. *et al.* ATLANTIC-CAMTRAPS: a dataset of medium and large terrestrial mammal communities in the Atlantic Forest of South America. **Ecology**, v. 98, n. 11, p. 2979–2979, 2017.

LIMA, R. A. F.; OLIVEIRA, A. A.; PITTA, G. R.; GASPER, A. L.; VIBRANS, A. C.; CHAVE, J.; STEEGE, H.; PRADO, P. I. The erosion of biodiversity and biomass in the Atlantic Forest biodiversity hotspot. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1–16, 2020.

LUDWIG, G.; LIMA, G. Y. F.; AZEVEDO, R. B. de; JERUSALINSKY, L.; VALENÇA-MONTENEGRO, M. M.; BUSS, G. Howlers in an anthropogenic matrix: how does an *Alouatta belzebul* group deal with the severely fragmented landscape of the Atlantic forest in northeastern Brazil? **Neotropical primates**, vol. 26, no. 2, p. 7–16, 2020. DOI 10.62015/np.2020.v26.49.

LUTZ, L.; VERHOFF, M. A.; AMENDT, J. Environmental factors influencing flight activity of forensically important female blow flies in Central Europe. **International journal of legal medicine**, v. 133, n. 4, p. 1267–1278, 2019. DOI 10.1007/s00414-018-1967-5.

LYNGGAARD, C.; NIELSEN, M.; SANTOS-BAY, L.; GASTAUER, M.; OLIVEIRA, G.; BOHMANN, K. Vertebrate diversity revealed by *metabarcoding* of bulk arthropod samples from tropical forests. **Environmental DNA**, v. 1, n. 4, p. 329–341, 2019. DOI 10.1002/edn3.34

MACHER, T. H.; SCHÜTZ, R.; ARLE, J.; BEERMANN, A. J.; KOSCHORRECK, J.; LEESE, F. Beyond fish eDNA *metabarcoding*: Field replicates disproportionately improve the detection of stream associated vertebrate species. **Metabarcoding and Metagenomics**, v. 5, p. 59–71, 2021.

MARTIN, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. **EMBnetjournal**, v. 17, n. 1, p. 10, 2011. DOI 10.14806/ej.17.1.200.

MASSEY, A. L.; BRONZONI, R. V. M.; SILVA, D. J. F.; ALLEN, J. M.; LÁZARI, P. R.; SANTOS-FILHO, M.; CANALE, G. R.; BERNARDO, C. S. S.; PERES, C. A.; LEVI, T. Invertebrates for vertebrate biodiversity monitoring: Comparisons using three insect taxa as iDNA samplers. **Molecular Ecology Resources**, v. 22, n. 3, p. 962–977, 2021.

MENA, J. L.; YAGUI, H.; TEJEDA, V.; BONIFAZ, E.; BELLEMAIN, E.; VALENTINI, A.; TOBLER, M. W.; SÁNCHEZ-VENDIZÚ, P.; LYET, A. Environmental DNA *metabarcoding* as a useful tool for evaluating terrestrial mammal diversity in tropical forests. **Ecological Applications**, v. 31, n. 5, p. 1–13, 2021.

MONTARSI, F.; MAZZON, L.; CAZZIN, S.; CIOCCHETTA, S.; CAPELLI, G. Seasonal and daily activity patterns of mosquito (Diptera: Culicidae) vectors of pathogens in northeastern Italy. **Journal of medical entomology**, v. 52, n. 1, p. 56–62, 2015. DOI 10.1093/jme/tju002.

MORANDI, P. S.; MARIMON, B. S.; EISENLOHR, P. V.; MARIMON-JUNIOR, B. H.; OLIVEIRA-SANTOS, C.; FELDPAUSCH, T. R.; OLIVEIRA, E. A.; REIS, S. M.; LLOYD, J.; PHILLIPS, O. L. Patterns of tree species composition at watershed-scale in the Amazon “arc of deforestation”: Implications for conservation. **Environmental Conservation**, v. 43, n. 4, p. 317–326, 2016.

MUYLAERT, R. L. *et al.* A dataset of bat communities from the Atlantic Forests of South America. **Ecology**, v. 98, n. 12, p. 3227–3227, 2017.

OLIVEIRA, M. M.; OLIVEIRA, J. C. C. A situação dos cebídeos como indicador do estado de conservação da Mata Atlântica no Estado da Paraíba, Brasil. In: YAMAMOTO, M. E.; SOUZA, M. B. C. (orgs.). **A Primatologia no Brasil**, v. 4. Natal: Editora Universitária/UFRN, 1993. p. 155–167.

OLIVEIRA, P. T.; SANTOS E SILVA, C. M.; LIMA, K. C. Climatology and trend analysis of extreme precipitation in subregions of Northeast Brazil. **Theoretical and applied climatology**, v. 130, n. 1–2, p. 77–90, 2017. DOI 10.1007/s00704-016-1865-z.

PAN Primatas Amazônicos. 2019. **Sumário Executivo do Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Primatas Amazônicos**. Disponível em: <https://www.gov.br/icmbio/pt-br/assuntos/biodiversidade/pan/pan-primatas-amazonicos/1-ciclo/pan-primatas-amazonicos-sumario.pdf> Acesso em: 24 mai. 2022.

PAN-PRINE, 2019. **Sumário executivo do Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Primatas do Nordeste**. Disponível em: <https://www.gov.br/icmbio/pt-br/assuntos/biodiversidade/pan/pan-primatas-do-nordeste/2-ciclo/pan-primatas-do-nordeste-sumario.pdf> Acesso em: 24 mai. 2022

PEDERSEN, M. W.; OVERBALLE-PETERSEN, S.; ERMINI, L.; SARKISSIAN, C.; HAILE, J.; HELLSTROM, M.; SPENS, J.; THOMSEN, P. F.; BOHMANN, K.; CAPPELLINI, E.; SCHNELL, I. B.; WALES, N. A.; CARØE, C.; CAMPOS, P. F.; SCHMIDT, A. M. Z.; GILBERT, M. T. P.; HANSEN, A. J.; ORLANDO, L.; WILLERSLEV, E. Ancient and modern environmental DNA. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 370, n. 1660, 2015.

PONTES, A. R. M.; JORDANI, R. A.; RIBEIRO, P. F. R.; NORMANDE, I. C.; FERNANDES, A. C. A.; SOARES, M. L.; RAMALHO, C. B. Ocorrência e abundância de primatas em fragmentos florestais no Centro de Endemismo Pernambucano. In:

BICCA-MARQUES, J. C. (Ed.). **A primatologia no Brasil**. Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Primatologia, 2007. p. 193-203.

POZO-MONTUY, G.; SERIO-SILVA, J. C. Movement and resource use by a group of *Alouatta pigra* in a forest fragment in Balancán, México. **Primates**, vol. 48, no. 2, p. 102–107, 2007. DOI 10.1007/s10329-006-0026-x.

PRATES, H. M.; BICCA-MARQUES, J. C. Age-sex analysis of activity budget, diet, and positional behavior in *Alouatta caraya* in an orchard forest. *International journal of primatology*, vol. 29, no. 3, p. 703–715, 2008. DOI 10.1007/s10764-008-9257-6

RIAZ, T.; SHEHZAD, W.; VIARI, A.; POMPANON, F.; TABERLET, P.; COISSAC, E. ecoPrimers: inference of new DNA barcode markers from whole genome sequence analysis. **Nucleic acids research**, v. 39, n. 21, e145-e145, 2011. DOI 10.1093/nar/gkr732

RODA, S. A.; PEREIRA, G. A.; ALBANO, C. **Conservação de aves endêmicas e ameaçadas do Centro de Endemismo Pernambuco**. Recife: Ed. Universitária da UFPE, 2011.

RODGERS, T. W.; XU, C. C. Y.; GIACALONE, J.; KAPHEIM, K. M.; SALTONSTALL, K.; VARGAS, M.; YU, D. W.; SOMERVUO, P.; MCMILLAN, W. O.; JANSEN, P. A. Carrion fly-derived DNA *metabarcoding* is an effective tool for mammal surveys: Evidence from a known tropical mammal community. **Molecular ecology resources**, vol. 17, no. 6, 2017. DOI 10.1111/1755-0998.12701.

RODRÍGUEZ, A.; RODRÍGUEZ, M.; CÓRDOBA, J. J.; ANDRADE, M. J. Design of primers and probes for quantitative real-time PCR methods. In: BASU, C. (eds). **PCR Primer Design**. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer New York, 2015. p. 31–56. DOI 10.1007/978-1-4939-2365-6_3.

ROGNES, T.; FLOURI, T.; NICHOLS, B.; QUINCE, C.; MAHÉ, F. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. **PeerJ**, v. 4, n. e2584, p. e2584, 2016. DOI 10.7717/peerj.2584.

SARANHOLI, B. H.; RODRIGUEZ-CASTRO, K. G.; CARVALHO, C. S.; CHAHAD-EHLERS, S.; GESTICH, C. C.; ANDRADE, S. C. S.; FREITAS, P. D.; GALETTI, P. M., Jr. Comparing iDNA from mosquitoes and flies to survey mammals in a semi-controlled Neotropical area. **Molecular ecology resources**, vol. 23, no. 8, p. 1790–1799, 2023. DOI 10.1111/1755-0998.13851.

SILVESTRE, S. M.; SETCHELL, J. M.; CALLE-RENDÓN, B. R.; DE TOLEDO, J. J.; HILÁRIO, R. R. The occurrence of the red-handed howler monkey (*Alouatta belzebul*) in amazonian savannas is related to forest patch area and density of flooded area palms. **American journal of primatology**, v. 82, n. 12, 2020. DOI 10.1002/ajp.23210.

SRIVATHSAN, A.; LOH, R. K.; ONG, E. J.; LEE, L.; ANG, Y.; KUTTY, S. N.; MEIER, R. Network analysis with either Illumina or MinION reveals that detecting vertebrate species requires *metabarcoding* of iDNA from a diverse fly community. **Molecular ecology**, v. 32, n. 23, p. 6418–6435, 2023. DOI 10.1111/mec.16767.

STEINMETZ, S. Ecologia e comportamento do Bugio (*Alouatta fusca clamitans*, Atelidae- Primates) no Parque Estadual Intervales - SP. 2000. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

TABARELLI, M.; PINTO, L. P.; SILVA, J.M.C.; HIROTA, M.M.; BEDÊ, L.C. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. **Megadiversidade**, v. 1, p. 132–138, 2005.

TAYLOR, P. G. Reproducibility of ancient DNA sequences from extinct Pleistocene fauna. **Molecular biology and evolution**, v. 13, p. 283–285, 1996. DOI 10.1093/oxfordjournals.molbev.a025566

THONGSRIPONG, P.; GREEN, A.; KITTAYAPONG, P.; KAPAN, D.; WILCOX, B.; BENNETT, S. Mosquito Vector Diversity across Habitats in Central Thailand Endemic for Dengue and Other Arthropod-Borne Diseases. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 10, 2013. DOI 10.1371/journal.pntd.0002507

USHIO, M.; FUKUDA, H.; INOUE, T.; MAKOTO, K.; KISHIDA, O.; SATO, K.; MURATA, K.; NIKAIIDO, M.; SADO, T.; SATO, Y.; TAKESHITA, M.; IWASAKI, W.; YAMANAKA, H.; KONDOH, M.; MIYA, M. Environmental DNA enables detection of terrestrial mammals from forest pond water. **Molecular Ecology Resources**, v. 17, n. 6, p. e63–e75, 2017.

VALENÇA-MONTENEGRO, M. M.; FIALHO, M. S.; CARVALHO, A. S.; RAVETTA, A. L.; RÉGIS, T.; MELO, F. R.; VEIGA, L. M. *Alouatta belzebul* (Linnaeus, 1766). In: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. **Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção**: Volume II – Mamíferos. 1. Brasília, DF: ICMBio/MMA, p.148-152, 2018.

VALENÇA-MONTENEGRO, M. M.; FIALHO, M. S.; CARVALHO, A. S.; RAVETTA, A. L.; RÉGIS, T.; DE MELO, F. R.; JERUSALINSKY, L.; VEIGA, L. M.; MITTERMEIER, R. A.; CORTES-ORTÍZ, L.; TALEBI, M. *Alouatta belzebul* (amended version of 2019 assessment). The IUCN Red List of Threatened Species 2021. 2021. Disponível em: <https://www.iucnredlist.org/fr/species/39957/190412426> Acesso em: 24 mai. 2022.

WILLIAMS, K. E.; HUYVAERT, K. P.; VERCAUTEREN, K. C.; DAVIS, A. J.; PIAGGIO, A. J. Detection and persistence of environmental DNA from an invasive, terrestrial mammal. **Ecology and Evolution**, v. 8, n. 1, p. 688–695, 2018.

WOOD, S. A.; POCHON, X.; LAROCHE, O.; VON AMMON, U.; ADAMSON, J.; ZAIKO, A. A comparison of droplet digital polymerase chain reaction (PCR), quantitative PCR and *metabarcoding* for species-specific detection in environmental DNA. **Molecular ecology resources**, v. 19, n. 6, p. 1407–1419, 2019. DOI 10.1111/1755-0998.13055.

ZHANG, J.; KOBERT, K.; FLOURI, T.; STAMATAKIS, A. PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR. **Bioinformatics**, v. 30, n. 5, p. 614–620, 2014. DOI 10.1093/bioinformatics/btt593

CAPÍTULO 2 – eDNAlyzer: UMA FERRAMENTA RÁPIDA E AMIGÁVEL PARA O PROCESSAMENTO DE DADOS MASSIVOS DE ATRIBUIÇÃO TAXONÔMICA EM ESTUDOS DE DNA AMBIENTAL

RESUMO

Ferramentas computacionais para analisar grandes volumes de dados são essenciais para otimizar e facilitar a busca por informações de interesse. No caso das análises de *metabarcoding*, embora, existam algumas ferramentas disponíveis, as etapas de filtragem e busca por informações de interesse costumam ser feitas manualmente ou usando *hand-made scripts* de acesso restrito. O processamento e filtragem manual de dados massivos, além de ser demorado pode conduzir a erros em etapas posteriores. Neste trabalho, nós desenvolvemos uma ferramenta computacional amigável e de uso livre, denominada eDNAlyzer, para processar dados de *metabarcoding* gerados, especialmente, em estudos de DNA ambiental (eDNA) e DNA derivado de invertebrados (iDNA). eDNAlyzer permite processar e filtrar dados de interesse a partir de critérios estabelecidos pelo usuário. Esta ferramenta, desenvolvida em Python 3.12, usando a ferramenta Tkinter e o pacote Pandas, possui uma interface gráfica amigável que permite o processamento e a filtragem de dados em duas etapas principais: "*initial processing and threshold application*" e "*build table of consolidated results*". A primeira etapa inclui o *input* dos dados de atribuição das Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs) e o estabelecimento de valores de corte (*threshold*) para filtragem de dados. O *output* desta etapa gera três arquivos, a saber: com o total de OTUs processadas, com as OTUs com valores do *threshold* por amostra de sequenciamento, e com as OTUs com valores iguais ou acima do *threshold*. A segunda etapa de trabalho consiste na busca pelas informações de interesse, considerando diferentes filtros selecionados pelo usuário. Nesta etapa, o programa tabulará os dados com as informações de interesse e gerará *outputs*, com extensão .xlsx, de acordo com as opções de filtragem. eDNAlyzer foi compilado em um único arquivo executável, o que facilita sua distribuição e uso. Comparado a outras ferramentas para análise de dados de *metabarcoding*, eDNAlyzer oferece uma interface gráfica mais amigável e opções de filtragem flexíveis, se mostrando especialmente útil em estudos de eDNA e iDNA.

Palavras-chave: ecologia molecular, bioinformática, *metabarcoding*; genética da conservação

2.1 INTRODUÇÃO

O princípio da metodologia de *metabarcoding* consiste em avaliar simultaneamente um conjunto expressivo de sequências de DNA, denominadas *barcodes*, geradas a partir da amplificação prévia de amostras de DNA obtidas das mais diversas fontes, incluindo do ambiente. Assim, a atribuição taxonômica de

dezenas, centenas e até mesmo milhares de espécies, amostradas simultaneamente, pode ser realizada em uma única análise (Taberlet *et al.*, 2012).

O sequenciamento de *barcodes* para múltiplas espécies pode ser feito a partir da utilização de *primers* desenhados para amplificar trechos conservados do DNA de grupos taxonômicos específicos de organismos, como, por exemplo, mamíferos ou vertebrados (Ficetola *et al.*, 2010). Esta abordagem desenvolvida inicialmente por Hebert e colaboradores no ano de 2003 (Hebert *et al.*, 2003), com a finalidade de identificar espécies através de um código de barras de DNA (*DNA barcoding*), expandiu enormemente seu uso, tendo sido empregada para diversas finalidades, auxiliando estudos aplicados à ecologia, evolução e conservação biológica (Gostel e Kress, 2022; Janzen *et al.*, 2017; Kress *et al.*, 2015).

Na abordagem de *metabarcoding*, após o processamento dos dados obtidos via sequenciamento de próxima geração (*Next Generation Sequencing*, NGS ou *next-gen*), as sequências obtidas em larga escala são agrupadas em *clusters* nos quais possuam pelo menos 97% de similaridade entre si, visando gerar sequências consenso para cada *cluster*. Os consensos representarão as Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs), as quais serão comparadas com sequências disponíveis em bancos de dados genômicos de referência e terão um táxon atribuído a si, processo este denominado de atribuição taxonômica. Dessa forma é possível listar os táxons presentes nas amostras sequenciadas (Porter e Hajibabaei, 2018).

O avanço constante no uso e aplicação de abordagens que envolvem análises de *metabarcoding* tem impulsionado o desenvolvimento de ferramentas computacionais para a análise dos grandes volumes de dados gerados a partir da atribuição taxonômica (Hakimzadeh *et al.*, 2023). As etapas de processamento e filtragem desses resultados, porém, muitas vezes é feita de forma manual ou através do uso de *hand-made scripts* desenvolvidos para conjuntos de dados específicos e/ou com acesso restrito (e.g. Harper *et al.*, 2019; Johnson *et al.*, 2022; Massey *et al.*, 2021; Saranholi *et al.*, 2024).

No caso específico da aplicação da abordagem de *metabarcoding* em estudos de DNA ambiental (eDNA) e de DNA derivado de invertebrados (iDNA), abordagens que geram sequências de DNA obtidas, respectivamente, a partir de amostras do ambiente, como água, solo, ar; e de amostras do conteúdo ingerido por invertebrados (Carvalho *et al.*, 2021; Massey *et al.*, 2021; Saranholi *et al.*, 2024), um conjunto grande de variáveis deve ser considerado na análise de dados, a saber, o ponto de coleta da

amostra, o tipo de amostra, o marcador molecular usado para gerar os *barcodes*, as *tags* moleculares, além de especificidades relacionadas a utilização de alíquotas das amostras no processo de extração de DNA.

A análise manual de dados massivos, em geral, demanda um tempo maior para processamento, que quando automatizada, e ainda está propensa a erros (Bernard, 2016; Mitchell *et al.*, 2022), especialmente, quando se considera múltiplas variáveis, como é o caso dos dados de eDNA e iDNA. Portanto esse trabalho teve como objetivo desenvolver uma ferramenta computacional de acesso livre, com interface gráfica amigável e intuitiva, destinada para uma ampla gama de usuários, incluindo aqueles que não dominam linhas de comando e/ou linguagem de programação, capaz de processar de forma rápida, simples e segura dados provenientes de atribuição taxonômica de *metabarcoding*, produzidos, e definir um valor de *threshold* para os dados obtidos, particularmente, em estudos de eDNA e/ou iDNA.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

O software eDNAAnalyzer foi desenvolvido em Python 3.12 (Python Software Foundation, 2023) no ambiente de desenvolvimento integrado (IDE) Pycharm Community Edition 2023.3.4 (JetBrains, 2023). A interface gráfica do programa foi desenvolvida utilizando a biblioteca Tkinter 8.6 (Python Software Foundation, 2023) e a biblioteca Pillow 10.2.0 (Murray *et al.*, 2024) para adicionar imagens à interface. Para o processamento de dados foi utilizada a biblioteca Pandas 2.1.4 (McKinney, 2010), que permite a análise e manipulação de dados massivos de maneira rápida, robusta e flexível (Rajagopalan, 2020; Temiz, 2022).

O código-fonte do programa foi estruturado em dois arquivos: um arquivo principal “janelas.py”, responsável por criar a interface gráfica e aplicar as funcionalidades do software; e um arquivo auxiliar “metabar.py”, que contém as funções de análise e manipulação de dados. Essa divisão foi feita para facilitar a organização dos dados e simplificar a resolução de erros. Os arquivos “.py” com o código-fonte junto com os arquivos de imagens foram reunidos e transformados em um arquivo executável (.exe), utilizando o aplicativo auto-py-to-exe 2.43.2 (Vollebregt, 2024).

O arquivo executável (.exe), assim como o código-fonte do programa foram depositados no GitHub no repositório <https://github.com/Leo-9821/eDNAAnalyzer>. O

arquivo executável foi desenvolvido para ser utilizado em sistema operacional Windows®, porém o código-fonte em Python (arquivos .py) pode ser utilizado para rodar o programa em sistemas Linux® ou macOS®. A Propriedade Intelectual do programa será registrada junto ao Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) por meio da Agência de Inovação da UFSCar.

A interface do programa foi desenvolvida em inglês e em português, e o usuário poderá selecionar o idioma de sua preferência antes de inicializar o programa. Além disso, um manual de instruções com as principais orientações de uso foi elaborado e inserido na interface do programa para ser acessado pelo usuário a qualquer tempo. Todas as tarefas executáveis e descrição de como utilizar o programa são apresentadas no tópico Resultados.

Em suma, a principal funcionalidade do eDNAAnalyzer é automatizar e otimizar o processamento e filtragem de dados de *metabarcoding*, obtidos particularmente a partir do emprego de métodos como eDNA e iDNA, após a atribuição taxonômica da OTUs, e calcular um valor de *threshold*, visando selecionar informações de interesse de forma segura e confiável. Para isso, o usuário deve fornecer ao programa uma tabela inicial de entrada com os dados de *metabarcoding* com definição prévia das OTUs. A partir de então, as informações fornecidas serão processadas considerando um valor de corte (*threshold*) para o número de *contigs* para cada OTU definida. O valor de corte consistirá na porcentagem mínima de *contigs* por amostra de sequenciamento que uma OTU deve possuir para ser incluída no resultado da atribuição taxonômica final, visando otimizar a identificação do táxon e evitar *bias* devido a erros de sequenciamento.

Na primeira etapa de trabalho, o eDNAAnalyzer irá calcular o valor de corte para cada amostra de sequenciamento e em seguida irá filtrar as OTUs considerando o valor de *threshold* definido. Após isso, a atribuição taxonômica deverá ser revisada pelo usuário, em uma etapa de curadoria manual, a fim de estabelecer os táxons finais definitivos para cada OTU. Posteriormente, numa segunda etapa de trabalho, o usuário poderá aplicar filtros específicos para selecionar informações de interesse, e gerar tabelas finais com os resultados consolidados. A Figura 2.1 ilustra um *workflow* representando a estrutura e o funcionamento geral do eDNAAnalyzer.

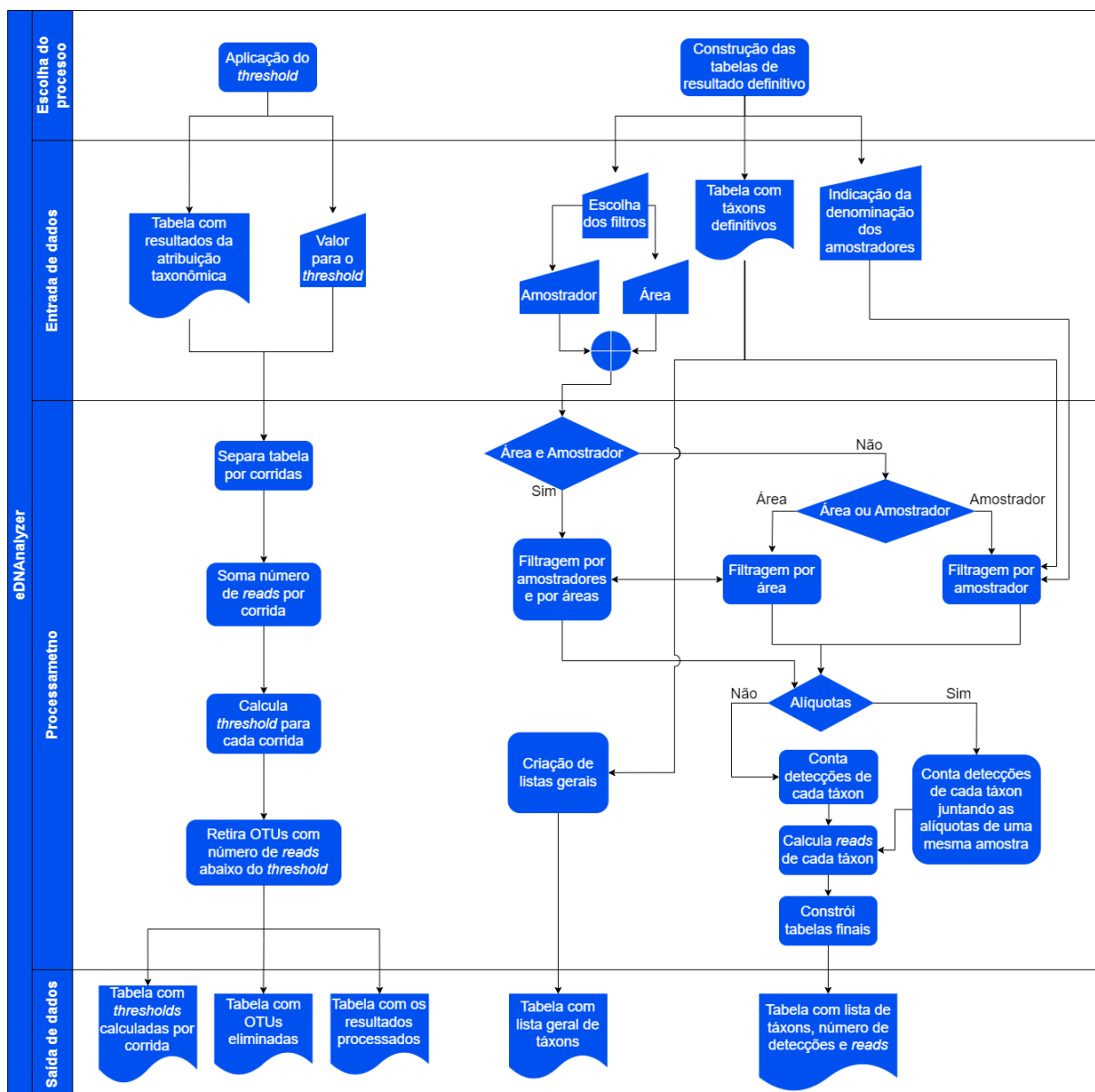


Figura 2.1 - Fluxograma de funcionamento do programa eDNAlyzer, evidenciando as principais ações do programa: o fluxograma à direita ilustra a primeira etapa do programa, aplicação do *threshold* à tabela de atribuição taxonômica e retirada das OTUs que não possuírem número de *reads* acima desse limite; à esquerda está ilustrado a segunda etapa de funcionamento do eDNAlyzer, mostra a entrada de dados com a tabela de táxons definitivos, escolhas dos filtros, denominação de amostradores, os dados serão analisados e filtrados de acordo com as opções escolhidas gerando as tabelas com o resultado definitivo.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Obtendo e Instalando o eDNAlyzer

O acesso ao eDNAlyzer deve ser feito primeiramente em ambiente *World Wide Web* (WWW), de forma gratuita e amigável. Para tal, o usuário deverá localizar o programa no endereço <https://github.com/Leo-9821/eDNAlyzer> e fazer *download* do arquivo executável (39,7 MB), que pode ser usado localmente. Para utilizar o programa no sistema operacional Windows® é sugerido o Windows 10 ou superior, processador Intel® i5-2450M ou superior e 4 GB ou mais de memória RAM. Antes de rodar o eDNAlyzer, no entanto, o usuário deverá selecionar o idioma de sua preferência (Inglês ou Português), e acessar o manual de instruções, conforme mostrado nas Figuras 2.2 e 2.3. Após estas etapas, o usuário poderá selecionar a tarefa que deseja executar, clicando na opção de interesse. O programa eDNAlyzer disponibiliza duas principais opções para execução de tarefas ou “*jobs*”, conforme mostrado na Figura 2.3 e descrito em maiores detalhes a seguir.



Figura 2.2 - Interface de interação com o usuário mostrando a opção de seleção de idioma do programa eDNAlyzer

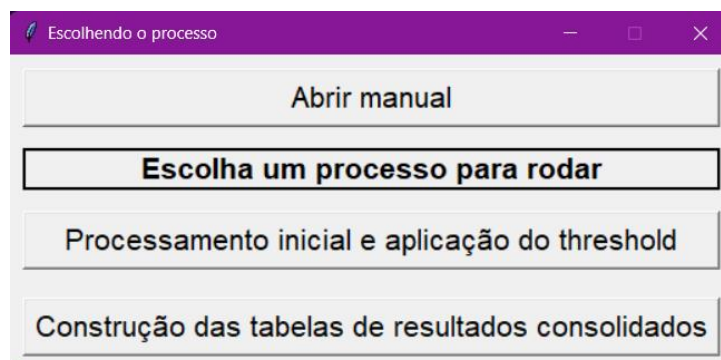


Figura 2.3 – Interface de interação com o usuário mostrando a opção de acesso ao manual de instruções e as duas principais tarefas executadas pelo programa eDNAlyzer

2.3.2 Usando o eDNAalyzer

2.3.2.1 Processamento inicial e aplicação do *threshold*

Para executar a tarefa denominada “*processamento inicial e aplicação do threshold*” o usuário deve fornecer ao programa uma tabela com os dados de atribuição taxonômica organizados em um arquivo de entrada em formato .xlsx. Este arquivo deverá conter ao menos seis colunas descrevendo os dados relativos à amostra de sequenciamento (Amostra_sequenciamento ou Sequencing_sample), às áreas de estudo e amostradores (Area_amostrador ou Area_sampler), ao ponto de coleta das amostras (Ponto ou Point), à identificação da OTU (Otu), ao número de *contigs* (N_contigs) obtidas por OTU, e à espécie ou táxon atribuído (Táxon ou Taxon). Deve-se indicar a área de coleta e o tipo de amostrador usado, separados por um *underscore* (e.g. área_amostrador), devendo-se usar códigos não ambíguos para não ocorrer erros durante a etapa de filtragem das informações. Além dessas colunas obrigatórias, outras informações poderão ser inseridas em colunas adicionais, de acordo com o interesse do usuário. Por exemplo, caso tenham sido utilizadas alíquotas na extração de DNA, o usuário poderá incluir uma coluna reportando estes dados. Informações relativas às *tags* moleculares utilizadas no sequenciamento, e aos valores de identidades obtidos nos alinhamentos para atribuição taxonômica, também poderão ser incluídas, à critério do usuário, como mostrado na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 - Modelo de tabela de entrada em inglês para executar a tarefa inicial para estabelecimento do *threshold* e tabelas filtradas para este dado no eDNAalyzer.

Sequencing_sample	Area_sampler	Point	Otu	N_contigs	Taxon	Aliquot	id_%	Tag
S1	A1_MC	1	1	89654	<i>Alouatta belzebul</i>	1	100	TA
S2	A1_MC	2	1	542	<i>Bos taurus</i>	2	100	TB
S3	A1_AG	1	1	20	<i>Bradypus variegatus</i>	1	97.45	TC
S4	A2_MQ	2	1	75234	<i>Homo sapiens</i>	1	100	TD

Nesta etapa de trabalho, o eDNAalyzer irá calcular os valores de *threshold* (valor padrão 0,05%) para cada amostra de sequenciamento para os dados de

atribuição taxonômica, provenientes da análise prévia de *metabarcoding* e filtrar as OTUs considerando este valor de corte. Como resultado desta análise serão fornecidos arquivos de saída em formato .xlsx. Após a execução desse passo, serão gerados três arquivos com extensão .xlsx, contendo: (i) os dados de *threshold* totais calculados para cada amostra de sequenciamento; (ii) os dados com as OTU que apresentaram valores de corte abaixo do definido; e (iii) os dados com as OTU que apresentaram valores de corte iguais ou acima do definido como limiar *threshold*. Esta última tabela deverá ser salva e curada manualmente para adição de uma coluna com a atribuição taxonômica revisada. A seguir são mostrados os principais passos para execução dessa tarefa inicial, seguindo um *pipeline* ilustrado no manual de instruções do programa e mostrado a seguir.

Passo 1: Selecione o item “processamento inicial e aplicação do *threshold*” (Figura 2.4).

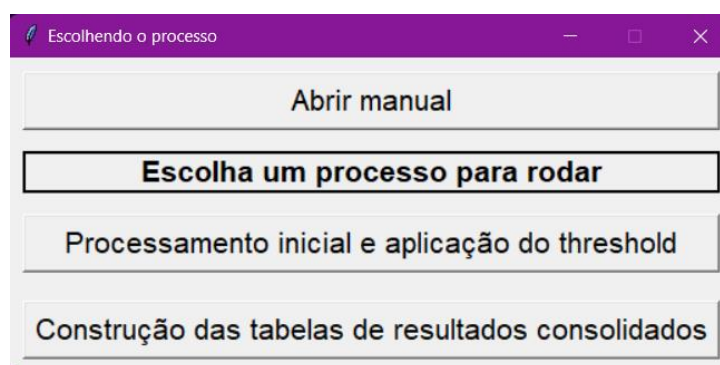


Figura 2.4 – Interface de interação com o usuário mostrando a opção de acesso à tarefa “processamento inicial e aplicação do *threshold*” disponível no programa eDNAlyzer.

Passo 2: Selecione o item “clique para selecionar” e faça o carregamento do arquivo de entrada (Figura 2.5).

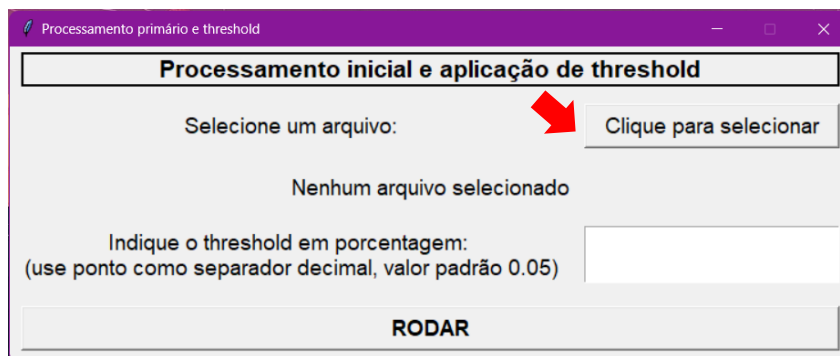


Figura 2.5 - Interface de interação com o usuário mostrando a opção de acesso à tarefa “Processamento da inicial a aplicação do threshold” indicando função de inserção de arquivo de entrada.

Passo 3: Clique na tabela carregada, no caminho exibido na tela, caso deseje conferir os dados do arquivo de entrada, antes de prosseguir para o próximo passo (Figura 2.6).

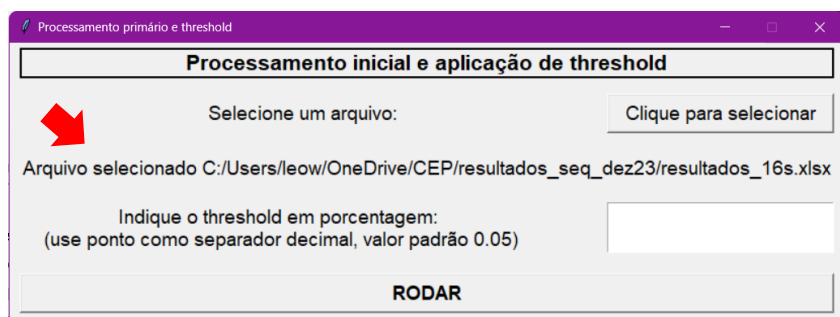


Figura 2.6 - Interface de interação com o usuário mostrando o arquivo de entrada disponível para análise.

Passo 4: Indique o valor de *threshold* que deseja utilizar. Recomenda-se utilizar o valor padrão de 0,05%. Porém, se desejar usar outro valor informe no campo disponível para digitação de texto. O valor digitado deve conter ponto (.) como separador decimal. (Figura 2.7).

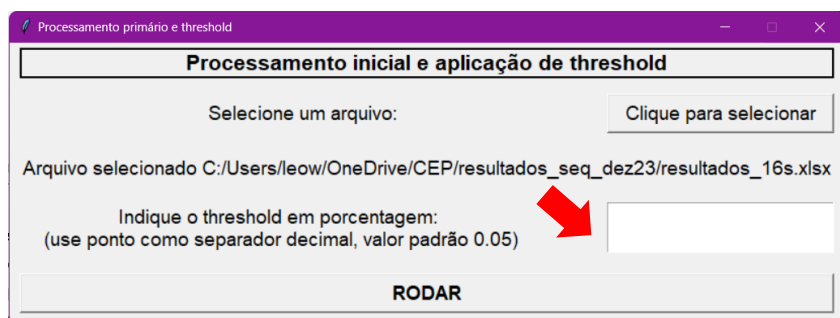


Figura 2.7 - Interface de interação com o usuário mostrando a opção de acesso à tarefa “Processamento da inicial a aplicação do threshold” indicando caixa de texto para inserir *threshold*.

Passo 5: Selecione o item “rodar” para executar a referida tarefa (Figura 2.8).

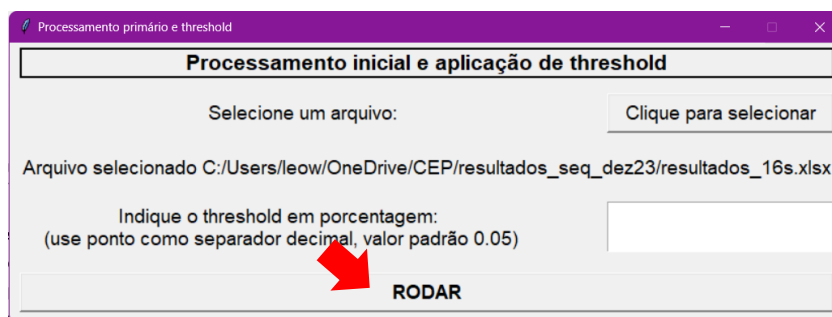


Figura 2.8 - Tela do “Processamento da inicial a aplicação do threshold” indicando botão para rodar a primeira etapa de processamento.

Passo 6: Salve localmente as tabelas de interesse. Caso deseje seguir para etapa seguinte de trabalho faça uma curadoria manual da tabela com as OTUs que apresentaram valores iguais ou acima do *threshold*, conforme descrito a seguir.

2.3.2.2 Construção de tabelas de resultados consolidados

Para execução da tarefa denominada “*construção de tabelas de resultados consolidados*”, a tabela com as OTUs de interesse deverá ser revisada e editada, adicionando-se uma coluna nomeada **OTUFinal** ou **FinalOTU**, caso esteja utilizando o programa em inglês, com a atribuição taxonômica definitiva, após curadoria manual (Tabela 2.2).

Tabela 2.2 - Modelo de tabela de entrada em inglês para executar a tarefa final para estabelecimento das tabelas filtradas com os resultados consolidados no eDNAAnalyzer.

Sequencing_sample	Area_sampler	Point	Otu	N_contigs	Species	Aliquot	id_%	Tag	FinalOTU
C1	A1_MC	1	1	89654	Alouatta belzebul	1	100	TA	Alouatta belzebul
C2	A1_MC	2	1	542	Bos taurus	2	100	TB	Bos taurus
C3	A1_AG	1	1	20	Bradypus variegatus	1	97.45	TC	Bradypus sp.
C4	A2_MQ	2	1	75234	Homo sapiens	1	100	TD	Homo sapiens

Nessa etapa de trabalho, o eDNAAnalyzer irá criar tabelas com os resultados consolidados, listando as espécies/táxons finais estabelecidos, com seus respectivos números de detecções e de *contigs*. As tabelas poderão ser geradas separando as

informações por amostrador, por área, e por amostrador e área conjuntamente, conforme descrito nos passos a seguir.

Passo 1: Selecione a opção “Construção das tabelas de resultados consolidados” (Figura 2.9).

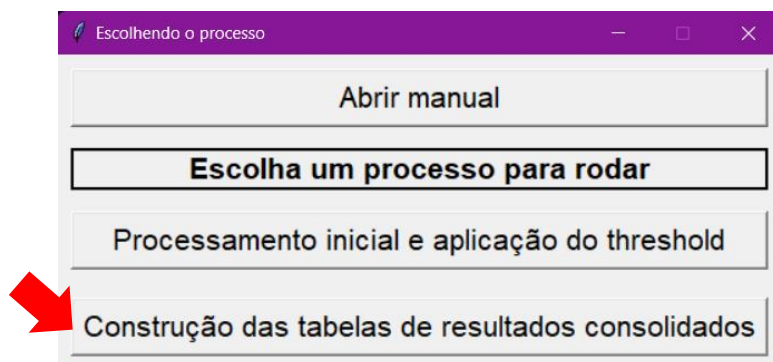


Figura 2.9 – Interface de interação com usuário indicando a opção “construção das tabelas de resultados consolidados” do programa eDNAlyzer.

Passo 2: Selecione a opção “clique para selecionar” para carregar o arquivo de entrada para rodar a tarefa de trabalho “construção das tabelas de resultados consolidados” (Figura 2.10).

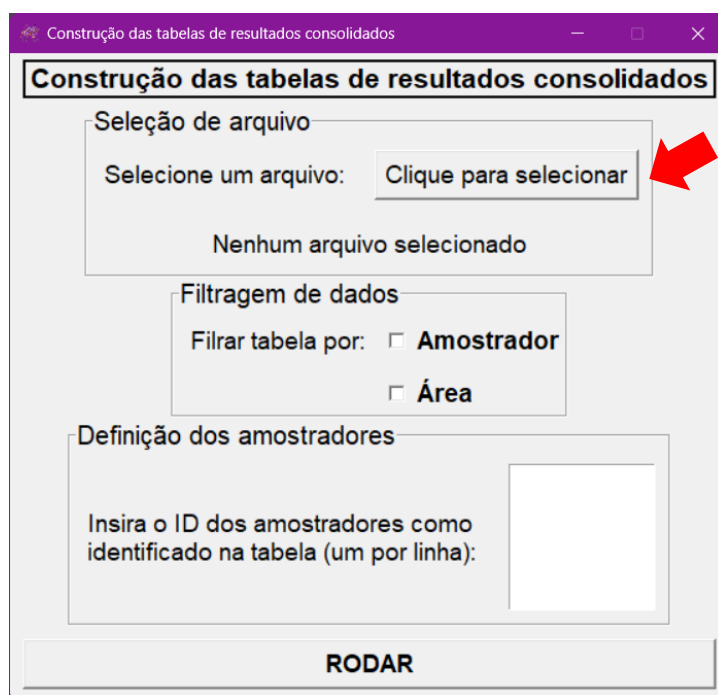


Figura 2.10 - Interface de interação com usuário indicando a opção de inserção do arquivo de entrada para a tarefa “construção das tabelas de resultados consolidados”.

Passo 3: Selecione o arquivo de entrada carregado e confira se os dados foram carregados corretamente (Figura 2.11).

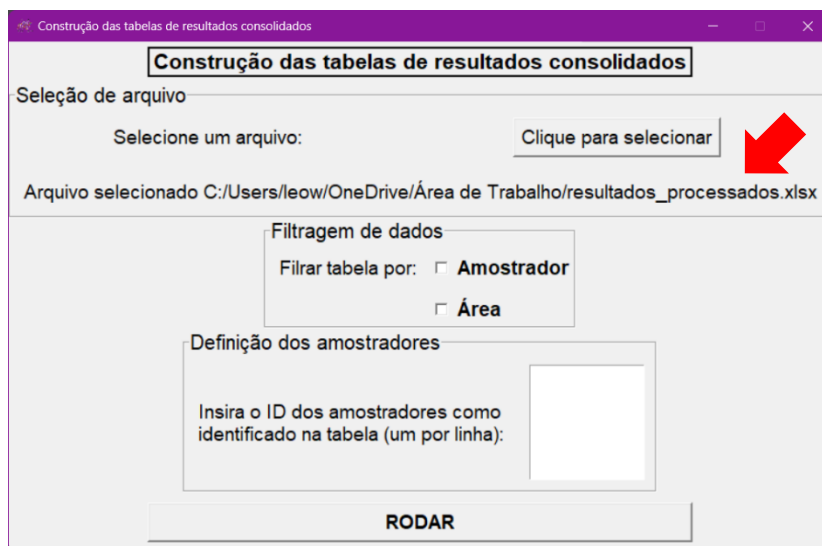


Figura 2.11 - Interface de interação com usuário indicando o arquivo de entrada carregado e a opção de filtros para seleção de dados de interesse no programa eDNAlyzer.

Passo 4: Selecione o(s) filtro(s) que deseja usar, por amostrador, por área ou por ambos (Figura 2.12).

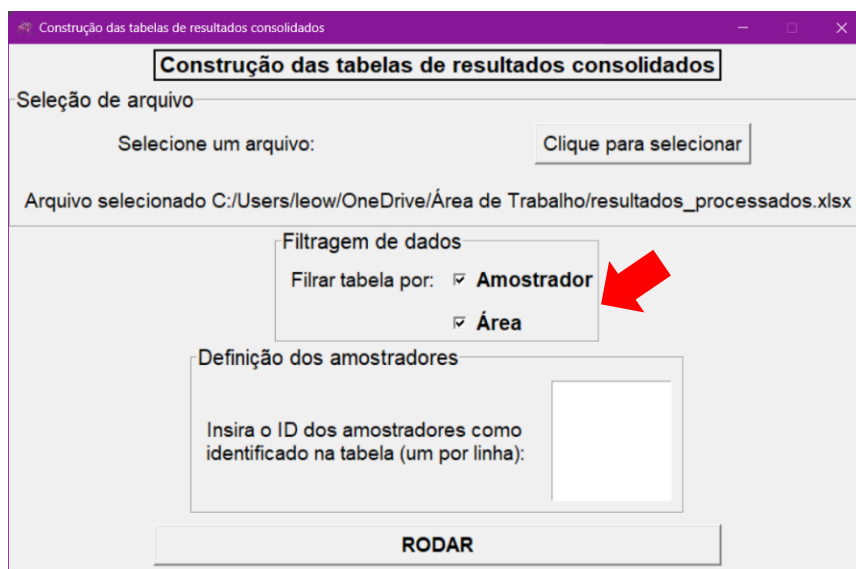


Figura 2.12 - Interface de interação com usuário indicando a opção “Construção das tabelas de resultados consolidados” para seleção dos filtros de Amostrador, Área.

Passo 5: Caso tenha selecionado a opção “Amostrador”, insira no próximo campo como identificou seus amostradores na tabela, separando-os em linhas distintas, de

maneira que fiquem um debaixo do outro (Figura 2.13). Se você não selecionou a opção “Amostrador”, deixe esse campo em branco.

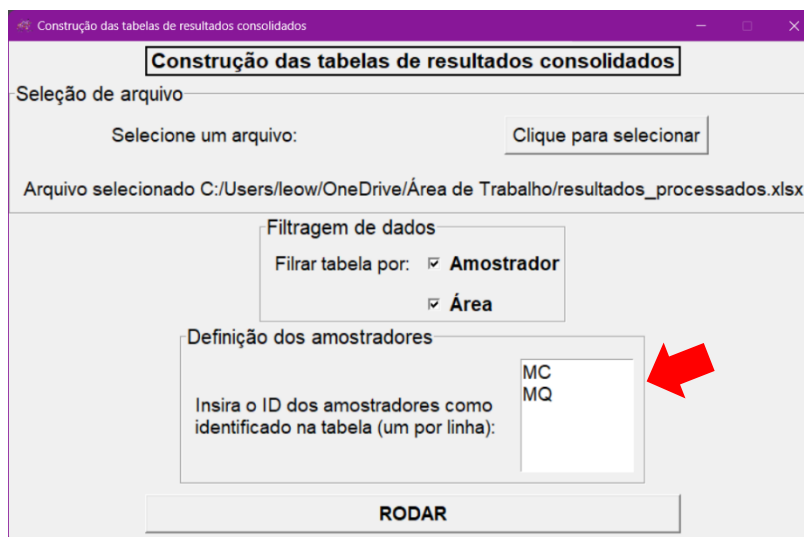


Figura 2.13 - Interface de interação com usuário indicando a opção “Construção das tabelas de resultados consolidados” para inserção da denominação dada aos amostradores no arquivo de entrada.

Passo 6: Selecione a opção “RODAR” para executar a tarefa (Figura 2.14).

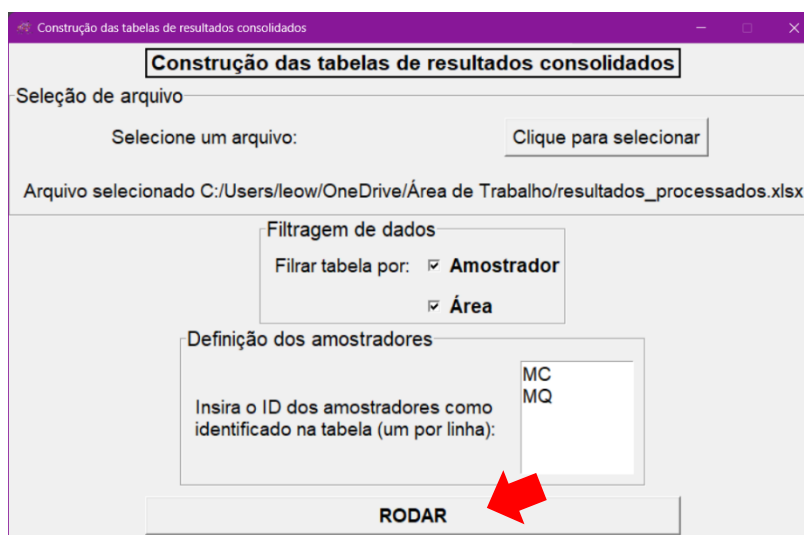


Figura 2.14 - Interface de interação com usuário indicando a opção “Construção das tabelas de resultados consolidados” para rodar esta tarefa no eDNAAnalyzer.

Após rodar a respectiva tarefa, o programa irá gerar as tabelas de acordo com as opções de filtros selecionadas. Portanto, o passo seguinte consiste em salvar os arquivos gerados localmente, contendo os dados finais filtrados e consolidados.

Passo 7: Salve as tabelas de interesse de acordo com os filtros aplicados.

2.4 DISCUSSÃO

O programa eDNAlyzer foi desenvolvido com a finalidade de facilitar o processamento e análises de dados obtidos, especificamente, em estudos de eDNA e iDNA, que utilizam a abordagem de *metabarcoding* para gerar OTUs e identificar as espécies presentes em uma amostra proveniente do ambiente, que pode ser de água, solo, ou de algum outro amostrador do ambiente, como, por exemplo, insetos que se alimentam de outros organismos (Abrams *et al.*, 2019; Clare *et al.*, 2022; Mena *et al.*, 2021; Pedersen *et al.*, 2015).

Além de ter uma interface gráfica intuitiva, o eDNAlyzer permite a utilização prévia de quaisquer programas para análise de dados brutos de *metabarcoding*, para a atribuição taxonômica, como por exemplo Stacks, utilizado para demultiplexagem (Catchen *et al.*, 2011), PEAR, utilizado para concatenação (Zhang *et al.*, 2014), Cutadapt, utilizado para remoção da sequência dos *primers* (Martin, 2011), e USEARCH (Edgar, 2010) ou VSEARCH (Rognes, *et al.*, 2016), utilizados para a clusterização de *contigs*.

Uma vez obtidos os dados de OTUs, tabelas simplificadas, contendo os dados da atribuição taxonômica, devem ser formatadas para gerar o arquivo de entrada requerido na etapa inicial de trabalho do eDNAlyzer. Ainda que sua interface gráfica restrinja a sua flexibilidade de gerenciamento de dados, em comparação com outras ferramentas baseadas em linhas de comando, o eDNAlyzer permite ao usuário a geração de tabelas distintas, a partir da seleção de filtros específicos, que garantem certa flexibilidade nas ações mantendo uma interface gráfica intuitiva.

Grande parte das ferramentas para análises de dados de *metabarcoding* é construída para ser utilizada através de linhas de comando, visando aumentar a flexibilidade de seu uso, permitindo a possibilidade de múltiplas ações, e.g. VSEARCH (Rognes, *et al.*, 2016), USEARCH (Edgar, 2010), OBITools, *pipeline* para *metabarcoding* (Boyer *et al.*, 2014). Porém, o avanço nos estudos de DNA ambiental, tem evidenciado a necessidade de simplificar processos que demandam de conhecimento adicional sobre linguagens e/ou ambientes de programação, especialmente, para permitir que usuários iniciantes nesta técnica, que não possuem familiaridade com interfaces computacionais não gráficas, analisem os dados de forma automatizada e segura. Neste sentido, o eDNAlyzer atende essa demanda de forma eficiente, permitindo seu uso a uma ampla gama de usuários.

Alguns *softwares* similares ao eDNAAnalyzer (e.g., TaxonTableTools, Macher; Beermann; Leese, 2021; SLIM, Dufresne *et al.*, 2019; JAMP, <https://github.com/VascoElbrecht/JAMP>), apresentam outras funcionalidades de exploração e visualização de resultados de *metabarcoding* bastante eficientes. Entretanto, tais ferramentas não foram desenvolvidas para processar dados de atribuição taxonômica de *metabarcoding*, especificamente, derivados de estudos de eDNA ou iDNA ou quando são desenvolvidos com essa intenção chegam apenas até a atribuição taxonômica, não possuem funcionalidades de filtragem e tratamento desses dados. Já o eDNAAnalyzer foi desenvolvido exatamente para esta finalidade, com opções de filtragem que se adequam a ambas as metodologias mencionadas, permitindo filtrações por área e amostradores; além de fornecer a possibilidade de reunir os resultados de alíquotas da extração de DNA, que, até então, são analisadas separadamente. Além disso, o código-fonte do eDNAAnalyzer e suas dependências foram reunidos em um único arquivo executável no formato “.exe”, o que facilita sua distribuição, pois o usuário apenas necessita de acesso a esse pequeno arquivo, não sendo necessários *downloads* de diretórios e/ou instalações. Por outro lado, outras ferramentas já disponíveis (e.g. OBITools, Boyer *et al.* 2014; ranacapa, Kandlikar *et al.*, 2018; eDNA-Container, Wheeler *et al.*, 2024), necessitam de instalação usando linhas de comando, e linguagens de programação e bibliotecas das quais estas dependem.

Em suma, o eDNAAnalyzer se apresenta como uma ferramenta amigável e eficiente para processar de forma rápida, simples e segura dados de atribuição taxonômica de *metabarcoding*, produzidos, particularmente, em estudos de eDNA e/ou iDNA, e adicionalmente atribuir um valor de *threshold* para os dados obtidos, que permite uma maior eficiência na filtragem das informações de interesse.

2.5 REFERÊNCIAS

ABRAMS, J. F.; HÖRIG, L. A.; BROZOVIC, R.; TAXTNER, J.; CRAMPTON-PLATT, A.; MOHAMED, A.; WONG, S. T.; SOLLMANN, R.; YU, D. W.; WILTING, A. Shifting up a gear with iDNA: From mammal detection events to standardised surveys. **Journal of Applied Ecology**, v. 56, n. 7, p. 1637–1648, 2019.

BERNARD, J. Python Data Analysis with pandas. *In*: BERNARD, J. **Python Recipes Handbook**. Berkeley, CA, USA: APRESS, 2016. p. 37–48.

BOYER, F.; MERCIER, C.; BONIN, A.; LE BRAS, Y.; TABERLET, P.; COISSAC, E. obitools: a unix-inspired software package for DNA *metabarcoding*. **Molecular ecology resources**, v. 16, n. 1, p. 176–182, 2016. DOI 10.1111/1755-0998.12428.

CARVALHO, C. S.; OLIVEIRA, M. E.; RODRIGUEZ-CASTRO, K. G.; SARANHOLI, B. H.; GALETTI JUNIOR, P. M. Efficiency of eDNA and iDNA in assessing vertebrate diversity and its abundance. **Molecular Ecology Resources**, v. 22, n. 4, p. 1262–1273, 2021.

CATCHEN, J.; AMORES, A.; HOHENLOHE, P.; CRESKO, W.; POSTLETHWAIT, J. Stacks: building and genotyping loci de novo from short-read sequences. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v.1, p. 171-182, 2011. DOI 10.1534/g3.111.000240

CLARE, E. L.; ECONOMOU, C. K.; BENNETT, F. J.; DYER, C. E.; ADAMS, K.; MCROBIE, B.; DRINKWATER, R.; LITTLEFAIR, J. E. Measuring biodiversity from DNA in the air. **Current Biology**, v. 32, n. 3, p. 693- 700, 2022.

DUFRESNE, Y.; LEJZEROWICZ, F.; PERRET-GENTIL, L. A.; PAWLOWSKI, J.; CORDIER, T. SLIM: a flexible web application for the reproducible processing of environmental DNA metabarcoding data. **BMC bioinformatics**, v. 20, n. 1, p. 88, 2019. DOI 10.1186/s12859-019-2663-2

EDGAR, R. C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 26, n. 19, p. 2460–2461, 2010. DOI 10.1093/bioinformatics/btq461.

FICETOLA, G.; COISSAC, E.; ZUNDEL, S.; RIAZ, T.; SHEHZAD, W.; BESSIÈRE, J.; TABERLET, P.; POMPANON, F. An In silico approach for the evaluation of DNA barcodes. **BMC genomics**, v. 11, n. 1, p. 434, 2010. DOI 10.1186/1471-2164-11-434

GOSTEL, M. R.; KRESS, W. J. The expanding role of DNA barcodes: Indispensable tools for ecology, evolution, and conservation. **Diversity**, v. 14, n. 3, p. 213, 2022.

HAKIMZADEH, A.; ABDALA ASBUN, A.; ALBANESE, D.; BERNARD, M.; BUCHNER, D.; CALLAHAN, B.; CAPORASO, J. G.; CURD, E.; DJEMIEL, C.; BRANDSTRÖM DURLING, M.; ELBRECHT, V.; GOLD, Z.; GWEON, H. S.; HAJIBABAEI, M.; HILDEBRAND, F.; MIKRYUKOV, V.; NORMANDEAU, E.; ÖZKURT, E.; PALMER, J.

M.; ... ANSLAN, S. A pile of pipelines: An overview of the bioinformatics software for *metabarcoding* data analyses. **Molecular Ecology Resources**, 2023. DOI 10.1111/1755-0998.13847.

HARPER, L. R.; LAWSON HANDLEY, L.; CARPENTER, A. I.; GHAZALI, M.; DI MURI, C.; MACGREGOR, C. J.; LOGAN, T. W.; LAW, A.; BREITHAUPT, T.; READ, D. S.; MCDEVITT, A. D.; HÄNFLING, B. Environmental DNA (eDNA) *metabarcoding* of pond water as a tool to survey conservation and management priority mammals. **Biological conservation**, v. 238, n. 108225, p. 108225, 2019. DOI 10.1016/j.biocon.2019.108225.

HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L.; DEWAARD, J. R. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings. Biological sciences**, v. 270, n. 1512, p. 313–321, 2003. DOI 10.1098/rspb.2002.2218

JANZEN, D. H.; BURNS, J. M.; CONG, Q.; HALLWACHS, W.; DAPKEY, T.; MANJUNATH, R.; HAJIBABAEI, M.; HEBERT, P. D. N.; GRISHIN, N. V. Nuclear genomes distinguish cryptic species suggested by their DNA barcodes and ecology. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 31, p. 8313–8318, 2017. DOI 10.1073/pnas.1621504114

JetBrains. **Pycharm Community Edition**. Versão 2023.3.4. 2023 Disponível em: https://download.jetbrains.com/python/pycharm-professional-2023.3.4.exe?_ga=2.182844261.253259166.1711133837-120513683.1709411782&_gl=1*1s2v79s*_ga*MTlwNTEzNjgzLjE3MDk0MTE3ODI.*_ga_9J976DJZ68*MTcxMTEzMzgzNi4zLjEuMTcxMTEzNDkxOS41OS4wLjA Acesso em: 22 mar. 2024.

JOHNSON, M. D.; BARNES, M. A.; GARRETT, N. R.; CLARE, E. L. Answers blowing in the wind: Detection of birds, mammals, and amphibians with airborne environmental DNA in a natural environment over a yearlong survey. **Environmental DNA** (Hoboken, N.J.), v. 5, n. 2, p. 375–387, 2023. DOI 10.1002/edn3.388.

KANDLIKAR, G. S.; GOLD, Z. J.; COWEN, M. C.; MEYER, R. S.; FREISE, A. C.; KRAFT, N. J. B.; MOBERG-PARKER, J.; SPRAGUE, J.; KUSHNER, D. J.; CURD, E. E. ranacapa: An R package and Shiny web app to explore environmental DNA data with exploratory statistics and interactive visualizations. **F1000Research**, v. 7, p. 1734, 2018. DOI 10.12688/f1000research.16680.1.

KRESS, W. J.; GARCÍA-ROBLEDO, C.; URIARTE, M.; ERICKSON, D. L. DNA barcodes for ecology, evolution, and conservation. **Trends in ecology & evolution**, v. 30, n. 1, p. 25–35, 2015. DOI 10.1016/j.tree.2014.10.008.

MACHER, T.; BEERMANN, A. J.; LEESE, F. TaxonTableTools: A comprehensive, platform-independent graphical user interface software to explore and visualise DNA *metabarcoding* data. **Molecular ecology resources**, v. 21, n. 5, p. 1705–1714, 2021. DOI 10.1111/1755-0998.13358. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/1755-0998.13358>.

MARTIN, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. **EMBnet.journal**, v. 17, n. 1, p. 10, 2011. DOI 10.14806/ej.17.1.200.

MASSEY, A. L.; BRONZONI, R. V. M.; SILVA, D. J. F.; ALLEN, J. M.; LÁZARI, P. R.; SANTOS-FILHO, M.; CANALE, G. R.; BERNARDO, C. S. S.; PERES, C. A.; LEVI, T. Invertebrates for vertebrate biodiversity monitoring: Comparisons using three insect taxa as iDNA samplers. **Molecular Ecology Resources**, v. 22, n. 3, p. 962–977, 2021.

MCKINNEY, W. **Data Structures for Statistical Computing in Python**. 2010. Proceedings of the Python in Science Conference [...]. [S. l.]: SciPy, 2010.

MENA, J. L.; YAGUI, H.; TEJEDA, V.; BONIFAZ, E.; BELLEMAIN, E.; VALENTINI, A.; TOBLER, M. W.; SÁNCHEZ-VENDIZÚ, P.; LYET, A. Environmental DNA *metabarcoding* as a useful tool for evaluating terrestrial mammal diversity in tropical forests. **Ecological Applications**, v. 31, n. 5, p. 1–13, 2021.

MITCHELL, K.; BRITO, J. J.; MANDRIC, I.; WU, Q.; KNYAZEY, S.; CHANG, S.; MARTIN, L. S.; KARLSBERG, A.; GERASIMOV, E.; LITTMAN, R.; HILL, B. L.; WU, N. C.; YANG, H. T.; HSIEH, K.; CHEN, L.; LITTMAN, E.; SHABANI, T.; ENIK, G.; YAO, D.; ... MANGUL, S. Benchmarking of computational error-correction methods for next-generation sequencing data. **Genome biology**, v. 21, n. 1, 2020. DOI 10.1186/s13059-020-01988-3.

MURRAY, A.; VAN KEMENADE, H.; WIREFOOL; CLARK (ALEX), J. A.; KARPINSKY, A.; BARANOVIČ, O.; GOHLKE, C.; DUFRESNE, J.; YAY; BRETT, M.; DWESL; SCHMIDT, D.; KOPACHEV, K.; HOUGHTON, A.; REDXEYE; MANI, S.; LANDEY, S.; KOSKELA, A.; WARE, J.; ... LEE, A. **python-pillow/Pillow**: 10.2.0. [S. l.]: Zenodo, 2024.

PEDERSEN, M. W.; OVERBALLE-PETERSEN, S.; ERMINI, L.; SARKISSIAN, C.; HAILE, J.; HELLSTROM, M.; SPENS, J.; THOMSEN, P. F.; BOHMANN, K.; CAPPELLINI, E.; SCHNELL, I. B.; WALES, N. A.; CARØE, C.; CAMPOS, P. F.; SCHMIDT, A. M. Z.; GILBERT, M. T. P.; HANSEN, A. J.; ORLANDO, L.; WILLERSLEV, E. Ancient and modern environmental DNA. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 370, n. 1660, 2015.

PORTER, T. M.; HAJIBABAEI, M. Scaling up: A guide to high-throughput genomic approaches for biodiversity analysis. **Molecular ecology**, v. 27, n. 2, p. 313–338, 2018. DOI 10.1111/mec.14478.

Python Software Foundation. **Python 3.12.2 documentation**. [S. l.], 2 out. 2023. Disponível em: <https://docs.python.org/3.12/>. Acesso em: 22 mar. 2024.

RAJAGOPALAN, G. Prepping your data with pandas. *In*: RAJAGOPALAN, G. A **Python Data Analyst's Toolkit**. Berkeley, CA, USA: APRESS, 2021. p. 147-241.

ROGNES, T.; FLOURI, T.; NICHOLS, B.; QUINCE, C.; MAHÉ, F. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. **PeerJ**, v. 4, n. e2584, p. e2584, 2016. DOI 10.7717/peerj.2584.

SARANHOLI, B. H.; FRANÇA, F. M.; VOGLER, A. P.; BARLOW, J.; VAZ DE MELLO, F. Z.; MALDANER, M. E.; CARVALHO, E.; GESTICH, C. C.; HOWES, B.; BANKS-LEITE, C.; GALETTI JR., P. M. Testing and optimizing *metabarcoding* of iDNA from dung beetles to sample mammals in the hyperdiverse Neotropics. **Molecular ecology resources**, 2024. DOI 10.1111/1755-0998.13961.

TABERLET, P.; COISSAC, E.; POMPANON, F.; BROCHMANN, C.; WILLERSLEV, E. Towards next-generation biodiversity assessment using DNA *metabarcoding*. **Molecular ecology**, v. 21, n. 8, p. 2045–2050, 2012. DOI 10.1111/j.1365-294x.2012.05470.x.

TEMIZ, H. Recording performances of some file types for pandas data. **European Journal of Science and Technology**, 2022. DOI 10.31590/ejosat.1103499

VOLLEBREGT, B. **auto-py-to-exe**. [S. l.: s. n.], 2024. Disponível em: <https://pypi.org/project/auto-py-to-exe/>.

WHEELER, D.; BRANCALION, L.; KAWASAKI, A.; ROURKE, M. L. The eDNA-container app: A simple-to-use cross-platform package for the reproducible analysis of eDNA sequencing data. **Applied sciences (Basel, Switzerland)**, v. 14, n. 6, p. 2641, 2024. DOI 10.3390/app14062641.

ZHANG, J.; KOBERT, K.; FLOURI, T.; STAMATAKIS, A. PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR. **Bioinformatics**, v. 30, n. 5, p. 614–620, 2014. DOI 10.1093/bioinformatics/btt593

CAPÍTULO 3 – MODELAGEM DE DISTRIBUIÇÃO DE ESPÉCIES PARA *Alouatta belzebul* NO CENTRO DE ENDEMISMO PERNAMBUCO E IMPLICAÇÕES PARA SUA CONSERVAÇÃO

RESUMO

Alouatta belzebul é uma espécie de primata vulnerável fortemente afetada pela perda e fragmentação de habitat, ocorrendo tanto na Amazônia quanto na Mata Atlântica. Na Mata Atlântica, *A. belzebul* ocorre no Centro de Endemismo Pernambuco (CEP), uma região altamente desmatada, onde restam menos de 5% da cobertura florestal original, com grande influência de atividades agropecuárias e potencial para extinções locais. Neste trabalho, foram realizadas análises de modelagem de distribuição de espécies para identificar áreas potenciais para a presença de *A. belzebul* no CEP. A área de estudo abrangeu os estados de Alagoas, Pernambuco, Paraíba e Rio Grande do Norte. Os dados de ocorrência de *A. belzebul* foram obtidos de bases de dados públicos e dos resultados das análises de iDNA. As variáveis climáticas e ambientais incluíam dados de temperatura, precipitação, de cobertura de solo, entre outros, e também foram obtidos de bases de dados públicos. Para gerar modelos mais robustos, foi utilizada a abordagem de *ensemble modeling*, que combina diversos algoritmos para criar um consenso entre os modelos com maior capacidade de previsão. As análises foram realizadas usando o pacote biomod2 em ambiente R. Os modelos foram avaliados através do *True Skill Statistic* (TSS). Os resultados mostraram que o *ensemble modeling* teve um desempenho superior na previsão da distribuição de *A. belzebul* no CEP, apresentando um valor de TSS de 0,895. As variáveis que mais contribuíram para a previsão de ocorrência da espécie foram precipitação anual, porcentagem de outras florestas e porcentagem de matriz agropastoril. O modelo destacou a importância de habitats com maior altura do dossel e maior cobertura de árvores. Duas áreas em Alagoas, onde ocorreram detecções inéditas da espécie por iDNA, e uma área em Pernambuco, atualmente não apontada como relevante para *A. belzebul*, foram indicadas como adequadas para ocorrência da espécie. Esses achados são relevantes para subsidiar ações estratégicas para a conservação de *A. belzebul*, direcionando esforços de monitoramento e proteção para áreas prioritárias no CEP.

Palavras-chave: áreas prioritárias para conservação, bugios-de-mãos-ruivas, monitoramento de espécies.

3.1 INTRODUÇÃO

A perda e fragmentação de habitat consiste em uma das principais ameaças à biodiversidade. A destruição de florestas e ecossistemas naturais, devido à atividade humana, tem levado à diminuição dramática da abundância de espécies em todo o planeta. Isso é particularmente preocupante no bioma Mata Atlântica, um importante *hotspot* de biodiversidade que apresenta mais de 8.000 espécies endêmicas, e que

vem sofrendo os impactos negativos ocasionados pelo desmatamento (Tabarelli *et al.*, 2005). O processo de fragmentação e perda de habitat aumenta a vulnerabilidade de muitas espécies, aumentando seu risco de extinção, devido principalmente à redução no tamanho de suas populações e no fluxo gênico (Reed, 2004).

O bugio de mãos-ruivas *Alouatta belzebul* é uma espécie vulnerável a extinção que vem sendo afetada pela perda e fragmentação de habitat nas áreas de sua ocorrência, que inclui a Amazônia e Mata Atlântica. Na Mata Atlântica, esta espécie é encontrada apenas no Centro de Endemismo de Pernambuco (CEP) (Fialho *et al.*, 2014; Pontes *et al.*, 2007), uma das áreas de Mata Atlântica mais ameaçadas, com menos de 2% de sua cobertura florestal original preservada (Lima *et al.*, 2020; Pontes *et al.*, 2007; Tabarelli *et al.*, 2005). Neste cenário, estratégias que assegurem o monitoramento e a proteção das populações de *A. belzebul* em fragmentos remanescentes no CEP são essenciais para contribuir com o programa de conservação da espécie (Benchimol e Peres, 2013; Bicca-Marques, 2003; Chiarello, 2003).

Os estudos de modelagem de distribuição de espécies se mostram eficientes para tal propósito, uma vez que permitem identificar áreas com capacidade potencial de abrigar uma espécie, com base em dados de sua ocorrência e de variáveis ambientais e climáticas, tais como temperatura, precipitação, cobertura da vegetação, entre outros (Elith e Franklin, 2013; Miller, 2010). Essa abordagem pode auxiliar a identificar áreas novas de ocorrência da espécie bem como sugerir áreas adequadas para reintrodução (Genes *et al.*, 2018), contribuindo para direcionar esforços de monitoramento e manejo de espécies e suas populações (Cayuela *et al.*, 2009; Giné e Faria, 2018). No presente trabalho, análises de modelagem de distribuição de espécies foram implementadas com o objetivo de identificar áreas propícias para ocorrência de *A. belzebul* no CEP e assim contribuir com dados relevantes para o desenvolvimento de estratégias de manejo e conservação da espécie.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Área de Estudo

A área de estudo consiste no Centro de Endemismo Pernambuco (CEP), uma área de Mata Atlântica situada mais ao norte, localizada na região nordeste do Brasil,

ao norte da foz do Rio São Francisco, que abrange os estados de Alagoas, Pernambuco, Paraíba e Rio Grande do Norte (Figura 3.1). O CEP possui 5,6 mil hectares de extensão, e apresenta brejos de altitude em seu entorno que atingem áreas de Caatinga. Sua vegetação é composta por áreas de tensão ecológica, floresta estacional semidecidual, floresta ombrófila aberta, floresta ombrófila densa e áreas de formações pioneiras (Santos, 2006). A vegetação natural do CEP é entremeada por uma grande matriz agropecuária formada em sua maioria por canaviais implementados a partir da década de 70. Essa matriz também é constituída de pastagens e áreas urbanas, fazendo com que os fragmentos florestais se tornem cada vez mais isolados e inadequados para a manutenção da biodiversidade neste local (Tabarelli e Roda, 2005).

Os brejos de altitude são enclaves na Caatinga que apresentam vegetação mais próxima da Mata Atlântica do sudeste do que o resto do CEP que possui mais similaridades com a Amazônia (Santos, 2006). Para as análises de modelagens, consideramos neste trabalho, apenas os limites de Mata Atlântica estabelecidos por Muylaert *et al.* (2018) para o CEP. Portanto, um *buffer* de 0,25 graus, a partir da borda do perímetro da área considerada foi criado, sem incluir os brejos de altitude, localizados em áreas de Caatinga, fora da distribuição reportada para a espécie (Valença-Montenegro *et al.*, 2018).

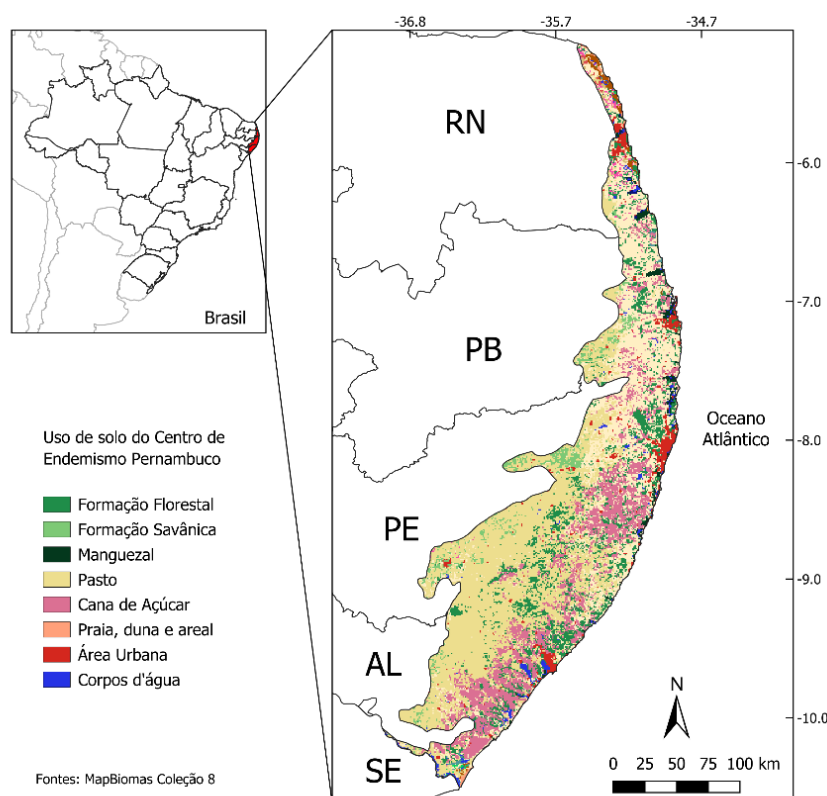


Figura 3.1 - Mapa de uso do solo do Centro de Endemismo Pernambuco.

3.2.2 Dados de Ocorrência de *Alouatta belzebul*

Para levantamento dos dados de ocorrência de *A. belzebul* foram feitas buscas nas bases de dados públicos do sistema SALVE-ICMBio (Sistema de Avaliação do Risco de Extinção da Biodiversidade – Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade), *Species Link* e *iNaturalist*, e no *Datapaper Atlantic Primates* (Culot et al., 2019) (Tabela 3.1). Posteriormente, as informações relativas à ocorrência de *A. belzebul* nos estados que compreendem o CEP foram selecionadas. Para considerar dados mais acurados e precisos das variáveis ambientais e climáticas, e dos registros de ocorrência da espécie, georreferenciados (GPS), consideramos apenas as informações disponíveis a partir de 1980 (Kumar e Moore, 2002). Não foram consideradas ocorrências para coordenadas que representavam a localidade de museus e/ou zoológicos. Além disso, consideramos também os dados de ocorrência da espécie, provenientes dos resultados derivados das análises de iDNA, descritos no primeiro capítulo dessa dissertação, para comparação dos resultados.

Tabela 3.1 - Ocorrência de *Alouatta belzebul* segundo a literatura e bancos de dados públicos.

Método	Estado	Longitude	Latitude	Referência	Base fonte
Entrevista	Paraíba	-34.919375	-6.9985	Dados não publicados. Valenca-Montenegro, M. M.	Data paper - Atlantic Primates
Transecto linear	Paraíba	-34.95555556	-7.021111111	Fialho e Gonçalves, 2008,	Data paper - Atlantic Primates
Transecto linear	Paraíba	-34.95781944	-7.025169444	Fialho et al., 2014	Data paper - Atlantic Primates
	Paraíba	-34.96666667	-7.133333333	Ayres, 1997	Data paper - Atlantic Primates
Entrevista	Rio Grande do Norte	-34.97962222	-6.437222222	Fialho et al., 2014	Data paper - Atlantic Primates
Museu	Rio Grande do Norte	-34.99849167	-6.40895	Coimbra-Filho; Câmara; Rylands, 1995	Data paper - Atlantic Primates
Entrevista	Paraíba	-35.08823889	-7.192813889	Fialho et al., 2014	Data paper - Atlantic Primates
Entrevista	Paraíba	-35.091025	-7.015108333	Dados não publicados. Valenca-Montenegro, M. M.	Data paper - Atlantic Primates
	Paraíba	-35.1	-6.666666667	Ayres, 1997	Data paper - Atlantic Primates
Coleta e visualização	Paraíba	-35.15441667	-7.042833333	Fialho et al., 2014	Data paper - Atlantic Primates
Transecto linear	Paraíba	-35.158889	-7.053056	Hue; Caubet; Moura, 2017	Data paper - Atlantic Primates
	Paraíba	-35.2	-7.083333333	Langguth et al., 1987	Data paper - Atlantic Primates
	Pernambuco	-35.41666667	-8.716666667	Almeida; Pimentel; Silva, 1995	Data paper - Atlantic Primates
	Pernambuco	-35.51666667	-8.7	Gregorin, 2006	Data paper - Atlantic Primates
Entrevista	Alagoas	-35.83635556	-9.2626	Fialho et al., 2014	Data paper - Atlantic Primates

Tabela 4.1 - Ocorrência de *Alouatta belzebul* segundo a literatura e bancos de dados públicos. (continuação)

Entrevista	Alagoas	-35.87130278	-9.214580556	Melo, 2017	Data paper - Atlantic Primates
	Alagoas	-35.93333333	-9.316666667	Gregorin, 2006	Data paper - Atlantic Primates
	Alagoas	-36.13333333	-9.916666667	Gregorin, 2006	Data paper - Atlantic Primates
Entrevista	Rio Grande do Norte	-35.017695	-6.473944	Ludwig et al., in prep.	Data paper - Atlantic Primates
Entrevista	Rio Grande do Norte	-35.021573	-6.487743	Ludwig et al., in prep.	Data paper - Atlantic Primates
Entrevista	Paraíba	-35.100458	-6.935659	Ludwig et al., in prep.	Data paper - Atlantic Primates
Entrevista	Paraíba	-35.137244	-6.984608	Ludwig et al., in prep.	Data paper - Atlantic Primates
Entrevista	Paraíba	-35.16556	-7.04687	Ludwig et al., in prep.	Data paper - Atlantic Primates
Fotografia/avistamento direto	Paraíba	-34.960447	-6.995101	https://www.inaturalist.org/observations/90469743	iNaturalist
Fotografia/avistamento direto	Paraíba	-35.1563	-7.04223	https://www.inaturalist.org/observations/118742205	iNaturalist
Vestígio	Paraíba	-34.989564	-7.018489		SALVE-ICMBio Jul 2023
Vestígio	Paraíba	-35.052117	-7.019156		SALVE-ICMBio Jul 2023
Visualização	Paraíba	-35.149058	-7.065944		SALVE-ICMBio Jul 2023
Visualização	Paraíba	-34.98736282	-7.0865581	Oliveira e Oliveira, 1993	SALVE-ICMBio Jul 2023
Visualização	Paraíba	-35.04426768	-7.15965781	Oliveira e Oliveira, 1993	SALVE-ICMBio Jul 2023
Visualização	Paraíba	-35.09875074	-7.18553205	Oliveira e Oliveira, 1993	SALVE-ICMBio Jul 2023

Tabela 5.1 - Ocorrência de *Alouatta belzebul* segundo a literatura e bancos de dados públicos. (continuação)

Visualização	Paraíba	-35.10002556	-6.878569492		SALVE-ICMBio Jul 2023
Visualização	Paraíba	-35.02219856	-7.15277578	Fialho et al., 2014	SALVE-ICMBio Jul 2023
Visualização	Paraíba	-35.18213548	-6.7256411	Fialho et al., 2014	SALVE-ICMBio Jul 2023
Visualização	Pernambuco	-35.403917	-8.712667	Coimbra-Filho; Câmara; Rylands, 1995	SALVE-ICMBio Jul 2023
Visualização	Paraíba	-34.95482825	-7.01435336	Fialho et al., 2014	SALVE-ICMBio Jul 2024
Visualização	Rio Grande do Norte	-34.981897	-6.430662	Coimbra-Filho; Câmara; Rylands, 1995	SALVE-ICMBio Jul 2025
Visualização	Paraíba	-35.17344276	-6.72652179	Porfírio; Laroque; Oliveira, 2002	SALVE-ICMBio Jul 2026
Coleta	Alagoas	-35.833333	-9.25	Langguth et al., 1987	SALVE-ICMBio Jul 2027
Observação por máquina/Vocalização	Paraíba	-35.23279953	-7.096389771		Species Link

3.2.3 Variáveis Ambientais

Para levantamento dos dados de variáveis ambientais e climáticas, utilizamos o *Google Earth Engine* (GEE) (Gorelick *et al.*, 2017), para acessar e/ou manipular informações disponíveis no *WorldClim V1 Bioclim* (Hijmans *et al.*, 2005), no Projeto MapBiomas, na Coleção 8 (Souza *et al.*, 2020), no DNIT (Departamento Nacional de Infraestrutura de Transportes do Brasil).

Para variáveis climáticas foram utilizados dados para temperatura média anual; temperatura máxima do mês mais quente; temperatura mínima do mês mais frio; sazonalidade da temperatura; variação anual da temperatura; precipitação anual; precipitação do mês mais úmido; precipitação do mês mais seco; e sazonalidade da precipitação. Para variáveis topográficas foram utilizados dados de elevação e declividade. Para variáveis de cobertura de solo, com exceção da altura do dossel e cobertura de árvores, foram usados dados para porcentagem agropastoril; número de fragmentos florestais; cobertura de árvores; altura do dossel; e porcentagem de outras florestas, incluindo as demais categorias de floresta, a saber: formação savânica, mangue, floresta alagável, restinga arbórea e silvicultura. Foram usados também dados de variáveis relacionadas à atividade humana, como distância para rodovias e o índice de modificação humana global gHM (*Global Human Modification*). Uma variável de distância para unidades de conservação também foi utilizada. Todas as variáveis foram reprojatadas para a resolução espacial de 1 km. Maiores detalhes sobre as variáveis usadas no trabalho são apresentados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 - Variáveis escolhidas para a modelagem de distribuição de espécie

Categoria	Variável	Código	Unidade de medida	Utilizado	Descrição	Provedor de dados	Referência
Climática	Temperatura média anual	annualTemp	°C * 10	Não	Temperatura média anual do WorldClim V1	University of California, Berkeley	Hijmans <i>et al.</i> , 2005
	Temperatura máxima de mês mais quente	tempMaxWarmMonth	°C * 10	Sim	Temperatura máxima de mês mais quente do WorldClim V1	University of California, Berkeley	Hijmans <i>et al.</i> , 2005
	Temperatura mínima do mês mais frio	tempMinColdMonth	°C * 10	Não	Temperatura mínima do mês mais frio do WorldClim V1	University of California, Berkeley	Hijmans <i>et al.</i> , 2005
	Sazonalidade da temperatura	tempSeason	°C * 100	Sim	Sazonalidade da temperatura do WorldClim V1	University of California, Berkeley	Hijmans <i>et al.</i> , 2005
	Variação anual da temperatura	tempAnnualRange	°C * 10	Não	Variação anual da temperatura do WorldClim V1	University of California, Berkeley	Hijmans <i>et al.</i> , 2005
	Precipitação anual	annualPrecip	mm	Sim	Precipitação anual do WorldClim V1	University of California, Berkeley	Hijmans <i>et al.</i> , 2005
	Precipitação do mês mais úmido	precWetMonth	mm	Não	Precipitação do mês mais úmido do WorldClim V1	University of California, Berkeley	Hijmans <i>et al.</i> , 2005
	Precipitação do mês mais seco	precDryMonth	mm	Não	Precipitação do mês mais seco do WorldClim V1	University of California, Berkeley	Hijmans <i>et al.</i> , 2005
Topográfica	Sazonalidade da precipitação	precSeason	mm	Sim	Sazonalidade da precipitação do WorldClim V1	University of California, Berkeley	Hijmans <i>et al.</i> , 2005
	Elevação	elevation	m	Não	Modelo de elevação digital	Copernicus	European Space Agency; Airbus, 2022
	Declividade	slope	m	Sim	Inclinação da superfície do solo	Copernicus	European Space Agency; Airbus, 2022

Tabela 3.1 - Variáveis escolhidas para a modelagem de distribuição de espécie (continuação)

Cobertura de solo	Porcentagem agropastoril	percAgropastoral	%	Sim	Porcentagem de matriz agropastoral em <i>buffer</i> de 1km de raio	MapBiomas Coleção 8.0	Souza <i>et al.</i> , 2020
	Número de fragmentos florestais	nFrag	%	Não	Número de fragmentos de Mata Atlântica em um <i>buffer</i> de 1km de raio	MapBiomas Coleção 8.0	Souza <i>et al.</i> , 2020
	Cobertura de árvores	treeCanopyCover	%	Sim	Porcentagem de <i>pixels</i> cobertos por árvores	NASA LP DAAC at the USGS EROS Center	Sexton <i>et al.</i> , 2013
	Altura do dossel	canopyHeight	m	Sim	Altura do dossel	ETH Global Sentinel-2 10m Canopy Height	Lang <i>et al.</i> , 2023
	Porcentagem de outras florestas	percOtherForests	%	Sim	Porcentagem de formações florestais não de Mata Atlântica em um <i>buffer</i> de 1km de raio	MapBiomas Coleção 8.0	Souza <i>et al.</i> , 2020
Humana	Distância para rodovias	distRoads	m	Sim	Distância euclidiana para rodovias federais e estaduais com dados do DNIT	DNIT	Departamento Nacional de Infraestrutura de Transportes do Brasil (DNIT)
	Global Human Modification	gHM	%	Sim	Medida cumulativa de modificação humana	Conservation Science Partners	Kennedy <i>et al.</i> , 2019
	Distância para áreas protegidas	distAreasProt	m	Sim	Distância euclidiana para áreas protegidas com dados do <i>World Database on Protected Areas</i>	UN Environment World Conservation Monitoring Centre (UNEP-WCMC) / Protected Planet	UNEP-WCMC; IUCN, 2023

Após a coletânea das variáveis, foi feita uma correlação de Pearson para exclusão de variáveis que apresentaram valores de $r > 0,7$ e/ou correlações com duas ou mais variáveis, tentando manter pelo menos uma variável de cada categoria (Collart *et al.*, 2020; Dormann *et al.*, 2013). Após isso, foi feito o cálculo de multicolinearidade, utilizando o Fator de Inflação da Variância (VIF). Este cálculo foi feito sucessivamente, removendo-se a variável com maior VIF, até que todas as variáveis apresentassem um valor de $VIF < 4$ (França, 2023; Gao *et al.*, 2023; Polaina, Pärt, Recio, 2020).

3.2.4 Modelagem de Distribuição de Espécies

As análises de modelagens foram feitas usando-se o pacote *biomod2* (Thuiler *et al.*, 2023) em ambiente R 4.2 (R Core Team, 2023). Foram utilizados 10000 pontos de pseudoausência com distância mínima de 1 km de ponto para ponto (Breiner *et al.*, 2015), considerando toda área do CEP. As distâncias entre esses pontos foram as mesmas do comprimento dos raios adotados para os *buffers*. Foram feitas 100 replicações para cada algoritmo (Scherrer *et al.*, 2019). Para gerar os modelos, os dados de ocorrência da espécie e de variáveis ambientais e climáticas foram separados em dois grupos, de treino e de teste, considerando 80% dos dados para treino e 20% para teste (Scherrer *et al.*, 2019).

Os modelos foram gerados utilizando os seguintes algoritmos: *generalized linear models* (GLM), *classification and regression trees* (CTA) (Breiman *et al.*, 1984), *artificial neural networks* (ANN) (Ripley, 1996), *surface range envelopes* (SRE) (Busby, 1991; Booth *et al.*, 2014), *flexible discriminant analysis* (FDA) (Hastie *et al.*, 1994), *multivariate adaptative regression splines* (MARS) (Friedman, 1991), *random forests* (RF) (Breiman, 2001) e *eXtreme Gradient Boosting Training* (XGBOOST) (Chen e Guestrin, 2016). Usamos também a abordagem *ensemble modeling* (EM) que consiste em, primeiramente, gerar diversos modelos usando algoritmos distintos e, posteriormente, gerar um consenso usando os modelos que apresentaram maior capacidade de previsão (Engler *et al.*, 2013; Hao *et al.*, 2019), considerando valores de *True skill statistic* (TSS) maiores que 0,8 (Allouche *et al.*, 2006).

Para gerar o consenso no EM foram atribuídos pesos para cada variável, de acordo com seu desempenho em cada modelo, para obtenção de dados relativos (i) à importância de cada variável para a distribuição da espécie; (ii) às curvas resposta

para cada variável, mostrando a probabilidade de ocorrência da espécie, dependendo do valor da variável em questão; (iii) à camada *raster* de probabilidade de ocorrência da espécie; e (iv) à camada *raster* binária de ocorrência e não-ocorrência da espécie.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após as análises de correlação de Pearson (Figura 3.2) e de multicolinearidade, considerando valores de VIF < 4,0 (Tabela 3.3), foram mantidas as seguintes variáveis: precipitação anual, sazonalidade da precipitação, sazonalidade da temperatura, temperatura do mês mais quente, porcentagem de outras florestas, porcentagem agropastoril, cobertura de árvores, altura do dossel, declividade, distância para rodovias e distância para áreas protegidas.

Três métodos apresentaram valores de TSS > 0,8 (RF, XGBOOST, EM) (Figura 3.3), e embora o *ensemble modeling*, tenha apresentado um valor de TSS de 0,895, ligeiramente inferior ao RF e XGBOOST, ele foi adotado como o mais adequado para prever a distribuição de *A. belzebul* no CEP, uma vez que combina as capacidades de diversos métodos estatísticos, apresentando uma tendência a criar modelos mais robustos e precisos (Meller *et al.*, 2014), em comparação com a maioria dos algoritmos que analisa os dados de forma isolada, e pode gerar respostas diferentes em relação ao tamanho amostral, prevalência da espécie e escala geográfica, por exemplo (Grenouillet *et al.*, 2011).

As variáveis que apresentaram na média maior importância para a previsão da distribuição de *A. belzebul* no Centro de Endemismo Pernambuco (Figura 3.4) foram precipitação anual ($\bar{x} = 0,48$), porcentagem de outras florestas ($\bar{x} = 0,27$), e porcentagem de matriz agropastoril ($\bar{x} = 0,18$). De acordo com o modelo final gerado pelo EM foi possível inferir preferências de habitat da espécie-alvo para as variáveis ambientais incluídas nos modelos (Figura 3.5). Foi notada uma preferência por habitats com maior altura do dossel, e com maior concentração em dosséis com altura de 20 metros ou mais. O mesmo foi visto em relação à cobertura de árvores, que indicou que locais com maior cobertura de árvores têm maior probabilidade de ocorrência da espécie.

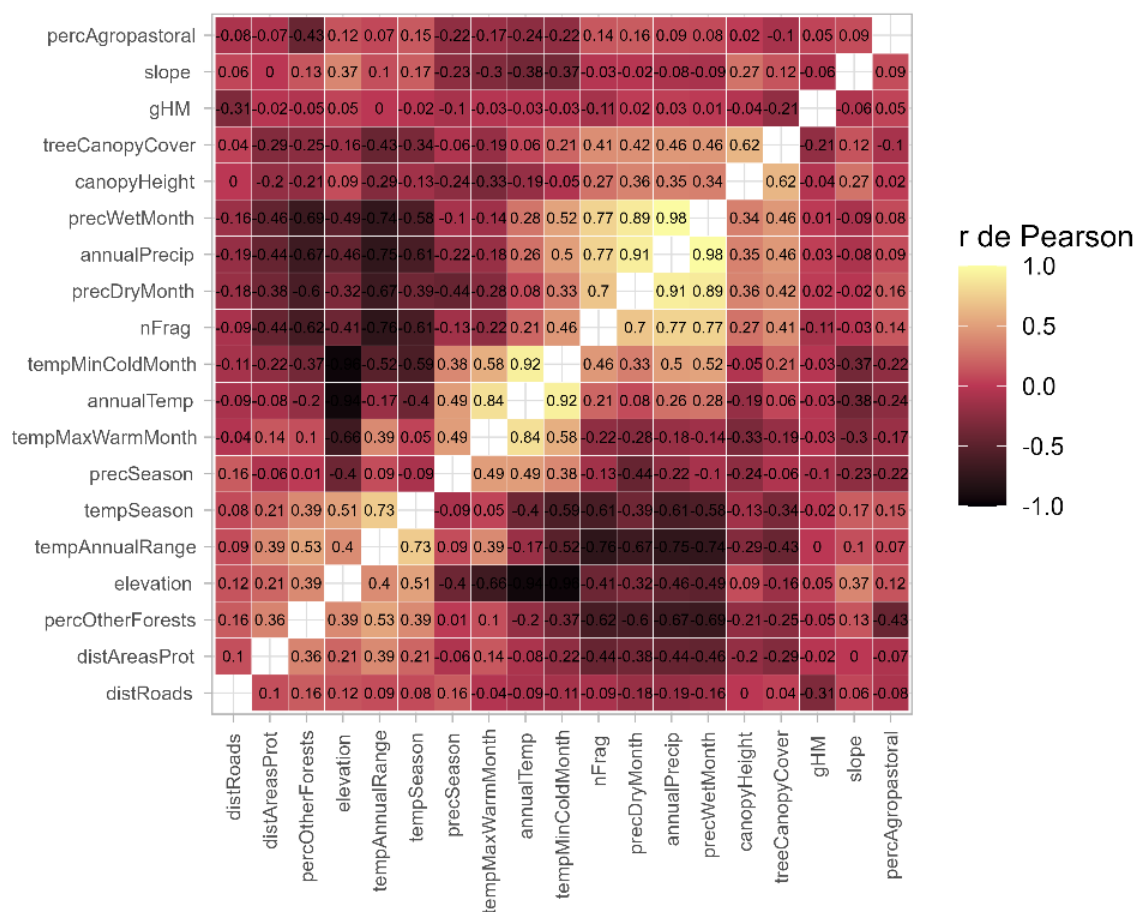


Figura 3.2 - Matriz de correlação mostrando o valor do r de Pearson para as variáveis ambientais pré-definidas para as modelagens de distribuição de espécies.

Tabela 3.3 - Valores de VIF para as variáveis, VIF inicial e VIF final depois da remoção da variável com maior multicolinearidade.

Variáveis	VIF Inicial	VIF Final
canopyHeight	1.983597	1.994368
treeCanopyCover	2.213081	2.221348
slope	1.283721	1.263052
distAreasProt	1.381774	1.409018
distRoads	1.211398	1.190051
Elevation	7.490128	Removida
gHM	1.231546	1.184474
percAgropastoral	1.746061	1.731061
percOtherForests	2.978685	2.960011
annualPrecip	4.69659	3.756113
precSeason	1.965601	1.877214
tempMaxWarmMonth	4.940685	1.552674
tempSeason	2.457164	1.972942

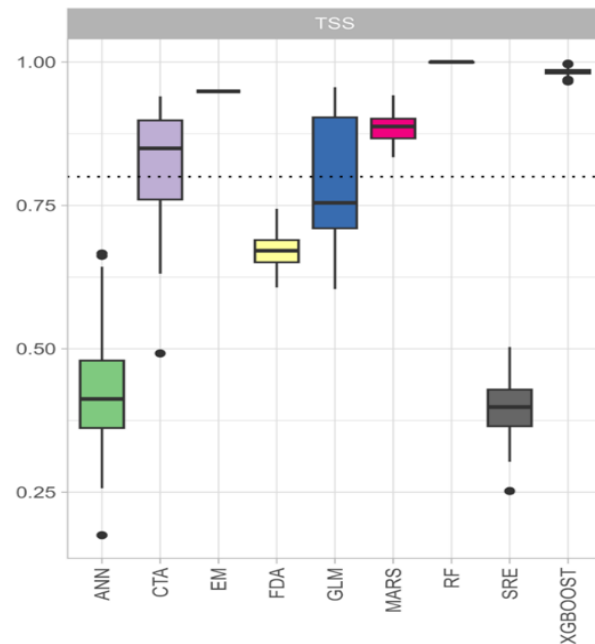


Figura 3.3 - Avaliação por TSS dos modelos gerados por cada um dos algoritmos isoladamente e do modelo gerado pelo *ensemble* desses modelos. Linha pontilhada representa TSS = 0,8.

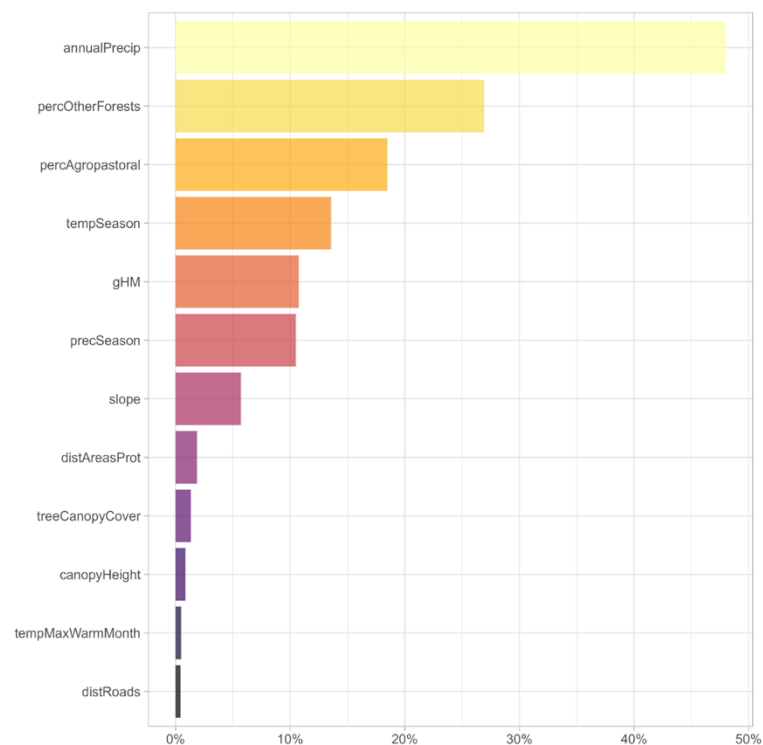


Figura 3.4 - Importância média das variáveis ambientais para previsão da distribuição de *Alouatta belzebul* no Centro de Endemismo Pernambuco.

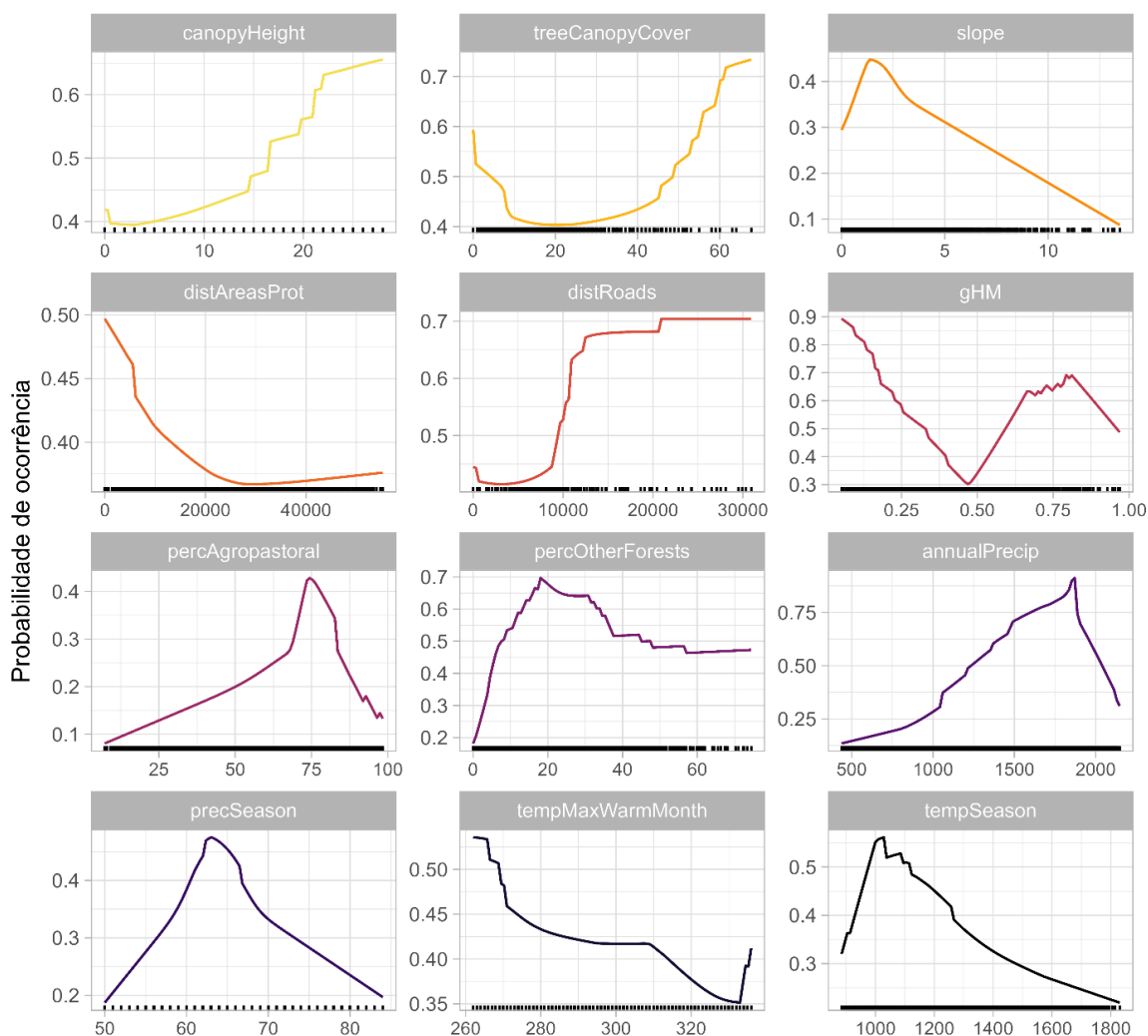


Figura 3.5 - Curvas resposta para a distribuição de *Alouatta belzebul* para a cada variável ambiental selecionada para a modelagem.

Em *Alouatta guariba* (Humboldt, 1812), estudos evidenciaram que habitats com a presença de corpos d'água, e eventualmente maior precipitação atrelada, tendem a ocupar uma posição de destaque na escala de importância para a distribuição da espécie (Galán-Acedo *et al.*, 2024), corroborando os dados aqui encontrados para importância de áreas com maior precipitação. Adicionalmente, Silvestre *et al.* (2020) demonstraram que para *A. belzebul* a estrutura florestal de savanas amazônicas não apresentou grande importância para a distribuição da espécie, coincidindo mais uma vez com os nossos achados, que apesar de apresentarem alguma previsão de ocorrência, não indicaram ser as variáveis ambientais mais preponderantes para a espécie.

Levando em conta a presença de formações florestais que não florestas de Mata Atlântica, os nossos dados mostraram que a ocorrência de *A. belzebul* é mais provável em ambientes com pouca presença dessas formações. Porém, áreas sem a presença de formações florestais diferentes apresentaram probabilidade muito baixas para ocorrência da espécie. Por outro lado, áreas com maior porcentagem de matriz agropastoril apontaram maior chance de ocorrência de *A. belzebul*, confirmando dados da literatura que reportam a capacidade desse gênero de ocupar ambientes fragmentados, usando matriz natural ou cultivada, para alimentação, descanso e outras atividades (Ludwig *et al.*, 2020; Pozo-Montuy; Serio-Silva; Bonilla-Sánchez, 2011; Pozo-Montuy *et al.*, 2013). Em relação à declividade do ambiente, áreas com menor variação no terreno parecem ter maior chance de abrigar *A. belzebul*. Quanto à influência humana, nossos achados revelaram que quanto menor a distância de um fragmento a uma área protegida ou unidade de conservação, maior é a probabilidade de encontrar a espécie. Por outro lado, quanto menor a distância para rodovias, menor a probabilidade de ocorrência da espécie, sendo que esta aumenta mais a partir de distâncias superiores a 9 km. Por fim, quando consideramos os dados de gHM houve uma probabilidade muito grande nos índices mais baixos, o que vai de encontro com o resultado das outras variáveis.

Estes resultados ressaltam a importância da manutenção e criação de unidades de conservação para a conservação de *A. belzebul* no CEP, não apenas em áreas florestais, mas também em áreas com diferentes matrizes, as quais podem representar áreas chaves para conservação de espécies com boa capacidade de resiliência e, portanto, de se adaptarem a ambientes modificados (Pozo-Montuy; Serio-Silva; Bonilla-Sánchez, 2011). Por outro lado, tais achados também indicam a necessidade de diminuir a proximidade de rodovias e centros urbanos das áreas adequadas para ocorrência da espécie, e eventualmente de construir pontes ou outros métodos de passagem de fauna que assegurem que os animais possam cruzar as rodovias de forma segura (Hetman *et al.*, 2019; Ludwig *et al.*, 2020).

Os resultados para as variáveis climáticas indicaram que locais com uma maior precipitação anual e um nível intermediário de variação da precipitação, tem maior probabilidade de ocorrência da espécie. Habitats com temperaturas mais amenas para o CEP, em torno de 26°C, e com baixo nível de variação de temperatura ao longo do ano, se mostraram mais adequados para a ocorrência de *A. belzebul*. De fato, esses animais tendem a se deslocar mais em períodos mais secos, permanecendo

mais tempo em locais com maior precipitação (Bonvicino, 1989; Souza, 2005; Silva, 2015). Em *Alouatta pigra* estudos evidenciam que altas temperaturas aumentam o tempo de descanso da espécie, o que pode impactar no tempo livre para as demais atividades (Aristizabal *et al.*, 2018). Neste contexto, os efeitos atuais das mudanças climáticas, com o aumento crescente da temperatura global, tendem a diminuir as áreas capazes de abrigar as espécies de *Alouatta*, incluindo *A. belzebul*. Ressaltamos, portanto, o direcionamento de esforços para a conservação de áreas que visem a manutenção de microclimas mais amenos, para abrigar esses primatas no caso da necessidade de remanejamento de populações em fragmentos com temperaturas mais elevadas.

3.3.1 Projeção dos Modelos

A projeção dos modelos de distribuição obtidos para a região do CEP (Figura 3.6) indica que os estados do Rio Grande do Norte e da Paraíba demonstram ser os mais adequados para abrigar *A. belzebul*, sendo que a Paraíba possui a maior área com alta probabilidade de ocorrência da espécie. Em Pernambuco foram apontadas duas áreas de menor extensão com alta probabilidade de ocorrência da espécie, sendo que mais ao nordeste do estado, há uma área de grande probabilidade de ocorrência de *A. belzebul*, que não está incluída nas Áreas Importantes para a Conservação de Primatas do Nordeste (AI-ICMBio, 2021) para esta espécie, sendo mencionada como relevante apenas para *Sapajus flavius*. Já em Alagoas as probabilidades mais altas se concentram apenas na ESEC de Murici.

Quando comparamos os dados de modelagem obtidos neste estudo com os dados de ocorrência da espécie obtidos através das análises de iDNA, e os dados disponíveis na literatura, os resultados mostram congruências (Tabela 3.1). Os pontos analisados por iDNA nos quais a espécie foi detectada na Paraíba e no Rio Grande do Norte estão todos localizados em áreas com alta chance de ocorrência de *A. belzebul*. Além disso, as novas áreas de ocorrência em Alagoas, em que a espécie foi detectada via iDNA, também são apontadas na análise de modelagem como áreas propícias para *A. belzebul*. Em relação à ESEC de Murici e à RPPN Fazenda Pacatuba, que possuem alta chance de abrigar a espécie de acordo com a projeção da modelagem aqui realizada, embora *A. belzebul* não tenha sido detectada por iDNA neste local, devido a limitações na coleta das amostras na região amostrada, a

presença da espécie já havia sido reportada na literatura nesta ESEC (Langguth *et al.*, 1987).

Em suma, a modelagem de distribuição de espécies empregada neste trabalho se mostrou capaz de indicar áreas adequadas para ocorrência de *A. belzebul*, corroborando dados de ocorrência atual, e apontando áreas que possuem potencial de abrigar a espécie em futuros projetos de reintrodução. Embora os resultados deste trabalho evidenciem áreas importantes para a ocorrência de *A. belzebul* no CEP, na atualidade, é importante ressaltar que as mudanças climáticas prementes têm afetado cada vez mais espécies dependentes de florestas que habitam áreas mais fragmentadas, como é o caso da espécie focal de estudo. Portanto, ainda que o CEP represente, atualmente, uma região considerada ambientalmente estável ao longo do tempo, sendo denominada Refúgio Pernambuco, projeções para o futuro demonstram perda de áreas adequadas para abrigar espécies de mamíferos (De Oliveira *et al.*, 2023). Neste cenário, estudos futuros que considerem análises preditivas no CEP, especificamente, para *A. belzebul*, podem ajudar a definir, e eventualmente mitigar, os impactos do aumento de temperatura, sob as populações desta espécie nas áreas levantadas. Assim, além de estabelecer as áreas prioritárias para conservação de *A. belzebul*, considerando os dados produzidos neste estudo, esforços devem ser empregados para simular mudanças climáticas e na paisagem e prever a adequabilidade das áreas do CEP para o futuro.

Figura 3.6 - Mapas de probabilidade e mapa binário da modelagem da distribuição de *Alouatta belzebul* no Centro de Endemismo Pernambuco.

3.4 REFERÊNCIAS

AI-ICMBio. **Áreas importantes para a conservação dos primatas do Nordeste.** Paraíba: ICMBio, 2021. Disponível em: <https://sites.google.com/view/areasimportantespanprine/Inicio?authuser=0> Acesso em: 05 de out. de 2022.

ALLOUCHE, O.; TSOAR, A.; KADMON, R. Assessing the accuracy of species distribution models: prevalence, kappa and the true skill statistic (TSS). **Journal of applied ecology**, v. 43, n. 6, p. 1223-1232, 2006. DOI 10.1111/j.1365-2664.2006.01214.x

ALMEIDA, R. T.; PIMENTEL, D. S.; SILVA, E. M. C. The red-handed howling monkey in the state of Pernambuco, North-East Brazil. **Neotropical Primates**, v. 3, p. 174-176, 1995.

ARISTIZABAL, J. F.; L., L.; CHAPMAN, C. A.; SERIO-SILVA, J. C. Impacts of Temperature on Behaviour of the Mexican Endangered Black Howler Monkey *Alouatta pigra* Lawrence, 1933 (Primates: Atelidae) in a Fragmented Landscape. **Acta Zoologica Bul**, v. 70, n. 3, p. 377–382, 2018.

AYRES, J. M. **Abordagens inovadoras para conservação da biodiversidade do Brasil: os corredores ecológicos das florestas neotropicais do Brasil.** Ministério do Meio Ambiente, 1997.

BENCHIMOL, M.; PERES, C. A. Anthropogenic modulators of species–area relationships in Neotropical primates: a continental-scale analysis of fragmented forest landscapes. **Diversity & distributions**, v. 19, n. 11, p. 1339–1352, 2013. DOI 10.1111/ddi.12111.

BICCA-MARQUES, J. C. How do Howler Monkeys Cope with Habitat Fragmentation? In: MARSH, L. K. (eds) **Primates in Fragments**. Springer, Boston, MA. 2003.

BONVICINO, C. R. Ecologia e comportamento de *Alouatta belzebul* (Primates: Cebidae) na mata atlântica. **Rev Nordest Biol**, v. 6, p. 149-179, 1989.

BONVICINO, C. R.; LANGGUTH, A.; MITTERMEIER, R. A. A study of pelage and geographic distribution in *Alouatta belzebul* (Primates: Cebidae). **Revista Nordestina de Biologia**, v. 6, n. 2, p. 139-148, 1989.

BOOTH, T. H.; NIX, H. A.; BUSBY, J. R.; HUTCHINSON, M. F. Bioclim: The first species distribution modelling package, its early applications and relevance to most current MaxEnt studies. **Diversity and Distributions**, v. 20, p. 1–9, 2014. DOI 10.1111/ddi.12144

BREIMAN, L. Random forests. **Machine Learning**, v. 45, p. 5–32, 2001. DOI 10.1023/A:1010933404324

BREIMAN, L.; FRIEDMAN, J. H.; OLSHEN, R. A.; STONE, C. J. **Classification and regression trees**. Monterey, CA: Wadsworth and Brooks/Cole, 1984.

BREINER, F. T.; GUIBAN, A.; BERGAMINI, A.; NOBIS, M. P. Overcoming limitations of modelling rare species by using ensembles of small models. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 6, n. 10, p. 1210–1218, 2015. DOI 10.1111/2041-210X.12403

BUSBY, J. R. BIOCLIM - a bioclimate analysis and prediction system. *In*: MARGULES, C. R.; AUSTIN, M. P. (Eds.), **Nature conservation**: Cost-effective biological surveys and data analysis. Melbourne, Vic.: CSIRO, 1991. p. 64-68.

CAYUELA, L.; GOLICHER, D. J.; NEWTON, A. C.; KOLB, M.; DE ALBURQUERQUE, F. S.; ARETS, E. J. M. M.; ALKEMADE, J. R. M.; PÉREZ, A. M. Species distribution modeling in the tropics: Problems, potentialities, and the role of biological data for effective species conservation. **Tropical conservation science**, v. 2, n. 3, p. 319–352, 2009. DOI 10.1177/194008290900200304.

CHEN, T.; GUESTRIN, C. XGBoost: A Scalable Tree Boosting System. *In*: **Proceedings of the 22nd ACM SIGKDD International Conference on Knowledge Discovery and Data Mining**. Association for Computing Machinery, New York, NY, USA: ACM, 2016. DOI 10.1145/2939672.2939785

CHIARELLO, A. G. Primates of the Brazilian Atlantic forest: The influence of forest fragmentation on survival. *In*: MARSH, L. K. (org.). **Primates in Fragments**. Boston, MA: Springer US, 2003. p. 99–121.

COIMBRA-FILHO, A. F.; CÂMARA, I. G.; RYLANDS, A. B. On the geographic distribution of the red-handed howling monkey *Alouatta belzebul* in North-East Brazil. **Neotropical Primates**, v. 3, n. 4, p. 176-178, 1995.

COLLART, F.; HEDENÄS, L.; BROENNIMANN, O.; GUIBAN, A.; VANDERPOORTEN, A. Intraspecific differentiation: Implications for niche and distribution modelling. **Journal of biogeography**, v. 48, n. 2, p. 415–426, 2021. DOI 10.1111/jbi.14009.

CULOT, L.; PEREIRA, L. A.; AGOSTINI, I.; DE ALMEIDA, M. A. B.; ALVES, R. S. C.; AXIMOFF, I.; BAGER, A.; BALDOVINO, M. C.; BELLA, T. R.; BICCA-MARQUES, J. C.; BRAGA, C.; BROCARD, C. R.; CAMPELO, A. K. N.; CANALE, G. R.; CARDOSO, J. da C.; CARRANO, E.; CASANOVA, D. C.; CASSANO, C. R.; CASTRO, E.; ... GALETTI, M. ATLANTIC-PRIMATES: a dataset of communities and occurrences of primates in the Atlantic Forests of South America. **Ecology**, v. 100, n. 1, 2019. DOI 10.1002/ecy.2525.

De OLIVEIRA, M. E.; GONÇALVES, C. F.; MACHADO, C. B.; GALETTI, P. M., Jr. Modeling responses of Brazilian Atlantic Forest mammals assemble to climate change. **Biodiversity and conservation**, v. 33, n. 2, p. 463–483, 2023. DOI 10.1007/s10531-023-02749-x.

DORMANN, C. F.; ELITH, J.; BACHER, S.; BUCHMANN, C.; CARL, G.; CARRÉ, G.; MARQUÉZ, J. R. G.; GRUBER, B.; LAFOURCADE, B.; LEITÃO, P. J.; MÜNKEMÜLLER, T.; MCCLEAN, C.; OSBORNE, P. E.; REINEKING, B.; SCHRÖDER, B.; SKIDMORE, A. K.; ZURELL, D.; LAUTENBACH, S. Collinearity: a review of

methods to deal with it and a simulation study evaluating their performance. **Ecography**, v. 36, n. 1, p. 27–46, 2013. DOI 10.1111/j.1600-0587.2012.07348.x.

ELITH, J.; FRANKLIN, J. Species distribution modeling. *In*: LEVIN, S. A. (org.). **Encyclopedia of Biodiversity**: Second Edition. [S. l.]: Elsevier, 2013. p. 692–705.

ENGLER, R.; WASER, L. T.; ZIMMERMANN, N. E.; SCHAUB, M.; BERDOS, S.; GINZLER, C.; PSOMAS, A. Combining ensemble modeling and remote sensing for mapping individual tree species at high spatial resolution. **Forest ecology and management**, v. 310, p. 64–73, 2013. DOI 10.1016/j.foreco.2013.07.059.

EUROPEAN SPACE AGENCY; AIRBUS. **Copernicus DEM. Copernicus DEM**. [S. l.]: European Space Agency, 2022.

FIALHO, M. D. S.; FERNANDES GONÇALVES, G. Primates da RPPN Gargaú, Paraíba, Brasil. **Neotropical Primates**, v. 15, p. 50-54, 2008.

FIALHO, M. D. S.; VALENÇA-MONTENEGRO, M. M.; SILVA, T. C. F. D.; FERREIRA, J. G.; LAROQUE, P. D. O. Ocorrência de *Sapajus flavius* e *Alouatta belzebul* no Centro de Endemismo Pernambuco. **Neotropical Primates**, v. 21, p. 214-218, 2014.

FRANÇA, S. Changes in the functional role of the Tejo estuary (Portugal, Europe) according to fish ecological guilds. **Fishes**, v. 8, n. 11, p. 545, 2023. DOI 10.3390/fishes8110545.

FRIEDMAN, J. H. Multivariate adaptive regression splines. **The Annals of Statistics**, n. 19, p. 1–67, 1991.

GALÁN-ACEDO, C.; HASS, G. P.; KLAIN, V.; BENCKE, P.; BICCA-MARQUES, J. C. Urban matrices threaten patch occurrence of howler monkeys in anthropogenic landscapes. **Land**, v. 13, n. 4, p. 514, 2024. DOI 10.3390/land13040514.

GAO, X.; JIANG, Y.; YUAN, X.; YANG, L.; LING, J.; LI, S. Modeling spatio-temporal variations in the habitat utilization of swordtip squid (*Uroteuthis edulis*) in the East China Sea and southern Yellow Sea. **Animals: an open access journal from MDPI**, v. 13, n. 22, p. 3492, 2023. DOI 10.3390/ani13223492.

GENES, L.; FERNANDEZ, F. A. S.; VAZ-DE-MELLO, F. Z.; DA ROSA, P.; FERNANDEZ, E.; PIRES, A. S. Effects of howler monkey reintroduction on ecological interactions and processes. *Conservation biology: the journal of the Society for Conservation Biology*, v. 33, n. 1, p. 88–98, 2019. DOI 10.1111/cobi.13188.

GINÉ, G. A. F.; FARIA, D. Combining species distribution modeling and field surveys to reappraise the geographic distribution and conservation status of the threatened thin-spined porcupine (*Chaetomys subspinosus*). **PloS one**, v. 13, n. 11, p. e0207914, 2018. DOI 10.1371/journal.pone.0207914.

GORELICK, N.; HANCHER, M.; DIXON, M.; ILYUSHCHENKO, S.; THAU, D.; MOORE, R. Google Earth Engine: Planetary-scale geospatial analysis for everyone.

Remote sensing of environment, v. 202, p. 18–27, 2017. DOI 10.1016/j.rse.2017.06.031.

GREGORIN, R. Taxonomy and geographic variation of species of the genus *Alouatta* Lacépède (Primates: Atelidae) in Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 23, p. 64–144, 2006.

GRENOUILLET, G.; BUISSON, L.; CASAJUS, N.; LEK, S. Ensemble modelling of species distribution: the effects of geographical and environmental ranges. **Ecography**, v. 34, n. 1, p. 9–17, 2011. DOI 10.1111/j.1600-0587.2010.06152.x.

HAO, T.; ELITH, J.; GUILLERA-ARROITA, G.; LAHOZ-MONFORT, J. J. A review of evidence about use and performance of species distribution modelling ensembles like BIOMOD. **Diversity & distributions**, v. 25, n. 5, p. 839–852, 2019. DOI 10.1111/ddi.12892. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/ddi.12892>.

HASTIE, T.; TIBSHIRANI, R.; BUJA, A. Flexible discriminant analysis by optimal scoring. **Journal of the American statistical association**, v. 89, n. 428, p. 1255–1270, 1994. DOI 10.2307/2290989

HETMAN, M.; KUBICKA, A. M.; SPARKS, T. H.; TRYJANOWSKI, P. Road kills of non-human primates: a global view using a different type of data. **Mammal review**, v. 49, n. 3, p. 276–283, 2019. DOI 10.1111/mam.12158.

HIJMANS, R. J.; CAMERON, S. E.; PARRA, J. L.; JONES, P. G.; JARVIS, A. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. **International journal of climatology: a journal of the Royal Meteorological Society**, v. 25, n. 15, p. 1965–1978, 2005. DOI 10.1002/joc.1276.

HIRSCH, A.; DIAS, L. G.; MARTINS, L. D. O.; CAMPOS, R. F.; LANDAU, E.; RESENDE, N. BDGEOPRIM: Database of Georeferenced Occurrence Localities of Neotropical Primates. **Neotropical Primates**, v. 10, p. 78–84, 2002.

HIRSCH, A.; LANDAU, E. C.; TADESCHI, A. C. M.; MENEGHETI, J. O. Estudo comparativo das espécies do gênero *Alouatta* Lacépède 1799 (Platyrrhini: Atelidae) e sua distribuição geográfica na América do Sul. In: RYLANDS, A. (Ed.). **A Primatologia no Brasil**. Fundação Biodiversitas, p. 239–262, 1991.

HUE, T.; CAUBET, M.; MOURA, A. C. A. Howlers and marmosets in Pacatuba: an overcrowded existence in a semi-deciduous Atlantic forest fragment? **Mammalia**, v. 81, n. 4, p. 339–348, 2017.

KENNEDY, C. M.; OAKLEAF, J. R.; THEOBALD, D. M.; BARUCH-MORDO, S.; KIESECKER, J. Managing the middle: A shift in conservation priorities based on the global human modification gradient. **Global change biology**, v. 25, n. 3, p. 811–826, 2019. DOI 10.1111/gcb.14549.

KUMAR, S.; MOORE, K. B. The Evolution of Global Positioning System (GPS) Technology. **Journal of science education and technology**, v. 11, n. 1, p. 59–80, 2002. DOI 10.1023/a:1013999415003.

LANG, N.; JETZ, W.; SCHINDLER, K.; WEGNER, J. D. A high-resolution canopy height model of the Earth. **Nature ecology & evolution**, v. 7, n. 11, p. 1778–1789, 2023. DOI 10.1038/s41559-023-02206-6.

LANGGUTH, A.; TEIXEIRA, D. M.; MITTERMEIER, R. A.; BONVICINO, C. The red-handed howler monkey in northeastern Brazil. **Primate Conservation**, v. 8, p. 36-38, 1987.

LIMA, F. *et al.* ATLANTIC-CAMTRAPS: a dataset of medium and large terrestrial mammal communities in the Atlantic Forest of South America. **Ecology**, v. 98, n. 11, p. 2979-2979, 2017.

LIMA, R. A. F.; OLIVEIRA, A. A.; PITTA, G. R.; GASPER, A. L.; VIBRANS, A. C.; CHAVE, J.; STEEGE, H.; PRADO, P. I. The erosion of biodiversity and biomass in the Atlantic Forest biodiversity hotspot. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1–16, 2020.

LUDWIG, G.; FIALHO, M. S.; AZEVEDO, R. B.; MARQUES, E. S.; VALENÇA-MONTENEGRO, M. M.; FILHO, R. F.; JERUSALINSKY, L.; BUSS, G. **Atualização da ocorrência de *Alouatta belzebul* e *Sapajus flavius* (Mammalia: Primates) em fragmentos florestais na mata atlântica da Paraíba e do Rio Grande do Norte**. Em preparação.

LUDWIG, G.; LIMA, G. Y. F.; AZEVEDO, R. B. de; JERUSALINSKY, L.; VALENÇA-MONTENEGRO, M. M.; BUSS, G. Howlers in an anthropogenic matrix: how does an *Alouatta belzebul* group deal with the severely fragmented landscape of the Atlantic forest in northeastern Brazil? **Neotropical primates**, v. 26, n. 2, p. 7–16, 2020. DOI 10.62015/np.2020.v26.49.

MELLER, L.; CABEZA, M.; PIRONON, S.; BARBET-MASSIN, M.; MAIORANO, L.; GEORGES, D.; THUILLER, W. Ensemble distribution models in conservation prioritization: from consensus predictions to consensus reserve networks. **Diversity & distributions**, v. 20, n. 3, p. 309–321, 2014. DOI 10.1111/ddi.12162.

MELO, M. D. V. C. **Plano de manejo da Esec de Murici**. 2017.

MILLER, J. Species distribution modeling. **Geography compass**, v. 4, n. 6, p. 490–509, 2010. DOI 10.1111/j.1749-8198.2010.00351.x.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA); IBAMA. **Plano de manejo da Reserva Biológica Guaribas**. 2003.

MUYLAERT, R. L. *et al.* A dataset of bat communities from the Atlantic Forests of South America. **Ecology**, v. 98, n. 12, p. 3227-3227, 2017.

MUYLAERT, R. L.; VANCINE, M. H.; BERNARDO, R.; OSHIMA, J. E. F.; SOBRAL-SOUSA, T.; TONETTI, V. R.; NIEBUHR, B. B.; RIBEIRO, M. C. Uma nota sobre os limites territoriais da Mata Atlântica. **Oecologia Australis**, v. 22, n. 03, p. 302–311, 2018. DOI 10.4257/oeco.2018.2203.09.

OLIVEIRA, M. M.; OLIVEIRA, J. C. C. A situação dos cebídeos como indicador do estado de conservação da Mata Atlântica no estado da Paraíba, Brasil. In: YAMAMOTO, A. (Ed.). **A Primatologia no Brasil**. Editora Universitária, p. 155-167, 1993.

POLAINA, E.; PÄRT, T.; RECIO, M. R. Identifying hotspots of invasive alien terrestrial vertebrates in Europe to assist transboundary prevention and control. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, 2020. DOI 10.1038/s41598-020-68387-3.

PONTES, A. R. M.; JORDANI, R. A.; RIBEIRO, P. F. R.; NORMANDE, I. C.; FERNANDES, A. C. A.; SOARES, M. L.; RAMALHO, C. B. Ocorrência e abundância de primatas em fragmentos florestais no Centro de Endemismo Pernambucano. In: BICCA-MARQUES, J. C. (Ed.). **A primatologia no Brasil**. Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Primatologia, 2007. p. 193-203.

PORFÍRIO, S.; LAROQUE, P.; OLIVEIRA, M. M. Reintrodução de um casal de guaribas *Alouatta belzebul* na Reserva Biológica Guaribas, Paraíba, Brasil. In: SBPr. In: **X Congresso Brasileiro de Primatologia**. (Resumo), 2002.

POZO-MONTUY, G.; SERIO-SILVA, J. C.; BONILLA-SÁNCHEZ, Y. M. Influence of the landscape matrix on the abundance of arboreal primates in fragmented landscapes. **Primates**, v. 52, n. 2, p. 139–147, 2011. DOI 10.1007/s10329-010-0231-5.

POZO-MONTUY, G.; SERIO-SILVA, J. C.; CHAPMAN, C. A.; BONILLA-SÁNCHEZ, Y. M. Resource Use in a Landscape Matrix by an Arboreal Primate: Evidence of Supplementation in Black howlers (*Alouatta pigra*). **International journal of primatology**, v. 34, n. 4, p. 714–731, 2013. DOI 10.1007/s10764-013-9691-y.

REED, D. H. Extinction risk in fragmented habitats. **Animal conservation**, v. 7, n. 2, p. 181–191, 2004. DOI 10.1017/s1367943004001313.

RIPLEY, B. D. **Pattern recognition and neural networks**. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1996.

SCHERRER, D.; CHRISTE, P.; GUISAN, A. Modelling bat distributions and diversity in a mountain landscape using focal predictors in ensemble of small models. **Diversity and Distributions**, v. 25, n. 5, p. 770–782, 2019. DOI 10.1111/ddi.12893

SEXTON, J. O.; SONG, X.-P.; FENG, M.; NOOJIPADY, P.; ANAND, A.; HUANG, C.; KIM, D.-H.; COLLINS, K. M.; CHANNAN, S.; DIMICELI, C.; TOWNSHEND, J. R. Global, 30-m resolution continuous fields of tree cover: Landsat-based rescaling of MODIS vegetation continuous fields with lidar-based estimates of error. **International journal of digital earth**, v. 6, n. 5, p. 427–448, 2013. DOI 10.1080/17538947.2013.786146.

SILVESTRE, S. M.; SETCHELL, J. M.; CALLE-RENDÓN, B. R.; DE TOLEDO, J. J.; HILÁRIO, R. R. The occurrence of the red-handed howler monkey (*Alouatta belzebul*) in amazonian savannas is related to forest patch area and density of flooded area palms. **American journal of primatology**, v. 82, n. 12, 2020. DOI 10.1002/ajp.23210.

SOUZA, C. M., Jr; Z. SHIMBO, J.; ROSA, M. R.; PARENTE, L. L.; A. ALENCAR, A.; RUDORFF, B. F. T.; HASENACK, H.; MATSUMOTO, M.; G. FERREIRA, L.; SOUZA-FILHO, P. W. M.; DE OLIVEIRA, S. W.; ROCHA, W. F.; FONSECA, A. V.; MARQUES, C. B.; DINIZ, C. G.; COSTA, D.; MONTEIRO, D.; ROSA, E. R.; VÉLEZ-MARTIN, E.; ... AZEVEDO, T. Reconstructing three decades of land use and land cover changes in Brazilian biomes with Landsat archive and earth engine. **Remote sensing**, v. 12, n. 17, p. 2735, 2020. DOI 10.3390/rs12172735.

SOUZA, S. P. **Ecologia e Conservação de *Alouatta belzebul belzebul* (Primates, Atelidae) na Paraíba, Brasil**. 2005. 121 f. Tese (Doutorado em Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.

TABARELLI, M.; PINTO, L. P.; SILVA, J.M.C.; HIROTA, M.M.; BEDÊ, L.C. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. **Megadiversidade**, v. 1, p. 132–138, 2005.

TABARELLI, M.; RODA, S. A. Uma oportunidade para o Centro de Endemismo Pernambuco. **Natureza & Conservação**, v. 3, n. 2, p. 22–28, 2005.

THUILLER, W.; GEORGES, D.; GUEGUEN, M.; ENGLER, R.; BREINER, F.; LAFOURCADE, B.; PATIN, R. **biomod2: Ensemble platform for species distribution modeling**. R package version 4.2.2, 2023.

UNEP-WCMC; IUCN. **Protected Planet: The World Database on Protected Areas (WDPA)**, 2023, Cambridge, UK: UNEP-WCMC and IUCN. Disponível em: www.protectedplanet.net.

VALENÇA-MONTENEGRO, M. M.; FIALHO, M. S.; CARVALHO, A. S.; RAVETTA, A. L.; RÉGIS, T.; MELO, F. R.; VEIGA, L. M. *Alouatta belzebul* (Linnaeus, 1766). In: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. **Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção**: Volume II – Mamíferos. 1. Brasília, DF: ICMBio/MMA, p.148-152, 2018.

III CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

O desenvolvimento desta dissertação de mestrado, possibilitou avaliar a eficiência do uso de métodos como DNA ambiental e DNA derivado de invertebrados para a detecção de *A. belzebul* no Centro de Endemismo Pernambuco (CEP). Além disso, uma abordagem de modelagem de distribuição de espécies foi realizada de forma complementar para indicar áreas potenciais para a ocorrência da espécie. Os dados obtidos indicam novos registros para a ocorrência atual da espécie e áreas com potencial para sua ocorrência. Tais dados são importantes para fomentar ações de manejo e de conservação da espécie. Adicionalmente, como resultado secundário do desenvolvimento deste projeto, um *software* para lidar com dados de *metabarcoding* produzidos em estudos de eDNA e/ou iDNA, foi desenvolvido com a finalidade de otimizar o processamento e manipulação de dados massivos provenientes das atribuições taxonômicas inerentes ao emprego de tais abordagens. Em suma, os dados gerados neste trabalho são valiosos para o desenvolvimento de estratégias que visem o monitoramento, o manejo e a conservação de *A. belzebul* no Centro de Endemismo Pernambuco, servindo como modelo para estudos similares em outras espécies e localidades. A seguir encontram-se descritas uma síntese dos principais resultados obtidos nos três capítulos apresentados neste trabalho.

- Dados relativos às condições do ambiente estudado, aos amostradores e aos mini-barcodes utilizados devem ser considerados, visando otimizar o emprego dos métodos de iDNA e eDNA para detecção de *A. belzebul*.
- A técnica de iDNA se mostrou eficiente para detectar a espécie no local de estudo, mostrando maior eficiência para o uso do amostrador mosca e do *mini-barcode* para o gene mitocondrial 16SrRNA para a busca da espécie no CEP.
- A técnica de eDNA não se mostrou eficiente para detectar a espécie no local de estudo, devido provavelmente às intensas chuvas ocorridas durante o período de coleta das amostras de água.
- Foi possível detectar a espécie via iDNA na maioria das áreas com confirmação anterior de sua ocorrência.
- Nas áreas em que a espécie possivelmente ocorre, mas não foi detectada via iDNA, foram destacados pontos relevantes que devem ser contornados durante a coleta de material para evitar resultados falsos-negativos em estudos futuros.

- Dados inéditos para ocorrência da espécie foram reportados em três áreas em que não havia registro anterior reportado na literatura, através do emprego do método iDNA.
- A análise de modelagem de distribuição de espécies para *A. belzebul* no CEP apontou uma grande área com alto potencial de ocorrência da espécie no estado da Paraíba e áreas menores no Rio Grande do Norte e Pernambuco, sendo que Alagoas possui menor potencial de ocorrência da espécie com algumas áreas menores com alto potencial.
- Uma grande área de alto potencial de abrigar a espécie foi evidenciada em Pernambuco, onde atualmente a ocorrência de *A. belzebul* é descartada, sendo considerada como área importante apenas para *Sapajus flavius*.
- Esta nova área com potencial adequabilidade para ocorrência da espécie pode se constituir em uma área para reintrodução em ações de conservação e manejo da espécie.
- Através da análise de modelagem foi possível compreender como algumas variáveis ambientais podem influenciar a distribuição de espécie no CEP.
- Os resultados das modelagens corroboram os resultados do iDNA, uma vez que as áreas em que houve detecção inédita da espécie via iDNA, consistiram em áreas de potencial elevado de abrigar a espécie pelas modelagens.
- O *software* eDNAAnalyzer, desenvolvido neste trabalho, se mostrou eficiente para agilizar o processo de análise dos resultados de atribuição taxonômica provenientes de sequenciamento via *metabarcoding* utilizados em abordagens de eDNA e/ou iDNA.
- Esta ferramenta computacional, desenvolvida em linguagem Python, possui interface gráfica amigável e intuitiva para permitir que usuários não familiarizados com linhas de comando/linguagens de programação simplifiquem o processamento e filtragem de dados oriundos de análise de *metabarcoding*.

REFERÊNCIAS

ARROYO-RODRÍGUEZ, V.; DIAS, P.A.D. Effects of habitat fragmentation and disturbance on howlermonkeys: a review. **Am J Primatol**, v. 72, p. 1–16, 2010. DOI 10.1002/ajp.20753.

ARROYO-RODRIGUEZ, V.; MORAL, E. C.; MANDUJANO, S.; CHAPMAN, C. A.; REYNAL-HURTADO, R.; FAHRIG, L. Assessing Habitat Fragmentation Effects on Primates: The Importance of Evaluating Questions at the Correct Scale. *In*: MARSH, L. K.; CHAPMAN, C. A. **Primates in Fragments: Complexity and Resilience**. 2013. Developments in Primatology: Progress and Prospects. Series Editor: Louise Barrett. 537p. DOI 10.1007/978-1-4614-8839-2_2

BANERJEE, P.; DEY, G.; ANTOGNAZZA, C. M.; SHARMA, R. K.; MAITY, J. P.; CHAN, M. W. Y.; HUANG, Y.-H.; LIN, P.-Y.; CHAO, H.-C.; LU, C.-M.; CHEN, C.-Y. Reinforcement of environmental DNA based methods (*Sensu stricto*) in biodiversity monitoring and conservation: A review. **Biology**, v. 10, n. 12, p. 1–17, 2021. DOI 10.3390/biology10121223

BICCA-MARQUES, J. C. How do Howler Monkeys Cope with Habitat Fragmentation? *In*: MARSH, L.K. (eds) **Primates in Fragments**. Springer, Boston, MA. 2003. DOI 10.1007/978-1-4757-3770-7_18.

BICCA-MARQUES, J. C.; CHAVES, Ó. M.; HASS, G. P. Howler monkey tolerance to habitat shrinking: Lifetime warranty or death sentence? **American Journal of Primatology**, v. 82, n. 4, p. 1–9, 2019. DOI 10.1002/ajp.23089

COIMBRA, A.; BUSS, G.; BOCORNY DE AZEVEDO, R. Abundância do Guariba-de-mãos-ruivas (*Alouatta belzebul*) na Reserva Biológica Guaribas, Paraíba, Brasil. **Biodiversidade Brasileira - BioBrasil**, v. 12, n. 1, p. 72–78, 2022. DOI 10.37002/biobrasil.v12i1.1842

CORRÊA, F. M. **Variação morfológica no crânio de *Alouatta clamitans* e *Alouatta caraya* (Primates, Atelidae)**. Trabalho de Pós-graduação *Lato Sensu*, na área de Diversidade e Conservação da Fauna - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Biociências: Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal Curso de Especialização em Diversidade e Conservação da Fauna, 2012.

DOUGLAS, M. W.; BEIDA, R.; MEJIA, J. F.; FUENTES, M. V. Developing MODIS-based cloud climatologies to aid species distribution modeling and conservation activities. **Frontiers of biogeography**, v. 8, n. 3, 2016. DOI 10.21425/f58329532.

GARCÍA-ROSELLÓ, E.; GUISANDE, C.; GONZÁLEZ-VILAS, L.; GONZÁLEZ-DACOSTA, J.; HEINE, J.; PÉREZ-COSTAS, E.; LOBO, J. M. A simple method to estimate the probable distribution of species. **Ecography**, v. 42, n. 9, p. 1613–1622, 2019. DOI 10.1111/ecog.04563.

GASPAR, D.A. **Ecologia e Comportamento do Bugio Ruivo, *Alouatta fusca* (Geoffroy, 1812, Primates:Cebidae), em Fragmento de Mata de Campinas, SP**. 1997. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1997.

GREGORIN, R. Taxonomia e variação geográfica das espécies do gênero *Alouatta* Lacépède (Primates, Atelidae) no Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 23, p. 64–144, 2006. DOI 10.1590/S0101-81752006000100005.

GRIMWADE, P. **Doctor Who**. Reino Unido: BBC, 1982.

HEFLEY, T. J.; HOOTEN, M. B. Hierarchical species distribution models. **Current landscape ecology reports**, v. 1, n. 2, p. 87–97, 2016. DOI 10.1007/s40823-016-0008-7.

IBAMA. **Plano de manejo da Reserva Biológica Guaribas**. Brasília, 2003. 520p

LARSON, M. A.; MILLSPAUGH, J. J.; THOMPSON, F. R., III. A review of methods for quantifying wildlife habitat in large landscapes. *In*: LARSON, M. A.; MILLSPAUGH, J. J.; THOMPSON, F. R., III (orgs.). **Models for Planning Wildlife Conservation in Large Landscapes**. [S. l.]: Elsevier, 2009. p. 225–250.

STEINMETZ, S. **Ecologia e comportamento do Bugio (*Alouatta fusca clamitans*, Atelidae- Primates) no Parque Estadual Intervales - SP**. 2000. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.